

Основы ИФА. Принцип Метода. Тест-системы. Оборудование.



Иммуноферментный анализ— лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных 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.

ИФА является одним из наиболее активно развивающихся направлений химической энзимологии. Это обусловлено тем, что в ИФА уникальная специфичность иммунохимической реакции (то есть антитела связываются исключительно с определёнными антигенами, и ни с какими другими) сочетается с высокой чувствительностью детекции ферментативной метки. Высокая стабильность реагентов, простота методов регистрации, возможность создания каскадных систем усиления различных химических сигналов, относительно низкая цена.

ОСНОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Иммунохимическая реакция в растворе протекает в несколько стадий:

- 1) Является обратимое образование комплекса между антителами и антигенами.
- 2) Образование комплекса обеспечивается гидрофобными, ионными, ван-дер-ваальсовыми и водородными связями. Наиболее существенную роль играют силы гидрофобного взаимодействия, которые стабилизируют всю систему.
- 3) Эффективность таких взаимодействий возрастает с повышением температуры.
- 4) Реакция антиген-антитело протекает с выделением теплоты.

Взаимодействие антигена с субпопуляцией антител

Ранее для количественного описания эффективности взаимодействия антиген-антитело за основу была взята простая модель взаимодействия одновалентного антигена и одновалентного антитела. Но так как молекула антитела имеет несколько антигенсвязывающих центров и, кроме того, способна взаимодействовать с несколькими антигенными детерминантами одной молекулы антигена, то такая характеристика образования иммунохимического комплекса является весьма упрощённой. Для описания более близкого к реальности процесса взаимодействия поливалентного антитела с поливалентным антигеном введён термин **авидность**.

Методы определения ферментативной активности

Фотометрический метод

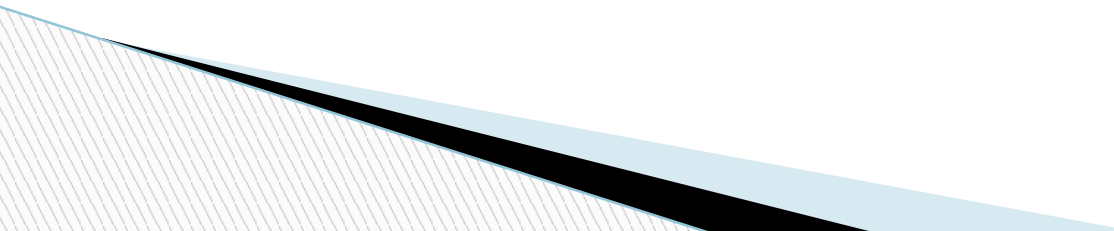
В ИФА наибольшее распространение получил фотометрический метод регистрации активности ферментов. В качестве субстратов ферментов при этом используют такие вещества, продукты превращения которых являются окрашенными соединениями или, наоборот, окраска самих субстратов изменяется в процессе реакции. Окрашенные соединения поглощают видимый свет. Для измерения оптической плотности используется спектрофотометр.

Флуориметрический метод

В последнее время в ИФА получили распространение субстраты, которые образуют продукты, регистрируемые флуориметрическим методом. Молекула при поглощении фотона переходит из основного электронного состояния в возбуждённое. Возбуждённая молекула может вернуться в основное состояние, при этом избыток энергии перейдёт в теплоту. Часть молекул, перешедших из возбуждённого состояния в основное с испусканием света, определяет квантовый выход ϕ .

Биолюминесценция и хемилюминесценция

В качестве детектирующих систем в ИФА нашли применение ферментативные реакции, энергия которых реализуется в виде светового излучения — реакции био- и хемилюминесценции. За скоростью таких реакций следят по интенсивности свечения реакционной системы, регистрируемой с помощью люминометра.



Электрохимический метод

Известны также электрохимические способы определения активности ферментов, используемых в качестве меток в иммуноанализе. В иммуноферментных методах анализа в качестве метки антигенов и антител могут использоваться как ферменты, так и их субстраты. Если меткой служит молекула фермента, то выбранный способ детекции должен обеспечивать регистрацию сигнала, пропорционально зависящего от концентрации фермента, а в случае применения в качестве метки субстрата — от концентрации субстрата. После проведения всех иммунохимических стадий любого метода ИФА необходимо установить концентрацию меченого ферментом компонента иммунохимической реакции. По наблюдаемой скорости реакции судят о концентрации фермента-маркера в системе.

Ферменты, используемые в ИФА в качестве меток

Принципиальная возможность применения ферментов в качестве меток в ИФА обусловлена чрезвычайно высокой чувствительностью регистрации ферментов в растворе.

Требования к ферментным меткам:

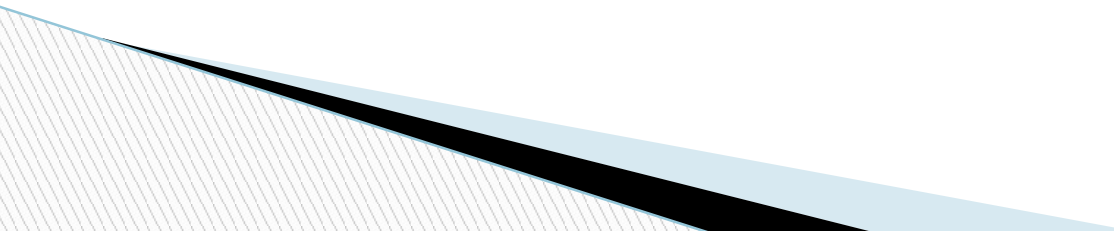
- 1) Высокая специфичность и удельная каталитическая активность, позволяющая обнаружить метку в низких концентрациях;
- 2) Доступность фермента, возможность получения достаточно чистых ферментных препаратов, сохраняющих высокую активность после химической модификации при получении конъюгата с антигенами или антителами;
- 3) Стабильность в оптимальных условиях взаимодействия антигена с антителом;
- 4) Простота и чувствительность метода определения концентрации фермента.

Наибольшее распространение в гетерогенном ИФА (где используются реагенты, иммобилизированные на поверхности твёрдых носителей) получили пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и β -D-галактозидаза. Наиболее доступной является пероксидаза хрена.

В качестве субстратного реагента наиболее часто применяется орто-фенилендиамин (ОФД) или тетраметилбензидин (ТМБ) с перекисью водорода, продукт окисления которых регистрируется фотометрически. Для остановки ферментативной реакции применяют «стоп реагент», который добавляют во все исследуемые и контрольные пробы в равных количествах. Наиболее часто в качестве «стоп реагента» применяют серную кислоту. Учёт результатов проводят спектрофотометрически.

Классификация методов ИФА

Существует два подхода:

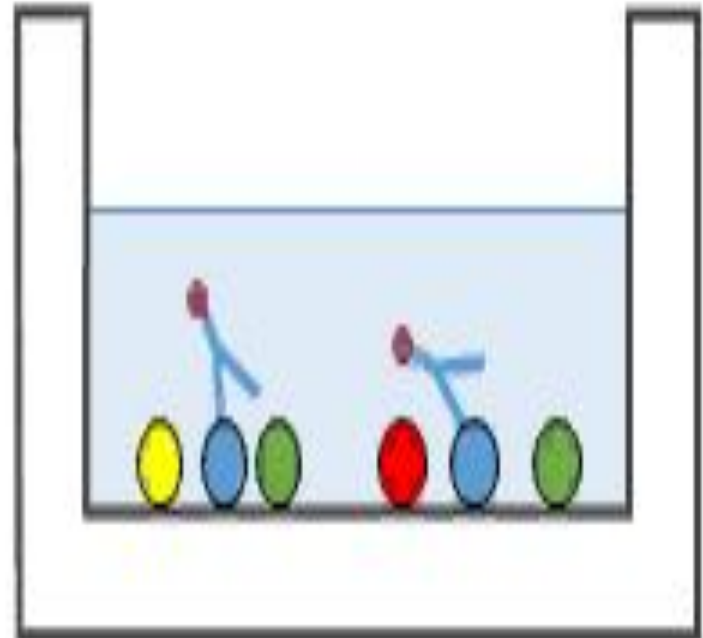
- 1) Прямое измерение концентрации образовавшихся комплексов;
 - 2) Определение концентрации оставшихся свободными (не вступивших в реакцию) антител.
- 

Прямой ИФА

В прямом иммуноферментном анализе вносимый материал (антиген) закрепляется во время инкубации на поверхности чистых лунок.

Количество исследуемого материала детектируется с помощью антител к выявляемому антигену, соединенных со специфической меткой, обеспечивающий ферментативную реакцию. Принцип прямого ИФА разноцветные круги — различные антигены из внесённой в лунку сыворотки;

У с лиловой точкой — антитела, меченные ферментом, обеспечивающим цветовую реакцию (конъюгат).



Непрямой ИФА

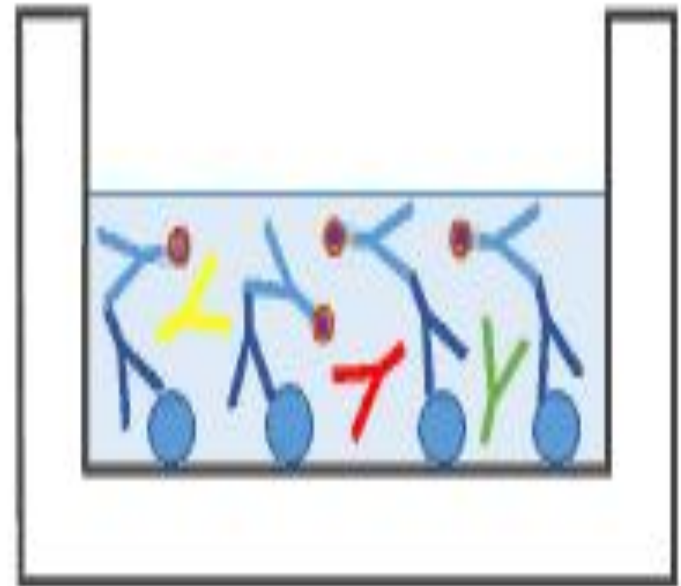
В непрямом иммуноферментном анализе используют антитела к выявляемому антигену, соединенные со специфической меткой. Эта специфическая метка и есть субстрат ферментативной реакции.

Непрямой неконкурентный ИФА

В лунки, на твёрдой поверхности которых предварительно сорбирован антиген, вносится исследуемый биологический материал (чаще всего сыворотка или плазма крови человека), содержащий антитела к антигену. Образец исследуется на содержание антител. синие круги — антиген, иммобилизованный на поверхности лунки;

У, У, У, У — антитела из внесённой в лунку сыворотки;

У с лиловой точкой — антитела, меченные ферментом, обеспечивающим цветовую реакцию (конъюгат).



«Сэндвич»

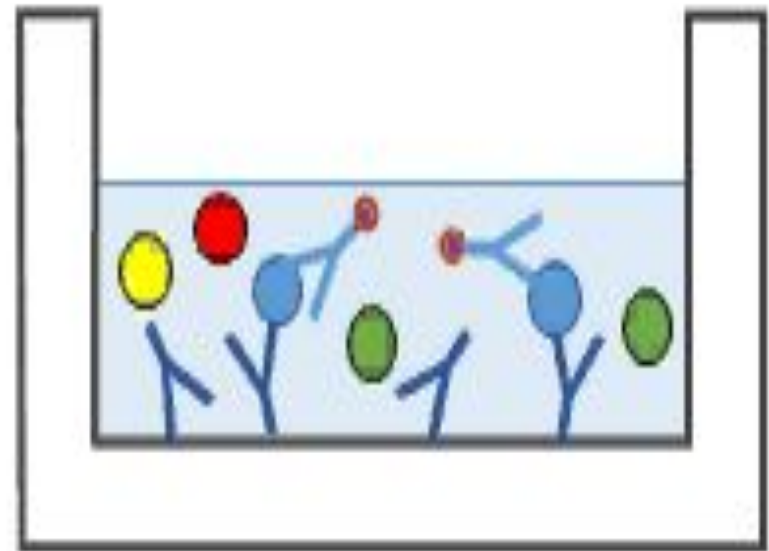
«Сэндвич» является вариантом непрямого неконкурентного гетерогенного ИФА, в котором в качестве иммуносорбента выступает антитело

Принцип непрямого неконкурентного ИФА «сэндвич»

разноцветные круги — различные антигены из внесённой в лунку сыворотки;

У — антитела, иммобилизованные на поверхности лунки;

У с лиловой точкой — антитела, меченные ферментом, обеспечивающим цветовую реакцию (конъюгат).



«Сэндвич»- метод может быть использован для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере, две пространственно удалённые 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.

Конкурентные

В случае конкурентного ИФА определяемые антигены или антитела конкурируют с аналогичными мечеными антигенами или антителами конъюгата за места связывания с иммуносорбентом. Анализ этого типа часто используют для определения антигенов, присутствующих в высоких концентрациях или гормонов, имеющих только один антиген-связывающий центр.

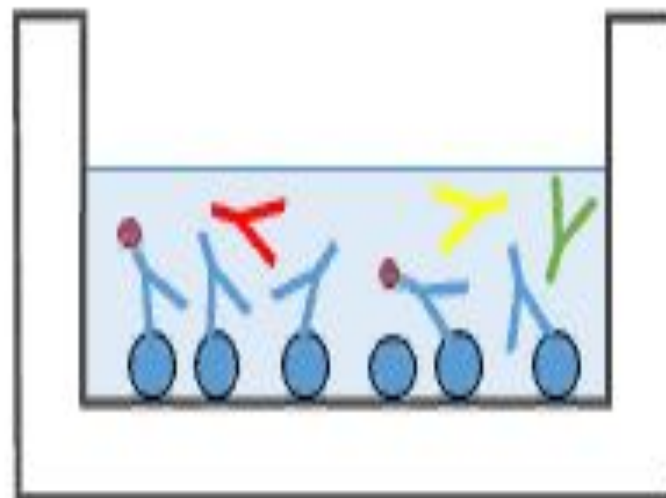
Прямой конкурентный ИФА

Прямой конкурентный формат ИФА использует иммобилизованные на твердой фазе специфические антигены, а меченые ферментом и немеченые антитела конкурируют за связь с иммобилизованным антигеном.

Принцип прямого конкурентного ИФА

синие круги — антиген, иммобилизованный на поверхности лунки; Y, Y, Y, Y — антитела из внесённой в лунку сыворотки;

Y с лиловой точкой — антитела, меченные ферментом, обеспечивающим цветовую реакцию (конъюгат). Преимуществом прямой схемы является небольшое число стадий, что позволяет легко автоматизировать анализ.



Непрямой конкурентный ИФА

В непрямом конкурентном формате ИФА используются меченные ферментом антивидовые антитела (специфические или вторичные) и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель. Одна из наиболее распространенных схем ИФА.

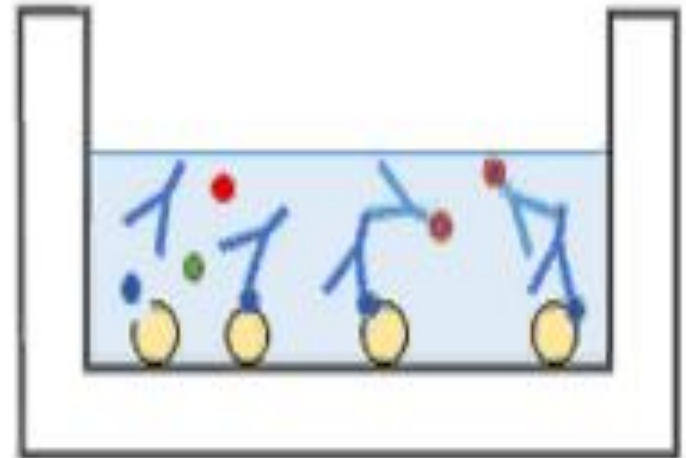
Принцип непрямого конкурентного ИФА

большие жёлтые круги — конъюгат антиген-белок, иммобилизованный на поверхности лунки;

малые красный, зелёный и синие круги — различные антигены из внесённой в лунку сыворотки (например, наркотические вещества);

Y — немеченые антитела, специфические к конкретному антигену;

Y с лиловой точкой — вторичные антивидовые антитела, меченные ферментом, обеспечивающим цветовую реакцию (конъюгат).



Особенности и проблемы ИФА

Ложноположительные результаты при определении антител к различным инфекциям могут возникнуть за счёт:

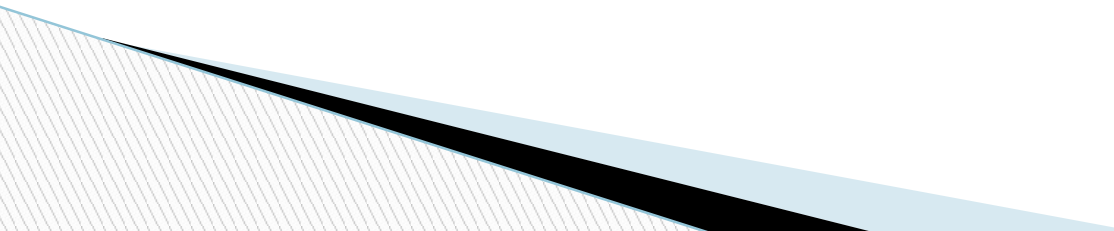
- 1) Ревматоидного фактора, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека;
 - 2) За счёт антител, образующихся при различных системных заболеваниях, нарушениях обмена или приёме лекарственных препаратов;
 - 3) У новорождённых такие ложноположительные реакции могут возникать за счёт образования в организме ребёнка М-антител к иммуноглобулину G матери. Помимо этого, причиной ложноположительных результатов может быть 4) 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.

Основные типы тест-систем в зависимости от используемых антигенов

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

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

Оборудование для ИФА лабораторий:

- 1) Автоматические ИФА анализаторы
 - 2) Полуавтоматические ИФА анализаторы (ИФА ридеры)
 - 3) Полуавтоматические люминесцентные анализаторы (люминометры)
 - 4) Промывочные устройства (вошеры) для ИФА
 - 5) Шейкеры и термошейкеры для ИФА
- 



Автоматические ИФА анализаторы



Полуавтоматические ИФА анализаторы



Полуавтоматические люминесцентные анализаторы



Промывочные устройства (вошеры) для ИФА



Механические **дозаторы** и наконечники



Шейкеры и термшейкеры для ИФА



Диспенсеры микропланшетного формата **Multidrop**



Мультиплексный ИФА анализ