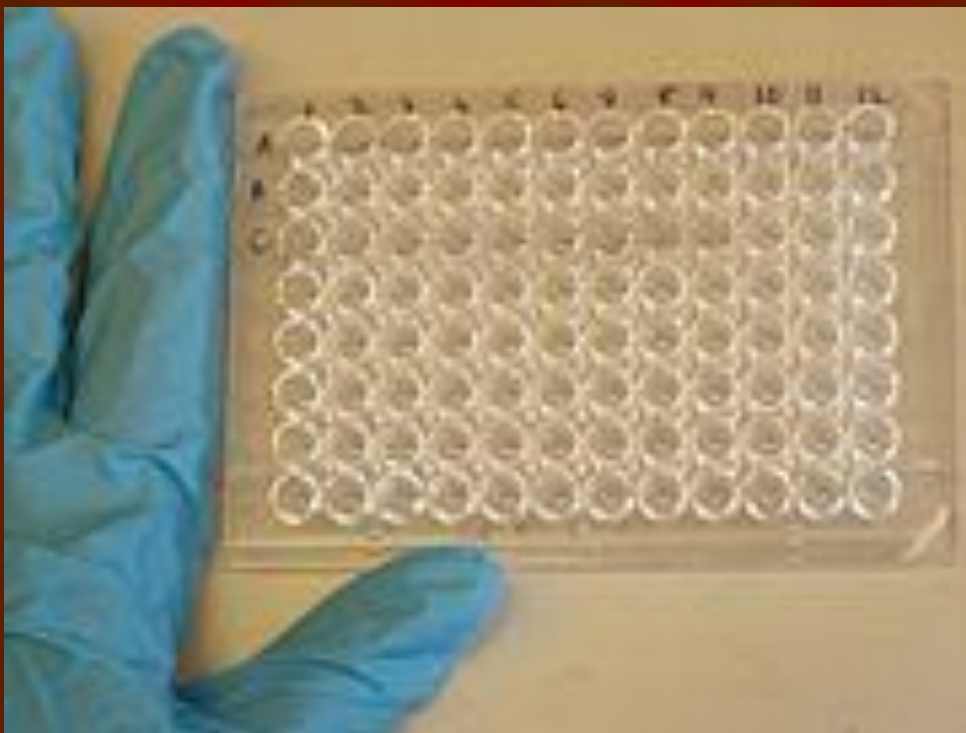
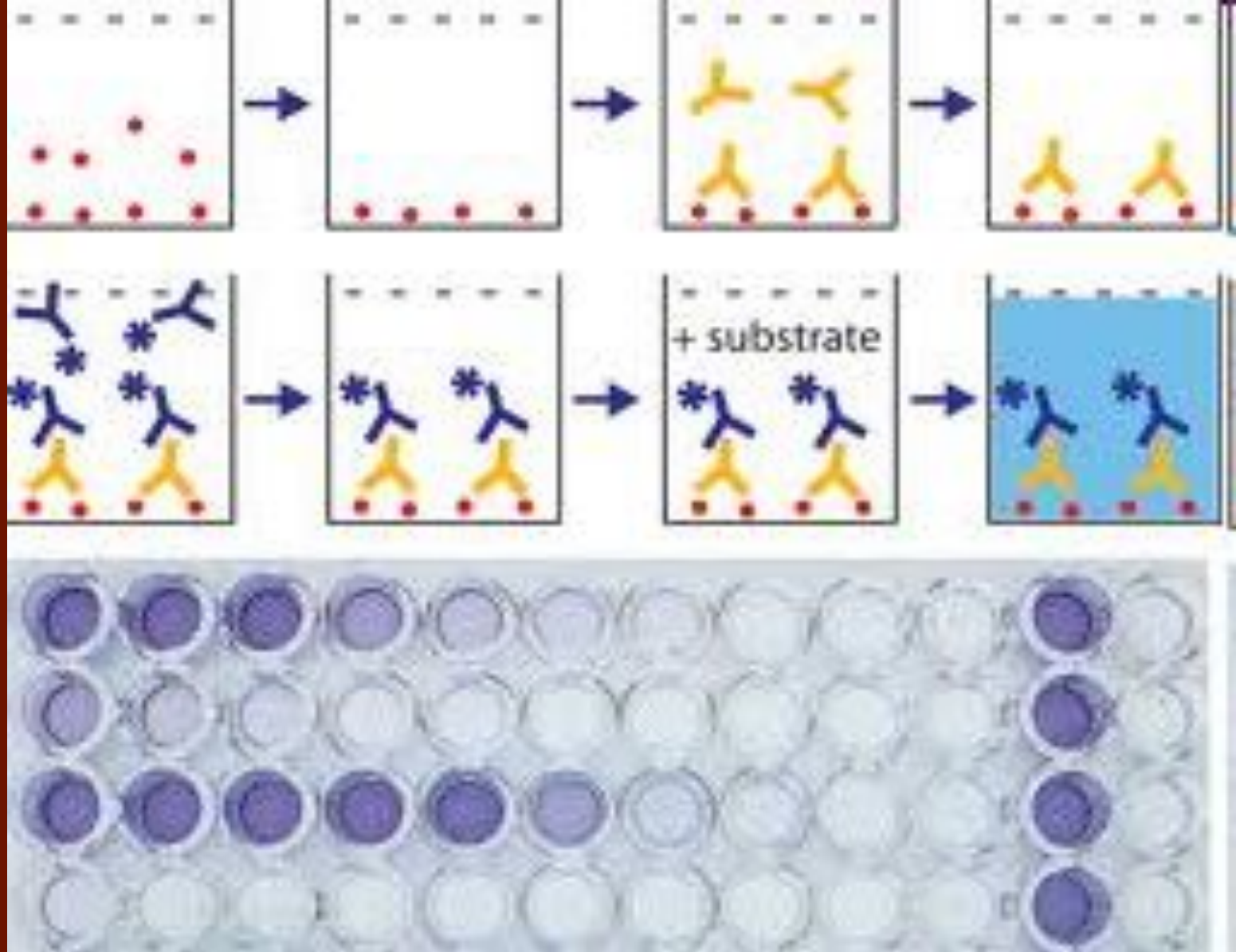


*ИФТ әдісі, оны
иммуноглобулиндердің,
цитокиндердің және ерігіш түрдегі
рецепторлардың концентрациясын
анықтау үшін қолдану мен қою
принциптері*



**Иммундық ферментті талдау (сараптама) –
антиденелер мен антигендерді сандық және
сапалық анықтау иммунологиялық
зертханалық әдісі**

70-шы жылдардың басында ИФТ әдісін
ашқан ғалымдар: Швеция ғалымдары –
Engvall және **Perlmann** Нидерланд
ғалымдары - **van Weemen** және **Schuur**,
АҚШ ғалымы - **Rubenstein**



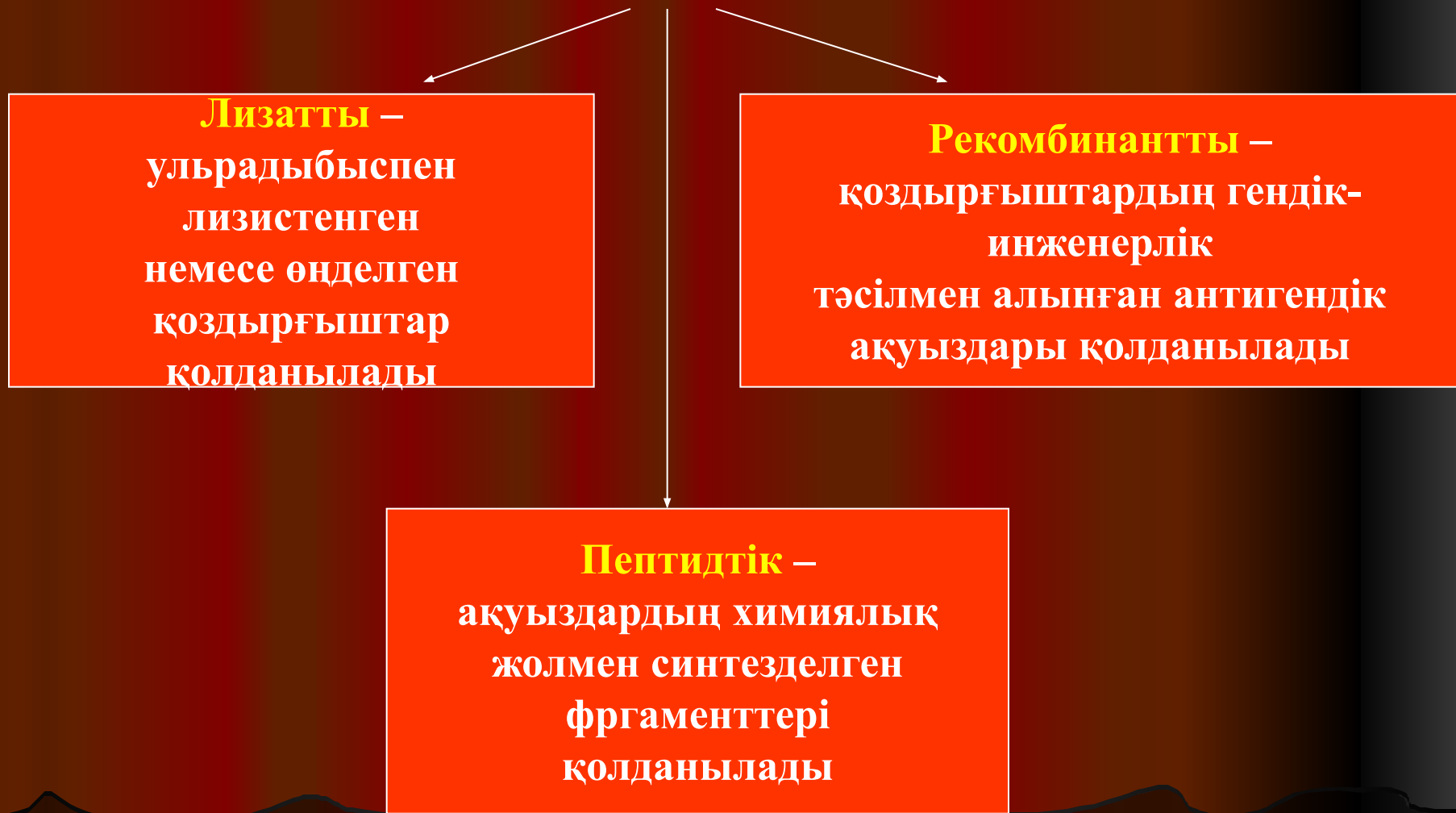
ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) –

Әдіс **антиген** мен оған сәйкес **антидене** арасындағы спецификалық әрекеттесу принципімен жасалады. Комплексті анықтау үшін **ферментті белгімен** (пероксидаза, сілтілі фофатаза, глюкозооксидаза, ацетилхолинэстераза, каталаза және т. б.) байланысқан анти-антидене болып табылатын арнайы **конъюгат** (адам Ig қарсы қоян антиденелері немесе моноклондық антиденелер) қолданылады.

Спецификалық антиденелерді анықтау әдісі (сэндвич әдісі)

- Планшет ойықтарына қоздырғыштың антигені орнатылып, зерттелетін сары сумен бірге инкубацияланады. Спецификалық антиденелер болған жағдайда олар байланысып, антиген-антидене комплексі түзіледі.
- Одан кейін бұл комплекс конъюгатпен инкубацияланған кезде анти-антиденелер антиген-антидене комплекстерімен байланысады.
- Ферменттік реакция (түрлі-түсті реакция) сутегі тотығы мен пероксидазды реакция процесінде тотығып, боялатын субстраттың қатысумен жүреді.
- Боялу қарқыны анықталатын спецификалық антиденелердің санына байланысты болады.
- Нәтижесі спектрофотометрмен немесе визуалды бағаланады.

Антиденелерді анықтауға арналған иммуноферментті сынама-жүйелерінің түрлері:



Иммуноферментті талдаудың түрлері:

Гомогенді ИФТ –
сараптаманың барлық
кезеңдері суда жүргізіледі

**Гетерогенді немесе қатты
фазалы ИФТ** –
реакцияның бір компоненті
антиген немесе антидене
арнайы қатты
тасымалдағыштарда
– полистрироды планшет немесе
пробиркада орнатылады

Аралас ИФТ –
ақуыздардың химиялық
жолмен синтезделген
фрагменттері
қолданылады

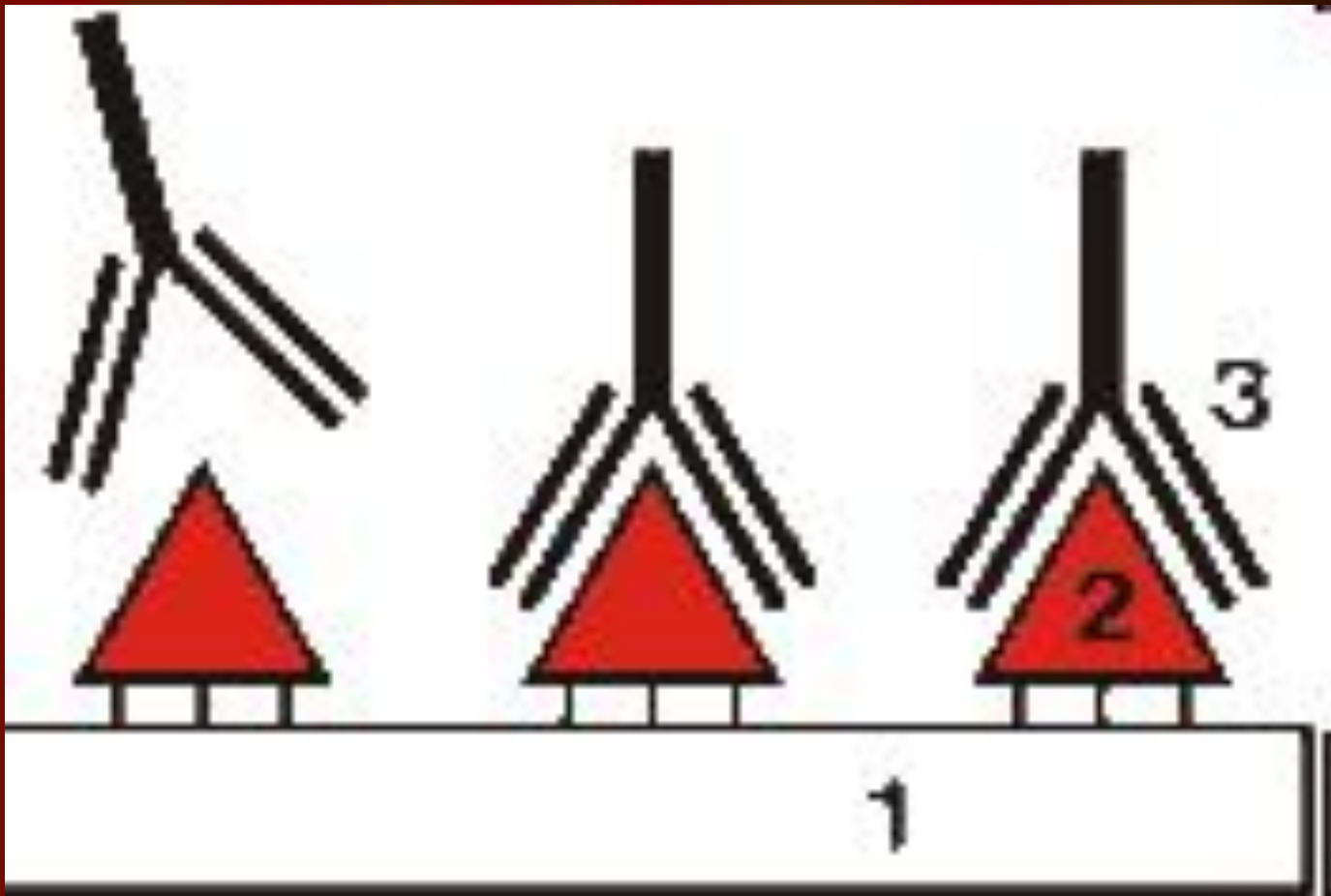
Иммуноферментті талдаудың түрлері:

**Қарапайым бәсекелес емес
(конкурентті емес) ИФТ –**
бірінші кезеңде жүйеде
антигеннің зерттелетін
байланысы және байланыс
орталықтары бар
спецификалық антиденелер
болады

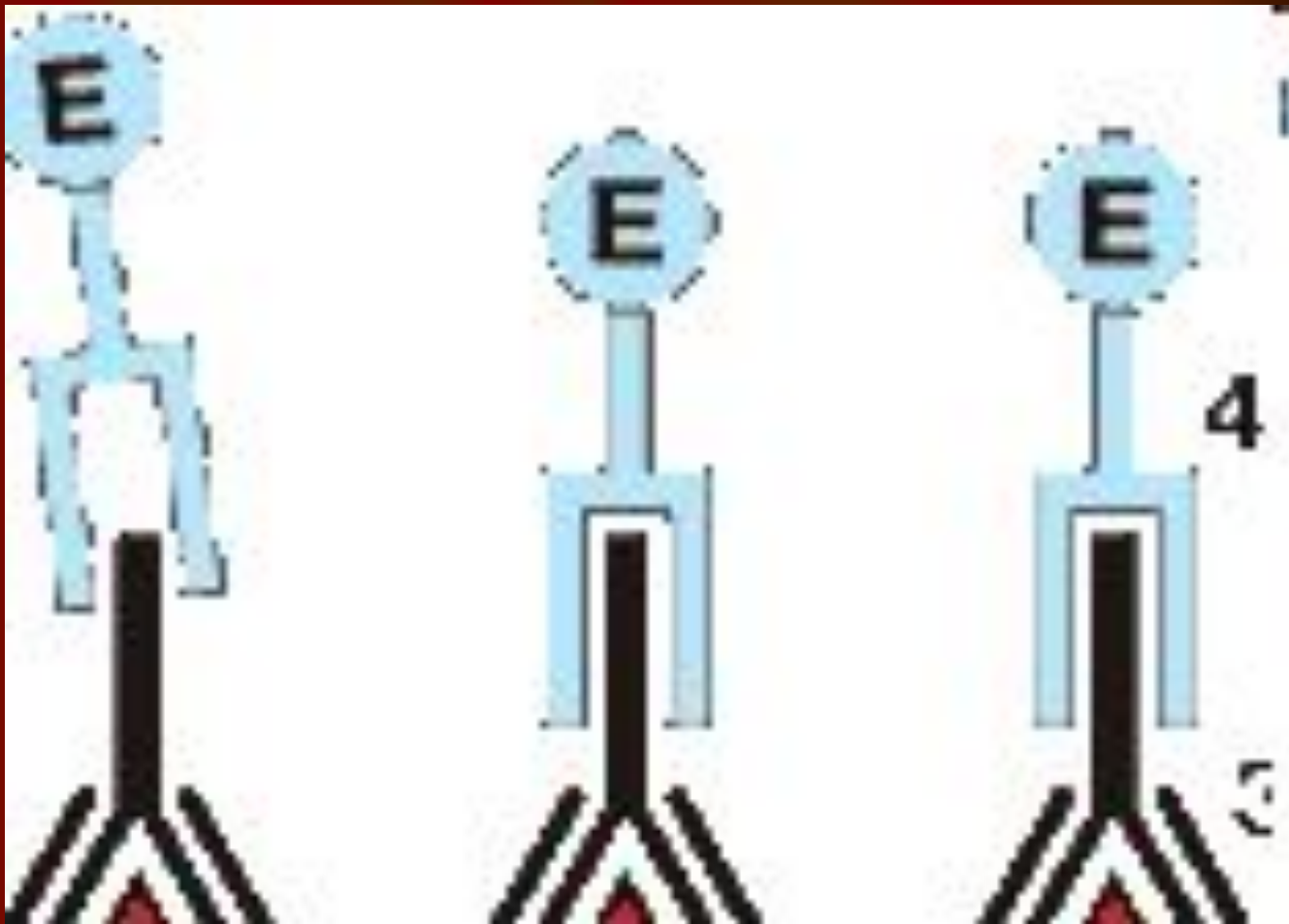
**Күрделі бәсекелес
(конкурентті) ИФТ –**
Зерттелетін байланыспен
бірге оның антиденелердегі
спецификалық байланыс
орталықтарына бәсекелес
аналогы болады

Гетерогенді қатты фазалы ИФТ

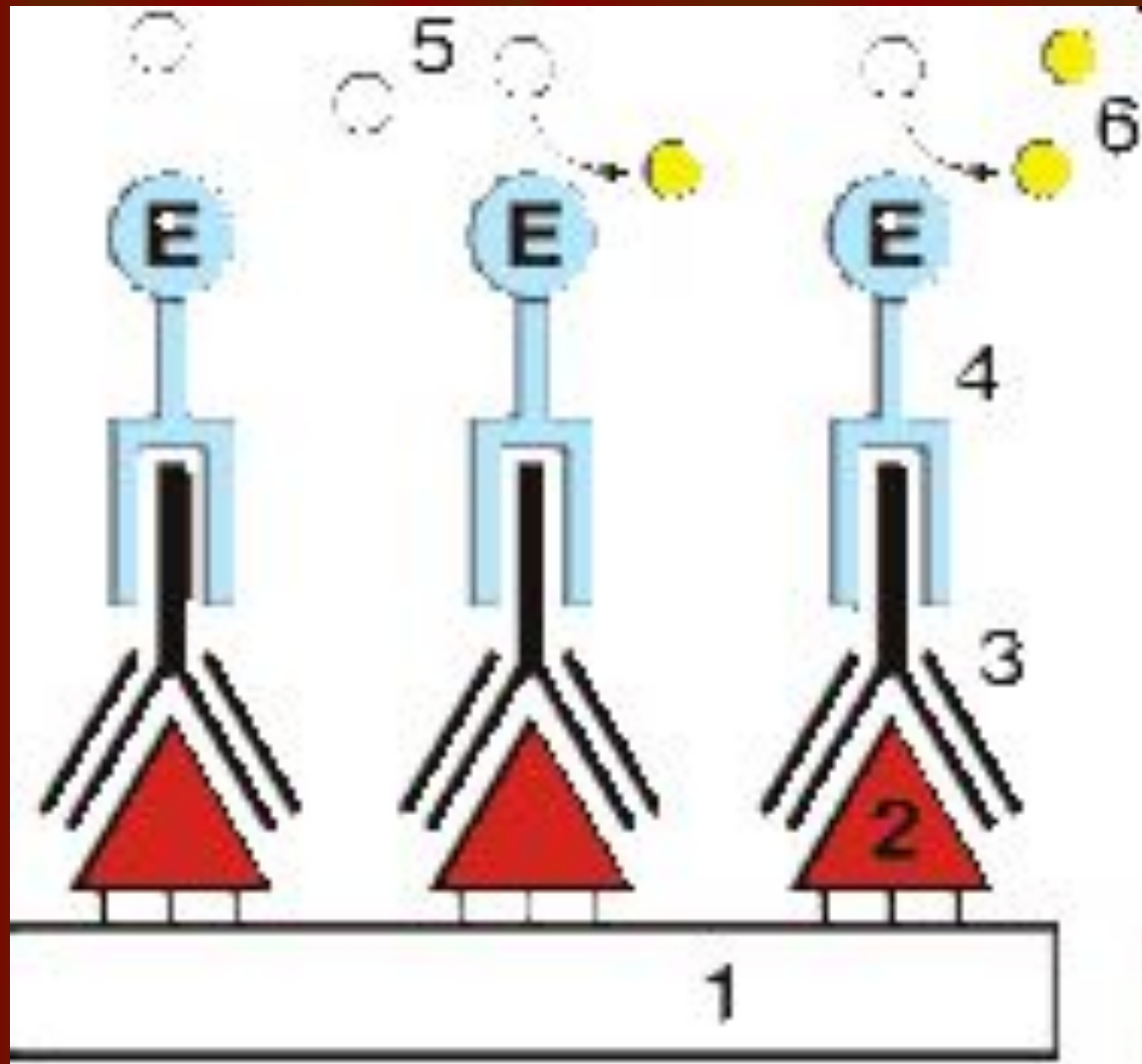
Қатты фаза ретінде полистиролды
96 ойықты планшет
пайдаланылады



Бұл схемада антигендер (2) планшеттің ойықтарына (1) орнатылған. Ойыққа зерттелетін сары су енгізіледі. Егер сары суда антигендерге қарсы антиденелер (3) болса, инкубациялану кезінде антиген/антидене байланысы түзіледі.

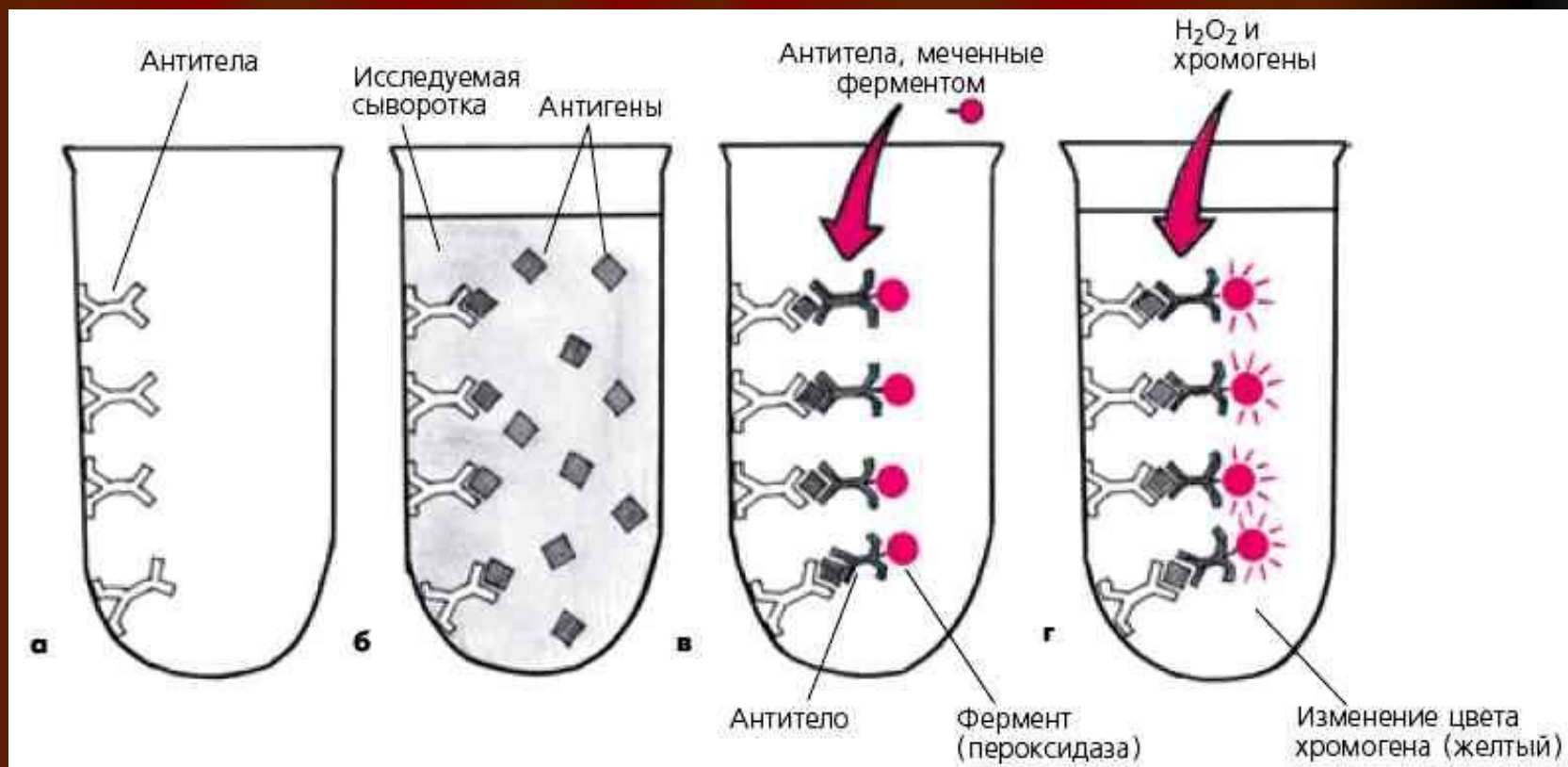


Планшеттің ойықтарын байланыспаған субстанциялардан (яғни спецификалық емес антиденелерден) тазалап, оған екінші антиденелер (4) қосылады. Бұл антиденелерге белсенді фермент (E) бекітілген. Мұндай комплекстік байланысу **конъюгат** деп аталады. Инкубациялану кезінде ойықта сэндвич тәрізді құрылым түзіледі.



Планшеттің ойықтарын байланыспаған конъюгаттан тазалап, оған түссіз субстрат (5) қосылады, бұл субстратқа фермент (E) әсер етіп, оны бояйды (6).

ИФТ жүргізу схемасы



- а – пробирканың қабырғасында белгілі антигенге қарсы антиденелер;
б – зерттелуші сары су қосылады, егер онда антигендер болса, олар антиденелермен байланысып, пробирканың қабырғасына бекітіледі;
в – белгілі антигенге қарсы ферментпен белгіленген антиденелерді енгізу, олар қабырғадағы иммундық комплекспен байланысады;
г – сутегі асқын тотығы мен хромогенді қосқанда оттегінің әсерімен сары түске боялады.

Иммуноферментті талдаудың қолданылуы:

- Жұқпалы ауруларды диагностикалау (IgA, IgM, IgG антиденелері), аурудың кезеңін анықтау
- Аутоиммундық ауруларды диагностикалау
- Аллергияны диагностикалау
- Гормондарды анықтау
- Онкомаркерлерді анықтау
- Цитокиндерді анықтау

ИФТ нәтижелерін бағалау

Ауру кезеңі	IgM	IgA	IgG
Теріс нәтиже	-	-	-
Алғашқы 2 апта	-	+	-
2,5-3 апта	+	+	-
3-4 апта	+	+	+
Жазылу кезеңі	-	Емделгеннен кейін титрдің 2-4 есе төмендеуі	Емделгеннен кейін титрдің 4 есе төмендеуі
Созылмалы кезең	-	төмендеуі	+
Ауру өршуінен кейін 2 аптадан соң	-	+	+
Жазылған ауру	-	-	+

Диагностика кезінде ескеру керек:

1. Зерттеуді аурудың ерте кезеңінде өткізу керек.
2. Бір уақытта бірнеше спецификалық антиденелерді анықтаған (немесе IgM және IgG антиденелерін) жөн, бұл біріншілік инфекцияны диагностикалау үшін қажет.
3. Аурудың динамикасын бағалау үшін антиденелердің санын анықтау қажет.
4. Белсенді және жасырын инфекцияны айыру үшін IgG авидтілігі деңгейін сараптау.
5. Бұрын жұқтырылған инфекцияның нәтижесінде антиденелер төмендеген иммунитетте, ақуызды ашығу кезінде анықталмауы мүмкін.

ELISPOT

(enzyme linked immunosorbent assay spots)

Кейс университетінің (Кливленд, Огайо штаты) ғалымдары және STL Analyzers LLS компаниясының қызметкерлері алғашқы сараптама анализаторы ашқан мен мәліметтерді өңдеу және есте сақтау үшін бағдарламаламен қамтамасыз еткен.

ELISPOT әдісімен Т- және В-жасушаларды сараптау үшін қолданылады.

ELISA әдісінен айырмашылығы гидрофобты мембрананың бетіндегі антиденелер жасушаның белгілі өнімін (цитокиндер) байланыстырады.

ИФТ әдісімен Т-лимфоциттердің
мембранасында кейбір
маркерлердің (CD2, CD3, CD4, CD8)
экспрессиялану деңгейін анықтау

Техникасы:

1. Планшет ойықтарына 100 мкл-ден Т-лимфоциттерді енгізу
2. Планшетті 1 сағат бойы 37°C температурада инкубациялау
3. Планшетті екі рет фосфатты-тұзды буфермен шаю
4. Ойықтарға 100 мкл-ден 0,5% бұқа сары су альбумині (БСА) енгізіледі
5. Планшетті 1 сағат бойы 37°C температурада инкубациялау
6. Планшетті екі рет фосфатты-тұзды буфермен шаю
7. Ойықтарға лимфоциттердің CD2, CD3, CD4, CD8 маркерлеріне сәйкес 100 мкл-ден моноклондық антиденелер енгізіледі
8. Планшетті 1 сағат бойы 37°C температурада инкубациялау

Техникасы:

9. Планшетті екі рет фосфатты-тұзды буфермен шаю
10. Ойықтарға лимфоциттердің 100 мкл-ден қой IgG конъюгаттары (пероксидазамен белгіленген) енгізіледі
11. Планшетті 1 сағат бойы 37°C температурада инкубациялау
12. Планшетті екі рет фосфатты-тұзды буфермен шаю
13. Ойықтарға лимфоциттердің 100 мкл-ден субстрат (цитратты буфердағы 0,2% сутегі пероксиді ерітіндісі мен ортофенилендиаминдигидрохлорид) енгізіледі
14. Планшетті 10 минут 20°C қараңғы жерде инкубациялау
15. Ойықтарға 50 мкл-ден 50% күкірт қышқылы (стопреагент) енгізіледі
16. Ойықтардың құрамының рптикалық тығыздығын вертикалді фотометрде өлшеу

Иммуноферментті талдаудың артықшылықтары:

- Жоғары сезімталдық (ферменттің бір молекуласы) – 70-80%
- Спецификалық – 95%
- Зерттелуші материалдың ең аз мөлшерін қолдануға болады
- Реакцияны жүргізу өте қарапайым, оңай
- Реакцияның барлық кезеңдерін автоматизациялау мүмкіншілігі
- Экологиялық таза және медперсонал үшін қауіпсіз
- Диагностикалық жинақтар бағасы арзан