

**Иммуноферментный анализ
(ИФА).**

Иммуноблоттинг.

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

- лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, бактерий, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело.

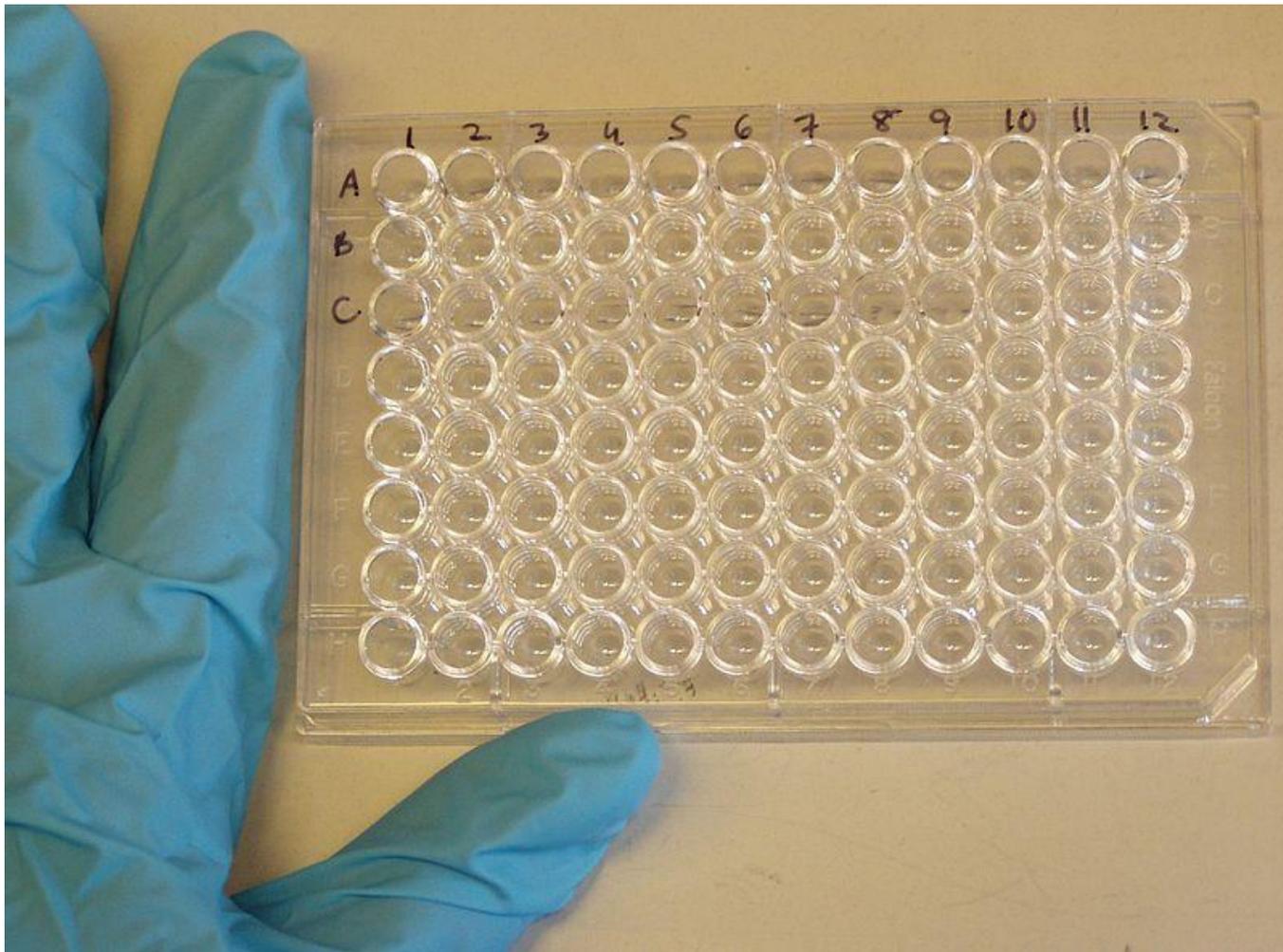
В ИФА иммунореагенты (чаще антитела), конъюгированы с ферментом-меткой (пероксидазой, бета-галактозидазой или щелочной фосфатазой).

После соединения антигена с меченной ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат/хромоген. Субстрат расщепляется ферментом, изменяется цвет продукта реакции.

Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Метод отличается высокой чувствительностью – обычно достаточно присутствия антигена в концентрации 1 нг/мл.

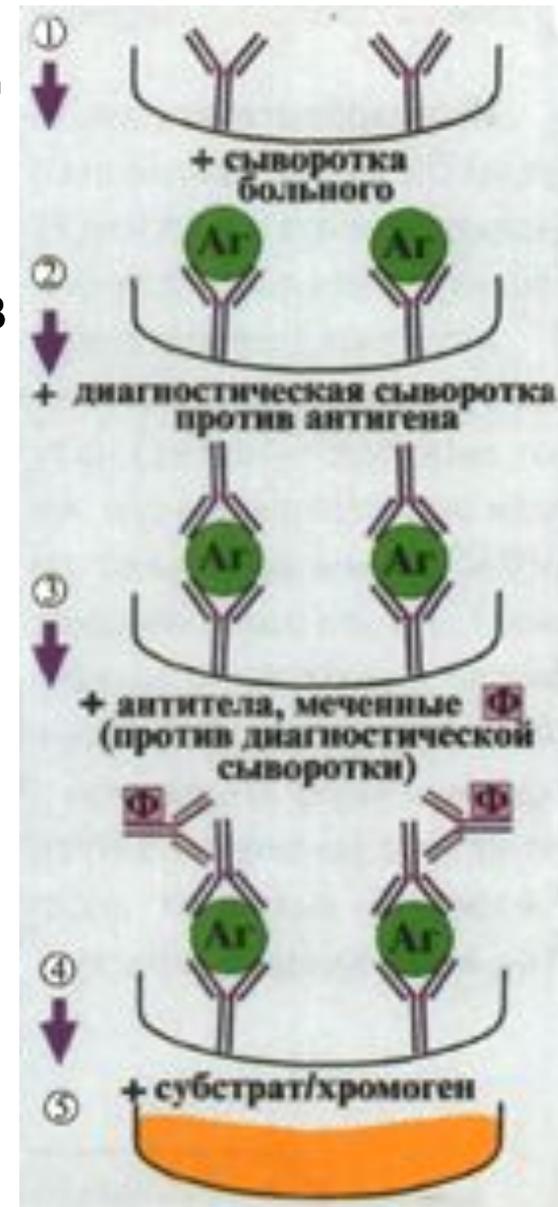
Результат реакции оценивается **спектрофотометрически** или **визуально**.



Твердофазный ИФА - вариант теста, когда один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе, напр., в лунках планшеток из полистирола.

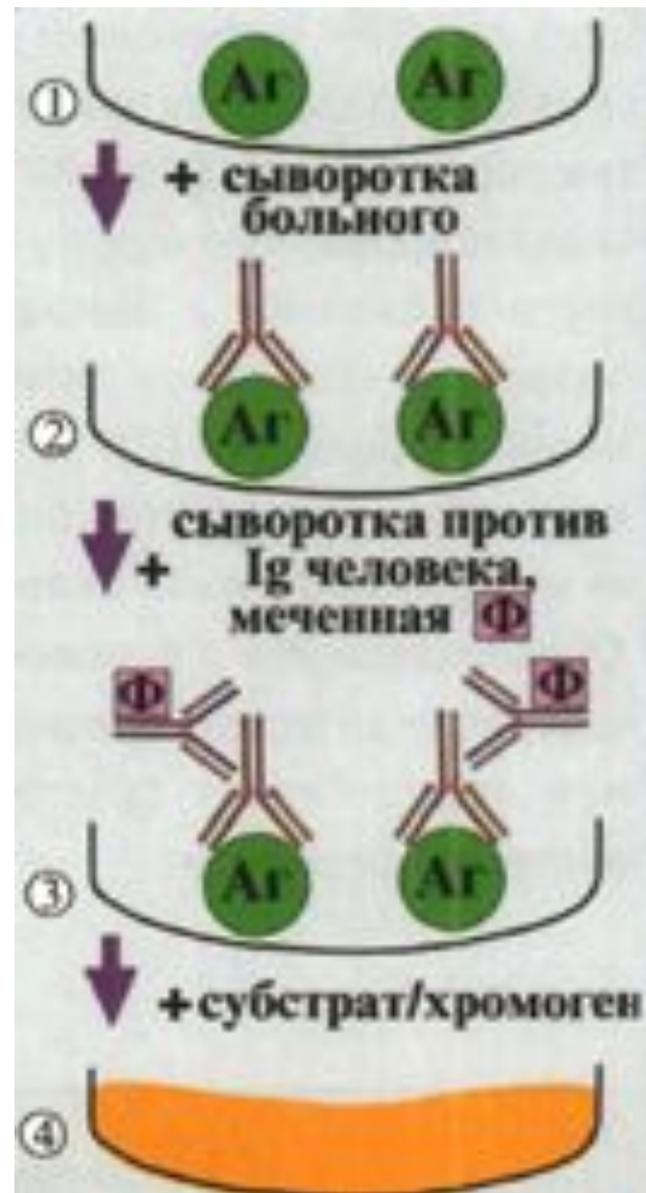
Обнаружение антигена при помощи ИФА.

1. Адсорбция специфических антител на твердой фазе.
2. Добавление исследуемого материала, в котором предполагается наличие антигена (напр., сыворотки больного).
Промывание луночек планшета.
3. Добавление специфической сыворотки, содержащей антитела против данного антигена
4. Добавление вторичных антител (против диагностической сыворотки), меченных ферментом.
5. Добавление субстрата, по изменению цвета которого оценивают результат.



Обнаружение антител при помощи ИФА.

1. Адсорбция специфических антигенов на твердой фазе.
2. Добавление исследуемого материала, в котором предполагается наличие антител (напр., сыворотки больного).
Промывание луночек планшета.
3. Добавление специфической сыворотки, содержащей антитела против Ig человека, меченные ферментом.
4. Добавление субстрата, по изменению цвета которого оценивают результат.



- 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.
- Ложноотрицательные результаты при определении антител могут быть обусловлены состояниями иммунодефицита, а также техническими ошибками при постановке реакции.

Преимущества ИФА: удобство в работе, быстрота, объективность за счёт автоматизации учёта результатов, возможности исследования иммуноглобулинов различных классов отдельно (что важно для ранней диагностики заболеваний и их прогноза).

ИММУНОБЛОТИНГ (от англ. blot,

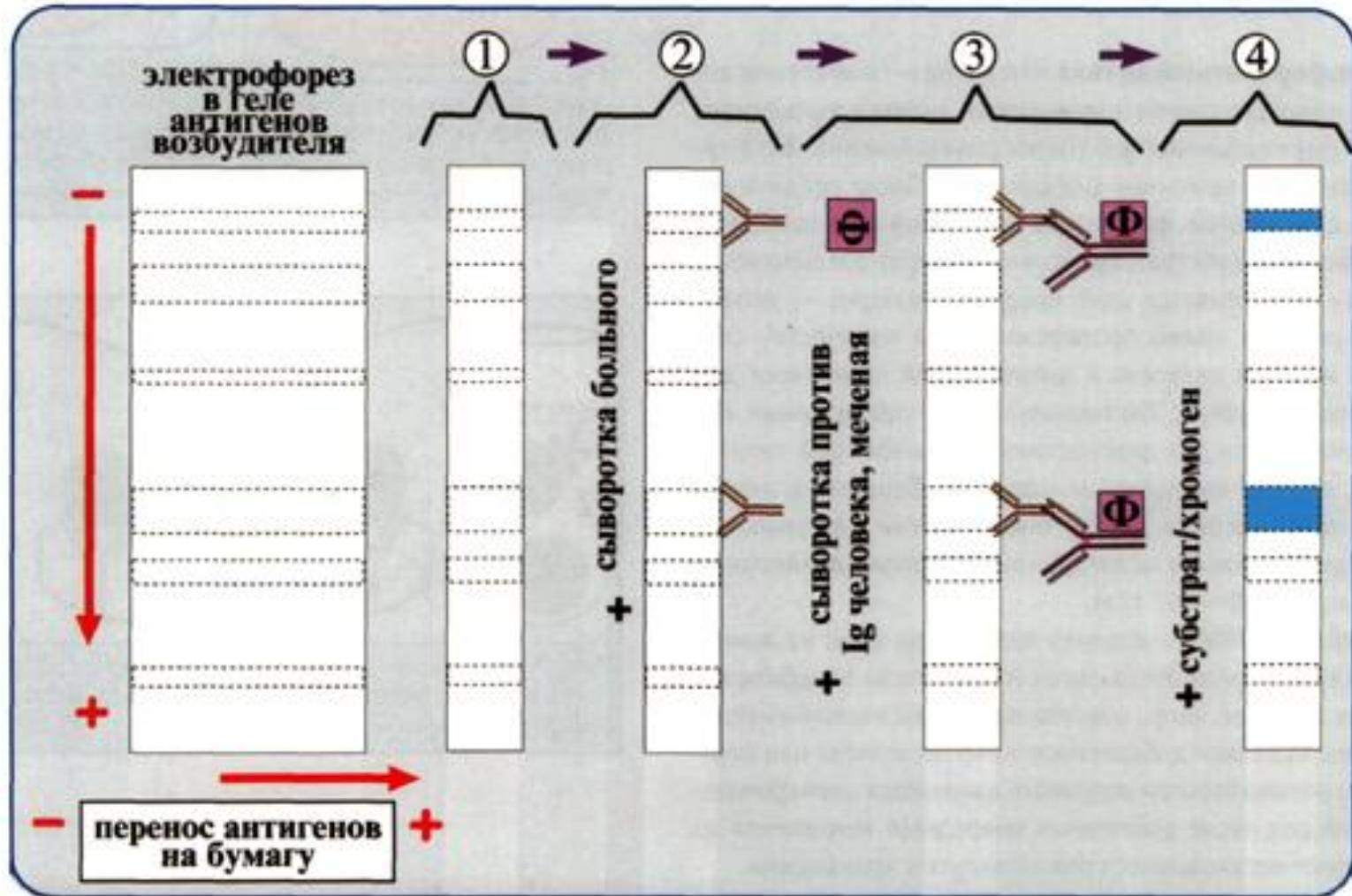
пятно)

- высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА.

Последовательность:

1. Разделение антигенов возбудителя с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.
2. Перенос разделенных молекул – блоттинг (от англ, blot - пятно) из геля на нитроцеллюлозную мембрану и проявление с помощью ИФА:
 - Нанесение сыворотки больного на полученные "блоты" антигенов.
 - Нанесение сыворотки против Ig человека, меченной ферментом.
 - Выявление образовавшегося на полоске комплекса [антиген + антитело больного + антитело против Ig человека] добавлением хромогенного субстрата, изменяющего окраску под действием фермента.

Иммуноблоттинг (схема).



- На практике наиболее часто метод иммуноблоттинга применяют для идентификации антигенов (белков) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).