



Иммуноферментные методы в лабораторной диагностике

План лекции

- Методы, основанные на использовании меченых компонентов реакции
- Иммуноферментный и иммунофлюоресцентный анализ
- Диагностика и мониторинг инфекционных заболеваний

Методы с использованием химических меток

Иммунологические реакции, такие, как иммунофлюоресценция, ИФА, радиоиммунный анализ, иммунный блоттинг (ИБ), основаны на применении химических или физических меток (флюоресцирующие вещества, фермент-субстратные взаимодействия, радиоактивные изотопы) для детекции образовавшегося комплекса «антиген–антитело», что обуславливает большую чувствительность анализа по сравнению с серологическими реакциями. Более высокая специфичность иммунологических реакций обусловлена возможностью применения моноклональных антител, характеризующихся высокой специфичностью к строго определённым участкам (эпитопам) анализируемых антигенов. Для иммунологических тестов необходимы специальное оборудование для проведения реакции и регистрации результатов, а также обученный персонал.



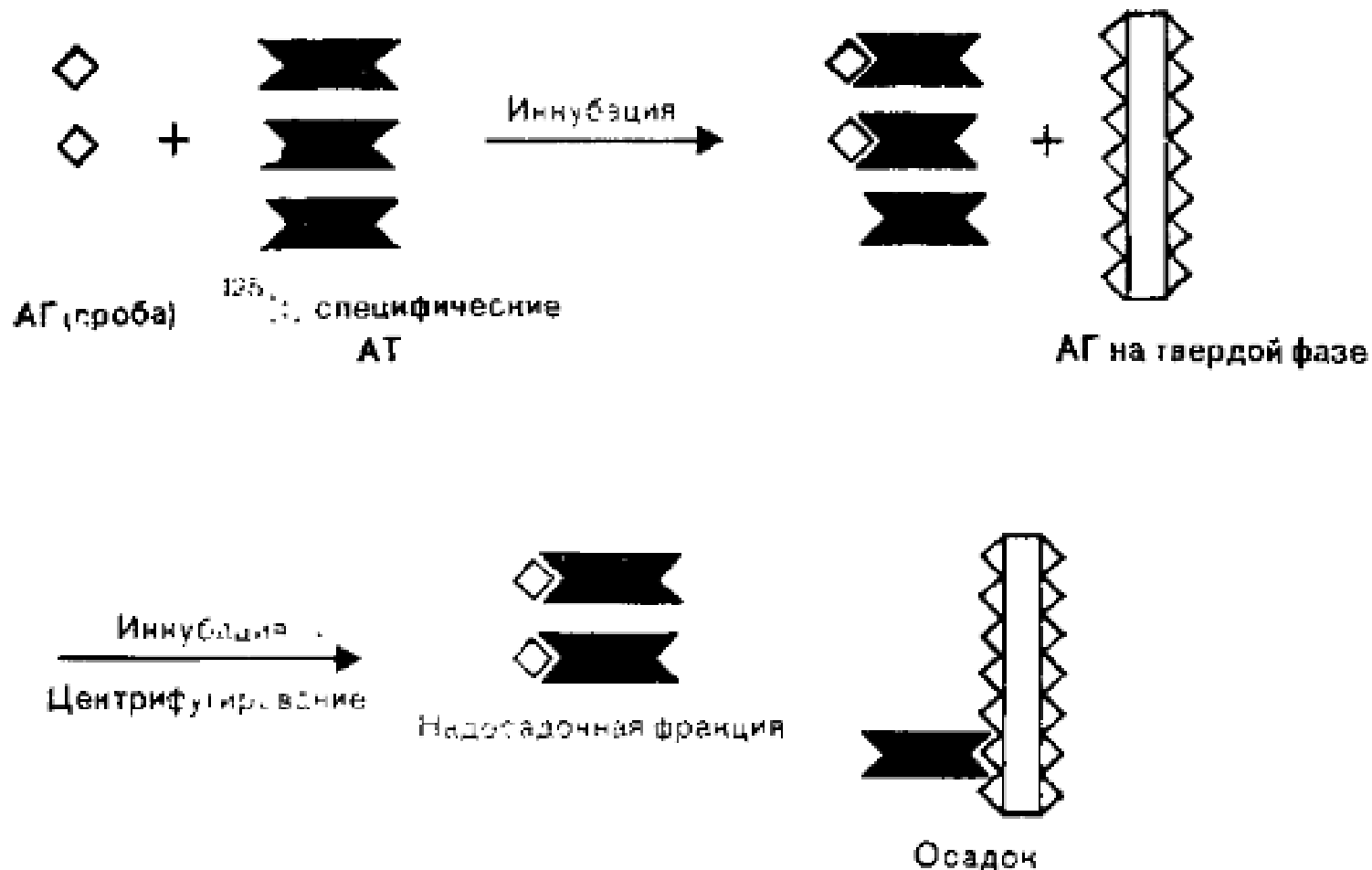
Радиоиммунный анализ

Радиоиммунный анализ

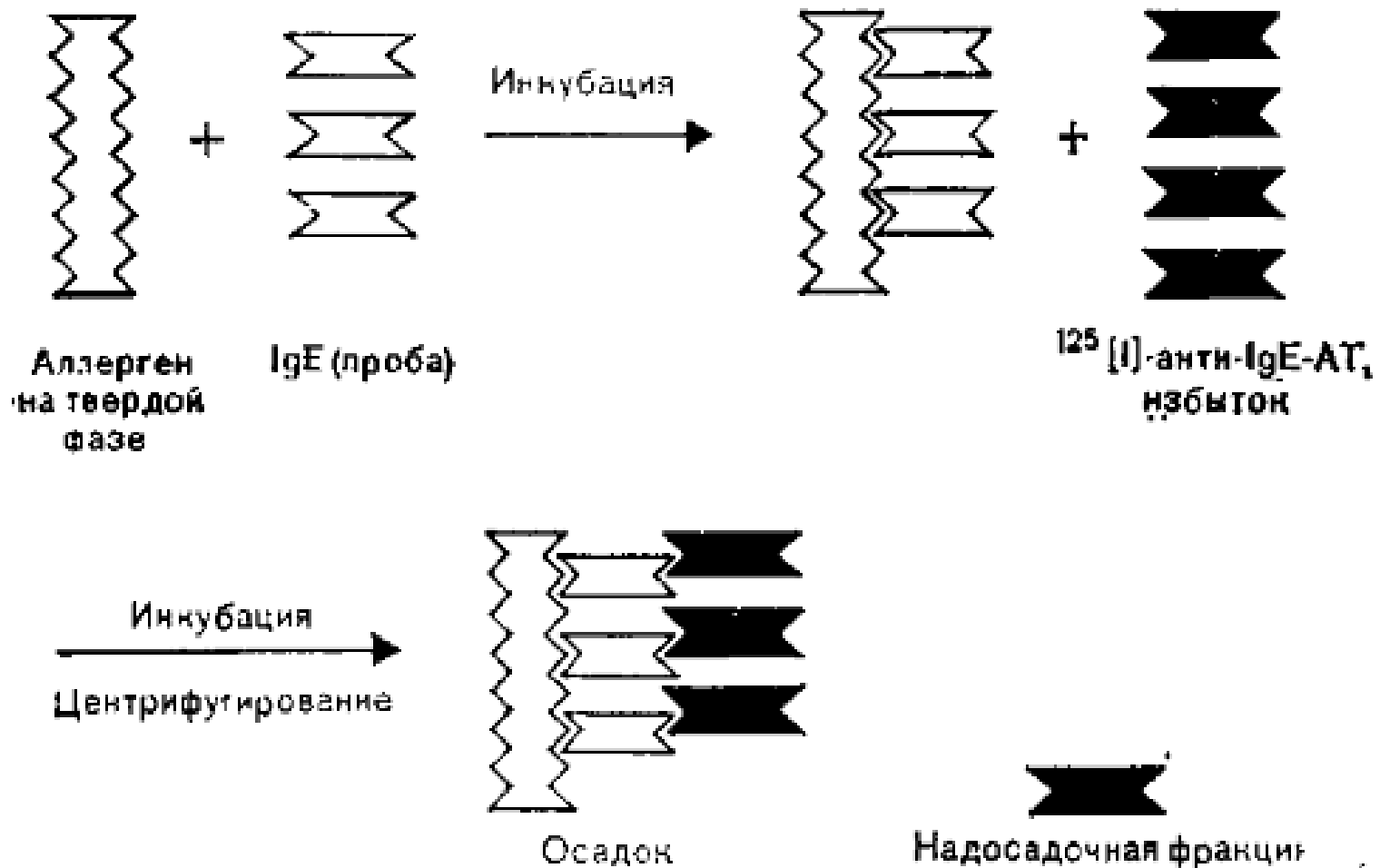
В 1960 г. Ялоу и Берсон опубликовали статью «Иммунологическое определение эндогенного инсулина в плазме человека», положившую начало эпохе радиоиммунологических исследований. Характерной чертой радиоиммунологических методов является сочетание специфичности, свойственной реакциям АГ—АТ, с простотой и высокой чувствительностью определения, которые дает применение радиоактивных изотопов, введенных в состав АГ или АТ. По сравнению с обычными методами анализа преимущество РИА состоит в том, что отсутствует необходимость оценивать протекающую реакцию по вторичным проявлениям, таким как агглютинация, преципитация, лизис эритроцитов. Важнейшим условием использования РИА является возможность соединения измеряемой радиоактивной субстанции с компонентами реакции АГ—АТ.

Возможность проводить конкурентный анализ, а также анализ в жидкой или твердой фазе приводит к созданию большого числа различных методик.

Модификация РИА, основанная на методе меченых антител. Конкурентный анализ для выявления антигена



Модификация РИА, основанная на методе меченых антител. Сэндвич анализ для выявления антител



Радиоиммунный анализ. Оценка метода.

- * Нужен гамма-счетчик
- * Применение твердофазных методов (сефадекс, целлюлоза, полимеры) упрощает процедуру
- * Колебания в серии как правило не превышают 10%
- * Для варианта с преципитацией ИК нужны микрограммы Аг/Ат, для конкурентного анализа – нанограммы
- * В части случаев получение меченых антигенов проще, чем в ИФА
- * Необходимость защиты от излучения, ограниченный срок жизни реагентов делает этот метод менее востребованным



Иммунофлюоресцентный анализ

Принцип реакции иммунофлюоресценции

- * Метод предложен Кунсом в 1942 году как экспресс метод диагностики инфекционных болезней
- * Принцип метода заключается в соединении специфического комплекса антиген - антитело с иммунной антивидовой сывороткой, меченной флюорохромом, и выявление его с помощью люминесцентного микроскопа

Этапы метода иммунофлюоресценции

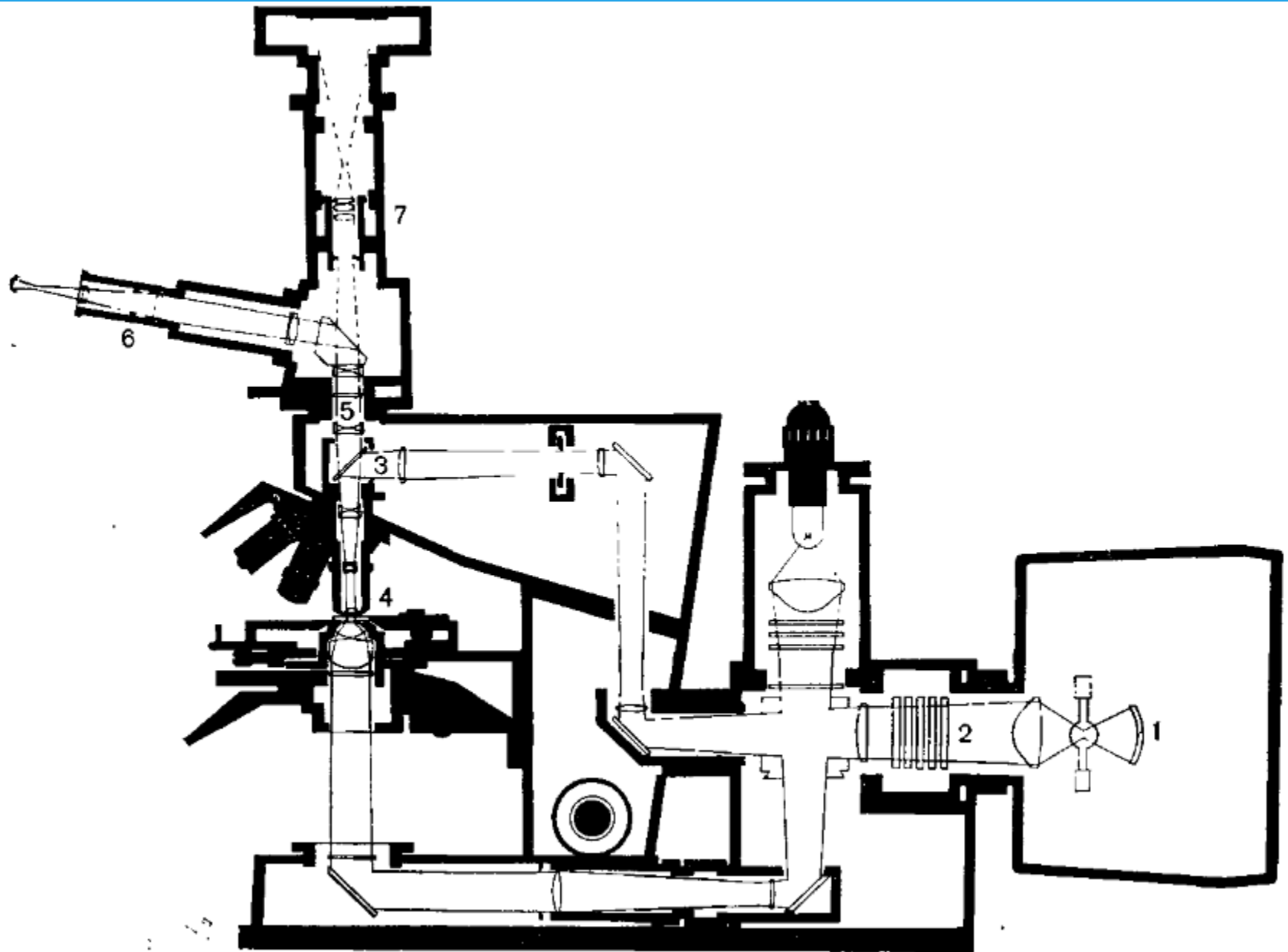
- получение, характеристика и маркировка антисывороток;
- получение антигенного субстрата;
- проведение анализа, т. е. обработка флюоресцирующими АТ;
- микроскопический анализ флюоресценции препаратов.

Микроскопия препарата. Иммерсионное масло

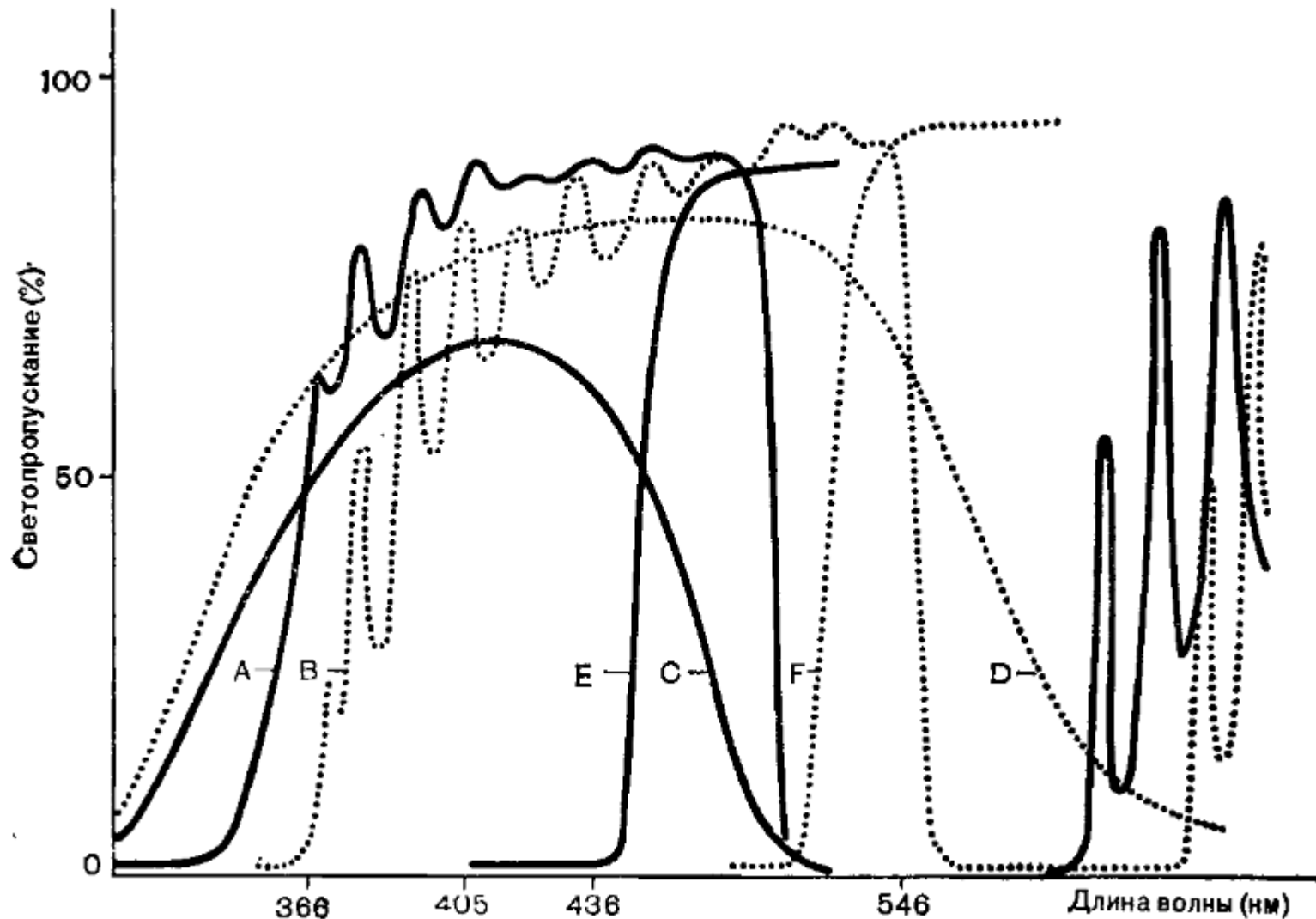
- * Кедровое масло может обладать собственной флюоресценцией
- * Для люминесцентной микроскопии существуют специальные виды масла для флуоресценции



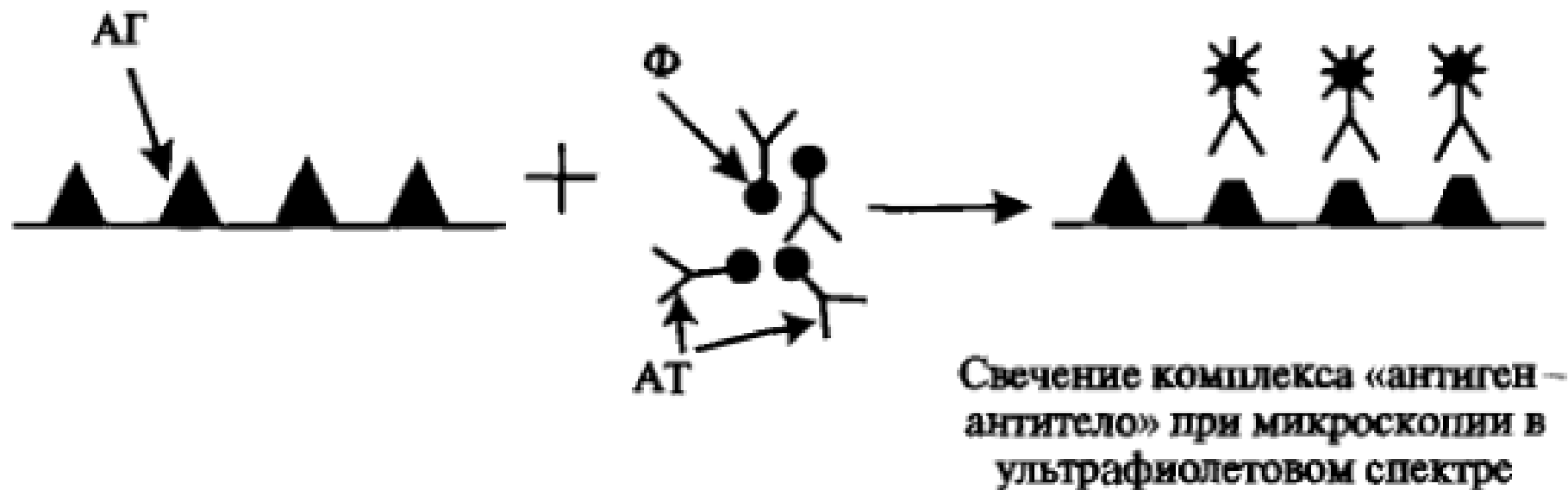
Ход лучей света в флюоресцентном микроскопе



Светофильтры подбираются с учетом возбуждающего и излучающего света используемого красителя



Метод прямой иммунофлуоресценции



Метод непрямой иммунофлюоресценции

А – с антигенсодержащим клиническим материалом
Б – со стандартным антигеном

А



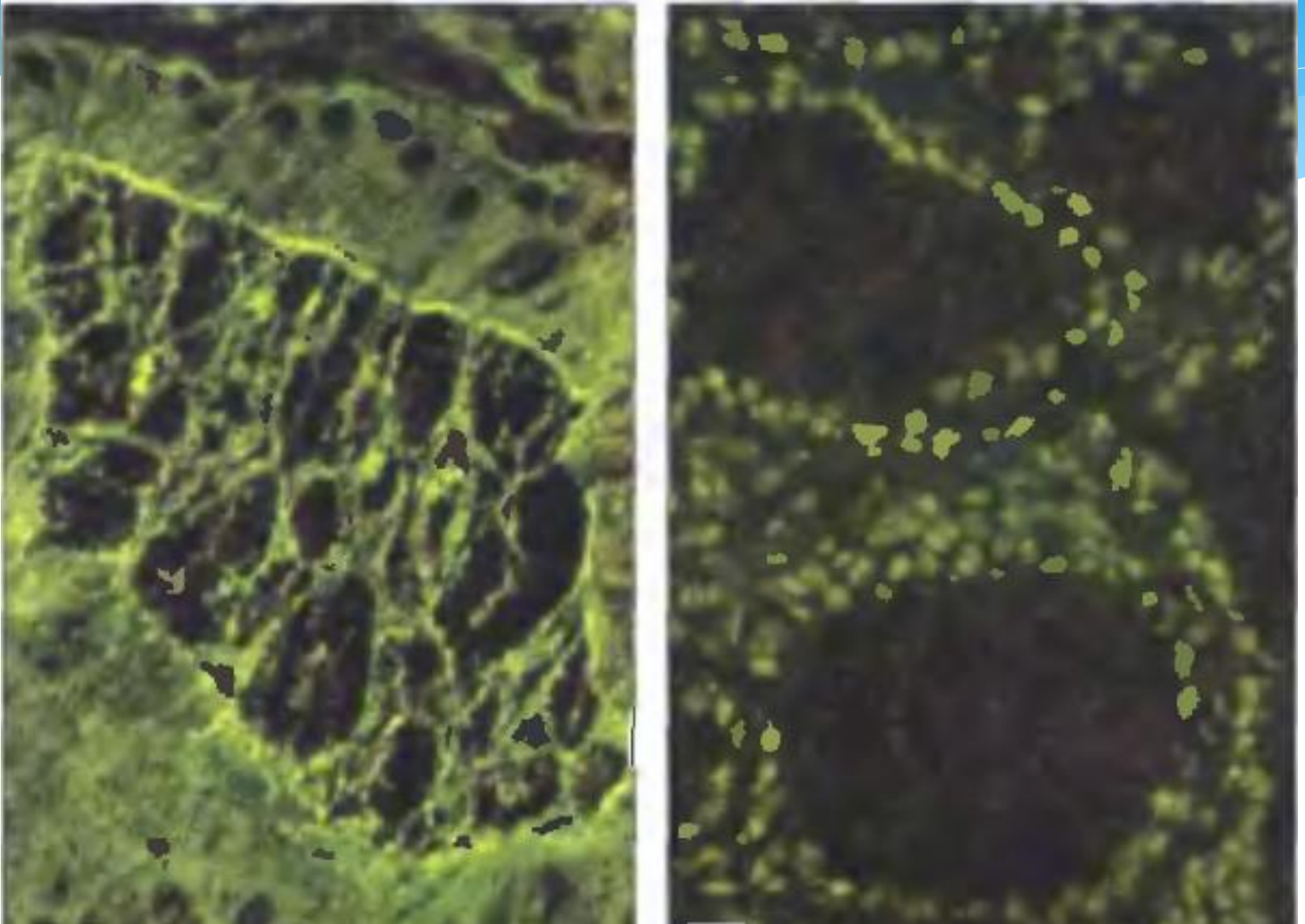
Свечение комплекса «антиген – антитело» при микроскопии в ультрафиолетовом спектре

Б

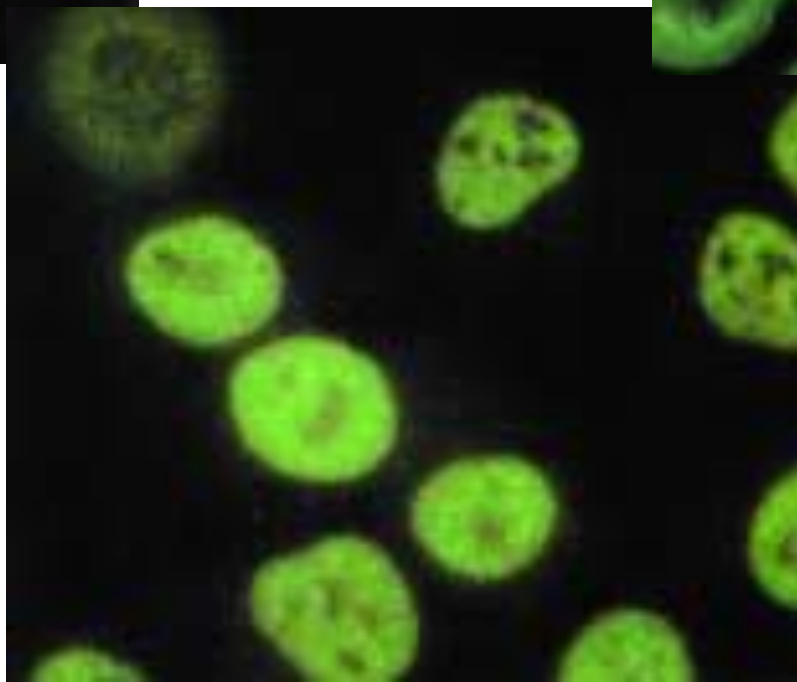
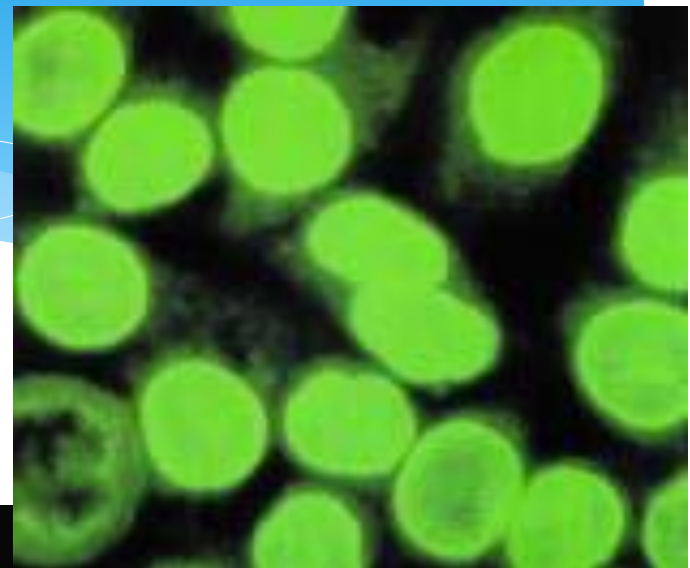
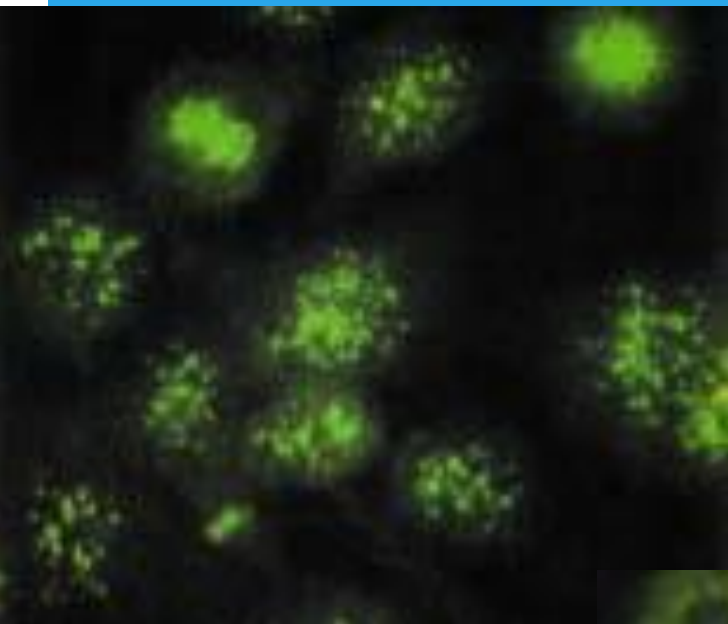


Свечение комплекса «антиген – антитело» при микроскопии в ультрафиолетовом спектре

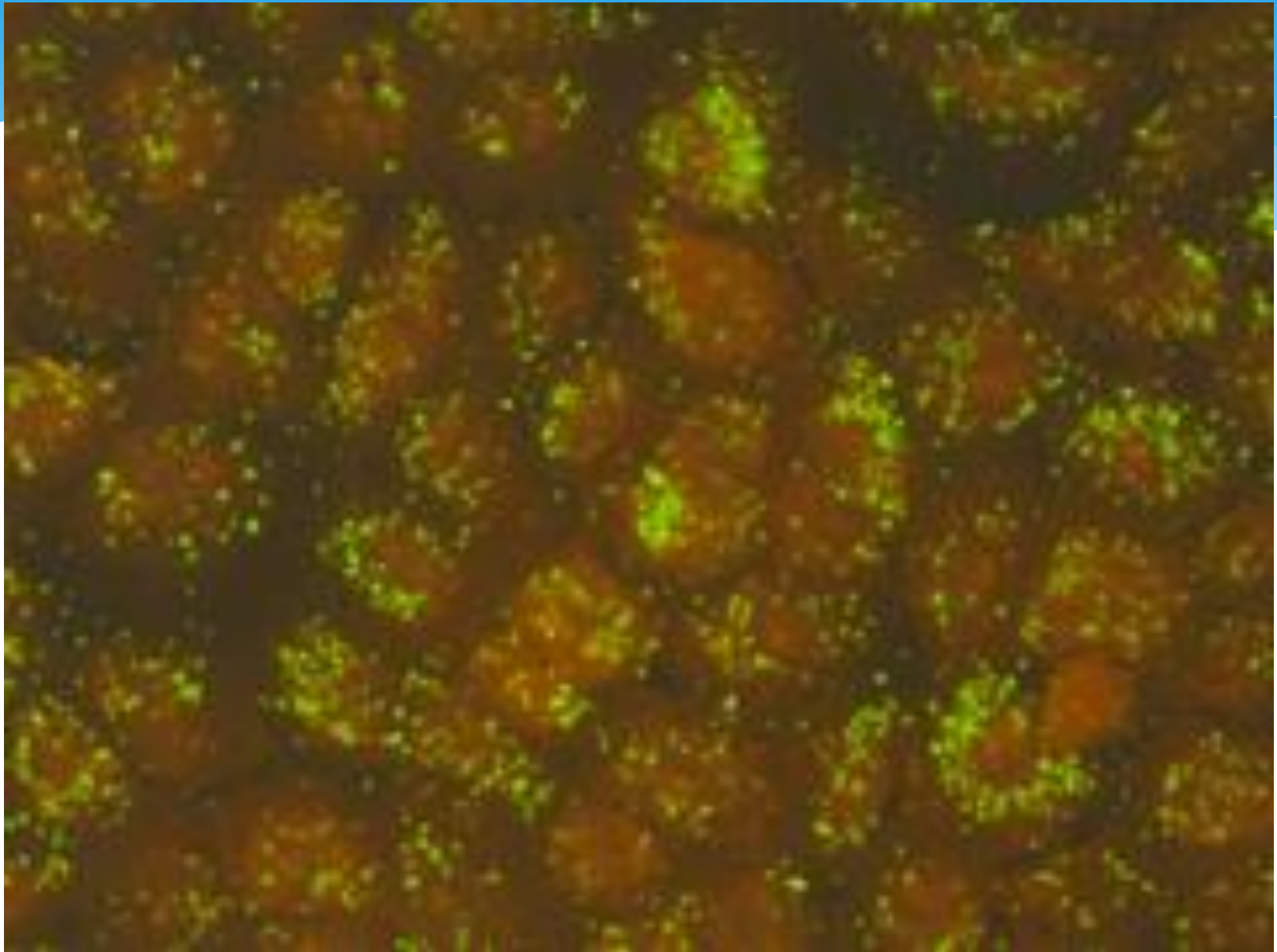
Антитиреоидные и антинуклеарные антитела в срезях щитовидной железы (окрашены эпителиальные клетки и ядра)



Различные типы антинуклеарных антител



Хламидиоз реакция иммунофлюоресценции



Иммуноферментный анализ (ИФА)

- * Предложен в начале 70-х годов тремя независимыми группами исследователей из Швеции, Нидерландов, США
- * Аг или Ат, вступающие в реакцию, метятся ферментом, по активности которого судят о количестве вступившего в реакцию вещества.
- * Позволяет определять нанограммы вещества

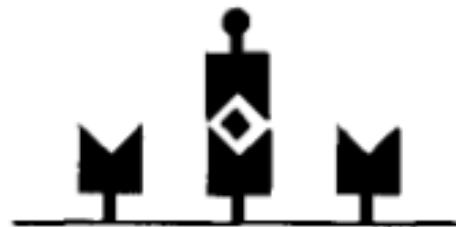


1 Антитела (Y) иммобилизованы на твёрдой фазе — на дне лунки полистиролового планшета



2 Внесение биологического субстрата, содержащего антиген (♦), инкубация

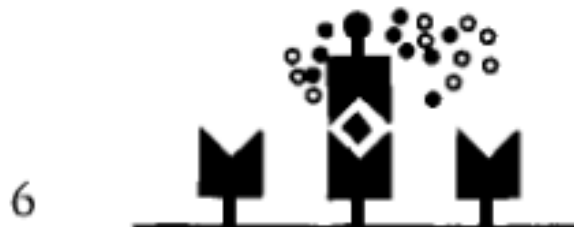
3 Отмывка



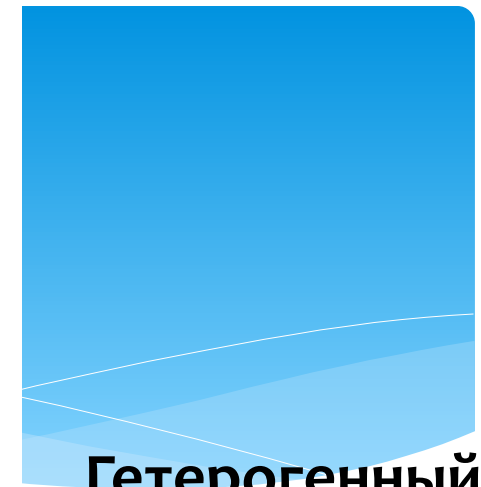
4

4 Внесение меченных ферментом антител (Y), инкубация

5 Отмывка



6 Добавление субстрата/хромогена (светлые кружки), ферментативная реакция — активация (тёмные кружки)

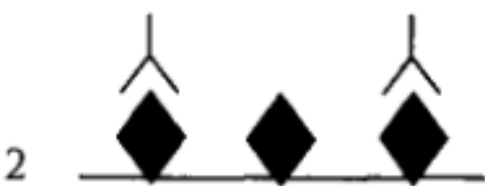


**Гетерогенный
неконкурентный
ИФА.**

**Сэндвич метод.
Определение
антигена.**

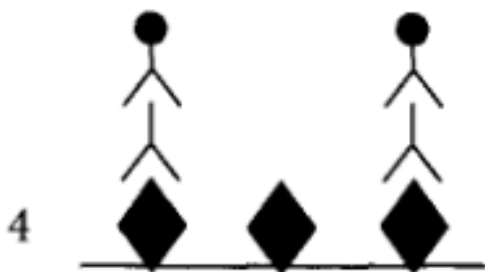


Антиген (◆) связан с твёрдой фазой на дне лунки полистиролового планшета



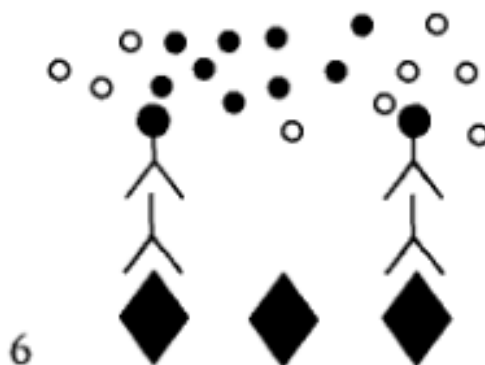
Внесение содержащей антитела (Y) сыворотки крови больного, инкубация

3 Отмывка



Внесение меченой ферментом антиглобулиновой сыворотки (●Y), инкубация

5 Отмывка



Добавление субстрата/хромогена (светлые кружки), ферментативная реакция — активация субстрата (тёмные кружки)



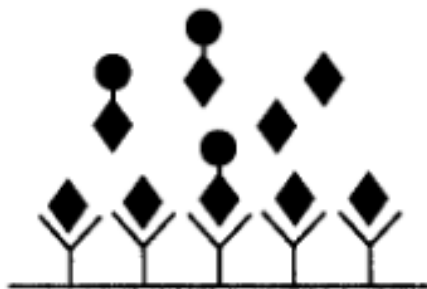
**Гетерогенный
неконкурентный ИФА.
Сэндвич метод.
Определение антител.**

1



Антитела (Y) иммобилизованы на твёрдой фазе — на дне лунки полистиролового планшета

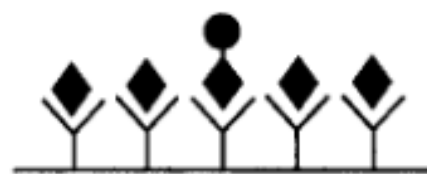
2



Внесение биологического субстрата, содержащего антиген (◆), и меченного ферментом антигена (◆●), инкубация

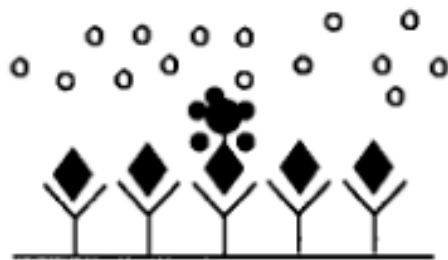
3

Отмывка



Антиген, находящийся в биологическом субстрате, конкурируя с конъюгатом, занял большинство связей иммобилизованных антител

4

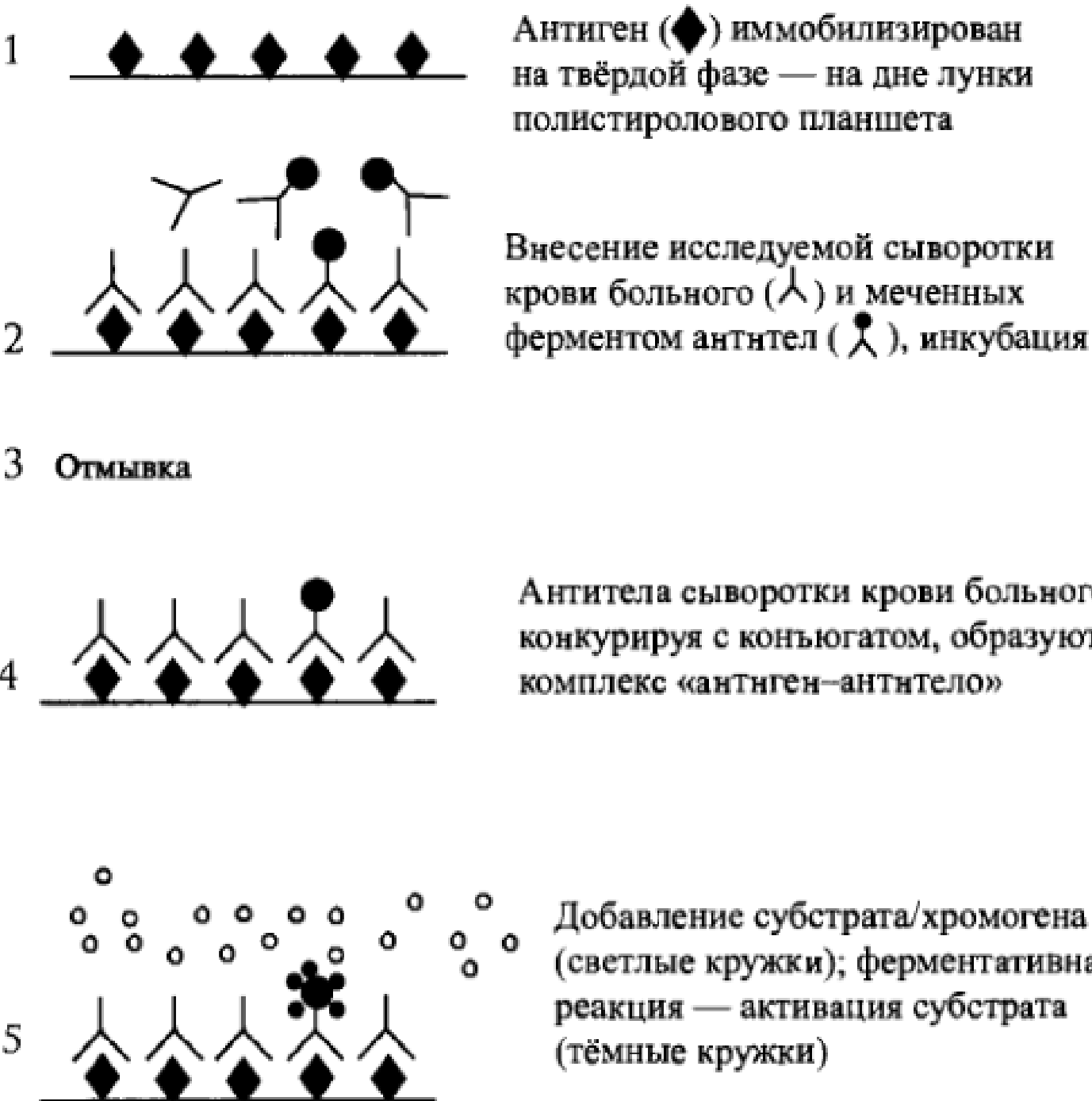


Добавление субстрата/хромогена (светлые кружки); ферментативная реакция — активация субстрата (тёмные кружки)

5



**Гетерогенный конкурентный ИФА.
Определение антигена.**



Гетерогенный конкурентный ИФА.
Определение антител.



Вопросы?