

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого»
Институт медицинского образования

“Иммуноферментный анализ”

Выполнили: студенты группы 6324
Салманов Иса Хабибулаевич.

Великий Новгород
2017г.

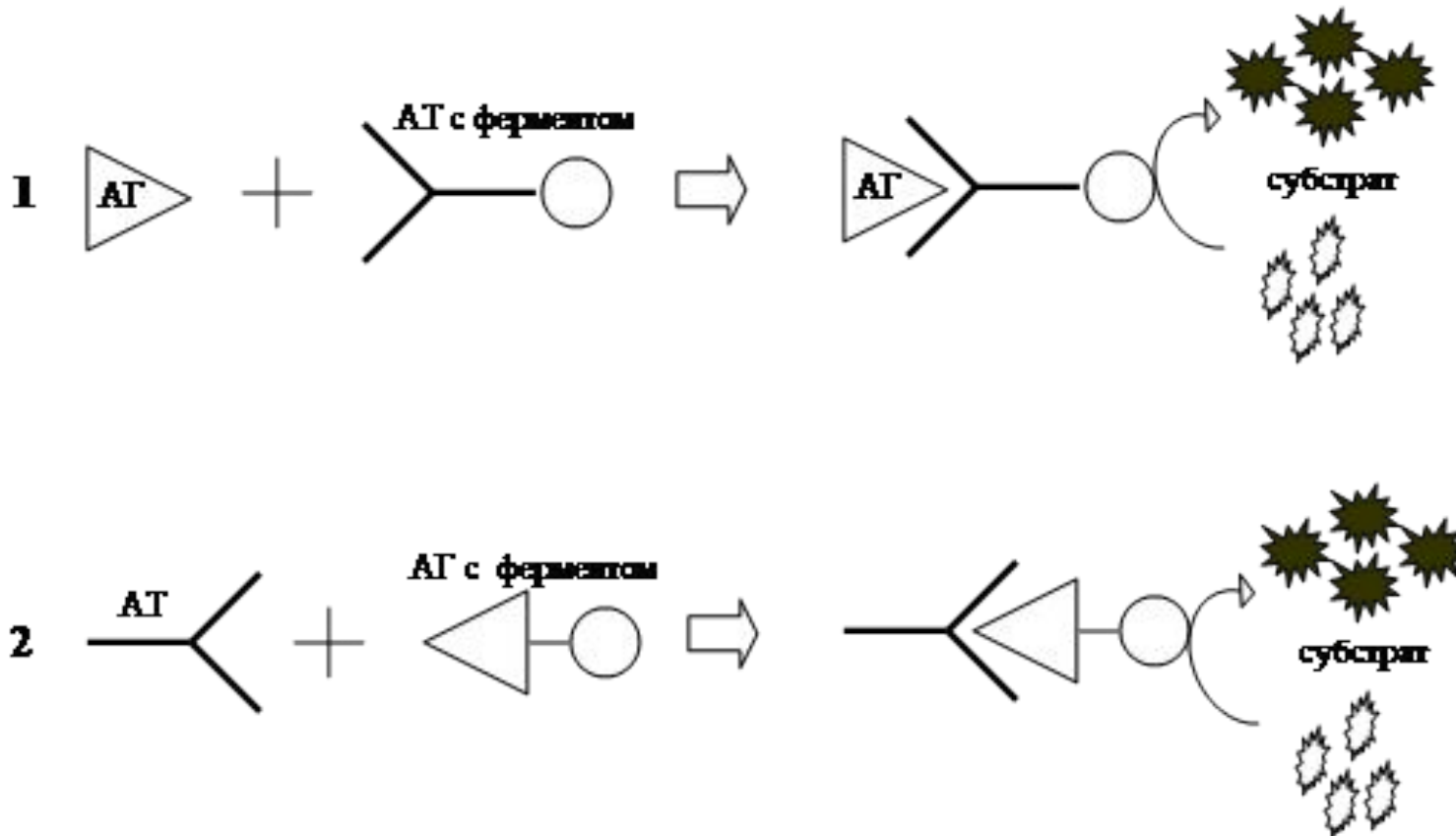
Иммуноферментный анализ

(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. В настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.



- ИФА появился в середине 60-х годов и первоначально был разработан как метод для идентификации антигена в гистологическом препарате, а также для визуализации линий преципитации в тесте иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза, а затем стал использоваться для количественного определения антигенов и антител в биологических жидкостях. В разработке метода принимали участия Е. Энгвалл и Р. Пэлман, а также независимо от них В. Ван Веeman и Р.

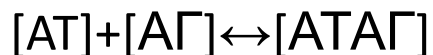
Основной принцип ИФА.



- 1) Для выявления антигенов.
- 2) Для выявления антител.

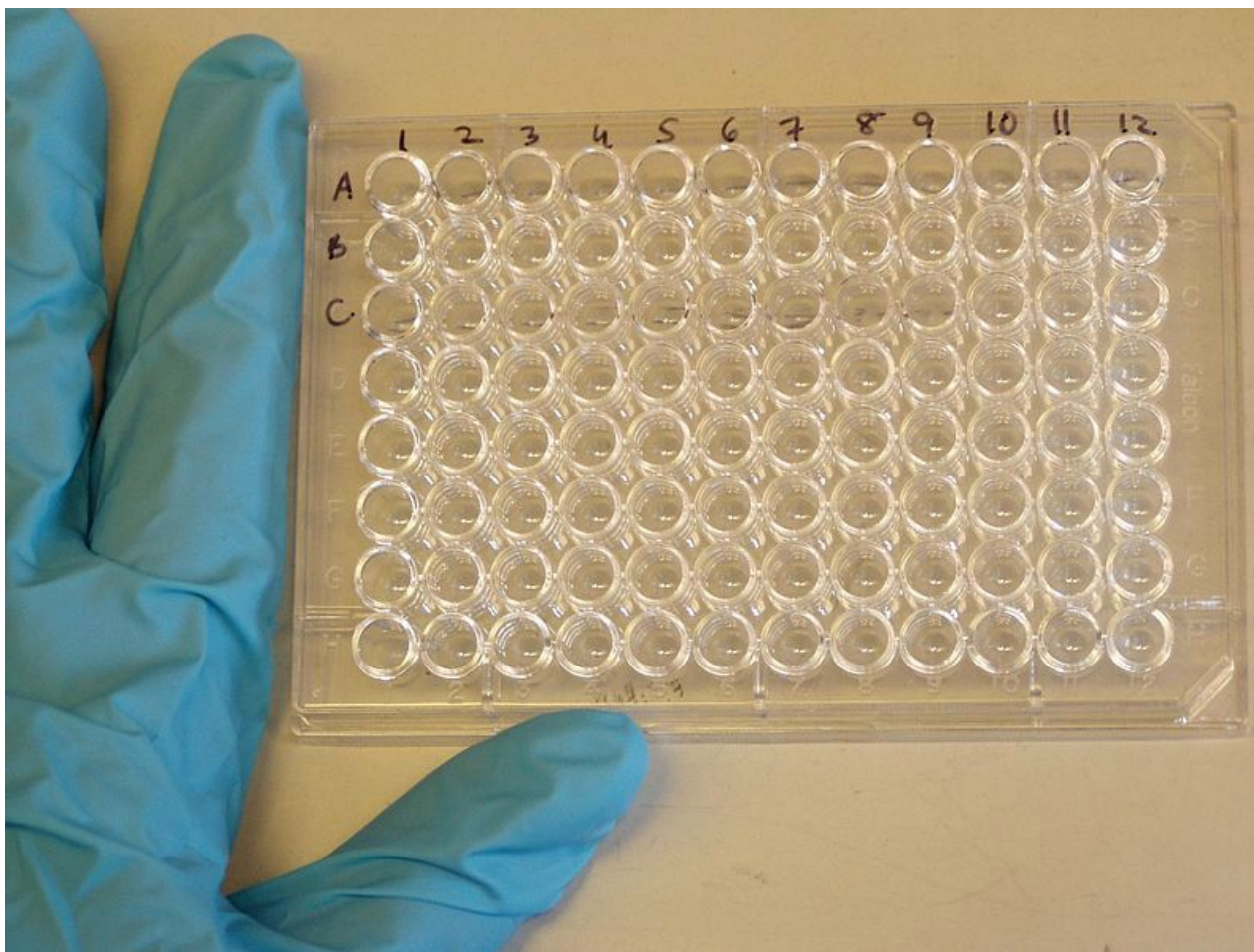
- Метод основан на специфическом связывании антитела с антигеном, при этом один из компонентов коцюгирован с ферментом, в результате реакции с соответствующим хромогенным субстратом образовывается окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрически
- Открытие возможности иммобилизации антигена и антитела на различных носителях с сохранением их связывающей активности позволило расширить использование ИФА в различных областях биологии и медицины.
- Появление моноклональных антител послужило дальнейшему развитию ИФА, что позволило повысить его чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов.

- Теоретически ИФА основывается на данных современной иммунохимии и химической энзимологии, знании физико-химических закономерностей реакции антиген-антитело, а также на главных принципах аналитической химии. Чувствительность ИФА и время его проведения определяется несколькими основными факторами: кинетическими, термодинамическими характеристиками реакции антиген-антитело, соотношением реагентов, активностью фермента и разрешающей способностью методов его детекции. В общем виде реакция антиген-антитело может быть описана простой схемой:



- Разнообразие объектов исследования от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, а также необычайно широкий круг задач, связанных с многообразием условий применения ИФА, обуславливают разработку чрезвычайно большого количества вариантов этого метода.

96 ячеечный микропланшет, используемый
для постановки ИФА.



Любой вариант ИФА содержит 3 обязательные стадии:

1. стадия узнавания тестируемого соединения специфическим к нему антителом, что ведет к образованию иммунного комплекса;
2. стадия формирования связи конюгата с иммунным комплексом или со свободными местами связывания;
3. стадия превращения ферментной метки в регистрируемый сигнал.

Сущность и классификация

Из-за разнообразия объектов исследования — от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, и многообразия условий проведения ИФА существует большое количество вариантов этого метода.

Возможна *классификация по типу иммунохимического взаимодействия* на первой стадии анализа (в которой происходит связывание определяемого вещества):

- Если в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела), то метод является *неконкурентным*.
- Если же на первой стадии в системе одновременно присутствует анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за ограниченное количество центров специфического связывания, то метод является *конкурентным*.

Примером неконкурентного формата ИФА является «сэндвич»-метод. 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. 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.

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.

Результат оценивается спектрофотометрически или визуально.

«Сэндвич»-метод может быть использован для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере, две антигенные детерминанты. На этом формате основано большое количество тест-систем для иммуноферментной диагностики различных инфекций: ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, цитомегаловирусная, герпесная, токсоплазменная и другие инфекции.

Среди конкурентных схем твердофазного ИФА существует два основных формата:

- *Прямой конкурентный* формат ИФА использует иммобилизованные на твердой фазе специфические антитела, а меченый ферментом и немеченый антиген конкурируют за связь с иммобилизованным антителом. К иммобилизованным антителам добавляют раствор, содержащий определяемое вещество и фиксированную концентрацию меченого антигена, инкубируют и после отмытки носителя от несвязавшихся компонентов регистрируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов. Величина детектируемого сигнала находится в обратной зависимости от концентрации антигена.

Преимуществом прямой схемы является небольшое число стадий, что позволяет легко автоматизировать анализ. К недостаткам схемы относятся сложность методов синтеза ферментных конъюгатов, а также возможное влияние компонентов образца на активность фермента.

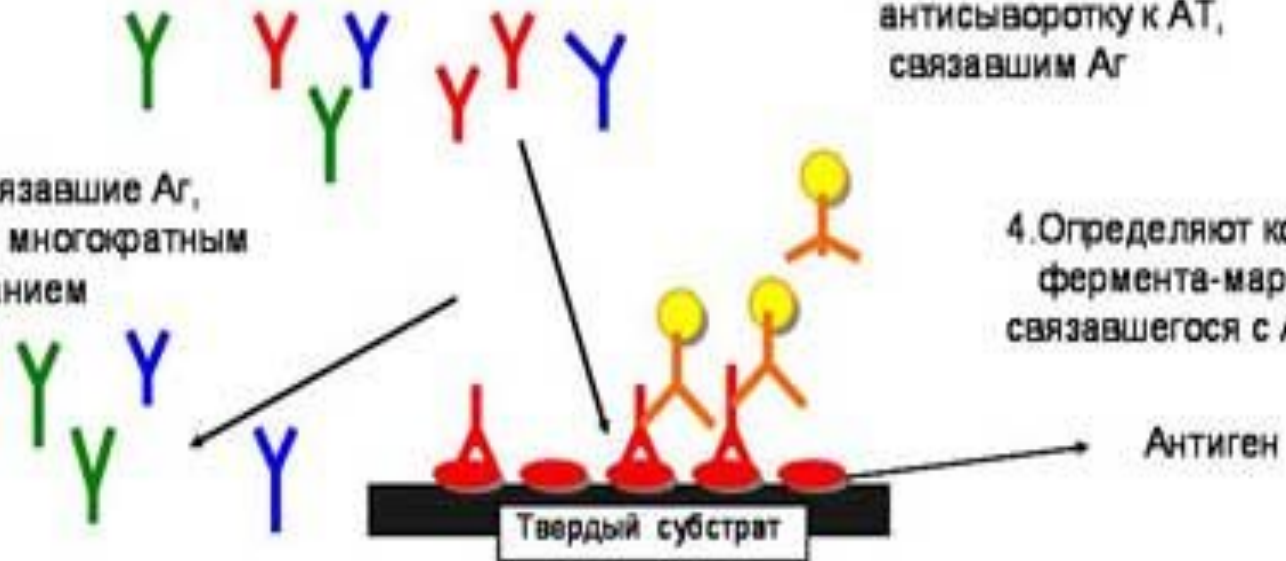
Прямой твердофазный ИФА (схема)

1. Сыворотку инкубируют с Аг, фиксированным на твердом субстрате (пластиковая микропланшетка)

2. АТ, не связавшие Аг, удаляют многократным промыванием

3. Вносят меченную ферментом антисыворотку к АТ, связавшим Аг

4. Определяют количество фермента-маркера, связавшегося с АТ



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

Непрямая схема с использованием меченых антивидовых антител является одной из наиболее распространенных схем ИФА. На поверхности носителя иммобилизуют конъюгат антиген-белок, к которому добавляют раствор, содержащий определяемый антиген и фиксированную концентрацию немеченых специфических антител, инкубируют и после удаления несвязавшихся компонентов добавляют фиксированную концентрацию меченых антивидовых антител. После инкубации и отмывки носителя детектируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов, причем величина сигнала находится в обратно-пропорциональной зависимости от концентрации определяемого антигена.

Применение универсального реагента — меченых антивидовых антител — даёт возможность выявлять антитела к разным антигенам. Кроме того, анализируемый образец и меченый реагент вводятся в систему на разных стадиях, что устраняет влияние различных эффекторов, содержащихся в образце, на каталитические свойства ферментной метки. Однако такая схема анализа усложняет его проведение из-за введения дополнительных стадий.

Непрямой метод

АТ-положительная сыворотка



АТ-отрицательная сыворотка



- ❖ Если все три стадии ИФА проходят в растворе и между основными стадиями нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов, метод относится к группе *гомогенных*:

В основе гомогенного ИФА, применяемого, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций, лежит ингибирование активности фермента при его соединении с антигеном или антителом. Активность фермента восстанавливается в результате реакции антиген-антитело.

- При связывании антитела с антигеном, содержащим ферментную метку, происходит ингибирование активности фермента на 95% по отношению к высокомолекулярному субстрату, что обусловлено стерическим исключением субстрата из активного центра фермента. По мере увеличения концентрации антигена связывается все больше антител и сохраняется все больше свободных коңюгатов антиген-фермент, способных гидролизовать высокомолекулярный субстрат. Анализ проводят очень быстро, для одного определения требуется 1 минута. Чувствительность метода достаточно высока. С его помощью можно определить вещество на уровне пикомолей.

- ❖ Для *гетерогенных* методов характерно проведение анализа в двухфазной системе с участием твердой фазы – носителя, и обязательная стадия разделения иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов (отмывка), которые находятся в разных фазах (образовавшиеся иммунные комплексы находятся на твердой фазе, а непрореагировавшие комплексы – в растворе). Гетерогенные методы, в которых формирование иммунных комплексов на первой стадии протекает на твердой фазе, называют твердофазными методами.
- ❖ Методы относятся к *гомогенно-гетерогенным*, если 1 стадия – образование специфических комплексов происходит в растворе, а затем для разделения компонентов используют твердую фазу с иммобилизированным реагентом.

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.

Ферменты

Ферментные метки обладают чрезвычайно мощным каталитическим действием, одна молекула фермента может реагировать с большим количеством молекул субстрата. Таким образом, фермент, присутствующий в ничтожных количествах, можно выявить и количественно определить по образованию продуктов, катализируемой им реакции. Другое преимущество применения ферментов в качестве меток обусловлено наличием в молекуле многочисленных функциональных групп (сульфгидрильных, карбоксильных, остатков тирамина и др.), через которые можно ковалентно присоединить молекулы лиганда.

Ферментные маркеры, используемые в ИФА, должны обладать следующими свойствами:

- – высокая активность и стабильность фермента в условиях анализа, при модификации и в коцугате с антителами или другими белками;
- – наличие чувствительных субстратов и простота метода определения продуктов или субстратов ферментативной реакции;
- – возможность адаптации субстратных систем к дальнейшему усилению;
- – отсутствие фермента и его ингибиторов в исследуемой биологической жидкости.

В ИФА может использоваться не менее 15 различных ферментов. Наибольшее применение, в соответствии с вышеназванными требованиями, нашли пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфотаза (ЩФ) и β -D-галактозидаза (табл.1). Все три стабильны и катализируют высокочувствительные реакции. Кроме того, продукты, получаемые в результате реакций, катализируемых этими ферментами, в зависимости от используемого субстрата, могут выявляться не только колориметрическими методами, но также флуоресцентными методами. Другие ферменты используются значительно реже. Это объясняется их более низкой в сравнении с ПХ и ЩФ удельной активностью.

Субстраты

Выбор субстрата в первую очередь определяется используемым в качестве метки ферментом, так как реакция фермент-субстрат высоко специфична.

Основные требования к субстрату:

- – обеспечение высокой чувствительности метода при выявлении фермента в коңюгате;
- – образование хорошо учитываемых (например, окрашенных) продуктов реакции фермент-субстрат;
- – субстрат должен быть безопасным, дешевым, доступным и удобным для применения.

Ферменты и их субстраты наиболее широко используемые в ИФА.

Фермент	Источник получения	М.М. (кДа)	Субстрат (рекомендуемая длина волны при фотометрии, нм)	Конъюгирующий реагент
Пероксидаза хрена	Хрен (<i>Armoracia rusticana</i>)	40	О-фенилендиаминдигидро-хлорид (ОФД, 492 нм) 5-аминосалициловая кислота (450 нм), диаминобензидин, о-дианизидин.	Глутаральдегид Мета-периодат натрия N-сукцинимидил-3(2-пиридилдитио)пропионат
β -D-галактозидаза	<i>E. Coli</i>	540	О-нитрофенил- β -D-галактозид (420 нм)	Мета-малеимидобензол-N-гидроксисукцинимидный эфир
Щелочная фосфатаза	<i>E. Coli</i> , слизистая кишечника теленка	84-150	P-нитрофенилфосфат (405 нм), 5-Бром-4-хлоро-3-	Глутаральдегид

преимущества иммуноферментного анализа

- высокая чувствительность, позволяющая выявлять концентрации до 0,05 нг/мл. Такая чувствительность метода определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата;
- возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала;
- стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более);
- простота проведения реакции;
- наличие как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета;
- возможность автоматизации всех этапов реакции
- относительно низкая стоимость диагностических наборов.

Основные типы тест-систем в зависимости от используемых антигенов

В зависимости от того, какие антигены используются, иммуноферментные тест-системы подразделяются на:

- *Лизатные* — в которых используется смесь нативных антигенов (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре);
- *Рекомбинантные* — в которых используются полученные генно-инженерным способом белки-аналоги определённых белковых антигенов возбудителя;
- *Пептидные* — использующие химически синтезированные фрагменты белков.

Общее направление развития ИФА-диагностикумов — это направление от лизатных тест-систем, которые принято называть тест-системами первого поколения, к рекомбинантным и пептидным. Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в достаточно чистом виде аналог практически любого отдельного антигена. Для создания высококачественной рекомбинантной тест-системы необходимо из всего антигенного многообразия возбудителя выбрать антигены, которые были бы иммуногенными (то есть, в организме инфицированного человека должны вырабатываться антитела к этим антигенам) и высоко специфичными (то есть, характерными лишь для данного возбудителя и, по возможности, не дающими перекрёстных реакций с антителами к другим антигенам). Кроме того, большое значение имеет качество очистки рекомбинантных белков. В идеальном случае возможно получение рекомбинантной тест-системы практически со 100%-ной специфичностью при высокой чувствительности. На практике этого не всегда удаётся достичь, однако специфичность лучших рекомбинантных тест-систем приближается к 100 %.

Литература

- ❖ Галактионов В.Г. Иммунология. Издательство Московского университета, 1998 г.
- ❖ Кишкун А.А. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. Медицинское информационное агентство, 2009 г.
- ❖ Кондратьева И.А. Практикум по иммунологии. Учебное пособие для ВУЗов. Академия, 2004 г.
- ❖ Лефковитс И., Пернис Б. Иммунологические методы исследования. Мир, 1988 г.
- ❖ Ройт А., Бростофф Д., Мейл Д. Иммунология. Мир, 2000 г.