

Методика ИФА

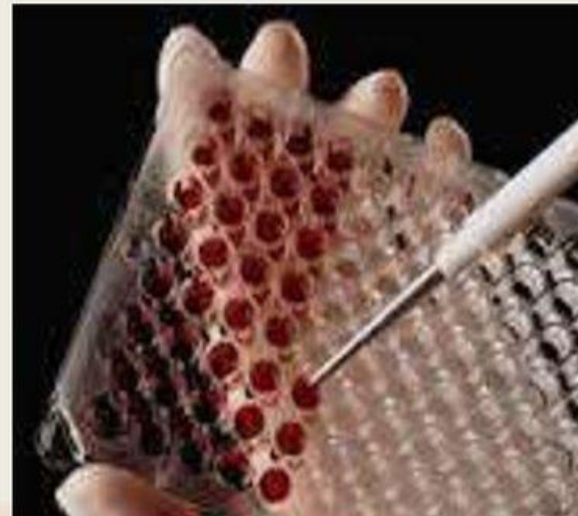
Выполнила: Магистрант 1 года
обучения А.А. Куртова

- Иммуноферментный анализ, или метод (ИФА) - выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, бета-галактозидазой и или щелочной фосфатазой). После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат/хромоген.

ИФА диагностика



- время анализа 1,5–2 ч;
- наличие положительного и отрицательного контролей;
- возможность использования инструментального и визуального учета
- при визуальном учёте минимальное приборное обеспечение (флаконы, пипетки).
- низкая стоимость анализа;
- удобен и выгоден для проведения массовых анализов.



Сущность иммуноферментного анализа (ИФА)



Конъюгат .



Субстрат(ТМБ).



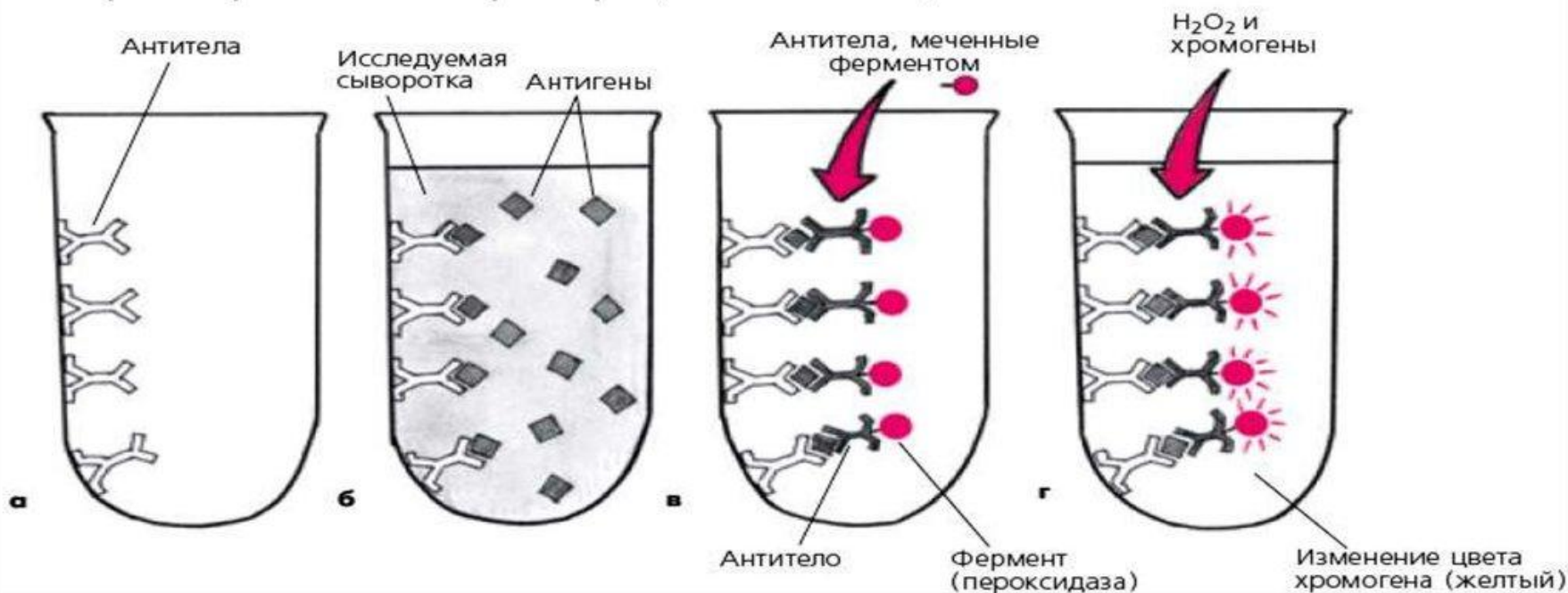
Окрашивание раствора под действием субстрата.



Stat Fax 2100 измеряет оптическую плотность раствора.

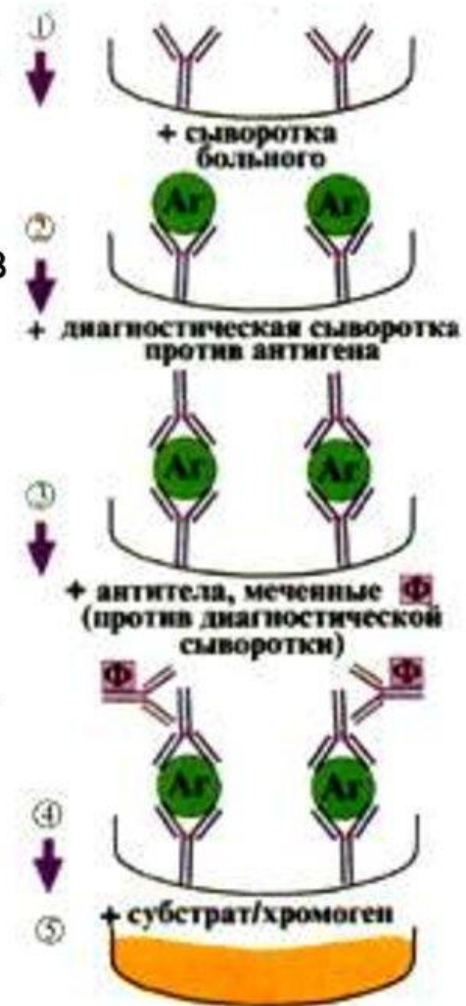
Метод ИФА (иммуноферментный анализ)

- Используются высокоспецифичные АТ (АГ) меченные ферментами (пероксидаза), способными разлагать субстрат и образовывать окрашенные продукты
- Характеризуется высокой чувствительностью и быстротой получения результата (6 часов)
- Пример: ВИЧ-инфекция, гепатит В, С



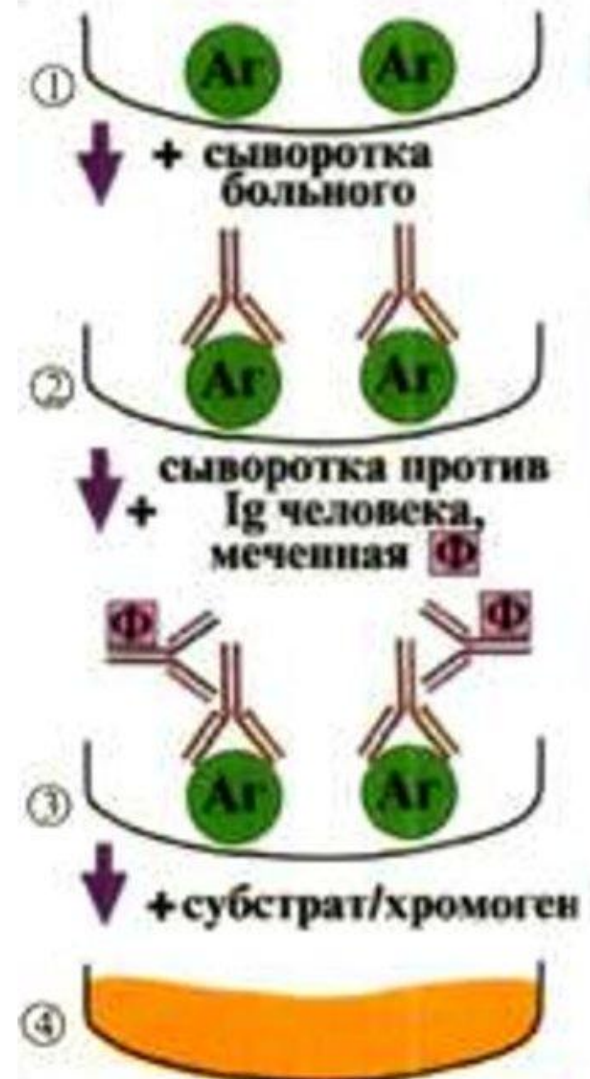
Обнаружение антигена при помощи ИФА.

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.

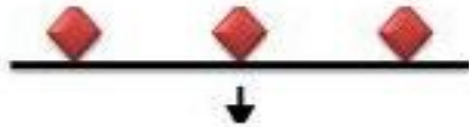


Обнаружение антител при помощи ИФА.

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.



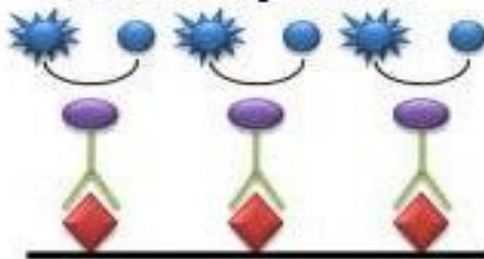
вирусный антиген,
адсорбированный на пластине



в конъюгат добавляют антитело

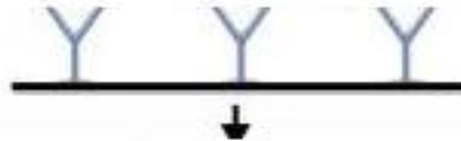


изменение цвета после
добавления реагента

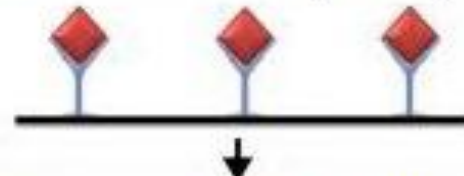


прямой ИФА

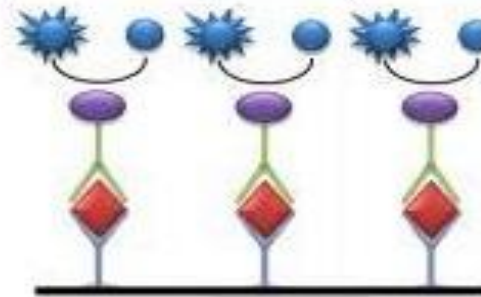
захват антитела на пластине



антиген захватывается, если присутствует



Таким образом, конъюгат антитела обнаруживается
при добавлении цветного реагента



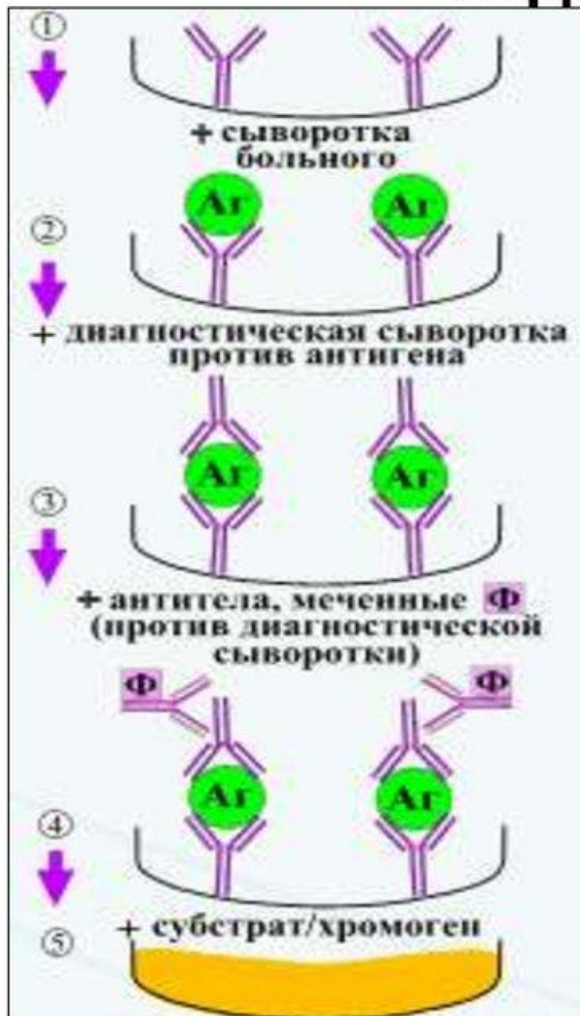
непрямой ИФА

Принцип проведения иммуноферментного анализа

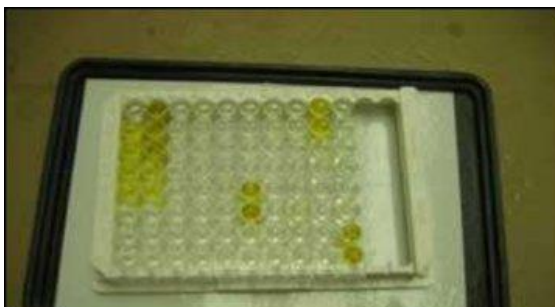
Твердофазный ИФА

- вариант теста, когда один из компонентов иммунной -реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе, напр., в лунках планшеток из полистирола. Компоненты выявляют добавлением меченых антител или антигенов. При положительном результате изменяется цвет хромогена

Схема иммуноферментного анализа твёрдофазный вариант



Определение антигена в сыворотке больного с сорбированными диагностическими антителами



Результат ИФА. Желтый цвет раствора в лунке является положительным результатом.

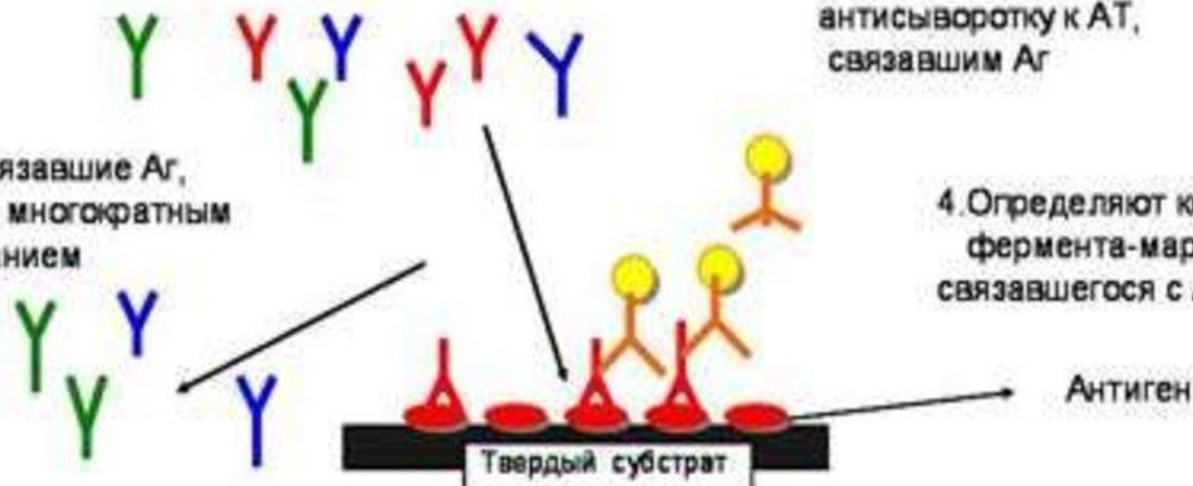
Прямой твердофазный ИФА (схема)

1. Сыворотку инкубируют с Ag, фиксированным на твердом субстрате (пластиковая микропланшетка)

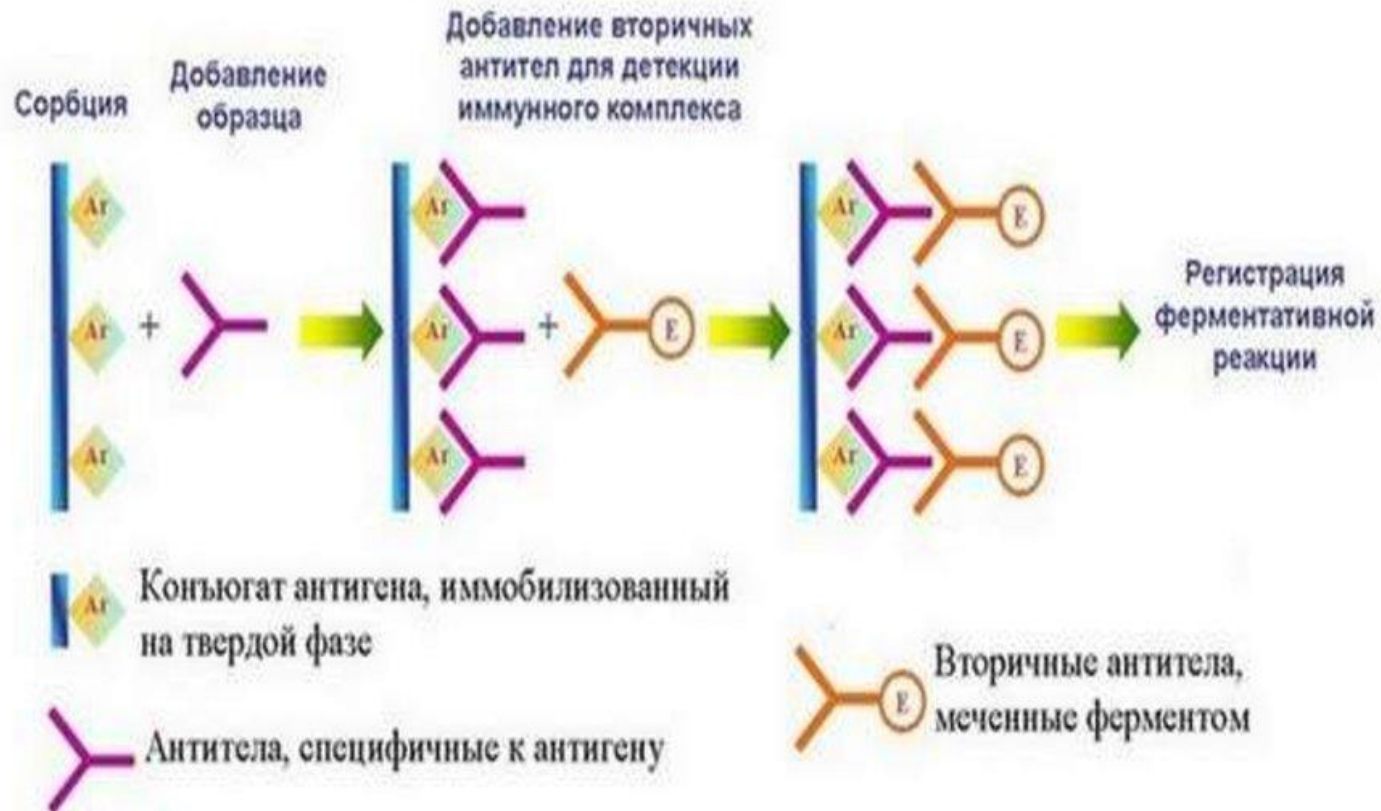
2. АТ, не связавшие Ag, удаляют многократным промыванием

3. Вносят меченную ферментом антисыворотку к АТ, связавшим Ag

4. Определяют количество фермента-маркера, связавшегося с АТ

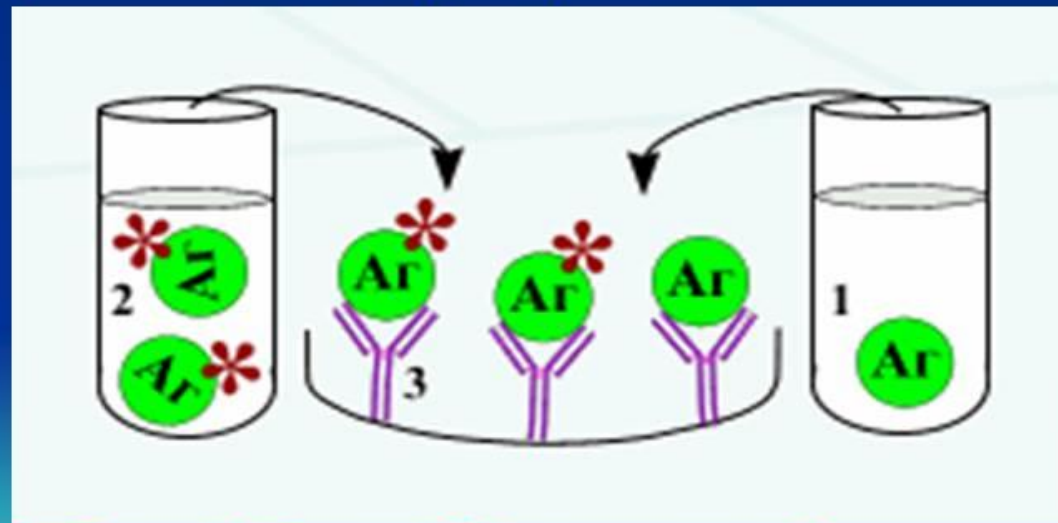


ПРИНЦИП НЕПРЯМОГО ИФА



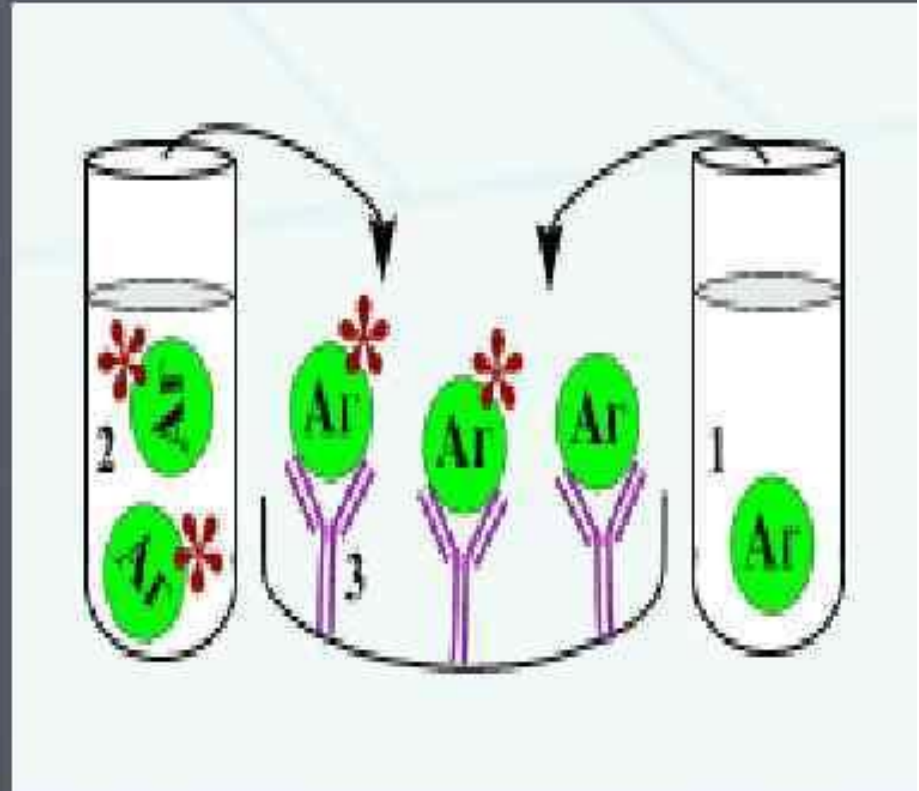
Конкурентный ИФА для определения антигенов

Искомый антиген(1) и меченый ферментом антиген(2) конкурируют друг с другом за антитела (3), сорбированные на твердой фазе.



- ▶ **Конкурентный ИФА для определения Аг:** искомый антиген(1) и меченый ферментом антиген(2) конкурируют друг с другом за антитела (3), сорбированные на твердой фазе.

- ▶ **Конкурентный ИФА для определения антител:** искомые антитела и меченые ферментом антитела конкурируют друг с другом за антигены, сорбированные на твердой фазе.

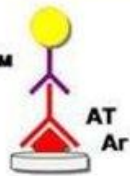


Иммуноферментный анализ

Общая схема

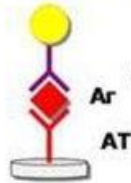
Иммуноферментный анализ (ИФА)

Антитела к АТ,
меченные ферментом



Выявление антител

Антитела к Аг,
меченные ферментом



Выявление антигена



Анализатор иммуноферментный
полуавтоматический



Иммуноферментный автоматический
анализатор

Спасибо за внимание!