Иммуноферментный анализ (ИФА) – вид иммунохимического анализа, основанный на высокоспецифичной иммунологической реакции антигена с соответствующим антителом с образованием иммунного комплекса, для выявления которого используют в качестве метки фермент или ферментзависимое вещество

- **Иммуноферментный анализ по сравнению с другими методами детекции антигенов и антител обладает следующими преимуществами:**

- высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации до 0,05 нг/мл. Такая чувствительность метода определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата;
- высокой специфичностью

- возможностью использовать минимальные объемы исследуемого материала (от 1 мкл);
- стабильностью при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более);
- простотой проведения анализа;
- наличием как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета;
- возможностью автоматизации всех этапов реакции
- относительно низкой стоимостью диагностических наборов.

- Вышеперечисленные преимущества определили широкое применение ИФА во всех областях медицины, в том числе и при диагностике инфекционных, эндокринных, онкологических, иммунных и других заболеваниях

Специфическое взаимодействие между антигеном и антителом лежит в основе иммуноферментного анализа.
Антигены – вещества различного происхождения, несущие признаки генетической чужеродности и вызывающие развитие иммунных реакций . Свойства антигенов определяются комплексом признаков: иммуногенность, антигенность, специфичность, чужеродность.

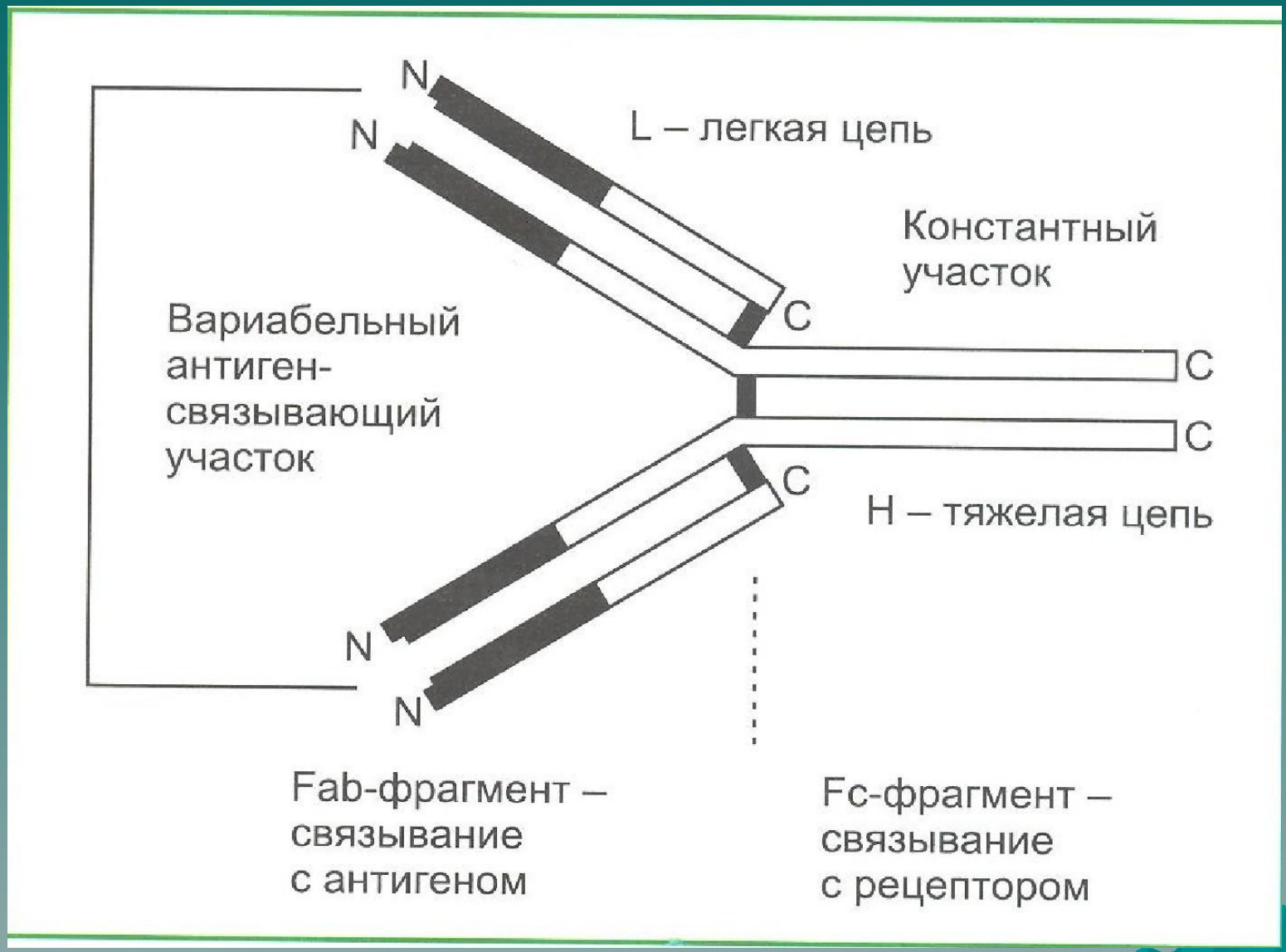
- Иммуногенность – способность индуцировать иммунный ответ
- Антигенность – способность антигенов избирательно реагировать со специфичными к нему антителами или антиген-распознающими рецепторами лимфоцитов. С понятием «антигенность» связан другой термин «чужеродность»: без чужеродности нет антигенности применительно к конкретному организму. Например, альбумины мыши не проявляют антигенные свойства по отношению к другим мышам, но являются антигенами для морской свинки.

- Специфичность – структурные особенности, отличающие один антиген от другого. Способностью вызывать развитие иммунного ответа и определять его специфичность обладает фрагмент молекулы антигена – антигенная детерминанта (эпитоп), избирательно реагирующая с Аг-распознающими рецепторами и АТ. Эпитоп – наименьшая распознаваемая единица Аг; молекула Аг может иметь несколько эпитопов, т.е. быть поливалентной. Чем сложнее молекула Аг и чем больше у нее эпитопов, тем больше вероятность развития иммунного ответа.

- Моноклональные АТ специфически распознают только одну Аг-детерминанту и связываются с ней. Поликлональные АТ распознают несколько антигенных детерминант в составе Аг. Количество молекул АТ, связывающих все эпитопы, определяет валентность Аг. Моноклональные антитела взаимодействуют только с одним эпитопом, таким образом, они проявляют абсолютную специфичность к определенному эпитопу. С использованием моноклональных антител резко повысилась специфичность иммуноферментной диагностики.

Иммуноглобулины сыворотки человека – это группа γ-глобулинов с идентичной базовой структурой, но отличающаяся по иммунологическим, биологическим и физическим свойствам. Синтезируются и секретируются они лимфоцитами В-линии. При антигенной стимуляции В-лимфоциты продуцируют в основном IgM. При пролиферации В-лимфоциты превращаются в плазматические клетки, которые секретируют в кровь высокоспецифичные антитела класса IgG, способные связывать дополнительное количество антигенов.

Иммуноглобулины представляют собой гликопротеины с молекулярной массой от 150 до 1000 кДа. В простейшем случае они состоят из 4 цепей: 2 одинаковых тяжелых цепей (H, мол. масса 50 кДа) и 2 одинаковых легких цепей (L, мол. масса 25 кДа). Каждая цепь в свою очередь состоит из доменов (мол. масса 12,5 кДа), соединенных дисульфидными мостиками.


N
N
L – легкая цепь
Константный участок
Вариабельный антиген-связывающий участок
C
C
C
C
H – тяжелая цепь
N
N
Fab-фрагмент – связывание с антигеном
Fc-фрагмент – связывание с рецептором

Все 4 цепи образуют симметричную Y-образную структуру. N-концевые участки H- и L-цепей представляют собой антигенсвязывающие фрагменты (Fab). Посредством гибкого участка – «шарнира» - они соединены с фрагментом Fc. Последний не участвует в связывании антигенов, но может реагировать с макрофагами, лимфоцитами и компонентами комплемента. N-концевой домен Fab-фрагмента является антигенспецифичным и называется вариабельным (V). С этой областью связана константная область (C), состоящая из одного домена и L-цепи (C_1) и трех-четырех доменов H-цепи ($C_{н1-4}$). C_L-домены могут относиться к типу к и λ, а C_H-домены – к одному из 5 типов – γ, μ, α, ε или δ. Эти типы доменов различаются по аминокислотной последовательности и содержанию углеводов.

В зависимости от типа C_H-домена иммуноглобулины относятся к одному из пяти классов IgG, IgM, IgA, IgD, и IgE.

Таким образом, одна часть молекулы антитела (Fab-фрагмент) может связываться с антигеном, другая его часть (Fc-фрагмент) взаимодействует с различными элементами иммунной системы, например с фагоцитами или с одним из компонентов комплемента.

По свойствам антител различают два понятия – афинность (или аффинитет) и авидность (или авидитет). Афинность – это степень специфического средства активного центра к антигенной детерминанте. Авидность – это степень прочности связывания молекулы антитела с молекулой антигена. Чем выше аффинность (степень сродства), тем выраженнее и авидитет (прочность связывания). Основные характеристики иммуноглобулинов представлены в следующей таблице.

Характеристика иммуноглобулинов

Признак	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Молекулярная масса, кДа	160	170	970	184	188
Структура	Мономер	В плазме мономер, в секретах димер	Пентамер	Мономер	Мономер
Легкие цепи	$\kappa + \lambda$	$\kappa + \lambda$	$\kappa + \lambda$	$\kappa + \lambda$	$\kappa + \lambda$
Тяжелые цепи	γ	α	μ	δ	ε
Число антиген-связывающих мест	2	2 (4)	5 (10)	2	2
Перибд полувыведения из сыворотки	18–23 дня	6 дней	5 дней	3 дня	2 дня
Фиксация комплемента	+	–	+	–	–
Прохождение через плаценту	+	–	–	–	–
Функция основная	Защита от микро-организмов и токсинов	Защита слизистых поверхнос-тей от микроорга-низмов	Первичный иммунный ответ на инфекцию	Неиз-вестна	Стимуляция выброса гистамина при аллергии
Присутствие в биологических жидкостях	Плазма крови и межкле-точная жидкость	Сыворотка, слюна, секреты из ЖКТ и бронхов, молоко, сперма	В основ-ном в сы-воротке, немного в межкле-точной жидкости	Поверх-ность лимфо-цитов	Немного в сыворотке и тканевой жидкости; на поверхности плазматичес-ких клеток и базофилов

IgG – основной класс антител сыворотки. В составе молекул IgG сыворотки может быть большое количество поликлональных антител различной специфичности, но сходных по структуре. Антитела класса IgG продуцируются в ответ на проникновение в организм большинства бактерий и вирусов, способны агрегировать и покрывать небольшие растворимые белки, такие, как бактериальные токсины. Они участвуют в формировании активного иммунитета и иммунологической памяти. Антитела класса IgG активируют систему комплемента, связываются с антигенами на клеточной поверхности, представляя эти клетки для фагоцитоза (опсонизация). IgG, как самые мелкие иммуноглобулины, могут проникать через плацентарный барьер из крови матери в кровь плода.

Так как до рождения существенной продукции антител не происходит – для этого нужен контакт с чужеродным агентом, - IgG матери служат важным механизмом защиты новорожденного от инфекции.
Имеется 4 подкласса IgG (IgG_1, IgG_2, IgG_3 и IgG_4). При ряде заболеваний происходит перераспределение подклассов IgG, в частности, дефицит некоторых подклассов имеет значение в патогенезе возвратной инфекции, иммунодефицитных состояний, аутоиммунных заболеваний.

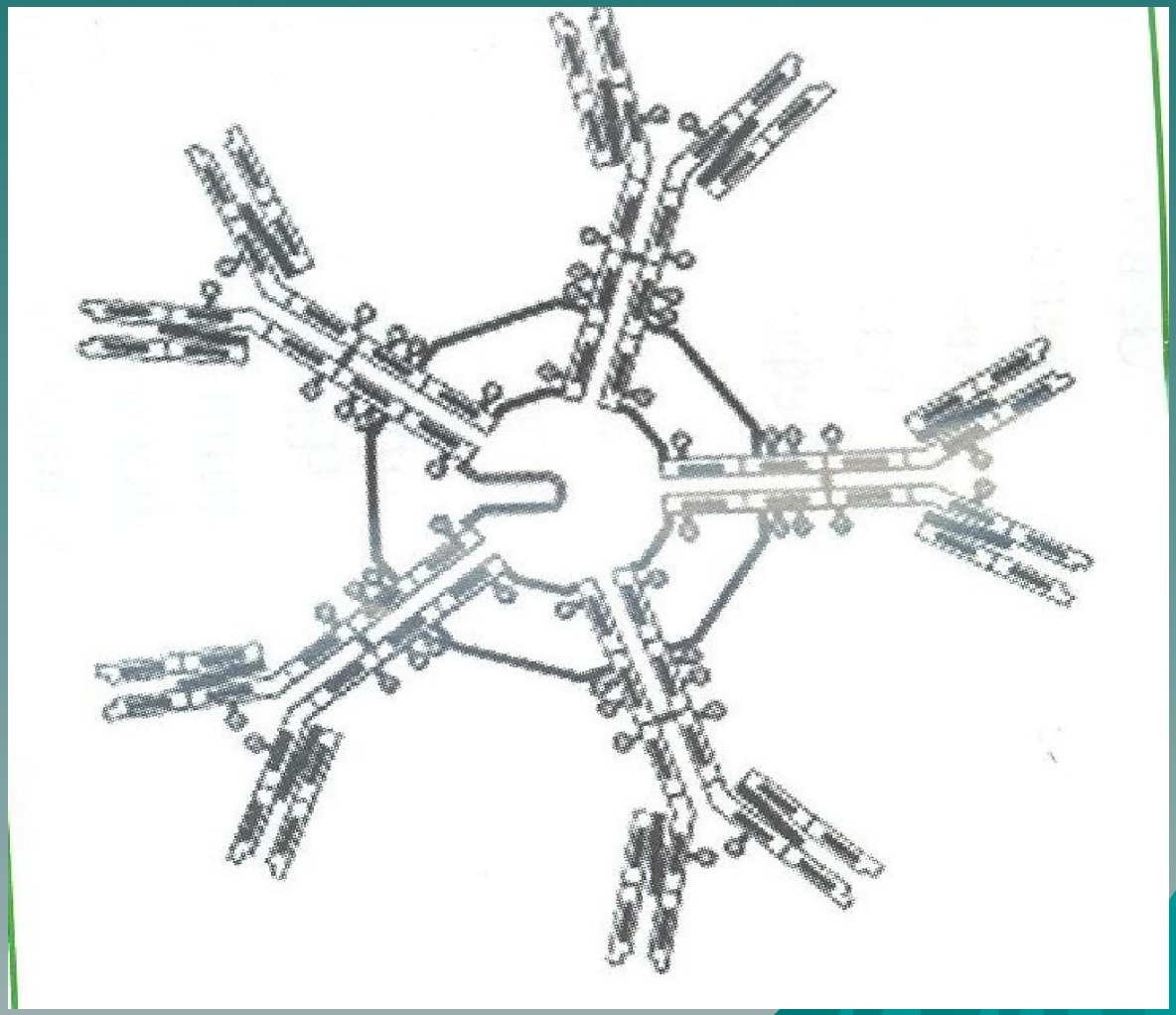
Функции подклассов иммуноглобулинов IgG

IgG_1	• основной реактант при формировании антител против полисахаридов оболочки вирусов и капсулы бактерий • активирует систему комплемента • эффективно связывается с лимфоцитами через Fc-рецепторы • аутоантитела
IgG_2	• формирует иммунный ответ на полисахаридные антигены таких бактерий, как пневмококки, стрептококки группы А и *Haemophilus influenzae*
IgG_3	• антитела с высоким сродством к белковым антигенам • самые сильные активаторы комплемента • эффективно связываются с лимфоцитами через Fc-рецепторы • аутоантитела
IgG_4	• реакция на хроническую антигенную стимуляцию • иммунный ответ на аллергены даже после гипосенсибилизации • блокирование IgE-зависимых реакций

IgA составляют 10-15% иммуноглобулинов сыворотки, они могут представлять собой как мономеры, так и полимеры. Часть IgA в сыворотке – это полимеры, которые устойчивы к деструкции под действием патогенных бактерий. Вторая и, вероятно, наиболее важная форма IgA – это секреторные IgA. Они содержатся в продуктах внешней секреции (слезная жидкость, слюна, пот, слизь бронхиального и кишечного эпителия). Секреторные IgA – это первая линия защиты против бактериальных и вирусных антигенов. Секреторные IgA, продуцируемые В-клетками, внутри слизистого слоя селективно связываются с бактериями и предупреждают их адгезию к стенке.

IgM – самые крупные антитела. Они состоят из 5 одинаковых субъединиц, соединенных дисульфидными мостиками, каждая субъединица схожа с IgG. Это единственный класс антител, синтез которых начинается до рождения ребенка. IgM первыми появляются в сыворотке после введения антигена.
IgM способны нейтрализовать инородные частицы и, благодаря наличию множественных участков связывания, вызывают агглютинацию клеток.

Структура IgM человека: 5 доменов-10 мест связывания АГ.



IgE играют существенное значение в антипаразитарном иммунитете. Однако основное значение IgE имеют в развитии аллергических реакций, в том числе астмы, экземы и других аллергических заболеваний. Когда IgE встречается с соответствующим антигеном, клетка-носитель этого иммуноглобулина секретирует гистамин и другие вазоактивные вещества, вызывающие аллергическую реакцию.

Заболевания, сопровождающиеся повышением IgE в сыворотке

Паразитарные инвазии	Аллергические заболевания	Иммунные заболевания с неясным генезом
Аскаридоз	Астма	Гипер-IgE и возвратная пиодермия (синдром Джоба–Буклея)
Синдром миграции в организме личинок гельминтов	Аллергический ринит	Дисплазия и дефицит тимуса
Нематодоз кишечника	Сенная лихорадка	Синдром Вискотта–Олдрича
Эхинококкоз	Ингаляционная аллергия	Пузырчатка (синдром Нейманна)
Анкилостоматоз (некатороз)	Атопический ринит и синусит	Узелковый периартериит
Амебиаз	Атопический дерматит и крапивница	Синдром гиперэозинофилии
Бронхолегочный аспергиллез	Гиперчувствительная пневмония	IgE-миелома
	Лекарственная и пищевая аллергия	

IgD присутствуют в плазме в низких концентрациях, примерно 1% от всех иммуноглобулинов сыворотки. IgD – мономеры, по структуре схожи с IgG. О физиологической роли IgD известно мало.

Выбор стратегии тестирования, отбор приемлемых тестов или комбинации тестов зависит от трех критериев:

- Целей тестирования;
- Чувствительности и специфичности используемых тестов;
- Распространенности инфекции в исследуемой популяции.

Выделяют 3 главные цели тестирования.

- *Скрининговые исследования.* Скрининговые исследования проводятся, например, с целью обеспечения безопасности реципиента при переливании крови (пересадке органов), объектом их является здоровая популяция доноров. Скрининг крови и продуктов крови включает выявление маркеров гепатитов В и С, ВИЧ и сифилиса среди донорского контингента. Другим примером скрининга является обследование беременных на токсоплазмоз, краснуху, ЦМВ, герпес. К скрининговым можно отнести исследование на наличие маркеров гепатитов В и С, ВИЧ и сифилиса перед плановым оперативным вмешательством.

- *Эпидемиологические исследования.* Специальные эпидемиологические или не связанные с ними анонимные тестирования с целью динамического слежения за частотой встречаемости и тенденцией распространения инфекции в данной популяции.
- *Диагностика инфекции.* Добровольное тестирование сыворотки как пациентов без выраженных симптомов, так и лиц с клиническими признаками или симптомами, предположительно характерными для данной инфекции.

Чувствительность и специфичность – два главных фактора, которые определяют достоверность результатов теста при дифференцировке инфицированных и неинфицированных лиц.

- Чувствительность теста определяется как доля лиц с положительным результатом, полученным при использовании данного теста в популяции с изучаемым заболеванием. Чувствительность является показателем частоты встречаемости ложноотрицательных результатов.

- Специфичность теста – доля лиц с отрицательным результатом, полученным при использовании данного теста в популяции, где изучаемое заболевание отсутствует. Специфичность является показателем частоты встречаемости ложноположительных результатов.

  Тест с высокой чувствительностью будет давать мало ложноотрицательных результатов. Тесты с высокой специфичностью будут давать мало ложноположительных результатов.

Вероятность того, что тест выявит инфицированность пациента по образцу сыворотки, значительно варьирует в зависимости от распространенности инфекции в популяции, из которой происходит пациент. Чем выше распространенность инфекции в данной популяции, тем выше вероятность того, что пациент, у которого результат анализа положительный, является действительно инфицированным (т.е. выше прогностическая ценность положительного результата – ПЦПР).

Таким образом, с увеличением распространенности инфекции число ложноположительных результатов снижается. Вероятность того, что пациент с отрицательным результатом тестирования является неинфицированным, т.е. прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР), также значительно снижается. Однако при увеличении распространенности инфекции увеличивается число ложноотрицательных результатов.

Промежуток времени с момента внедрения инфекционного агента в организм до момента появления антител в сыворотке крови называется серонегативным периодом. В связи с сопоставлением клинической эффективности разных методов в диагностике инфекций применение этого термина расширилось, и «серонегативный период в методе» часто определяют как период между проникновением инфекции в организм и выявлением маркера инфекции данным методом.

Период нарастания титра антител в ответ на первичную антигенную стимуляцию называется сероконверсией.

Определенные классы антител связаны с различными стадиями инфекционного процесса: первичная инфекция (острая), реинфекция, хроническая инфекция, реконвалесценция, перенесенная инфекция

- Первичная (острая) инфекция может быть идентифицирована определением диагностически значимого уровня IgM в единственном образце или значимым ростом концентрации антител класса IgA и/или класса IgG в парных сыворотках, взятых с интервалом в 1-4 недели.
- Реинфекция выявляется быстрым подъемом уровня IgA и/или IgG-антител. IgA-антитела имеют более высокую концентрацию у пациентов старшего возраста и точнее диагностируют текущую инфекцию у взрослых.

- Сероконверсия. IgM-, IgA- и IgG-антитела могут не выявляться в первичном образце и становятся позитивными во втором.
- Реконвалесценция. Во время выздоровления существенно снижается уровень IgA- и/или IgG-антител; IgM-антитела отсутствуют.
- Перенесенная инфекция. Отмечается присутствие IgG-антител без нарастания их концентрации в парных сыворотках, взятых с интервалом в 2 недели; IgM и IgA отсутствуют.

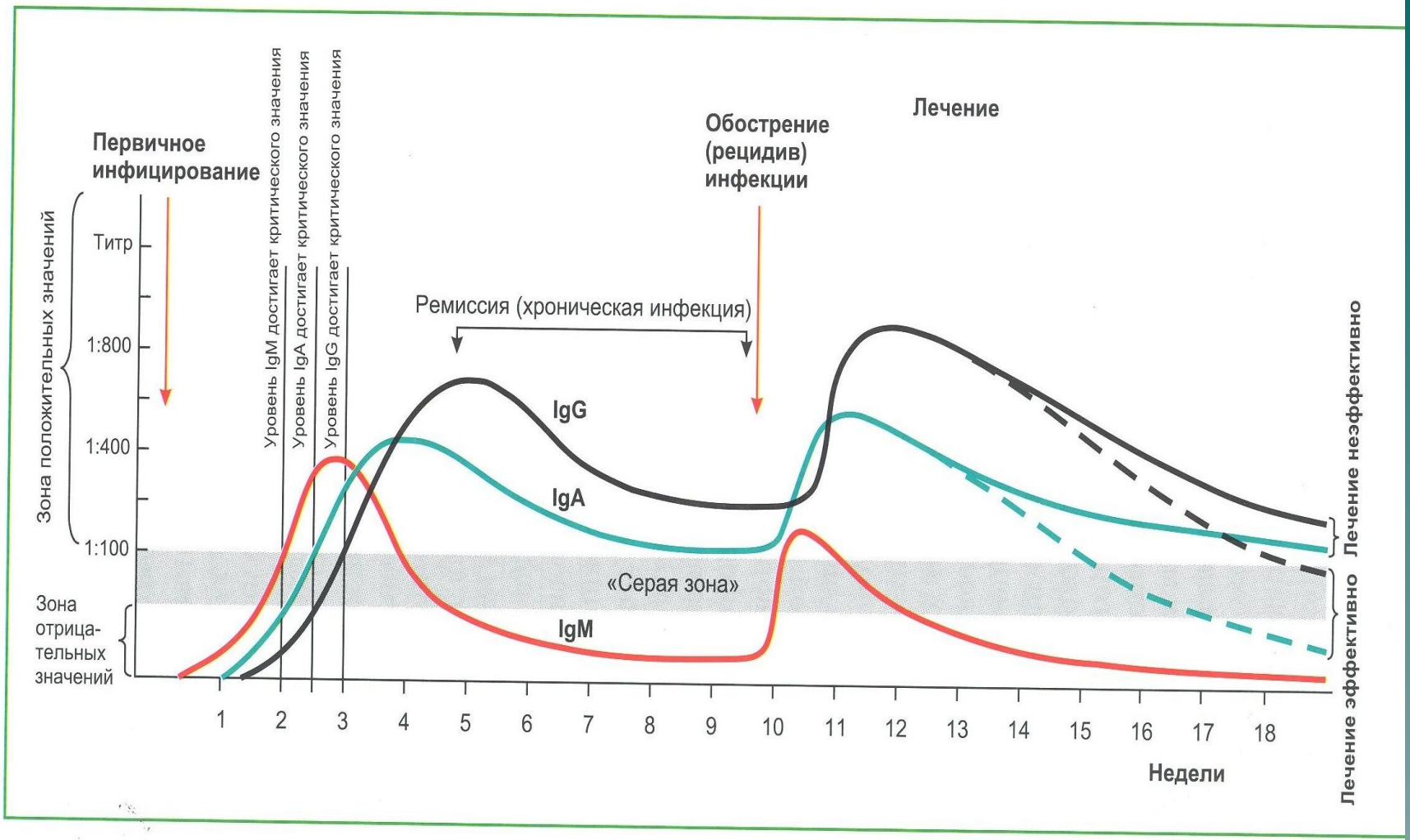


Рис. 4. Типичная динамика антительного ответа на первичное и повторное инфицирование

У новорожденных IgG в крови имеют, как правило, материнское происхождение. В то же время материнские IgM-антитела через плаценту не проникают, поэтому присутствие в крови новорожденных специфических IgM, образование которых у плода отмечается с 14-й недели развития, свидетельствует о врожденной инфекции.

- IgM-антитела первыми синтезируются в ответ на первичную антигенную стимуляцию. Они определяются в сыворотке пациента с 5-го дня от начала заболевания и достигают пика в промежутке от 1 до 4 недель (в зависимости от этиологии инфекционного процесса). Затем их уровень снижается до диагностически не значимых концентраций независимо от эффективности проводимой терапии. Из-за раннего появления и короткого времени жизни определение IgM в сыворотке пациента может являться признаком острой стадии инфекции. Однако отсутствие этого класса антител еще не говорит об отсутствии инфекции, т.к. может иметь место хроническая форма заболевания.

- IgG-антитела определяются через 15-20 дней от начала заболевания. Уровень специфических IgG повышается при иммунном ответе медленнее, чем IgM, и продолжает увеличиваться после того, как содержание IgM в сыворотке крови снижается. Часто этот период связывают со стадией перехода инфекции из острой фазы в хроническую. Обычно спустя несколько месяцев после выздоровления уровень IgG опускается ниже критического значения, тем не менее следует с осторожностью использовать данные анализа IgG в качестве показателя излеченности. Если организм справляется с инфекцией, то IgG могут еще длительное время оставаться повышенными. Таким образом, антитела IgG в сыворотке пациента могут свидетельствовать не только о текущей, но и о перенесенной инфекции

- IgA в сыворотке пациента начинают определяться в период наибольшего титра IgM или чуть позже, в зависимости от природы возбудителя (обычно через 10-14 дней от начала заболевания). В результате успешного лечения уровень IgA снижается к 2-4-му месяцу, а при реинфекциях вновь возрастает. Если уровень IgA не падает после проведения терапии, то это может указывать на хроническую или персистирующую форму инфекции. В течение короткого периода времени могут параллельно определяться IgM- и IgA-антитела. В это же время или с небольшой задержкой могут быть определены антитела класса IgG. У пожилых пациентов для диагностики текущей инфекции предпочтительнее определять уровень IgA-антител, а не IgM.

Таким образом, при постановке окончательного лабораторного диагноза инфекционного процесса с использованием серологических методов необходимо проводить определение IgA- и IgG-антител одновременно. При неясном результате IgA подтверждение осуществляется определением IgM. Альтернативно второй серологический образец, полученный на 8-14 дней позже, должен быть проверен параллельно для определения роста концентрации IgG-антител.

Следует учитывать, что положительный результат анализа содержания IgG в сыворотке пациента в отсутствии других тестов может свидетельствовать как о текущей, так и о перенесенной инфекции, а отрицательный результат анализа содержания IgM в сыворотке пациента без определения других тестов не может являться показателем отсутствия инфекции. Результаты тестов должны использоваться в совокупности с данными, полученными другими диагностическими методами, а также при амбулаторном осмотре больного с учетом данных анамнеза.

Интерпретация результатов, основанных на определении комбинации IgG-, IgM-, IgA-антител

Наличие класса антител			Интерпретация
IgG	IgM	IgA	
–	–	–	Не показывает наличия инфекции
– (+)	+	– (+)	Острая стадия заболевания
+	–	–	Перенесенная или текущая инфекция
– (+)	–	+	Текущая или хроническая инфекция

Примечание. «–» – отрицательный результат ИФА; «+» – положительный результат ИФА; «– (+)» – возможны оба варианта анализа.

Благодарю за внимание!