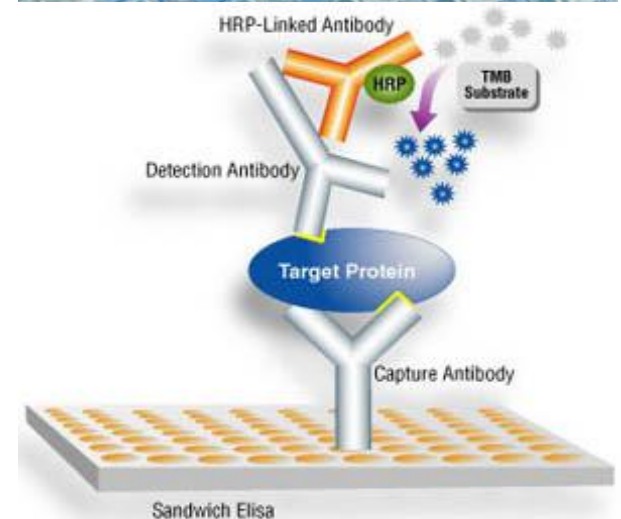


Врач интерн Шикейб С.А.

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

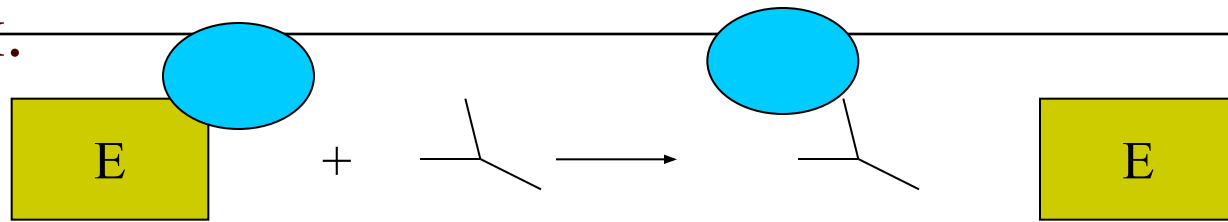
«Твердая фазы» для ИФА

- 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

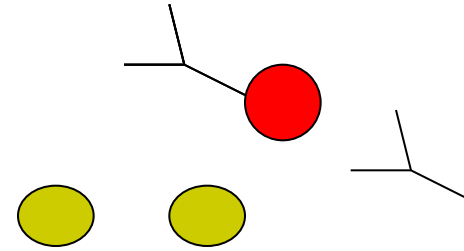
EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) – способ гомогенного ИФА, основанный на связи с ферментами.



- 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.

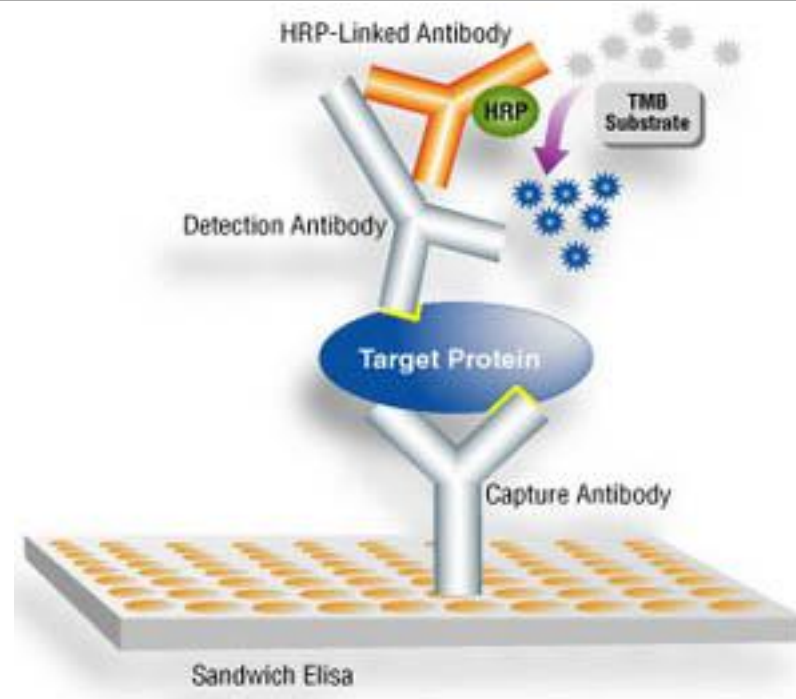
- К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации образуется комплекс антиген-антитело.
- Добавляют меченные ферментом специфические антитела.
- Ферментативная реакция –при добавлении субстрата
- Определяют ферментативную активность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

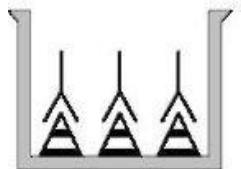
- Гетерогенный
 1. конкурентный
 2. ингибиторный
 3. Сэндвич-анализ (неконкурентный)
 4. иммуномерсентометрический

СХЕМА непрямого

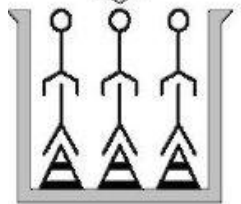
ИФА



Адсорбция антигена на
твердой фазе



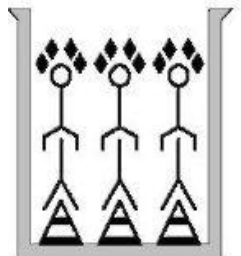
Внесение исследуемого материала
с содержащимися специфическими
антителами



Внесение антиглобулинового
конъюгата



Внесение субстрата

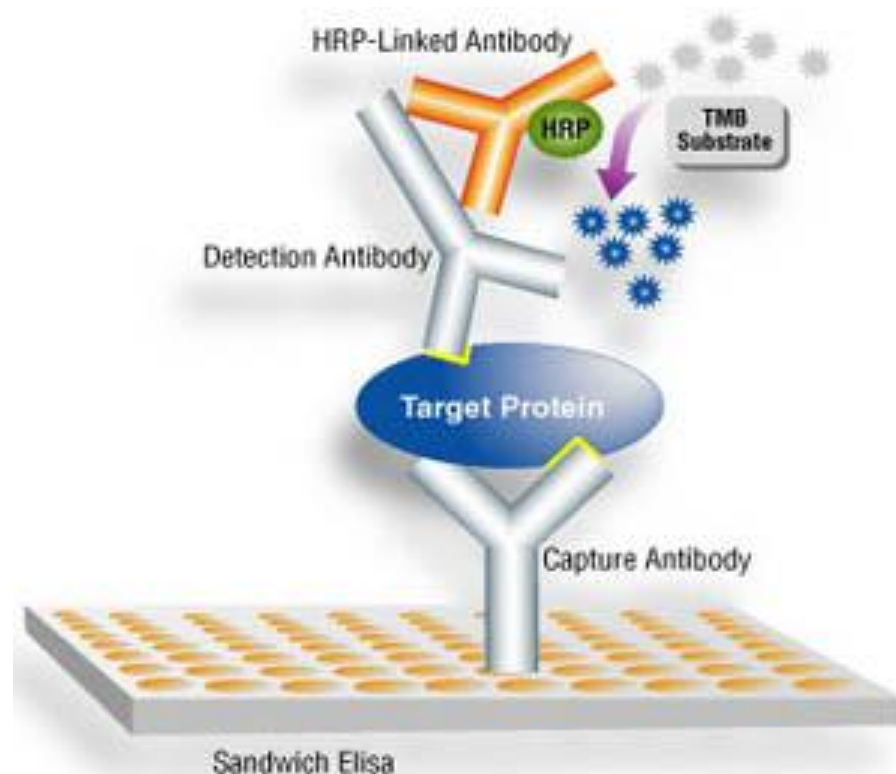


Образовшийся продукт реакции
выявляют на ИФА-ридере

- 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.

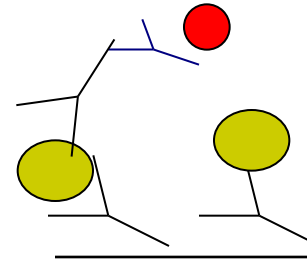
Непрямой «сэндвич»-метод

- 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

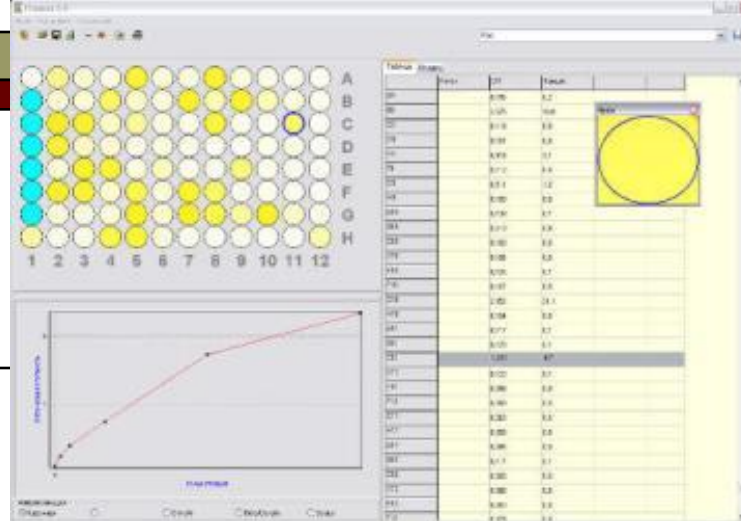
Недостатки ИФА:

- 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.