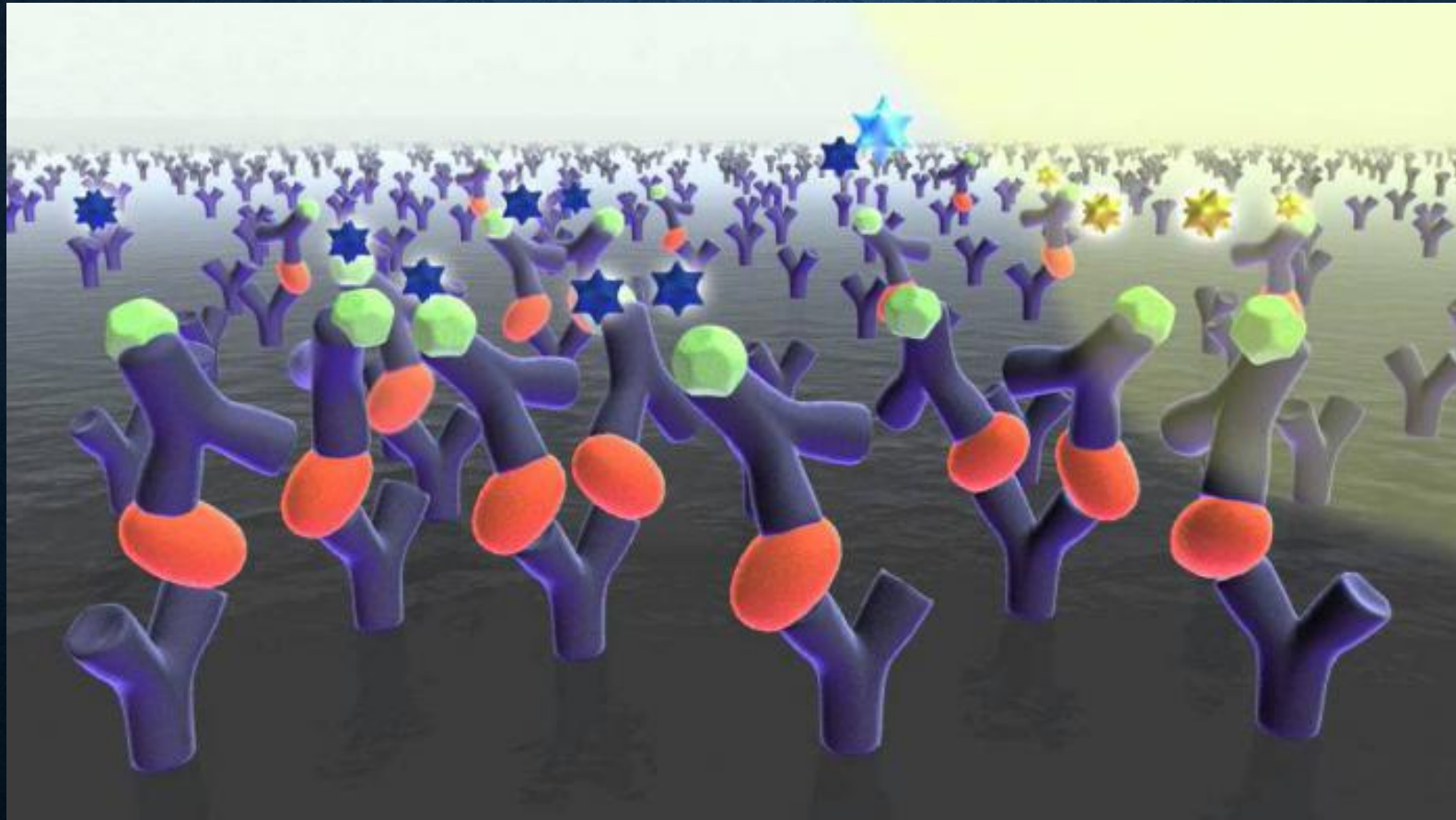


# ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ





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



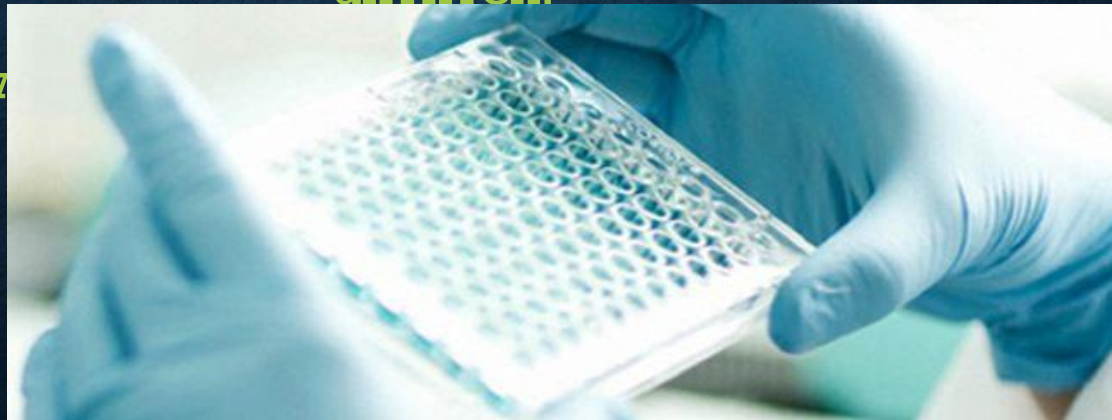
**ИФА**-ЭТО ЛАБОРАТОРНОЕ  
ИССЛЕДОВАНИЕ, ОСНОВАННОЕ НА  
РЕАКЦИИ «АНТИГЕН-АНТИТЕЛО».  
СУТЬ ЭТОГО ЛАБОРАТОРНОГО  
МЕТОДА- ВЫЯВЛЕНИЕ  
СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ С  
ПОМОЩЬЮ СПЕЦИФИЧЕСКИХ  
БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ,  
КОТОРЫЕ ПОМОГАЮТ ОПРЕДЕЛИТЬ  
ПРИСУТСТВИЕ ИЛИ ОТСУТСТВИЕ  
АНТИТЕЛ И ИХ КОЛИЧЕСТВО.





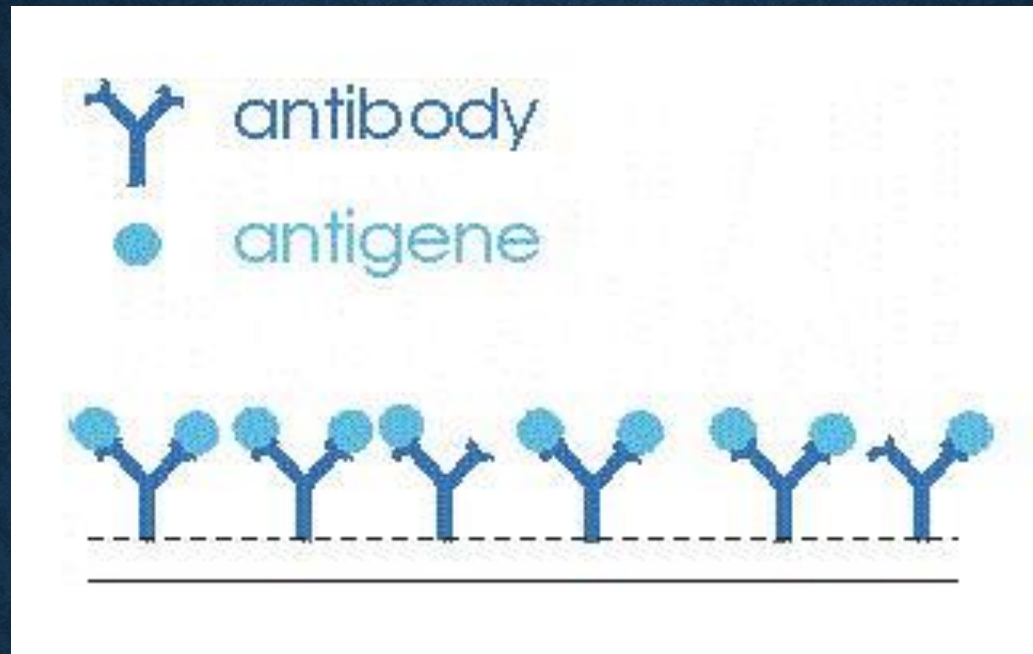
# ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

- массовой диагностики инфекционных заболеваний (выявление различных специфических антигенов или антител к ним);
- выявления и определения уровня гормонов и лекарственных препаратов в биологических образцах;
- определения изотипов (IgG, IgM и другие) антител против конкретного антигена;
- выявления иммунных комплексов
- выявления онкомаркеров;
- определения белков сыворотки крови (ферритин, фибронектин и др.);
- определения общего IgE и специфических IgE антител:





## Антигены



## Антитела

Генетически чужеродные вещества, которые при внедрении в организм способны стимулировать иммунный ответ (клеточную реакцию, образование антител, аллергию, толерантность) и специфически реагировать с образовавшимися антителами как *in vivo*, так *in vitro*, называют антигенами.

**-специфические белки, иммуноглобулины, образующиеся в организме под воздействием антигена и обладающие свойством специфически с ним связываться и отличающиеся от обычных глобулинов наличием активного центра.**

# Классификация методов ифа

```
graph TD; A[Классификация методов ифа] --> B[По типу реагентов]; A --> C[По условиям проведения реакций]; A --> D[По принципу проведения]; B --> B1[-конкурентный]; B --> B2[-неконкурентный]; C --> C1[-гомогенные]; C --> C2[-гетерогеногенные]; D --> D1[- прямые]; D --> D2[- не прямые];
```

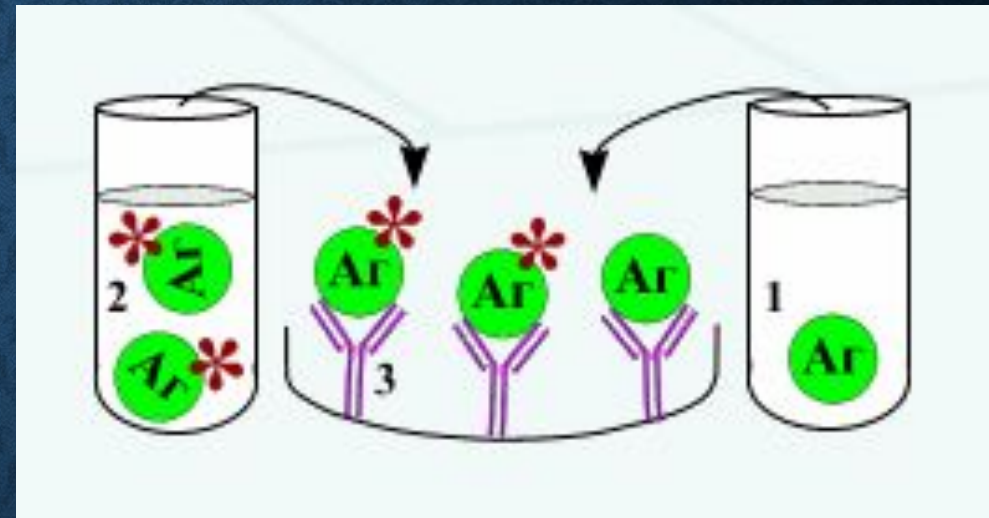
По типу реагентов  
-конкурентный  
-неконкурентный

По условиям  
проведения реакций  
-гомогенные  
-гетерогеногенные

По принципу  
проведения  
- прямые  
- не прямые



- В конкурентном ИФА на первой стадии одновременно присутствуют анализируемое соединение и его аналог, меченый ферментом и конкурирующий за центры специфического связанного с ним.



- для неконкурентных методов характерно присутствие в системе на первой стадии только анализируемого соединения и специфичных к нему центров связывания



**ВСЕ МЕТОДЫ ИФА ДЕЛЯТСЯ НА  
ГОМОГЕННЫЕ И ГЕТЕРОГЕННЫЕ.**

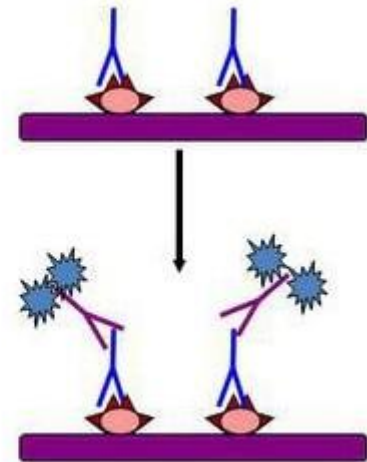
**ЕСЛИ ВСЕ ТРИ СТАДИИ ИФА ПРОХОДЯТ В  
РАСТВОРЕ И МЕЖДУ ОСНОВНЫМИ СТАДИЯМИ  
НЕТ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ЭТАПОВ РАЗДЕЛЕНИЯ  
ОБРАЗОВАВШИХСЯ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ  
ОТ НЕПРОРЕАГИРОВАВШИХ КОМПОНЕНТОВ,  
МЕТОД ОТНОСИТСЯ К ГРУППЕ ГОМОГЕННЫХ.**

**ДЛЯ ГЕТЕРОГЕННЫХ МЕТОДОМ ХАРАКТЕРНО  
ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА В ДВУХФАЗНОЙ  
СИСТЕМЕ С УЧАСТИЕМ ТВЕРДОЙ ФАЗЫ –  
НОСИТЕЛЯ**

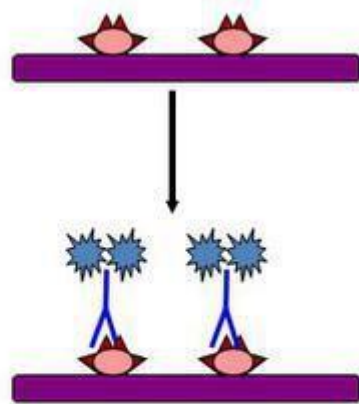


**Определение концентрации вещества по разности общего числа мест связывания и оставшихся свободными центрами связывания. Концентрация определяемого вещества при этом будет возрастать, а регистрируемый сигнал снижаться, следовательно, в данном случае прослеживается обратная зависимость от величины регистрируемого сигнала.**

Непрямой метод



Прямой метод



**Прямое определение концентрации вещества (антигена или антитела) по числу взаимодействующих с ним центров связывания. В этом случае ферментная метка будет находиться в образовавшемся специфическом комплексе АГ-АТ. Концентрация определяемого вещества будет прямо пропорциональна регистрируемому сигналу.**



# ПРЯМЫЕ МЕТОДЫ



- Микроскопия
- Ифа на антигены
- ПЦР
- Культуральный метод





# НЕПРЯМЫЕ МЕТОДЫ

Все серологические реакции – РСК, РПГА, ИФА, РТГА  
и т.д.

## Несомненные плюсы

- ✓ Ответ появится независимо от локализации процесса
- ✓ Дают представление реакции организма на пба
- ✓ Можно определить стадию заболевания

## Минусы

- ✓ Подходят только для «инфекционного серологического окна»
- ✓ х заболеваний
- ✓ Наличие «Малая информативность при иммунодефиците
- ✓ Целый ряд инфекций встречается и у здоровых пациентов



# ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ

ВЕКТОР

**БЕСТ**



**D-0772**

набор реагентов  
для иммуноферментного выявления  
иммуноглобулинов классов G и M  
к вирусу гепатита С

## **Бест анти-ВГС** (комплект 2)

### СОСТАВ:

1. Планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВГС
2. Положительный контрольный образец, инактивированный
3. Отрицательный контрольный образец, инактивированный
4. Конъюгат, концентрат
5. Раствор для разведения сывороток
6. Раствор для разведения конъюгата
7. Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином
8. Субстратный буферный раствор
9. Тетраметилбензидин, концентрат
10. Стоп-реагент
11. Плёнка для заклеивания планшета
12. Ванночки для реагентов
13. Наконечники для пипеток



**СТРОГОЕ  
ВЫПОЛНЕНИЕ  
ИНСТРУКЦИИ  
ПРОВЕДЕНИЯ ИФА,  
УКАЗАННЫХ В  
ИНСТРУКЦИИ!!!**



# ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

- Внимательно изучить инструкцию по применению тест-системы
- Не использовать тест-системы с истекшим сроком годности
- Не смешивать реактивы из различных серий наборов
- Компоненты набора перед началом ифа должны быть прогреты до комнатной температуры
- Разборный планшет перед вскрытием необходимо выдержать при комнатной температуре не менее 30 минут для предотвращения конденсации влаги
- Кристаллы в концентрате отмывающего буфера должны быть растворены.



# ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

- Сухие компоненты набора должны быть восстановлены заранее и выдержанны не менее 15 мин до использования
- Неиспользованные стрипы должны быть немедленно упакованы и тщательно запечатаны в пакет для планшета с влагопоглотителем
- Необходимо следить за состоянием влажной камеры-исключить бактериальные заросты (желательно камеру готовить ежедневно) влажная камера должна быть предварительно до температуры инкубации



ANTI-HCV\_АНТИТЕЛА\_TRITURUS

Набор: VECTORBEST ID-0772 Бест анти-ВГС  
Лот: 3918  
Годен: 15.11.19

ELISA-111217-010



Создан: KUTURYOVA 11.12.2017 8:22:27

Изменен: KUTURYOVA 11.12.2017 8:23:03

Table with columns: №, Номер пробы, Пунка, №, Номер пробы, Пунка. Contains a list of 90 samples with their respective numbers and codes.

HELIХ logo and product information: ООО «ИЛХ», Санкт-Петербург, Периодическая серия ANTI-HCV\_АНТИТЕЛА\_TRITURUS.

Table with columns: Текст, Номер, Код набора, Оператор, 1, 1.1, 1.2. Contains instructions for use and storage of the kit components.

Table with columns: Рабочий раствор, Объем, Периодичность. Contains details about the working solution and its stability.

СХЕМА внесения контролей и образцов

Table with columns: ID, Проба, Единиц. 1, 2, 3, 4, 5, и т.д., Единиц. 1, 2, 3, 4, 5, и т.д., Единиц. 1, 2, 3, 4, 5, и т.д.

- 2.1.
2.2.
2.3.
2.4.
2.5.

Внимание! Обязательно необходимо использовать повторно в другие. Если в повторной постановке опыта был дана ошибка повторной постановки опыта.

Положить в лоты, пронумерованные по схеме. Указать название набора. Указать название партии. Указать название серии. Указать название набора. Указать название партии. Указать название серии.

Handwritten signature or mark







# ВНЕСЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

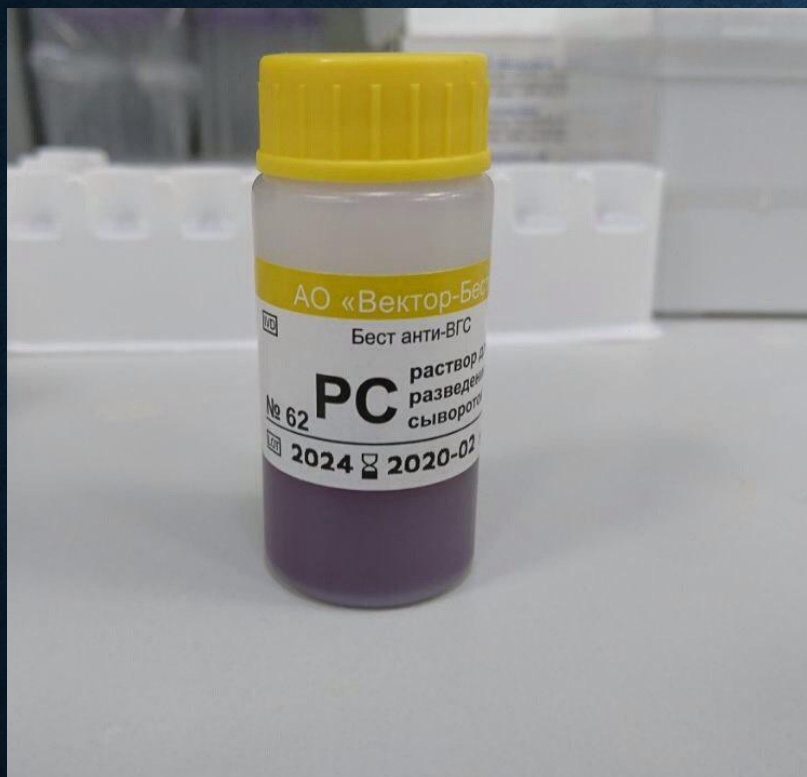




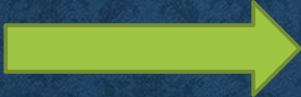
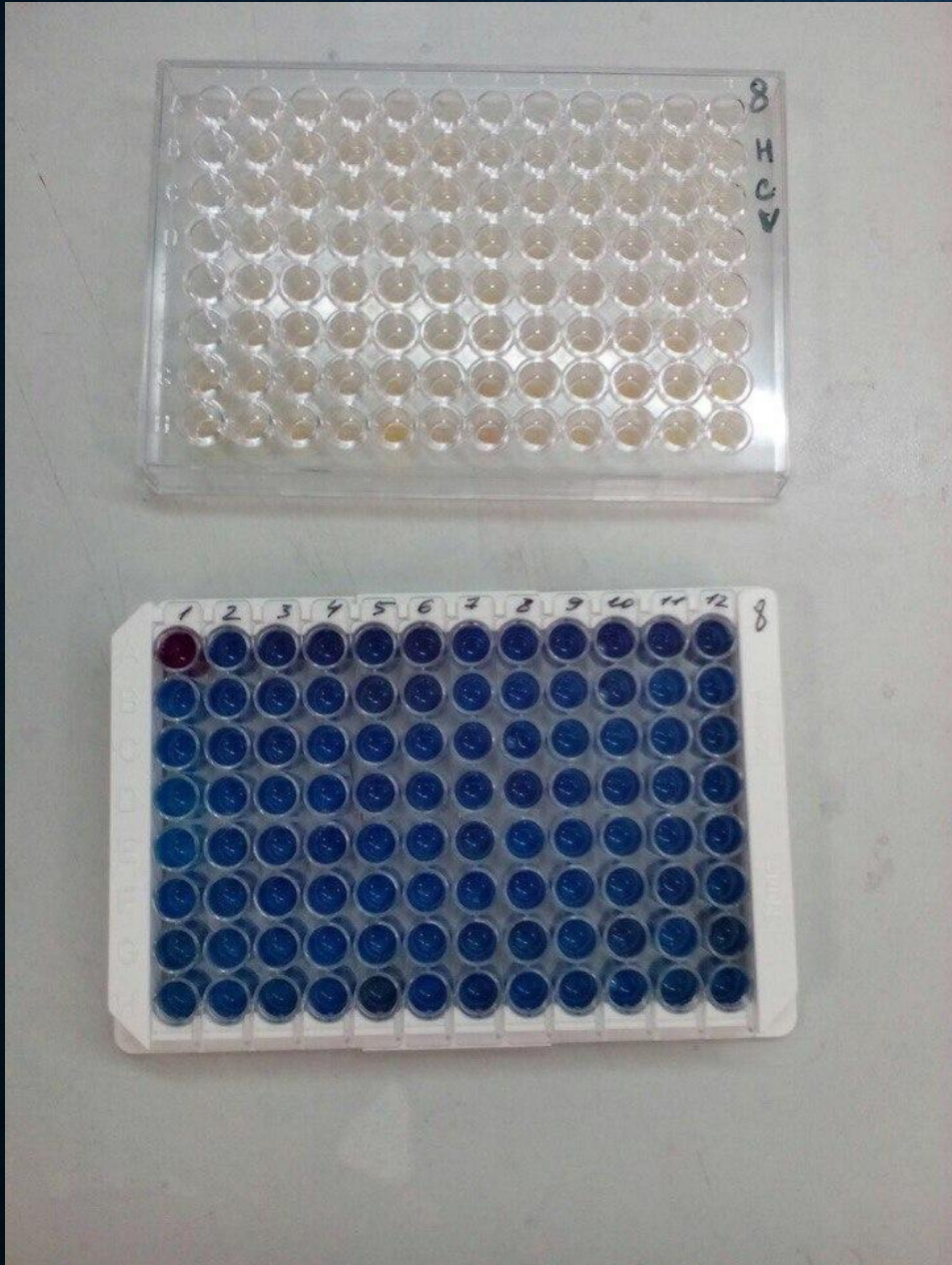
- Контролировать качество вносимых исследуемых образцов (отсутствие сгустков, клеточных элементов крови, прозрачность)
- При внесении образца в разводящий раствор- тщательно перемешивание пипетированием.
- Исключить манипуляции с образцами над рабочим планшетом
- Продолжительность внесения образцов в лунки не более 20-30% от времени

инструкция











# ИНКУБАЦИЯ

- Контроль температуры в термостате
- Предварительный прогрев влажной камеры( если она используется)
- Тщательное заклеивание планшета клейкой пленкой, предотвращающее испарение жидкостей и от нежелательного переноса сыворотки
- Размещение планшетов в один слой
- Строгое соблюдение продолжительности инкубации





# ПРОМЫВКА ПЛАНШЕТА



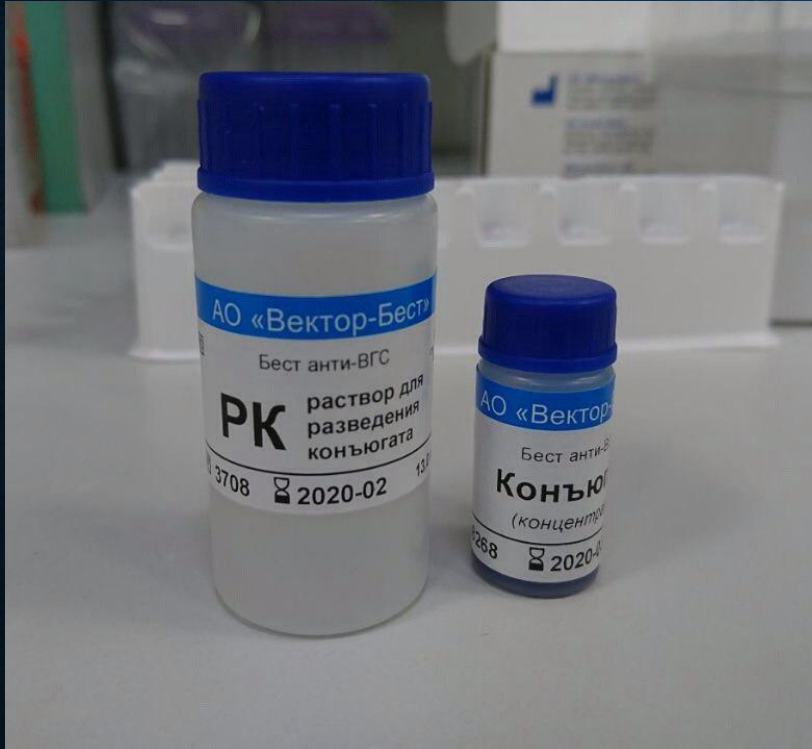
- Соответствие состояния промывающих устройств требованиям: равномерность внесения-удаления промывочного раствора, чистота емкостей и шлангов
- Полное заполнение лунок промывающим раствором и полное его удаление
- Время экспозиции промывочного раствора в лунке каждом цикле промывки должно быть не менее 10 сек( если в инструкции не указано по другому)
- Тщательное удаление влаги из лунок
- Не допускать высыхания лунок между операциями
- Смена фильтровальной бумаги на разных стадиях постановки ИФА



# ВНЕСЕНИЕ КОНЪЮГАТА

- Использовать одноразовую посуду и наконечники
- При повторном использовании-отдельно выделенные наконечники и посуда, которые не обрабатывать дезинфицирующими средствами
- При одновременной инкубации сыворотки и конъюгата вносить, не касаясь наконечниками сывороточного раствора



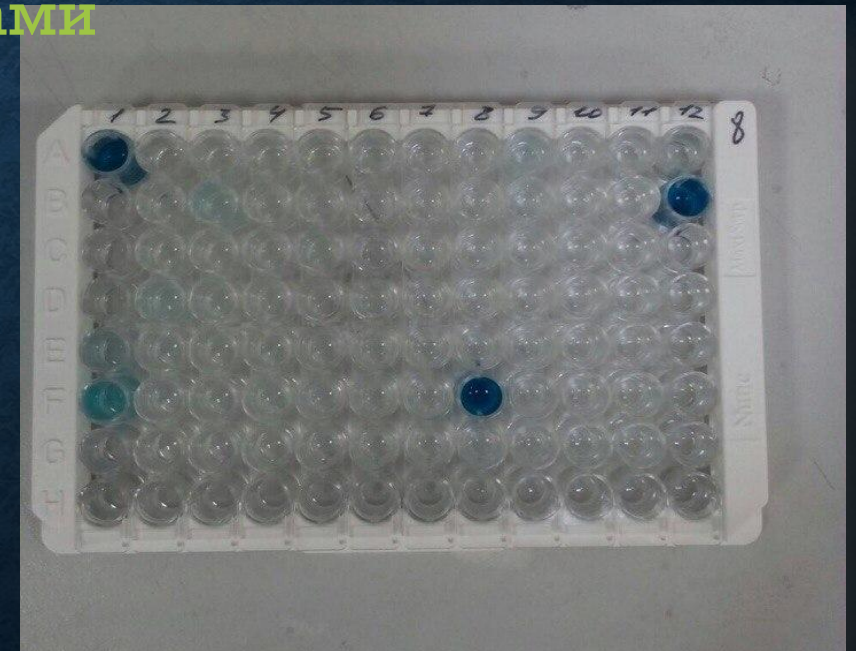




# ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ВНЕСЕНИЕ РАСТВОРА ХРОМОГЕНА

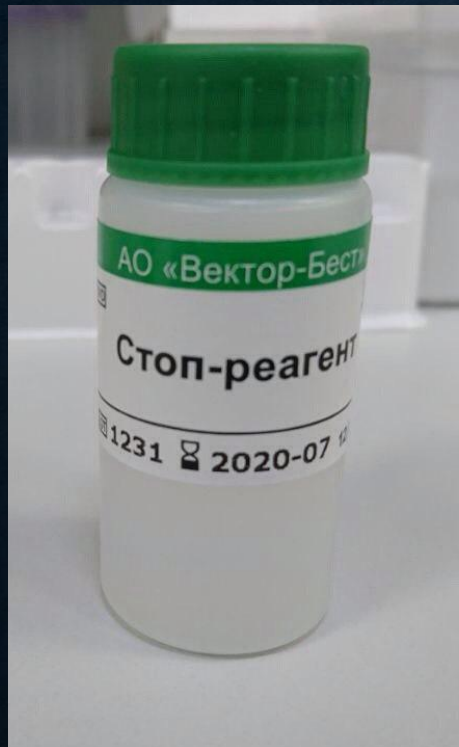
- Использовать одноразовую посуду и наконечники
- При повторном использовании-отдельные наконечники и посуда, которые не обрабатывать дезинфицирующими и моющими средствами

- Категорически недопустимо перекрестное использование посуды и наконечники для работы с разными хромогенами
- Исключить воздействие прямого солнечного света





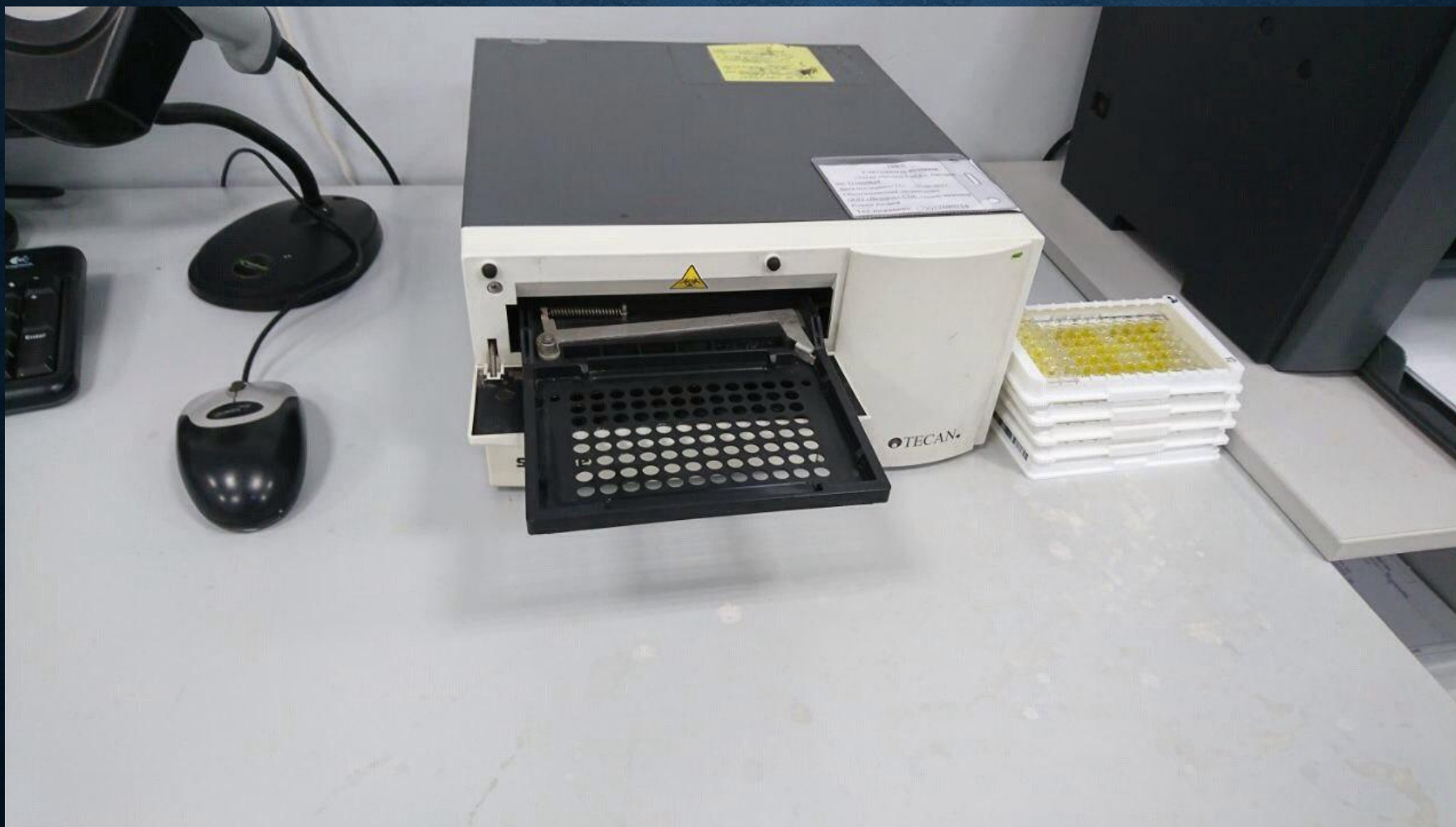
# ОСТАНОВКА РЕАКЦИИ



При внесении стоп-реагента необходимо добиваться полного промешивания раствора (не пипетированием)



# УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ





# УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Исправный , проверенный спектрофотометр.
- Предварительный прогрев прибора.
- Сопоставить визуальную оценку планшета с распечаткой. Причиной повышенной ОП могут быть: загрязнения дна лунки, дефект пластика, посторонние включения в растворе, загрязнения линзы спектрофотометра.
- Исключить влияние артефактов позволяет измерение оп относительно фильтра 620нм

Рабочее пространство/метод/список идент. образцов: ELISA-112127-010.wsp - ANTI-ICV\_АНТИТЕЛА\_...  
Дата: 2017-12-11  
Время: 11:31:11  
Страница 1/1

Порядок печати:  
1: Разностные данные  
2: Результаты применения граничных значений  
3: КИ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.32 neg 0.029..	0.006 neg 0.043..	0.009 neg 0.019..	0.004 neg 0.019..	0.004 neg 0.019..	0.006 neg 0.029..	0.006 neg 0.029..	0.007 neg 0.034..	0.012 neg 0.058..	0.01 neg 0.04878	0.015 neg 0.073..	0.022 neg 0.10732
B	0.005 neg 0.014..	0.003 neg 0.034..	0.007 neg 0.019..	0.004 neg 0.019..	0.006 neg 0.029..	0.005 neg 0.02439	0.007 neg 0.034..	0.007 neg 0.034..	0.013 neg 0.063..	0.009 neg 0.043..	0.017 neg 0.082..	0.019 neg 0.092..
C	0.005 neg 0.019..	0.004 neg 0.039..	0.008 neg 0.039..	3.294 POS 16.968	0.005 neg 0.02439	0.005 neg 0.02439	0.009 neg 0.043..	0.005 neg 0.02439	0.01 neg 0.04878	0.008 neg 0.039..	0.012 neg 0.058..	0.016 neg 0.078..
D	0.006 neg 0.019..	0.004 neg 0.019..	3.356 POS 16.371	0.255 POS 1.2439	0.007 neg 0.034..	0.008 neg 0.039..	0.008 neg 0.039..	0.008 neg 0.039..	0.017 neg 0.082..	0.014 neg 0.068..	0.021 neg 0.10244	0.023 neg 0.1122
E	0.119 neg 0.029..	0.006 neg 0.029..	0.006 neg 0.043..	0.009 neg 0.043..	0.008 neg 0.039..	0.007 neg 0.034..	0.008 neg 0.039..	0.007 neg 0.034..	0.019 neg 0.092..	0.01 neg 0.04878	0.014 neg 0.068..	0.018 neg 0.087..
F	0.884 neg 0.019..	0.004 neg 0.034..	0.007 neg 0.019..	0.004 neg 0.019..	0.005 neg 0.02439	0.008 neg 0.039..	0.008 neg 0.039..	0.007 neg 0.039..	0.014 neg 0.034..	0.01 neg 0.068..	0.014 neg 0.04878	0.019 neg 0.068..
G	0.005 neg 0.02439	3.123 POS 15.234	0.01 neg 0.04878	0.006 neg 0.029..	0.006 neg 0.029..	0.009 neg 0.043..	0.019 neg 0.092..	0.009 neg 0.043..	0.015 neg 0.073..	0.015 neg 0.073..	0.039 neg 0.19024	0.026 neg 0.12683
H	0.009 neg 0.043..	0.003 neg 0.014..	0.005 neg 0.02439	0.003 neg 0.014..	0.005 neg 0.02439	0.005 neg 0.02439	3.594 POS 17.532	0.006 neg 0.029..	0.01 neg 0.04878	0.007 neg 0.034..	0.012 neg 0.058..	0.019 neg 0.092..

Критерии проверки контроля качества

Номер эксп. группы 1  
Критерия контроля: Разностные данные  
NCI <= 0.2 -> TRUE  
PCI >= 0.8 -> TRUE

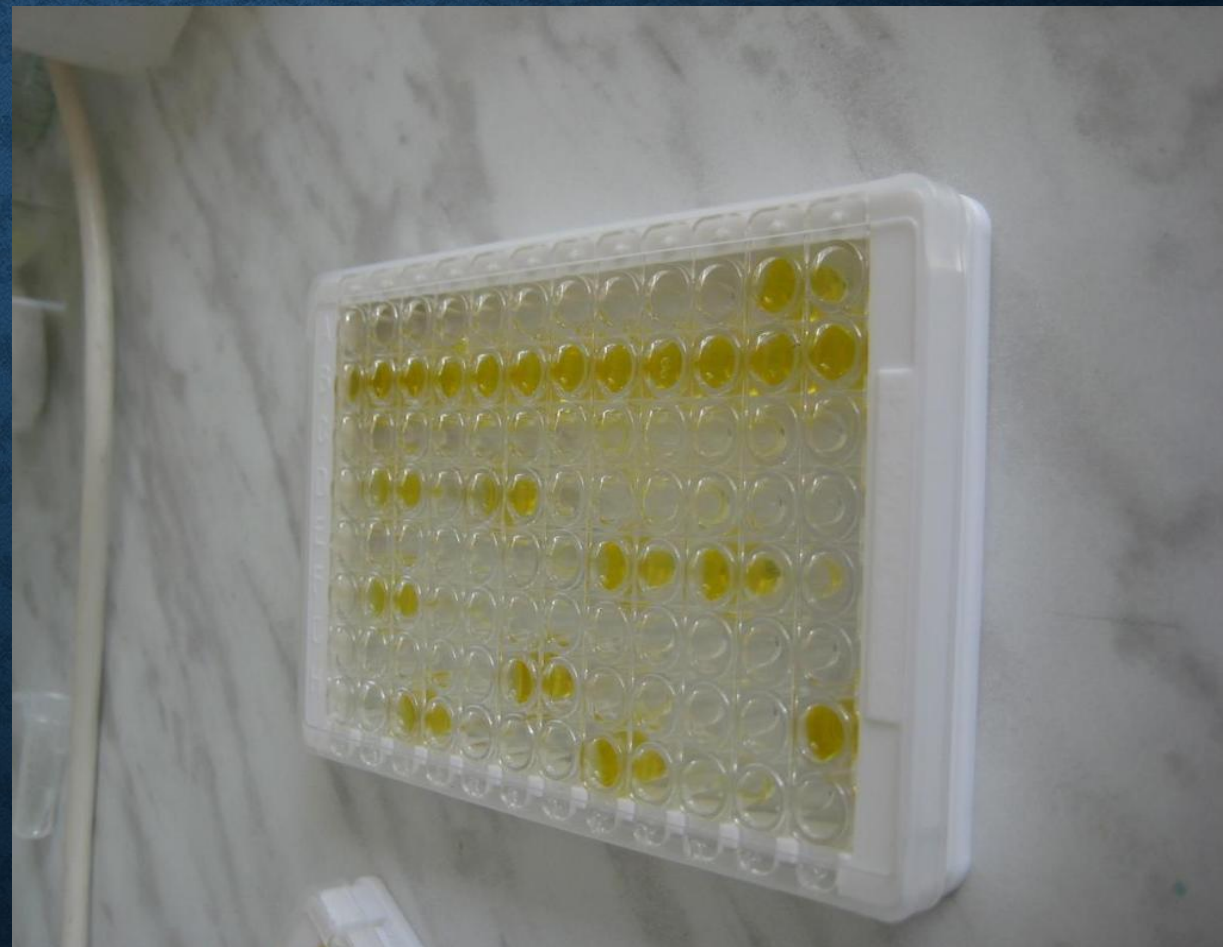


# ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ЗАНИЖЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ АНАЛИЗА

- Уменьшение времени инкубации
- Использование загрязненной посуды и наконечников
- Плохая отмывка после инкубации сывороток в тестах, выявляющих антитела
- Растворы, непрогретые перед постановкой до комнатной температуры
- Размещение планшетов в термостате стопкой
- Нарушение правил и сроков хранения в вскрытых компонентах при детальном использовании набора
- Длительное внесение образцов по отношению к времени инкубации
- Неправильная работа с пипетками (контаминация пипетки. Неправильное дозирование)
- Неисправный планшетный спектофотометр
- Контаминированный вошер



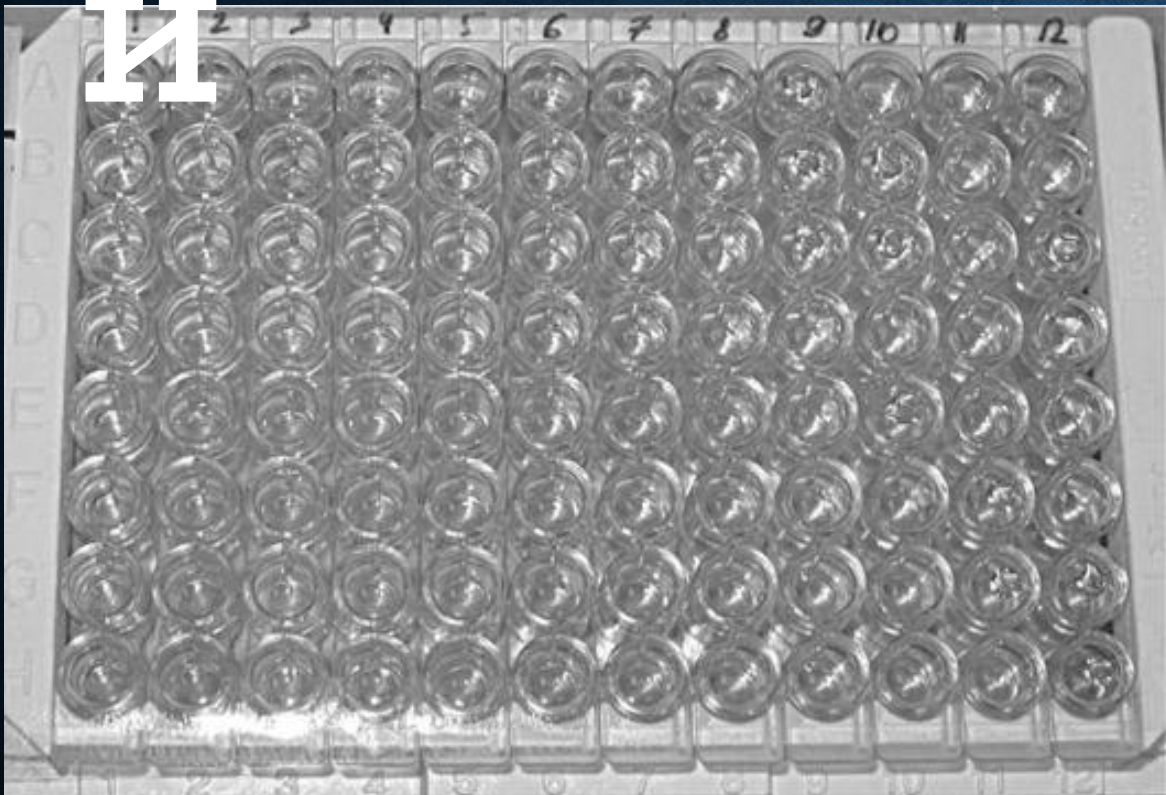
# ОШИБКИ ПРИ ПОСТАНОВКЕ ТЕСТА





# ОШИБК

# И





## **ЕСТЬ ЛИ НЕДОСТАТКИ У ИФА?**

**Главным отрицательным моментом исследования является возможность получения ложноотрицательных и ложноположительных данных. Причиной недоразумений могут стать технические недочеты, прием медикаментов, который может исказить картину**



# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Высокая чувствительность, позволяющая выявлять концентрации до 0,05нг/мл.
- Возможность использовать минимальные объёмы исследуемого затеряла
- 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
- Относительно низкая стоимость диагностических наборов
- Возможность постановки большого количества анализов пациента за короткий срок.



**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ ;)**

