

Профессор кафедры биохимии и
молекулярной биологии,
Д.м.н. Спирина Людмила Викторовна

Иммунохимические
методы. ИФА –
иммуноферментный анализ

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- Иммунохимические методы анализа основаны на специфическом связывании определяемого соединения с соответствующими антителами.

Классификация иммунохимических методов анализа

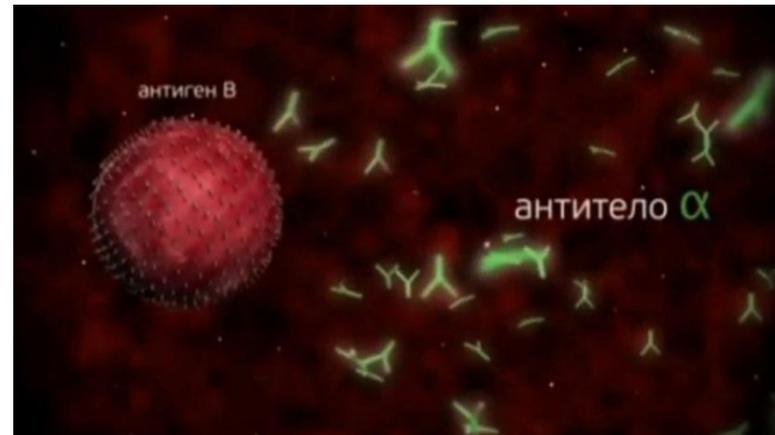
Метод	Способ детектирования
Иммуноферментный анализ (ИФА)	Ферментная активность
Флуоресцентно-поляризационный иммуноанализ (ФПИА)	Интенсивность флуоресцентной поляризации
Радиоиммунный анализ (РИА)	Радиоактивность
Люминесцентный иммуноанализ (ЛИА)	Интенсивность люминесценции
Иммуносенсорные методы	Электрический сигнал
Спин-иммунологический анализ (СИА)	Электронный спин-резонанс свободных радикалов
Металлоиммуноанализ (МИА)	Атомарные спектры поглощения
Нефелометрические иммунометоды	Преломление света

Индикация образующегося комплекса антиген-антитело может быть осуществлена, различными методами.

- 1. Радионуклид используется при радиоиммунном анализе (РИА).
- 2. Ферменты, катализирующие превращение *бесцветного* субстрата в *цветной* или *флюоресцирующий* продукт. В данном случае исследование называют иммуноферментным анализом (ИФА), его разновидность - анализ иммуноферментно-флюоресцентный.
- 3. Флюоресцирующие, люминесцирующие вещества и др.

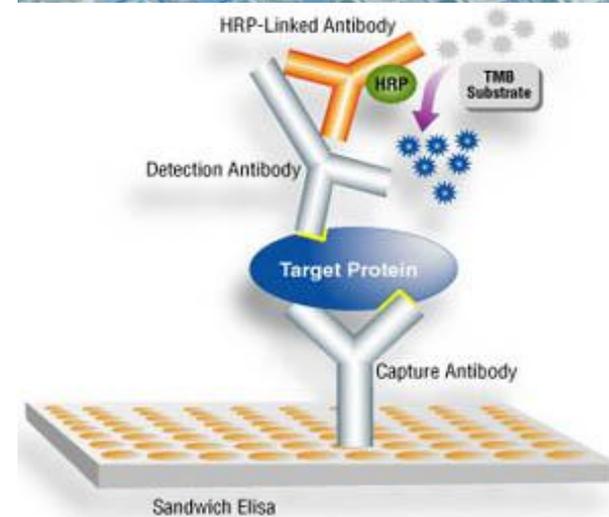
ИСТОРИЯ

- Исторически первым среди них был **радиоиммунологический анализ (РИА)**
- В середине 60-х годов для идентификации и локализации антигенов в качестве высокочувствительной метки было предложено использовать молекулы ферментов.
- На протяжении последних трех десятилетий **иммуноферментные методы анализа** интенсивно развивались как в теоретическом, так и практическом плане.



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

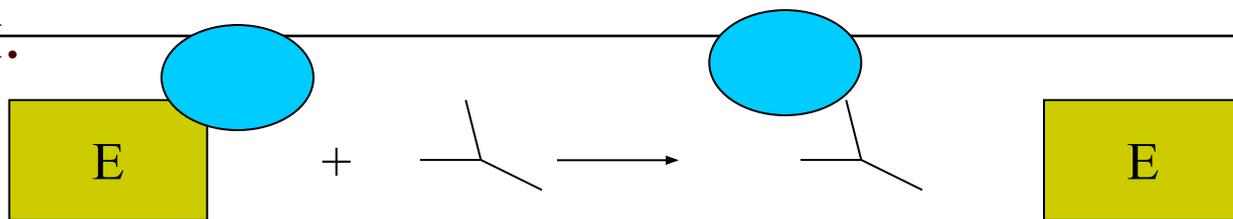
«Твердая фазы» для ИФА

- 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

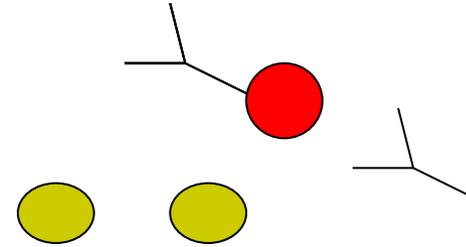
ЕМІТ (enzyme multiplied immunoassay technique) – способ гомогенного ИФА, основанный на связи с ферментами.



- 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**.

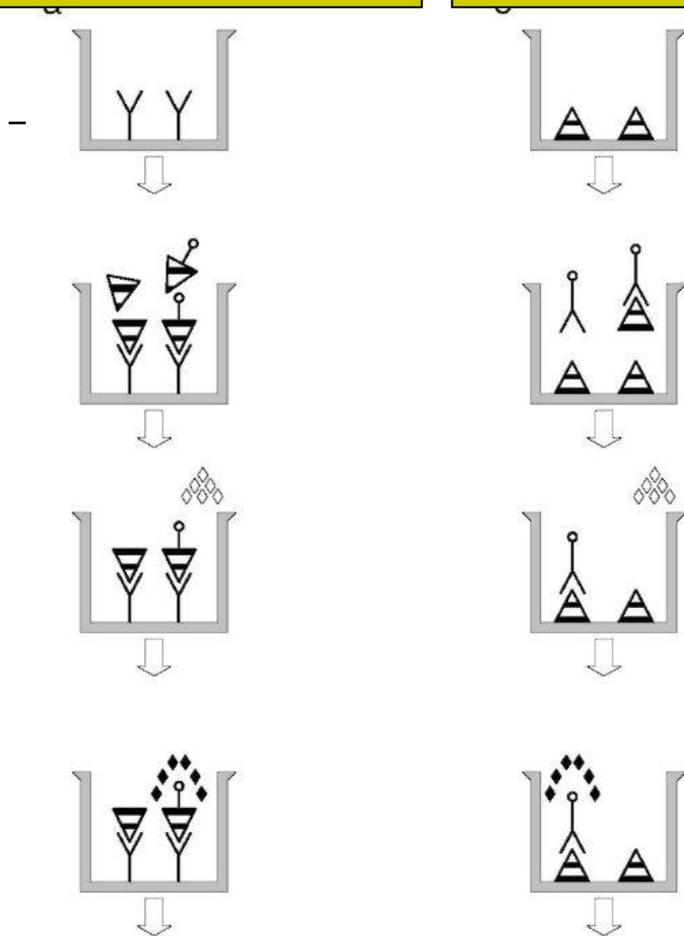
- Величина детектируемого сигнала находится в обратной зависимости от концентрации антигена.

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

конкурентный

ингибиторный

Ингибиторный ИФА



В ингибиторном ИФА на твердой фазе иммобилизуют антиген. Растворимые антитела как реагент конъюгированы с ферментом. Определяемый антиген в испытуемой пробе конкурирует с иммобилизованным на твердой фазе антигеном за растворимые антитела. В итоге ферментативная активность, измеряемая на твердой фазе, **обратно пропорциональна** концентрации определяемого вещества в пробе.

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

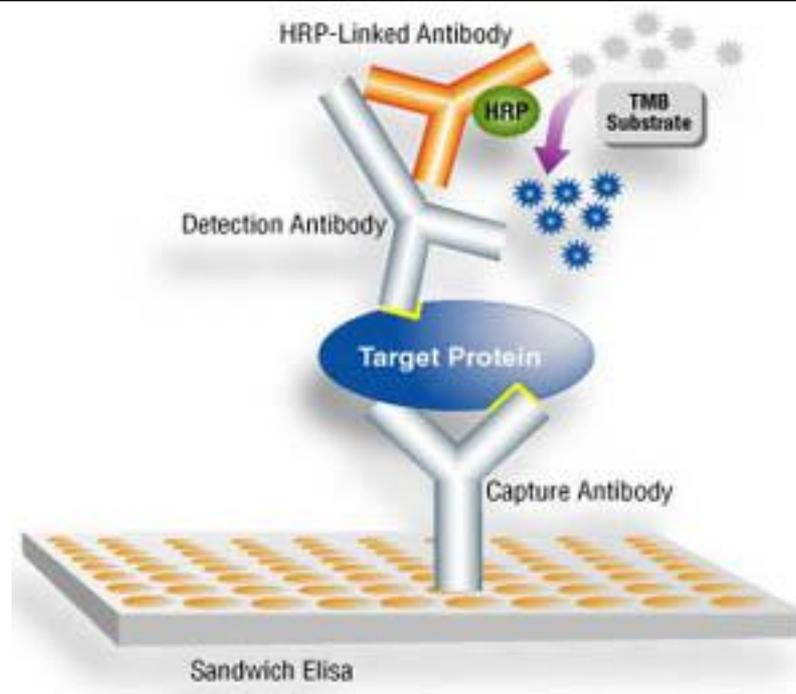
- К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации образуется комплекс антиген-антитело.
- Добавляют меченные ферментом специфические антитела.
- Ферментативная реакция –при добавлении субстрата
- Определяют ферментативную активность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



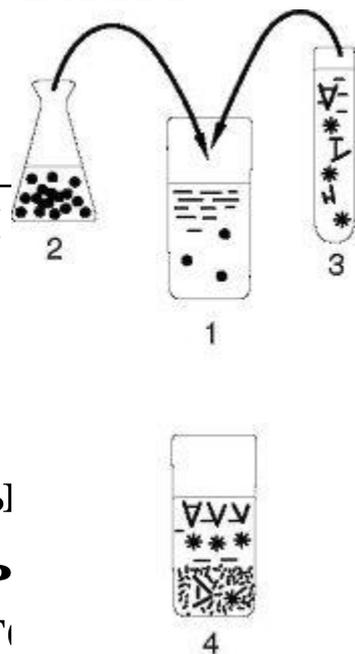
«СЭНДВИЧ»-МЕТОД -

пример *неконкурентного* ИФА

- «Сэндвич»-ИФА не требует препаратов очищенных антигенов, что выгодно отличает его от конкурентных и ингибиторных методик, поскольку чистые антигены всегда труднодоступны и дороги.
- Чувствительность «сэндвич»-ИФА потенциально выше, чем конкурентных и ингибиторных.
- Аналогичная технология применима и с использованием одного антитела (и на твердой фазе, и в составе конъюгата с ферментом) в случаях наличия на заданном антигене повторяющихся эпитопов.
- В современных модификациях ту же технологию называют ловушечным ИФА (**capture IA**) - антитела на твердой фазе «ловят» свой антиген из смеси веществ в биопробе.

Иммунометрический анализ

- При иммунометрическом анализе в пробирку с испытуемой пробой, предположительно содержащей определяемый антиген, вносят **заведомый избыток меченых антител**. Затем к этой смеси добавляют также **заведомый избыток иммобилизованного на мелкодисперсной твердой фазе антигена**.



- После инкубации центрифугированием отделяют растворимую фракцию (супернатант) и в ней измеряют ферментативную активность (если метка - фермент).

Непрямой ИФА

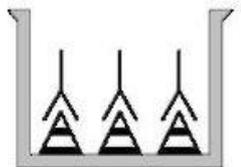
- Гетерогенный
 1. конкурентный
 2. ингибиторный
 3. Сэндвич-анализ (неконкурентный)
 4. иммуномерсентометрический

СХЕМА непрямого

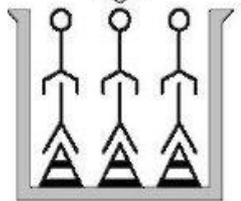
ИФА



Адсорбция антигена на
твердой фазе



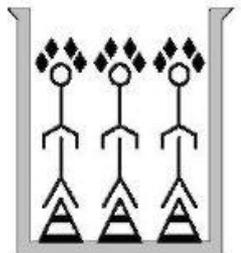
Внесение исследуемого материала
с содержащимися специфическими
антителами



Внесение антиглобулинового
конъюгата



Внесение субстрата

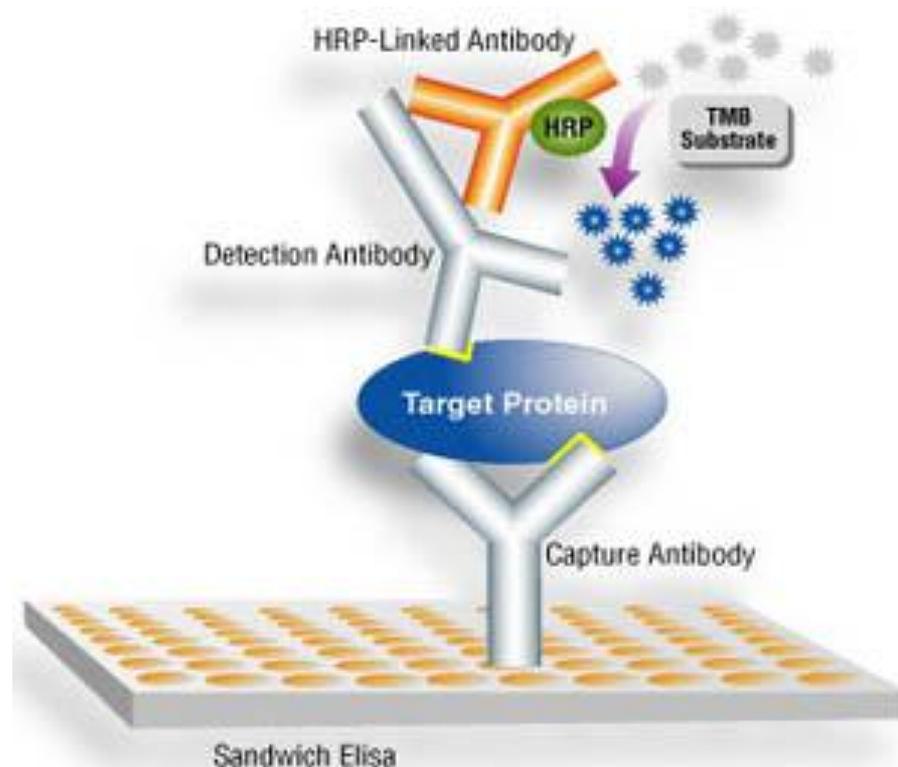


Образовшийся продукт реакции
выявляют на ИФА-ридере

- 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.

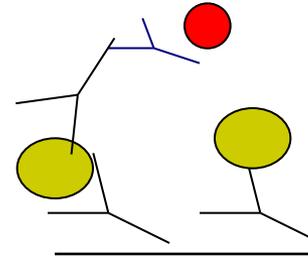
Непрямой «сэндвич»-метод

- 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).

Основные типы тест-систем в зависимости от используемых антигенов

Лизатные

смесь нативных антигенов
(лизированный или
обработанный
ультразвуком возбудитель
инфекции,
полученный в культуре)

Рекомбинантные

полученные генно-
инженерным способом
белки-аналоги 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.

«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

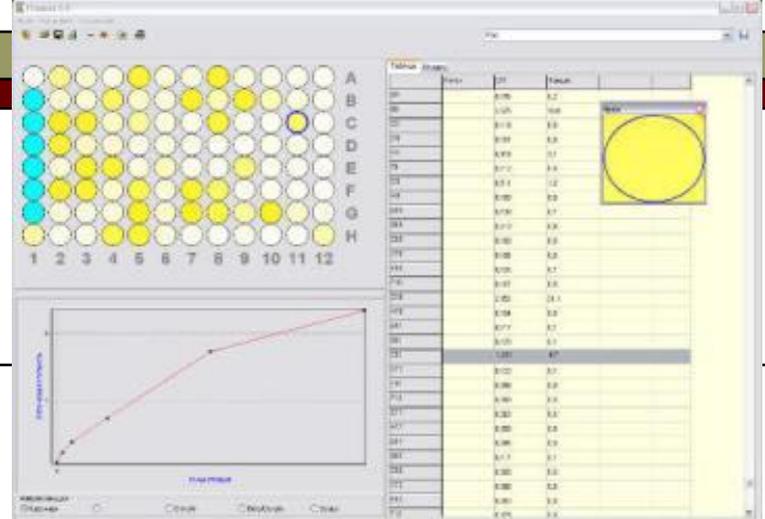
Недостатки ИФА:

- 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.

РИА – радиоиммунный анализ

- С целью определения гормонов в крови на современном этапе применяются различные методики. Каждая методика имеет свои недостатки и преимущества и используется с максимальной эффективностью. Так, с помощью биологических методик, как правило, можно определить наличие вещества, но нельзя сделать его количественную оценку. Таковую возможность дают количественные иммунохимические и неиммунохимические методы анализа.

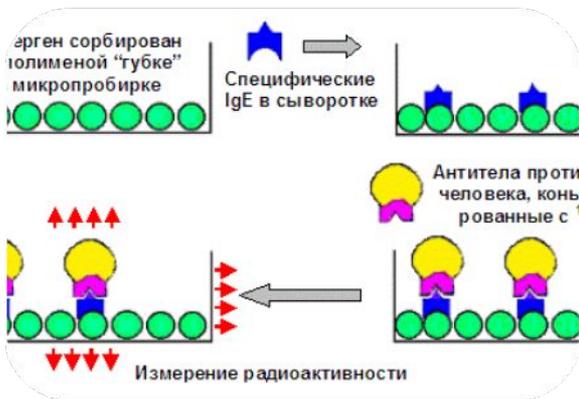
Принцип РИА

- Принцип, используемый в РИА, распространяется и на другие иммунохимические и неиммунохимические методы анализа - принцип конкурентного связывания.
- В основе РИА лежит феномен конкуренции: связывание антител с антигеном, меченным радиоактивным изотопом, подавляется в присутствии немеченого антигена.

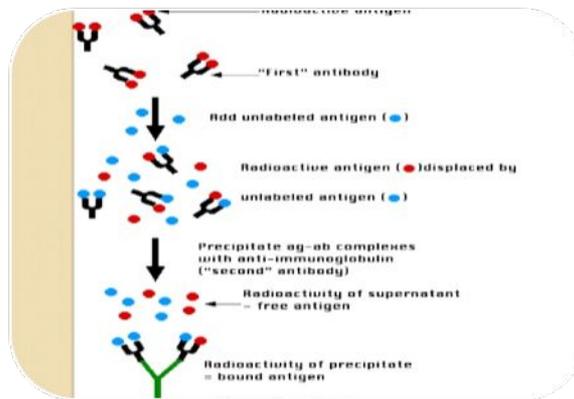
Методика РИА проста и включает следующие основные этапы:

- К антителам добавляют меченый антиген и пробу (содержащую неизвестное количество немеченого антигена).
- Реакционную смесь инкубируют при определенной температуре заданное время. Меченый и немеченый антигены конкурентно связываются с антителами, при этом образуются иммунные комплексы, содержащие либо меченый, либо немеченый антиген. Таким образом, к концу инкубации в реакционной смеси присутствуют меченные и немеченые иммунные комплексы, а также свободные меченные и немеченые антигены. Количество меченных иммунных комплексов обратно пропорционально количеству немеченого антигена в пробе.
- Чтобы оценить количество образовавшихся меченных иммунных комплексов, их отделяют от оставшегося несвязанным свободного меченого антигена.
- Определяют концентрацию антигена в пробе по калибровочной кривой. Для ее построения используют несколько стандартных калибровочных растворов с известными концентрациями немеченого антигена.

Разработано множество вариантов РИА.



Методика, описанная выше, называется твердофазным РИА.



Ранее применялась более трудоемкая и долгая в постановке жидкофазная РИА (все реагенты находились в растворенном состоянии).



Особая разновидность метода - иммунорадиометрический анализ (ИРМА), в котором используются меченые антитела, в отличие от РИА, где используются меченые антигены.

ПРЕИМУЩЕСТВО РИА

- Преимуществом практически всех РИА наборов является проведение анализа без предварительного разведения анализируемых проб. Таким образом, при достаточно широком диапазоне определяемых концентраций исключается дополнительный источник

РИА и влияние условий инкубации

- Следует также учесть, что ферментативная реакция (ИФА) сильно зависит от температуры, времени, pH, качества воды, степени попадания прямого света. Поэтому хорошие результаты с ИФА достигаются при использовании полностью автоматизированных (в большинстве закрытых) анализаторов, исключающих возможные неточности в процедуре анализа. Однако такие анализаторы очень дороги и ставят потребителя в зависимость от определенной фирмы.

Стоимость и качество РИА

- В настоящее время, сравнивая качество, получаемых методом РИА результатов, рядом достоин стоят лишь хемилюминесцентный или флуоресцентный анализ. Главным же недостатком хемилюминесцентных систем является их ориентация на закрытые автоматические анализаторы, что, несомненно, сказывается на стоимости анализа (в среднем в 2 раза выше, чем РИА методика).

по сравнению с другими биологическими и биохимическими методами РИА обладает

высокая чувствительность, позволяющая определять малые количества вещества (10^{-10} г/мл)

высокая специфичность, обусловленная принципом иммунологических (антиген-антитело) реакций;

высокая точность и воспроизводимость метода;

простота выполнения анализа и значительная пропускная способность, дающая возможность проводить без особых трудностей большое количество проб;

отсутствие лучевой нагрузки на больного.

Недостаток РИА , - НАЛИЧИЕ СПЕЦИАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ

- короткий срок «жизни» антител и антигенов, меченных радиоактивными изотопамиограниченный периодом полураспада изотопа;
- высокая стоимость разового определения, обусловленная стоимостью регистрирующей аппаратуры;
- отсутствие полевых вариантов регистрирующей аппаратуры;
- усиленные меры по технике безопасности, связанные с радиационным риском для персонала; риск загрязнения окружающей среды радиоактивными продуктами.

Разница между ПЦР и ИФА. ПЦР или ИФА не являются заменяемыми методами исследования

- **ИФА-анализ основан на выявлении не самой инфекции, а ее продуктов жизнедеятельности — белков-маркеров. ПЦР-анализ напротив выявляет существующие в настоящее время инфекционные агенты (бактерии, вирусы, грибы).**
- **Случается, что результаты ПЦР и ИФА-диагностики могут не совпадать. Обычно это происходит вследствие нескольких причин:**
 - «Иммунологический след» — «след» от уже перенесенной инфекции.
 - Разница в используемых тест-системах для проведения диагностики.

Разница между ПЦР и ИФА. ПЦР или ИФА не являются заменяемыми методами исследования

□ Разница в используемом материале.

Материал для ПЦР получают из места предполагаемой локализации инфекции. Для ИФА-диагностики разницы в месте нет, поскольку ИФА «реагирует» на антитела, которые вырабатываются при инфекционном процессе любой локализации.

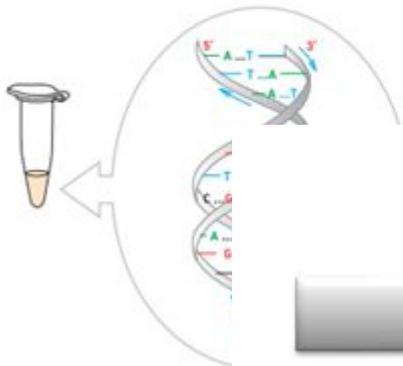
□ Хронические инфекционные заболевания могут стать причиной разницы в результатах ИФА и ПЦР-диагностики.

При этом зачастую ПЦР дает положительный, а ИФА — отрицательный результат. 1. Уставшая от хронического инфекционного процесса иммунная система может «не показать» повышенный уровень антител к инфекции.

□ 2. В случае «свежей» инфекции до 2 недель. ПЦР дает положительный, а ИФА — отрицательный результат.

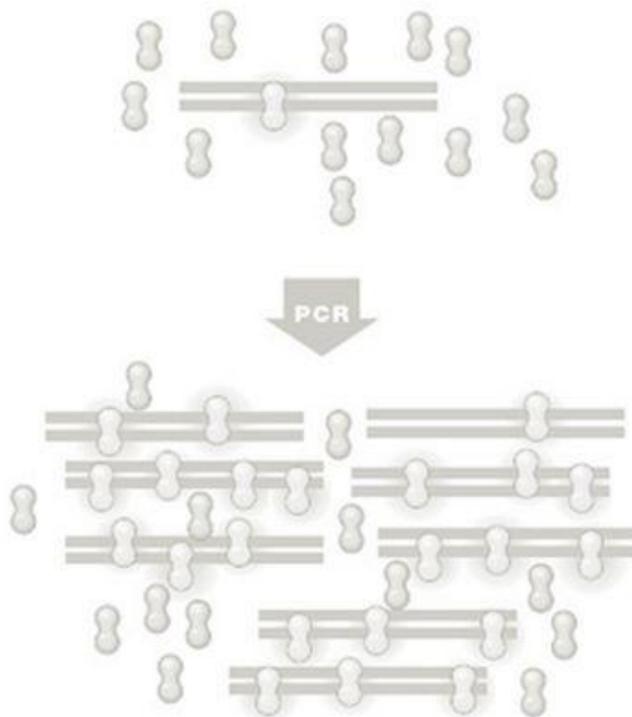
I этап
Выделение ДНК/РНК
(ручное или автоматизированное)

II этап
ПЦР в реальном времени



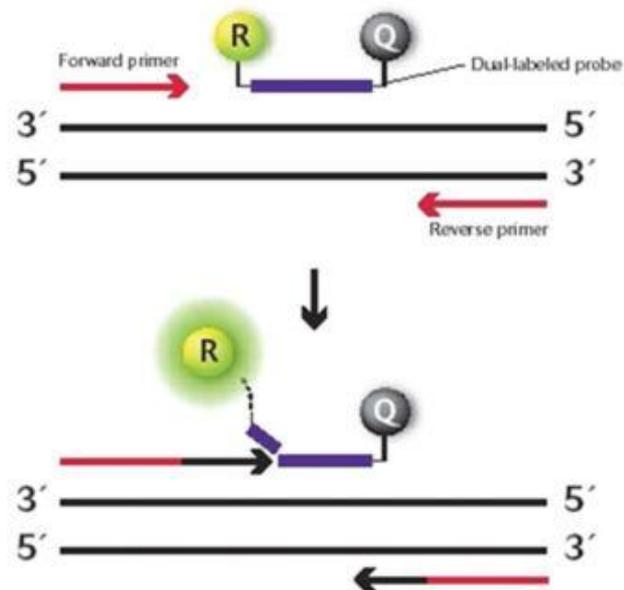
ПЦР «в реальном времени»

SYBR Green



Изображение взято с сайта: <http://www3.bio-rad.com>

TaqMan



Изображение взято с сайта: <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>

ПЦР в реальном времени.

- Сущность метода заключается в исследовании накопления продуктов амплификации с помощью специального прибора без последующего электрофореза.
- Так как кинетика накопления продуктов амплификации связана с исходным количеством матрицы, это дает возможность точно оценить её количество.

Преимущества

- Отсутствие стадии электрофореза позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов..
- Данная методика в ее сегодняшнем формате, благодаря экономии производственных площадей, уменьшению количества персонала и востребованности количественного определения ДНК/РНК.

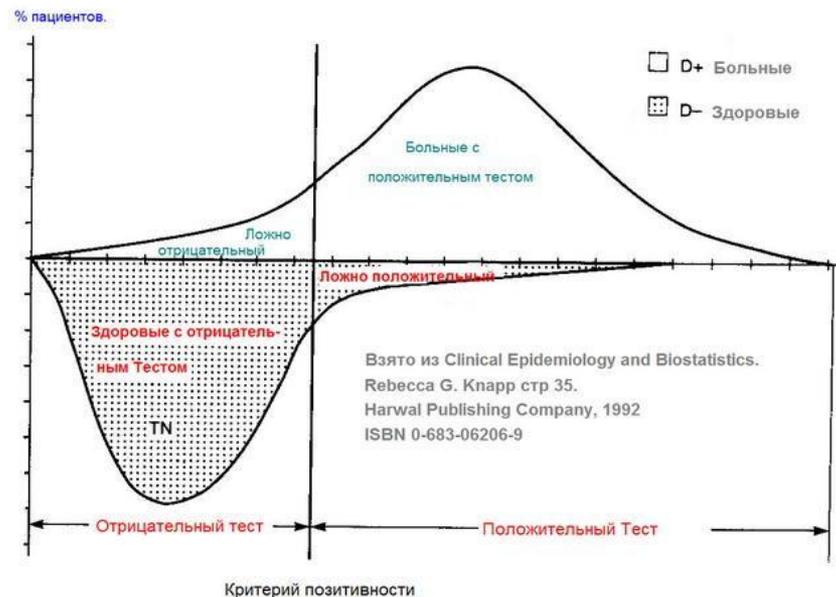
Причины ложноположительных и ложноотрицательных результатов ИФА.

ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ

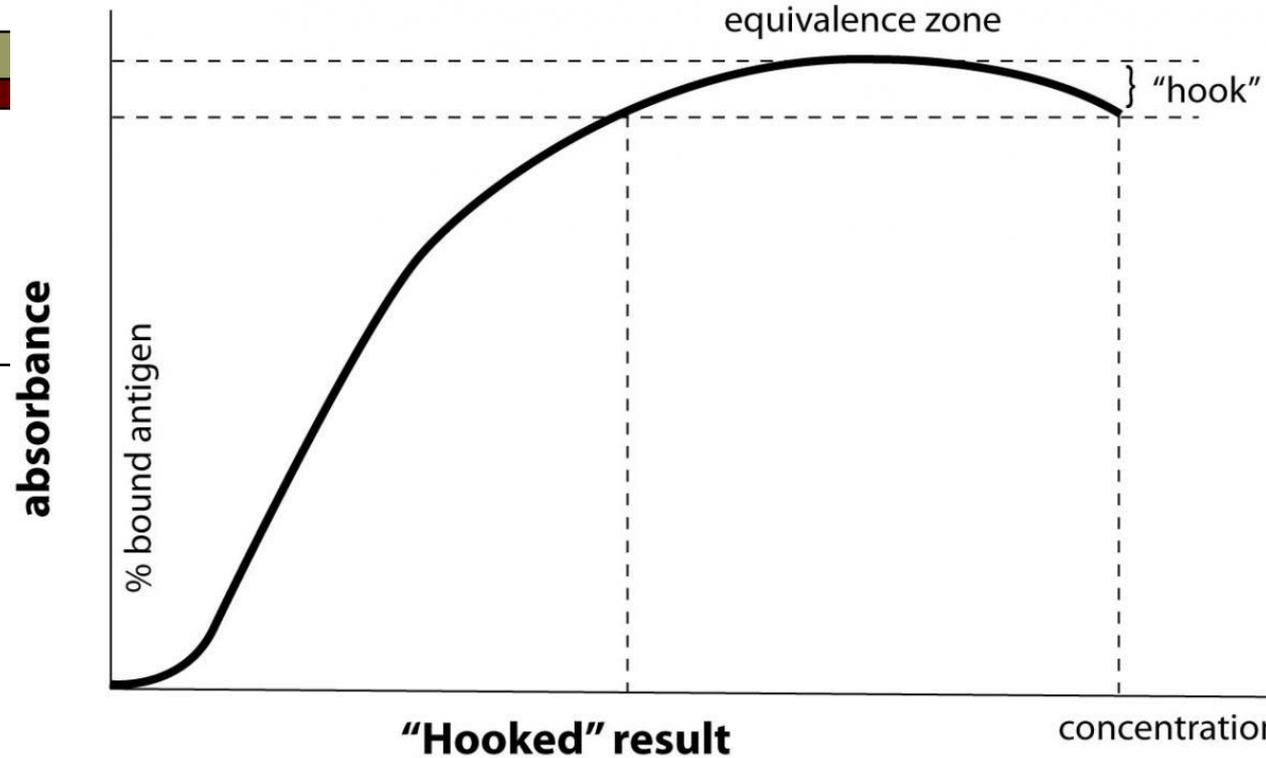
- за счёт **ревматоидного фактора**, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека;
- за счёт **антител, образующихся при различных системных** заболеваниях, нарушениях обмена или приёме лекарственных препаратов;
- у **новорождённых** такие **ложноположительные** 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

- могут быть обусловлены состояниями иммунодефицита,
- а также **техническими ошибками** при постановке реакции.



Любой
положительный
результат ИФА
проверяется
иммуноблотом
(золотой стандарт).



Hook effect

- Понятие "highdose hook effect" отражает тот факт, что при чрезмерно высоких концентрациях вещества, с которым идет реакция, результат реакции может быть неверным - показывать неправдоподобно низкий уровень.

ЭТАПЫ АНАЛИЗА

- - **Преаналитический (долабораторный) этап** включает в себя все стадии от назначения анализа клиницистом до поступления исследуемого образца в лабораторию на рабочее место, а именно: назначение анализа, отбор биологического материала, его обработку и доставку в лабораторию.
- - **Аналитический доприборный этап** представляет собой все стадии ручного или полуавтоматического анализа до момента регистрации результатов.
- - **Приборный этап** обычно является стадией регистрации результатов, но может также включать все процедуры, которые происходят с пробой при проведении автоматических видов анализа.
- - **Постаналитический этап** состоит из оформления бланка с результатами, интерпретации результатов лабораторного исследования, доведения результатов до лечащего врача и постановки диагноза. На постаналитическом этапе возможным источником ошибок может являться неправильное заполнение бланка с результатами, а также неверная трактовка полученных данных.

Технические ошибки при постановке реакции

Стадия исследования	Причины погрешностей	Механизм влияния на результат ИФА	Признаки	Влияние на результат	Меры предупреждения ошибок
Хранение тест-системы	<ul style="list-style-type: none"> Повышенная температура хранения Замораживание компонентов тест-систем Воздействие влаги на иммуносорбент после вскрытия упаковки 	<p>Снижение активности антигенов, антител, конъюгатов</p> <p>Снижение специфичности антигенов, антител, конъюгатов</p>	<p>Низкие значения ОП для положительных контролей и образцов</p> <p>Высокие значения ОП для отрицательных контролей и образцов</p>	<p>Низкая чувствительность</p> <p>Низкая специфичность</p>	<ul style="list-style-type: none"> Соблюдать условия хранения Тщательно упаковывать иммуносорбент после вскрытия упаковки для хранения
	<ul style="list-style-type: none"> Применение образцов с признаками гемолиза, гиперлипидемии, микробного пророста, прогретых образцов 	<p>Неспецифические компоненты образца связываются с иммуносорбентом</p>	<p>Высокие значения ОП для отрицательных контролей и образцов</p>	<p>Низкая специфичность</p>	<ul style="list-style-type: none"> Исследовать образцы, подготовленные по стандартной методике Хранить образцы в регламентированных условиях
Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т	<ul style="list-style-type: none"> Ошибки при приготовлении рабочего раствора ФСБ-Т 	<p>Состав промывающего раствора ФСБ-Т не является оптимальным, отмывка несвязавшихся компонентов не протекает нормально</p>	<p>Высокие значения ОП для отрицательных контролей и образцов</p>	<p>Низкая специфичность</p>	<ul style="list-style-type: none"> Исключить ошибки при приготовлении растворов Использовать поверенное мерное оборудование (стаканы, цилиндры)
	<ul style="list-style-type: none"> Использование некачественной воды 	<p>В составе промывающего раствора ФСБ-Т присутствуют факторы, препятствующие нормальной отмывке</p>	<p>Высокие значения ОП для отрицательных контролей и образцов</p>	<p>Низкая специфичность</p>	<ul style="list-style-type: none"> Регулярный контроль качества воды, обработка приемной емкости, шлангов, посуды

Технические ошибки при постановке реакции

Стадия исследования	Причины погрешностей	Механизм влияния на результат ИФА	Признаки	Влияние на результат	Меры предупреждения ошибок
Дозирование образцов, контролей, РБР-С	<ul style="list-style-type: none"> Температура дозируемых реагентов ниже комнатной температуры 	Укороченное время инкубации при заданной температуре – реакция связывания определяемого маркера с иммуносорбентом протекает неполно	Краевой эффект	Низкая воспроизводимость	<ul style="list-style-type: none"> Реагенты перед применением выдерживать при комнатной температуре
	<ul style="list-style-type: none"> Погрешность дозирования – низкая воспроизводимость дозатора 	В разных лунках концентрации реагирующих компонентов различны	Низкие значения ОП	Низкая чувствительность	
	<ul style="list-style-type: none"> Загрязнение дозируемых реагентов через наконечники или посуду Ошибки при дозировании – перенос капель положительных контролей (образцов) в другие лунки 	Контаминация – ошибочное внесение определяемого маркера в лунки планшета	Различные значения ОП для повторов	Низкая воспроизводимость	<ul style="list-style-type: none"> Использовать поверенные дозаторы Регулярно контролировать работоспособность дозаторов
Инкубация с образцами	<ul style="list-style-type: none"> Инкубация планшета, незаклеенного пленкой, не во влажной камере 	Жидкость в лунках охлаждается за счет испарения – реакция связывания определяемого маркера с иммуносорбентом протекает неполно	Краевой эффект	Низкая воспроизводимость	<ul style="list-style-type: none"> Заклеивать планшет пленкой или проводить инкубацию во влажной камере
	<ul style="list-style-type: none"> Повышенная температура инкубации Увеличенное время инкубации 	Неспецифические компоненты образца связываются с иммуносорбентом	Низкие значения ОП положительных контролей и образцов	Низкая чувствительность	
	<ul style="list-style-type: none"> Пониженная температура инкубации Уменьшенное время инкубации 	Реакция связывания определяемого маркера с иммуносорбентом протекает неполно	Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	<ul style="list-style-type: none"> Соблюдать условия (время и температуру) инкубации
<ul style="list-style-type: none"> Низкие значения ОП отрицательных контролей и образцов 		Низкие значения ОП положительных контролей и образцов	Низкая чувствительность		

Технические ошибки при постановке реакции

Стадия исследования	Причины погрешностей	Механизм влияния на результат ИФА	Признаки	Влияние на результат	Меры предупреждения ошибок
Отмывка после инкубации с образцами	<ul style="list-style-type: none"> Недостаточное наполнение лунок Недостаточная аспирация (удаление) раствора из лунок Недостаточное время экспозиции лунок с промывающим раствором 	Недостаточная отмывка – несвязанные компоненты остаются в лунках планшета	Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	<ul style="list-style-type: none"> Тщательно контролировать процесс промывки Стандартизовать: позицию игл, скорость потока при дозировании, силу вакуума при аспирации, дозируемый в лунки объем ФСБ-Т, время экспозиции лунок планшета с промывающим раствором Минимизировать остаток жидкости в лунках планшета после аспирации Исключить возможность загрязнения боковых поверхностей лунок при промывке
	<ul style="list-style-type: none"> Разница в наполнении лунок Разница в аспирации (удалении) раствора из лунок Различное время экспозиции лунок с промывающим раствором 	Разница в отмывке для разных лунок – одни лунки отмываются интенсивнее, чем другие	Различные значения ОП для повторов	Низкая воспроизводимость	
	<ul style="list-style-type: none"> Загрязнение образцами боковых поверхностей лунок 	Контаминация – несвязанные компоненты остаются в лунках планшета	Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	
Приготовление рабочего раствора конъюгата	<ul style="list-style-type: none"> Ошибки при приготовлении рабочего раствора конъюгата Погрешности дозирования 	<p>Завышенная концентрация конъюгата – конъюгат неспецифически связывается с иммуносорбентом</p> <p>Заниженная концентрация конъюгата – реакция связывания конъюгата с определяемым маркером протекает неполно</p>	Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	<ul style="list-style-type: none"> Исключить ошибки при приготовлении растворов Использовать поверенные дозаторы Регулярно контролировать работу дозаторов
	<ul style="list-style-type: none"> Преждевременное приготовление рабочего раствора конъюгата Загрязнение реакционной смеси через наконечники или посуду 	Уменьшение активности конъюгата	Низкие значения ОП положительных контролей и образцов	Низкая чувствительность	
			Низкие значения ОП положительных контролей и образцов	Низкая чувствительность	

Технические ошибки при постановке реакции

Стадия исследования	Причины погрешностей	Механизм влияния на результат ИФА	Признаки	Влияние на результат	Меры предупреждения ошибок
Дозирование рабочего раствора конъюгата	<ul style="list-style-type: none"> Температура рабочего раствора конъюгата ниже комнатной температуры 	Укороченное время инкубации при заданной температуре – реакция связывания конъюгата с определяемым маркером протекает неполно	Краевой эффект	Низкая воспроизводимость	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Реагенты перед применением выдерживать при комнатной температуре
	<ul style="list-style-type: none"> Погрешность дозирования – низкая воспроизводимость дозатора Ошибки при дозировании 	В разных лунках концентрации реагирующих компонентов различны	Низкие значения ОП положительных контролей и образцов	Низкая чувствительность	
	<ul style="list-style-type: none"> Погрешность дозирования – низкая точность дозатора Ошибки при дозировании 	Слишком большой объем рабочего раствора конъюгата – конъюгат неспецифически связывается с иммуносорбентом	Различные значения ОП для повторов	Низкая воспроизводимость	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Исключить ошибки при дозировании раствора ✓ Использовать поверенные дозаторы ✓ Регулярно контролировать работу дозаторов
	<ul style="list-style-type: none"> Загрязнение дозируемого раствора через наконечники или посуду 	Слишком малый объем рабочего раствора конъюгата – реакция связывания конъюгата с определяемым маркером протекает неполно	Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	
		Уменьшение активности конъюгата	Низкие значения ОП положительных контролей и образцов	Низкая чувствительность	
			Низкие значения ОП положительных контролей и образцов	Низкая чувствительность	
		Различные значения ОП для повторов	Низкая воспроизводимость		

Технические ошибки при постановке реакции

Стадия исследования	Причины погрешностей	Механизм влияния на результат ИФА	Признаки	Влияние на результат	Меры предупреждения ошибок
Приготовление рабочего раствора ТМБ	<ul style="list-style-type: none"> Ошибки при приготовлении рабочего раствора ТМБ Погрешности при дозировании 	Повышенная концентрация ТМБ – субстрата слишком много, реакция ферментативного окисления субстрата протекает слишком интенсивно, происходит излишнее окрашивание реакционной смеси	Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	<ul style="list-style-type: none"> Исключить ошибки при приготовлении растворов Использовать поверенные дозаторы Регулярно контролировать работу дозаторов
		Пониженная концентрация ТМБ – субстрата недостаточно для нормального протекания реакции ферментативного окисления	Низкие значения ОП положительных контролей и образцов	Низкая чувствительность	
	<ul style="list-style-type: none"> Воздействие света Преждевременное приготовление рабочего раствора ТМБ Загрязнение реакционной смеси через наконечники или посуду 	Реакционная смесь окрашивается продуктами окисления ТМБ	Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	<ul style="list-style-type: none"> Не приготавливать рабочий раствор ТМБ заранее Исключить воздействие интенсивного света на ТМБ, БРС, рабочий раствор ТМБ Использовать чистые (новые) наконечники Использовать чистую посуду

Технические ошибки при постановке реакции

Стадия исследования	Причины погрешностей	Механизм влияния на результат ИФА	Признаки	Влияние на результат	Меры предупреждения ошибок
Дозирование рабочего раствора ТМБ	<ul style="list-style-type: none"> Температура рабочего раствора ТМБ ниже комнатной температуры 	Укороченное время инкубации при заданной температуре – реакция ферментативного окисления субстрата протекает неполно	Краевой эффект	Низкая воспроизводимость	<ul style="list-style-type: none"> Реагенты перед применением выдерживать при комнатной температуре
	<ul style="list-style-type: none"> Воздействие света Загрязнение дозируемой реакционной смеси через наконечники или посуду 	Реакционная смесь окрашивается продуктами окисления ТМБ	Низкие значения ОП	Низкая чувствительность	
	<ul style="list-style-type: none"> Ошибки при дозировании Погрешности при дозировании 	Количество рабочего раствора ТМБ в лунках различно – условия протекания реакции ферментативного окисления субстрата в лунках различаются	Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	<ul style="list-style-type: none"> Исключить воздействие интенсивного света на рабочий раствор ТМБ Использовать чистые (новые) наконечники Использовать чистую посуду
Инкубация с ТМБ	<ul style="list-style-type: none"> Инкубация незаклеенного планшета, не во влажной камере 	Охлаждение жидкости в лунках за счет испарения – реакция ферментативного окисления субстрата протекает неполно	Краевой эффект	Низкая воспроизводимость	<ul style="list-style-type: none"> Заклеивать планшет пленкой или инкубировать планшет во влажной камере
	<ul style="list-style-type: none"> Воздействие света 	Реакционная смесь окрашивается продуктами окисления ТМБ	Низкие значения ОП	Низкая чувствительность	
	<ul style="list-style-type: none"> Увеличение температуры, времени инкубации 	Реакция ферментативного окисления субстрата протекает слишком интенсивно	Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	<ul style="list-style-type: none"> Инкубировать планшет в защищенном от света месте
	<ul style="list-style-type: none"> Уменьшение температуры, времени инкубации 	Реакция ферментативного окисления субстрата протекает слишком медленно	Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	
			Низкие значения ОП положительных контролей и образцов	Низкая чувствительность	<ul style="list-style-type: none"> Соблюдение условий инкубации (времени и температуры)

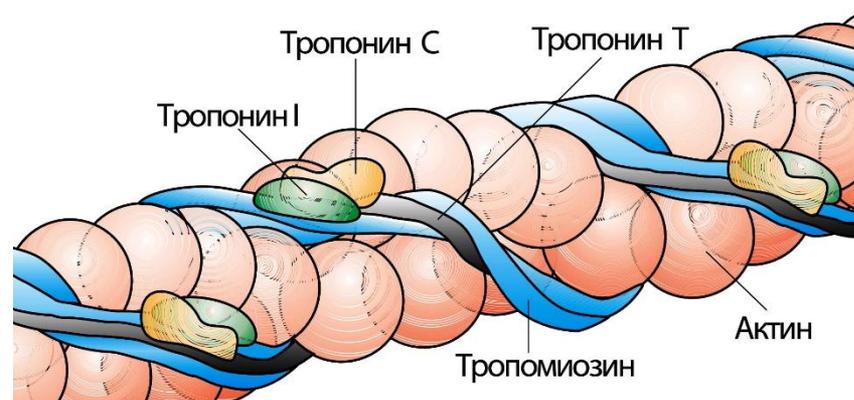
Технические ошибки при постановке реакции

Стадия исследования	Причины погрешностей	Механизм влияния на результат ИФА
Измерение ОП	<ul style="list-style-type: none"> Измерение проводится через недопустимо продолжительное время после остановки реакции 	Реакция ферментативного окисления продолжается, окрашивание реакционной смеси продолжает развиваться
	<ul style="list-style-type: none"> Неисправный спектрофотометр 	Оптическая плотность лунок измеряется неверно

Признаки	Влияние на результат	Меры предупреждения ошибок
Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	<ul style="list-style-type: none"> Минимизировать время между остановкой реакции и измерением ОП
Высокие значения ОП отрицательных контролей и образцов	Низкая специфичность	<ul style="list-style-type: none"> Использовать поверенный спектрофотометр
Низкие значения ОП положительных контролей и образцов	Низкая чувствительность	<ul style="list-style-type: none"> Регулярно контролировать работу спектрофотометра
Различные значения ОП для повторов	Низкая воспроизводимость	

Тропониновый тест

- Тропонин – это белок, являющийся одним из компонентов сократительного аппарата поперечно-полосатых мышц, позволяющий мышечным волокнам актина и миозина скользить относительно друг друга.



Показания для определения тропонинов:

- диагностика ИМ,
- оценка реперфузии после применения тромболитической терапии,
- выделение групп высокого коронарного риска среди больных острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST,
- выделение больных, получающих наибольший эффект от низкомолекулярных гепаринов.



Экспресс диагностика



ИФА набор

Заключение

- Таким образом, за счёт несомненных преимуществ иммуноферментного анализа: удобства в работе, быстроты, объективности за счёт автоматизации учёта результатов, возможности исследования иммуноглобулинов различных классов (что важно для ранней диагностики заболеваний и их прогноза) в настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.

ИММУНОТУБИДИМЕТРИЯ



- это количественное измерение концентрации специфических белков по изменению мутности раствора при реакции антиген–антитело.



Спинномозговая жидкость

сыворотка

моча

Характеристика метода

- высокая чувствительность
- простота и скорость проведения анализов
- легкая адаптация к большинству полуавтоматических и автоматических биохимических анализаторов.
- С-реактивный белок (сыворотка, моча)
- Гликированный гемоглобин
- Альбумин в моче
- Церулоплазмин
- Ревматоидный фактор
- Миоглобин
- ферритин

Кривая доза-эффект

- Зона избытка антител.
- Зона соответствия антигена и антитела.
- Зона избытка антигенов – прозона.



Для иммунотурбидиметрических измерений необходимо, чтобы они проводились в зоне избытка антител.

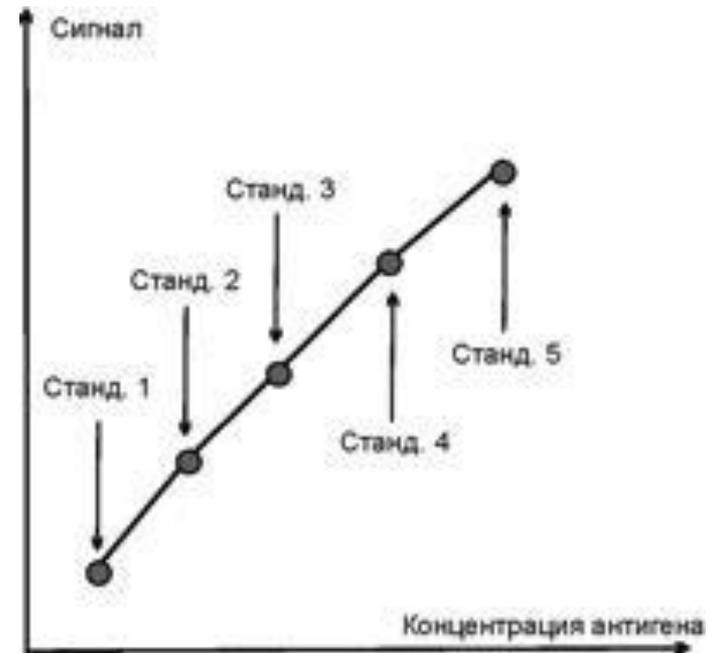
Только этот восходящий участок кривой доза-эффект используется в качестве калибровочного графика.

Калибровочная кривая строится:

- для каждого индивидуального белка,
- для каждого прибора,
- при любом изменении условий регистрации и
- периодически по мере проведения исследований.

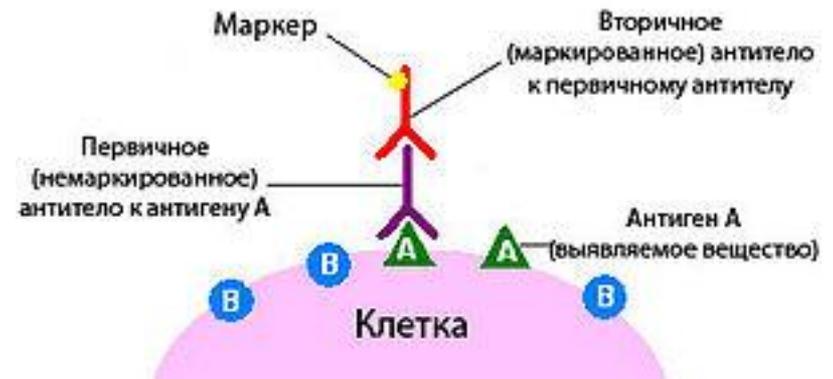
Калибровочный график для иммунотурбидиметрического определения специфических белков

- Для построения графика обычно требуется 3–5 стандартных растворов антигена (определяемого белка). В настоящее время используются калибраторы (стандарты) с разным уровнем концентрации анализата, определенного точным (лучше референсным) методом. Для каждой концентрации согласно методике определения проводят три параллельных исследования, в которых определяют оптическую плотность в каждой калибровочной пробе.



ИММУНОГИСТОХИМИЯ

- метод микроскопического исследования тканей, обеспечивающий наиболее специфическое выявление в них искомым веществ и основанный на обработке срезов специфическими антителами к нему.



с флуоресцентным красителем
(родамин, флуоресцеин)

антитела

с ферментами (щелочная фосфатаза,
пероксидаза хрена)

ИММУНОГИСТОХИМИЯ

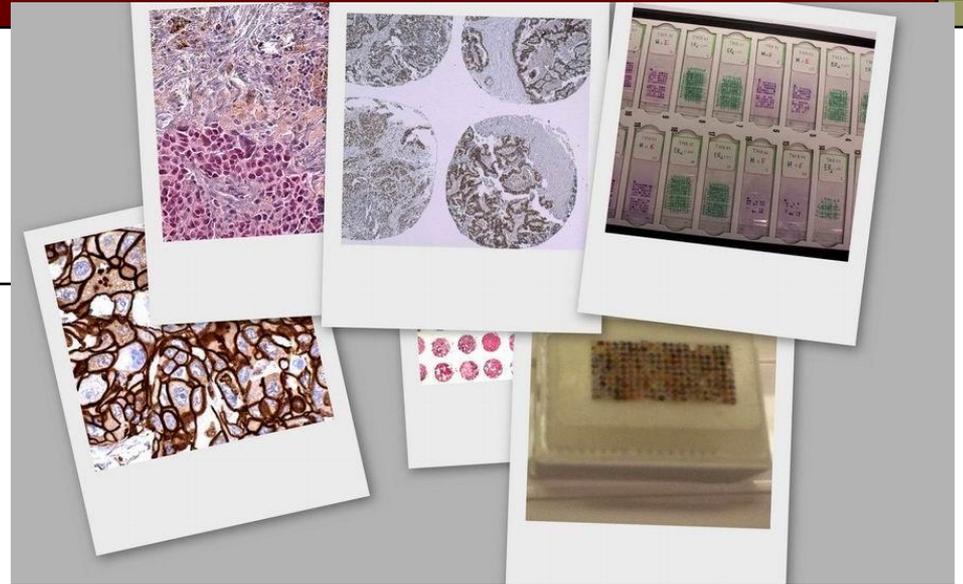
- Классификация
прямой и непрямой

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Системы автоматической окраски
образцов для иммунного
окрашивания срезов тканей

Водяные бани для
депарафинизации препаратов
и демаркировки антигенов при
иммуногистохимическом
методе исследования

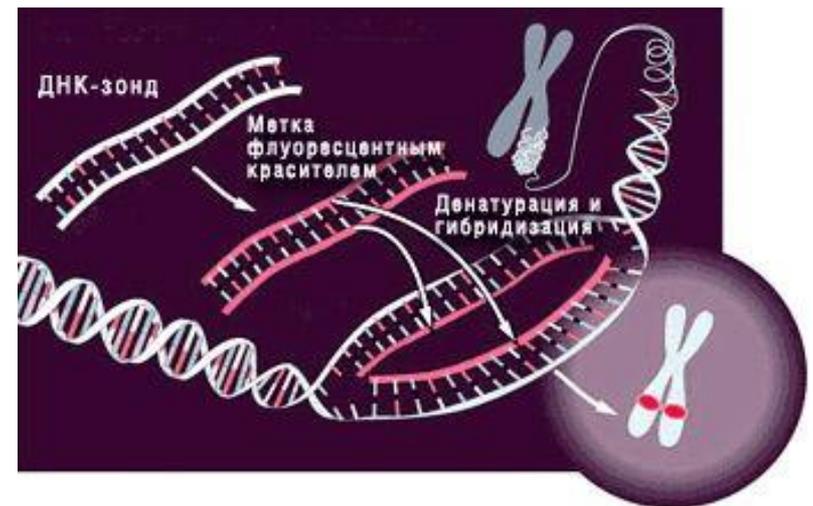
Автоматические системы для
выполнения денатурации и
гибридизации



FISH-анализ (флюоресценстная гибридикация in situ)

- FISH сочетает в себе преимущества классических цитологических, цитогенетических и новейших молекулярных методов.
- Объектом исследования - уникальные нуклеотидные последовательности конкретной хромосомы или ее отдельного участка.

1. Используются зонды, которые являются комплементарными по отношению к последовательностям ДНК, представляющим объект изучения.
2. Они помечены флуоресцентной меткой, позволяют видеть локализацию интересующих генов в составе ДНК или хромосом.



Недостаток метода. Применение.

Зонды являются специфичными только к одному участку генома и, как следствие, при одном исследовании можно определить наличие или число копий только этого участка (или нескольких при использовании многоцветных зондов).

Применение в клинической практике.

1. лабораторная генетика (оценка грубых хромосомных аномалий)
2. в онкологии оценка статуса рецепторов Her2neu

