

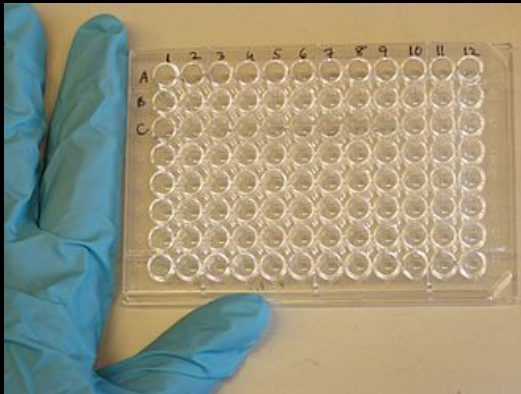
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА).

Выполнена: студенткой группы 4802
Васильевой Алиной Петровной.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА).

- Лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. Теоретические основы ИФА опираются на современную иммунохимию и химическую энзимологию, знание физико-химических закономерностей реакции антиген-антитело, а также на основные принципы аналитической химии.

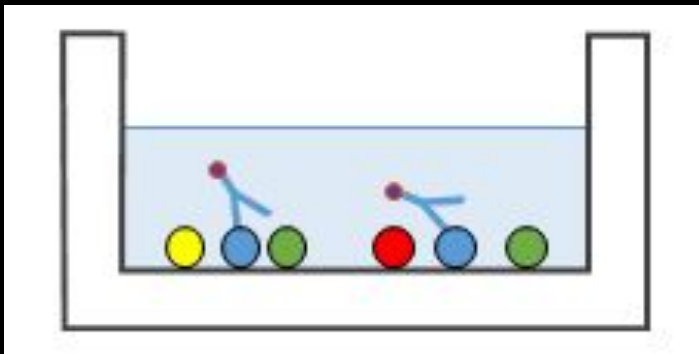
ГЕТЕРОГЕННЫЙ ИФА В МИКРОПЛАНШЕТНОМ ФОРМАТЕ.



96-луночный микропланшет, используемый для ИФА.

- Для осуществления анализа эффективности комплексообразования необходимо провести полную очистку комплексов от свободных компонентов. Эту задачу оказалось легко решить, если один из компонентов пары антиген-антитело прочно связать (иммобилизовать) на твёрдом носителе. Иммунизация позволяет предотвратить агрегацию в растворе и осуществить физическое разделение образующихся комплексов от свободных компонентов. Использование иммобилизации антител на твёрдом носителе положило начало методам твердофазного (гетерогенного) ИФА.
- Особую значимость для широкого внедрения твердофазного ИФА в практику имела разработка в качестве носителей для сорбционной иммобилизации антител и антигенов специальных полистирольных плат, содержащих 96 лунок. Введение полистирольных плат в практику ИФА позволило значительно увеличить число проводимых анализов и упростить методическую процедуру его выполнения. Были сконструированы специальные приборы, позволяющие автоматизировать стадии добавления реагентов, промывки и осуществлять одновременную регистрацию каталитической активности фермента-метки в каждой из лунок планшеты.
- В ходе специфической реакции иммуносорбента с определяемыми в исследуемом образце антителами или антигенами образуются иммунные комплексы, которые оказываются фиксированными на твёрдой фазе. Субстанции, не участвовавшие в реакции, а также избытки реагентов, удаляются при многократной промывке. Такая схема позволяет упростить процесс эффективного разделения компонентов реакции.

ПРЯМОЙ ИФА.



антигены.

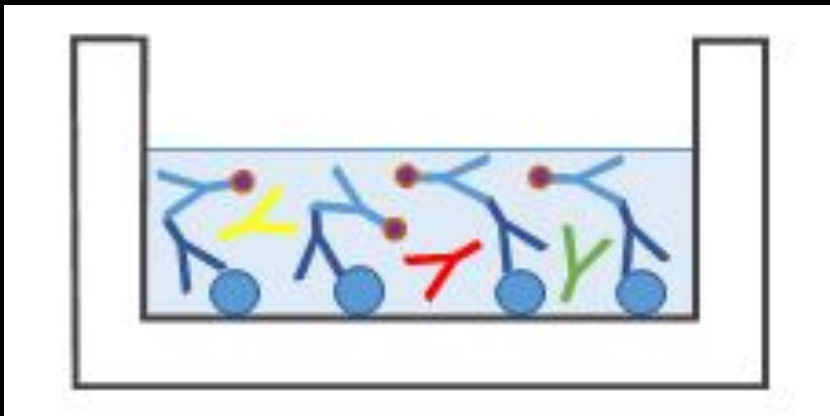
- Y с лиловой точкой — антитела.

- Биологический материал (кровь, соскобы со слизистых, мазки) помещается в чистые лунки на некоторое время (обычно 15—30 минут), достаточное, чтобы антигены могли приклеиться к поверхности лунок.
- Далее в лунки добавляют антитела к выявляемому антигену. Это значит, что выявляя антигены, например, сифилиса, добавляются антитела против антигенов сифилиса. Данную смесь исследуемого материала и антител оставляют на некоторое время (от 30 минут до 4—5 часов), чтобы антитела смогли найти и связаться со «своим» антигеном. Для того чтобы убрать «лишние» антитела, содержимое из лунок выливают (или вымывают методом декантации). В результате этого все «лишние» антитела убираются, а остаются те, которые связались с антигенами, поскольку антигены «приклеены» к поверхности лунок.
- Следующий этап — ферментативная реакция. В промытые лунки добавляют раствор с ферментом и оставляют на 30—60 минут. Данный фермент имеет сродство к веществу (специфической метке), с которым связаны антитела. Фермент проводит реакцию, в результате которой эта специфическая метка (субстрат) превращается в окрашенное вещество (продукт).

НЕПРЯМОЙ ИФА.

- В непрямом иммуноферментном анализе используют антитела к выявляемому антигену, соединенные со специфической меткой. Эта специфическая метка и есть субстрат ферментативной реакции.
- По типу иммунохимического взаимодействия на первой стадии анализа (в которой происходит связывание определяемого вещества) среди гетерогенных методов различают неконкурентный и конкурентный.

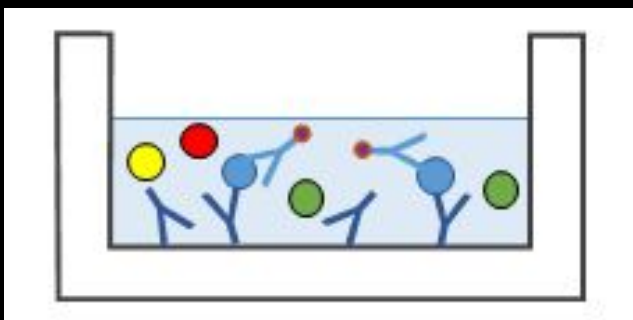
НЕПРЯМОЙ НЕКОНКУРЕНТНЫЙ ИФА.



- Y, Y, Y, Y — антитела из внесённой в лунку сыворотки.
- Y с лиловой точкой — антитела, меченные ферментом, обеспечивающим цветовую реакцию (конъюгат).

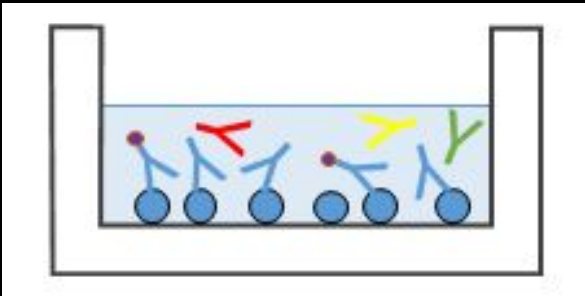
- В лунки, на твёрдой поверхности которых предварительно сорбирован антиген, вносится исследуемый биологический материал (чаще всего сыворотка или плазма крови человека), содержащий антитела к антигену. Образец исследуется на содержание антител.
- Исследуемые антитела из внесённого образца биологического материала во время инкубации связываются с антигеном и таким образом иммобилизируются на поверхности лунки. Несвязавшиеся антитела удаляют отмыванием.
- В лунку вносят конъюгат, то есть антитело с заранее прикрепленным к нему ферментом (например, пероксидазой хрена, способное связаться с антителом, иммобилизированным на первой стадии. Если в ячейке имеются образовавшиеся на первой стадии иммунные комплексы, то конъюгат соединяется с ними во время второй инкубации, а несвязавшийся конъюгат удаляется последующим отмыванием.
- Далее в лунку добавляется субстратно-хромогенный реагент, который превращается в окрашенный продукт под влиянием ферментного компонента конъюгата.
- Отличие от прямого метода состоит в том, что исследуемые антитела не приклеиваются к поверхности чистой лунки, а связываются с иммобилизированным на планшете антигеном.

«СЭНДВИЧ».

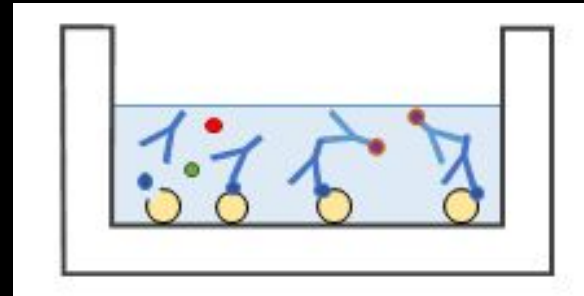


- разноцветные круги — различные антигены из внесённой в лунку сыворотки;
 - Y — антитела, иммобилизованные на поверхности лунки;
 - Y с лиловой точкой — антитела, меченные ферментом.
- К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации на первой стадии на твердой фазе образуется комплекс антиген-антитело.
 - Затем носитель отмывают от несвязавшихся компонентов и добавляют меченные ферментом специфические антитела.
 - После вторичной инкубации и удаления избытка конъюгата антител с ферментом определяют ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена. Ферментативная реакция (цветная реакция) проходит в присутствии перекиси водорода и субстрата, представленного неокрашенным соединением, которое в процессе пероксидазной реакции окисляется до окрашенного продукта реакции на заключительном этапе проведения исследования. Интенсивность окрашивания зависит от количества выявленных специфических антител.
 - На стадии выявления специфического иммунокомплекса антиген оказывается как бы зажатым между молекулами иммобилизованных и меченных антител, что послужило поводом для широкого распространения названия «сэндвич»-метод.

КОНКУРЕНТНЫЕ.



- Прямой конкурентный ИФА.
- Прямой конкурентный формат ИФА использует иммобилизованные на твердой фазе специфические антигены, а меченые ферментом и немеченые антитела конкурируют за связь с иммобилизованным антигеном.



- Непрямой конкурентный ИФА.
- В непрямом конкурентном формате ИФА используются меченные ферментом антивидовые антитела (специфические или вторичные) и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель.

ГОМОГЕННЫЙ ИФА.

- В 1972 г Рубенштейн с сотрудниками разработали новый подход с проведением всего анализа без твердой фазы. Метод получил название гомогенного ИФА и был основан на учёте различий каталитических свойств ферментной метки в свободном виде и в иммунохимическом комплексе. Суть его состоит в связывании низкомолекулярного антигена с ферментом лизоцимом вблизи активного центра. В комплексе с антителами активный центр фермента становится стерически недоступен макромолекулярному субстрату, которым являются стенки бактериальных клеток. При увеличении концентрации определяемого антигена концентрация неактивного комплекса конъюгата с антителами снижается, а следовательно, возрастает регистрируемый параметр ферментативной реакции. На основе данного подхода были разработаны наборы для определения широкого круга токсических, наркотических и лекарственных средств. Существенным достоинством ЕМІТ-анализа являются возможность использования малых объёмов анализируемого образца (5-50 мкл) и высокая скорость определения (2—5 мин), обусловленная отсутствием стадии разделения свободного и меченого анализируемого соединения. К недостаткам метода следует отнести меньшую чувствительность, чем в гетерогенном ИФА (~ 1 мкг/мл), и возможность определения только низкомолекулярных антигенов.

ОСОБЕННОСТИ И ПРОБЛЕМЫ ИФА.

- Как любые иммунохимические методы анализа, ИФА может давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Например, ложноположительные результаты при определении антител к различным инфекциям могут возникнуть за счёт ревматоидного фактора, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека; за счёт антител, образующихся при различных системных заболеваниях, нарушениях обмена или приёме лекарственных препаратов; у новорождённых такие ложноположительные реакции могут возникать за счёт образования в организме ребёнка М-антител к иммуноглобулину G матери. Помимо этого, причиной ложноположительных результатов может быть синдром поликлональной активации. При этом, особые вещества — суперантигены — неспецифически стимулируют выработку В-лимфоцитами антител к различным инфекциям. Практически это выражается в неспецифическом нарастании титра антител сразу ко многим возбудителям. Ложноотрицательные результаты при определении антител могут быть обусловлены состояниями иммунодефицита, а также техническими ошибками при постановке реакции.
- Таким образом, за счёт несомненных преимуществ иммуноферментного анализа: удобства в работе, быстроты, объективности за счёт автоматизации учёта результатов, возможности исследования иммуноглобулинов различных классов (что важно для ранней диагностики заболеваний и их прогноза) в настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.