

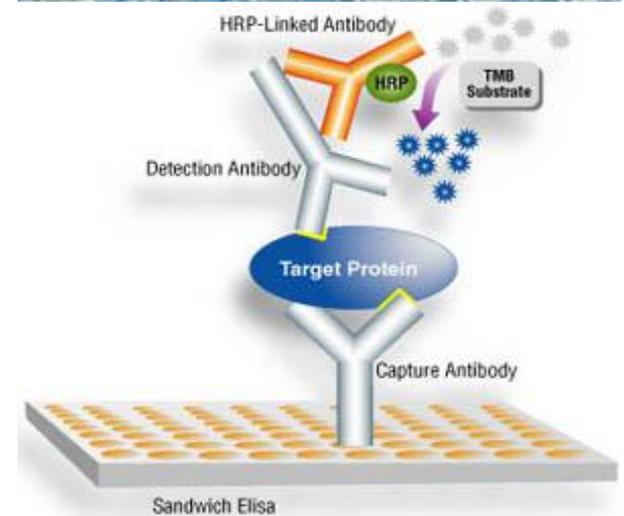
Врач интерн Шикейб С.А.

---

ИФА –  
иммуноферментный анализ

# Иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*)

лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных 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.



# Классификация.

---

по типу проводимых на каждой из иммунохимических стадий реакций

Гомогенные

Гетерогенные (имеется стадия  
механического разделения на фазы)

Гомогенно-гетерогенные

# Классификация.

по типу иммунохимического  
взаимодействия  
на первой стадии анализа

конкурентный

неконкурентный

прямой

непрямой

# Классификация.

---

по типу используемых  
меченных антител/антител

```
graph TD; A[по типу используемых меченных антител/антител] --> B[прямой]; A --> C[непрямой];
```

прямой

непрямой

# «Твердая фазы» для ИФА

---

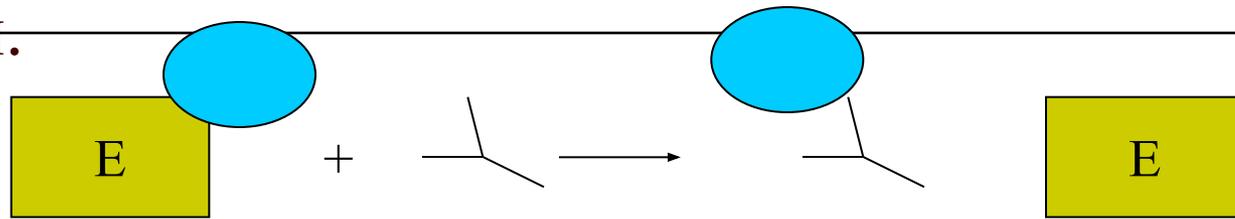
- пластмасса (полистирол, поливинилхлорид и др.) в виде стандартно штампованных микроплашек с 96 или 60 лунками (или шарики, колпачки и прочее - для постановки единичных проб);
- Белки хорошо сорбируются на подобранных для ИФА пластмассовых материалах.
- Все остальные реагенты тест-систем используют в виде растворов.
- Результат реакции «остается» на твердой фазе и регистрируется количественно.

# Прямой ИФА

---

- Гомогенный (ЕМІТ-анализ)
- Гетерогенный
  1. конкурентный
  2. ингибиторный
  3. Сэндвич-анализ
  4. иммуномерсентометрический

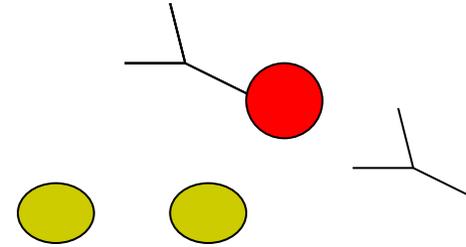
**ЕМІТ** (enzyme multiplied immunoassay technique) – способ гомогенного ИФА, основанный на связи с ферментами.



- В основе гомогенного ИФА лежит ингибирование активности фермента при его соединении с антигеном и восстановление ее в результате реакции антиген – антитело или же, наоборот, потеря активности фермента в результате реакции.
- Существенным достоинством гомогенного ИФА является экспрессность определения, которая составляет 2 – 5 минут.
- К недостаткам следует отнести меньшую чувствительность, чем в гетерогенном ИФА (~ 1 мкг/мл).

# Прямой конкурентный метод.

## ХОД РЕАКЦИИ



- К иммобилизованным антителам добавляют раствор, содержащий **определяемое вещество и фиксированную концентрацию меченого антигена**, инкубируют и после отмывки носителя от несвязавшихся компонентов регистрируют **ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов**.

- Величина детектируемого сигнала находится в обратной зависимости от концентрации антигена.

- Принцип - иммобилизованные на твердой фазе **специфические антитела + меченый ферментом и немеченый антиген** конкурируют за связь с антителом.

# Примером *неконкурентного* ИФА является «СЭНДВИЧ»-МЕТОД.

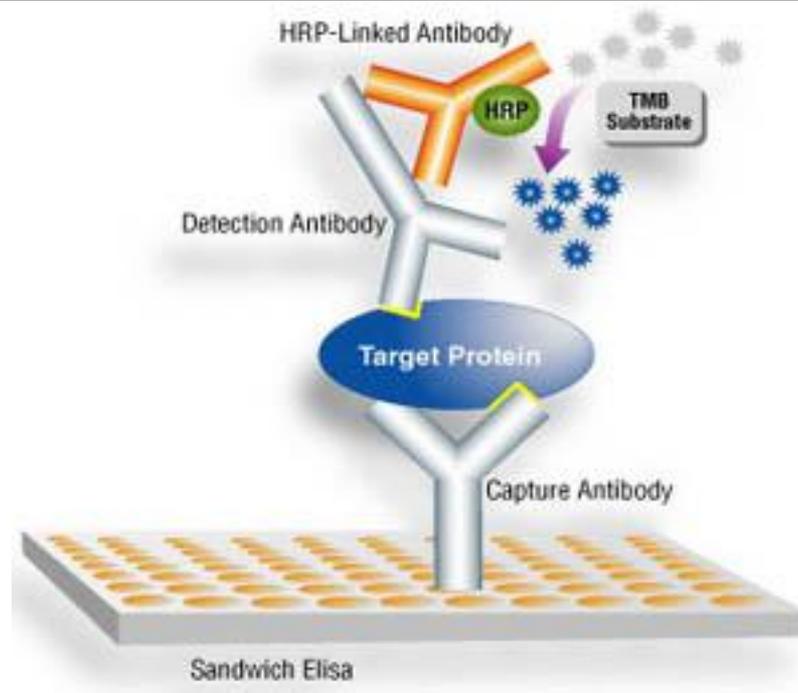
- К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации образуется комплекс антиген-антитело.
- Добавляют меченные ферментом специфические антитела.
- Ферментативная реакция –при добавлении субстрата
- Определяют ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена.



# Сэндвич- метод. ELISA

- 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.

- метод может быть использован для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют, Сэндвич по крайней мере, **две антигенные детерминанты.**



# Непрямой ИФА

---

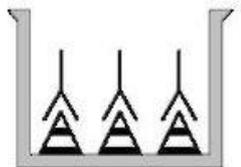
- Гетерогенный
  1. конкурентный
  2. ингибиторный
  3. Сэндвич-анализ (неконкурентный)
  4. иммуномерсентометрический

# СХЕМА непрямого

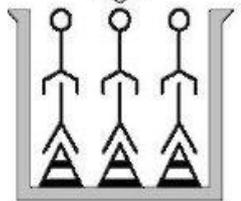
## ИФА



Адсорбция антигена на твердой фазе



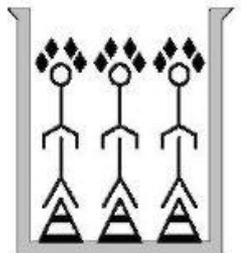
Внесение исследуемого материала с содержащимися специфическими антителами



Внесение антиглобулинового конъюгата



Внесение субстрата

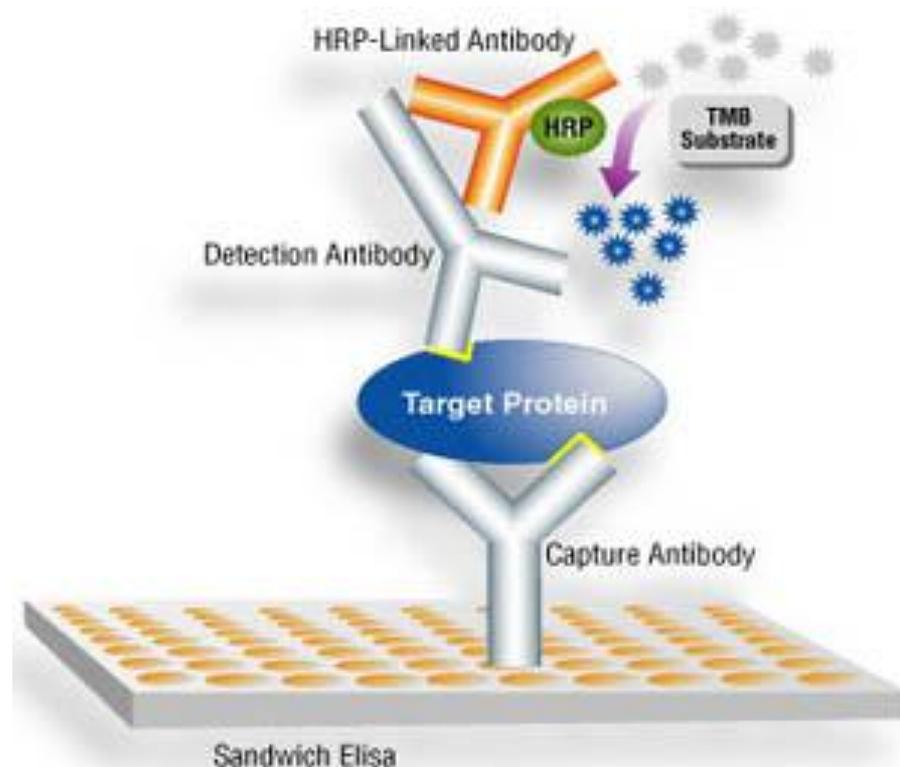


Образовшийся продукт реакции выявляют на ИФА-ридере

- метку присоединяют не к целевому антигену и не к антителу против целевого антигена, а к так называемым вторым антителам - антивидовым антииммуноглобулиновым антителам, т.е. антителам к иммуноглобулинам того вида животных или человека, с биологическим материалом которого работают.

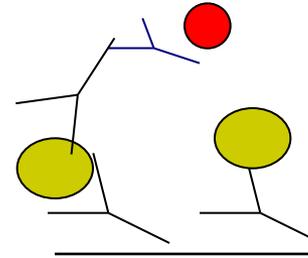
# Непрямой «сэндвич»-метод

- Непрямые варианты ИФА не требуют очистки искомым антигенов или антител
- Вместо антивидовых антиглобулиновых антител для конъюгации с ферментом может быть использован, например, протеин А стафилококка, который по своей природе с высокой аффинностью связывается с иммуноглобулинами класса G некоторых видов млекопитающих, включая человека.



# Непрямой конкурентный ИФА.

## ХОД РЕАКЦИИ



- На поверхности носителя иммобилизуют антиген-белок
  - добавляют раствор, содержащий определяемый антиген и фиксированную концентрацию немеченых специфических антител, инкубируют.
  - добавляют фиксированную концентрацию меченых антивидовых антител (вторичных).
  - детектируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов,
  - причем величина сигнала находится в **обратно-пропорциональной зависимости** от концентрации определяемого антигена
- **ПРИНЦИП** - используются меченные ферментом вторичные антитела и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель.

# Преимущества и недостатки

**ПРЯМОЙ ИФА**

**НЕПРЯМОЙ  
ИФА**

преимущество

**небольшое число стадий,  
что позволяет легко  
автоматизировать анализ**

Даёт возможность выявлять антитела к разным антигенам.  
Анализируемый образец и меченый реагент вводятся в систему на разных стадиях, что устраняет влияние различных эффикторов,

недостатки

сложность методов синтеза ферментных конъюгатов, а также возможное влияние компонентов образца на активность фермента.

Применение универсального реагента — меченых антивидовых антител усложняет анализ проведение из-за введения дополнительных стадий.

# Ферменты- метки в ИФА

---

***Пероксидаза из корней хрена*** (субстраты: • орто-фенилендиамин (продукт желто-коричневый, растворимый, поглощает при 492 нм); • 3,3'-диаминобензидин (продукт коричневый, нерастворимый); • 3-амино-9-этилкарбазол (продукт красный; нерастворимый); •

***β-Галактозидаза*** (субстраты - дериваты β-галактозида, например 4-метилумбелиферил-β-D-галактозин).

***Щелочная фосфатаза*** (субстраты: 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат в комбинации с голубым тетразолиевым, продукт голубой, нерастворимый; p-нитрофенил фосфат, продукт желтый, растворимый, поглощает при 405 нм).

***Уреаза*** (субстрат - мочеви́на в комбинации с бромкрезолом пурпурным, продукт образуется очень быстро, пурпурного цвета, растворимый, поглощает при 590 нм).

# «авидинбиотиновое»

## взаимодействие

---

- Если по тем или иным биохимическим причинам заданный антиген или интересующее антитело не удается конъюгировать с меткой без существенных потерь в аффинности их связывания, то в конструкцию тест-системы пробуют вводить дополнительные компоненты.
- Авидин - белок, выделяемый из «белка» куриных яиц, биотин - витамин Н (он же кофермент R). Авидин по своей природе с высокой аффинностью ( $K_d \sim 10^{-15} \text{ M}$ ) связывает биотин.
- Биотин легко конъюгируется с флюоресцеином. Кроме того, и против авидина, и против биотина получены высокоаффинные моноклональные антитела.
- Сходным по аффинности сродством к биотину обладает также белок стрептавидин, выделяемый из грибов *Streptomyces avidinii*.

# Преимущества и недостатки ИФА

## Преимущества метода ИФА:

- 1) Высокая специфичность и чувствительность метода ИФА (более 90%).
- 2) Возможность определения заболевания и отслеживания динамики процесса, то есть сравнение количества антител в разных временных промежутках.
- 3) Доступность ИФА-диагностики в любом медицинском учреждении.

## Относительный недостаток:

Выявление иммунного ответа (антител), но не самого возбудителя.



Оборудование: ИФА-ридер, шейкер, промыватель

## *Недостатки ИФА:*

---

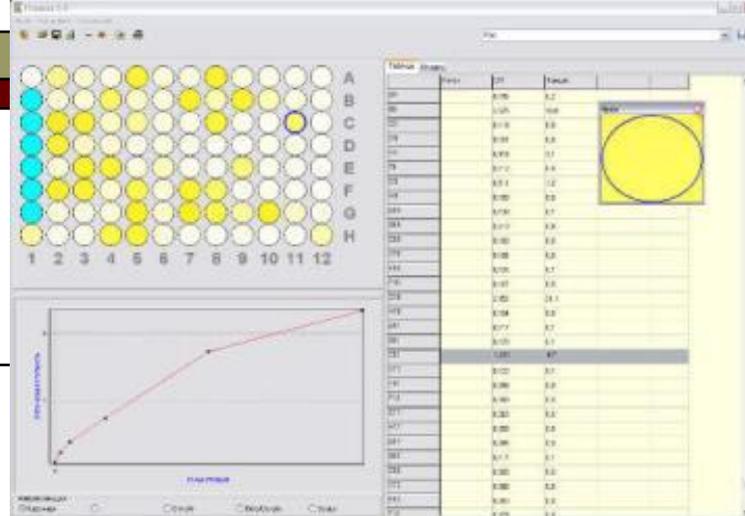
- влияние фона на результат анализа, наличие в тестируемых образцах модификаторов активности ферментов (кофакторов, ингибиторов);
- возможность денатурации ферментов под действием внешних факторов;
- применение метода возможно лишь к хорошо изученным системам, где есть очищенные антигены и высокоспецифичные антитела.

# Пути преодоления

---

- Для уменьшения вероятности получения ложноположительных результатов ИФА используют в сочетании с соответствующими хроматографическими подтверждающими методами.
- ВЕСТЕРН БЛОТТИНГ – подтверждающий метод для диагностики ВИЧ

# Применение.



- 1) Поиск специфических антител к любому инфекционному заболеванию;
- 2) поиск антигенов каких-либо заболеваний (инфекционных, венерологических);
- 3) исследование гормонального статуса пациента;
- 4) обследование на онкомаркеры;
- 5) обследование на предмет наличия аутоиммунных заболеваний.