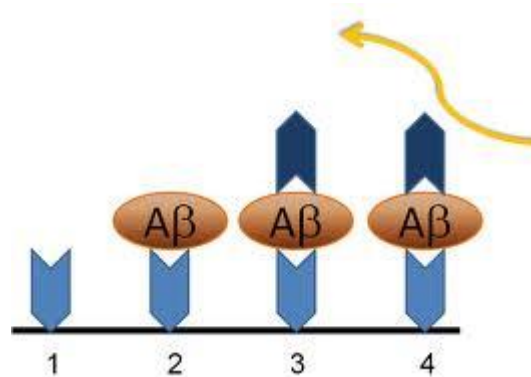


Иммуноферментный анализ Enzyme immunoassay (EIA)



- **Иммуноферментный анализ** (сокращённо ИФА, англ. enzyme immunoassay, EIA) — 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

Прямые методы

Определение антигена в образце

Непрямые методы

Определение антител в образце

На сегодняшний день ИФА - один из наиболее чувствительных методов.

К достоинствам этого метода относится возможность исследования большого количества проб, его высокая воспроизводимость. Всё это послужило стимулом для разработки в нашей стране большого числа иммунодиагностических наборов различного целевого направления

Классификация методов иммуноферментного анализа



В основу классификации методов ИФА положено несколько подходов:

1. По **типу реагентов**, присутствующих на первой стадии ИФА, различают **конкурентный** и **неконкурентный** методы.

А) В **конкурентном ИФА** на первой стадии в системе присутствуют одновременно анализируемое соединение и его аналог, меченный ферментом и конкурирующий за центры специфического связывания с ним.

Б) Для **неконкурентных** методов характерно присутствие в системе на первой стадии только анализируемого соединения и специфичных к нему центров связывания.

Классификация методов иммуноферментного анализа



2. По принципу определения тестируемого вещества:

А) Прямое определение концентрации вещества (антигена или антитела) по числу прореагировавших с ним центров связывания. В этом случае ферментная метка будет находиться в образовавшемся специфическом комплексе АГ-АТ.

Б) 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.

Классификация методов иммуноферментного анализа

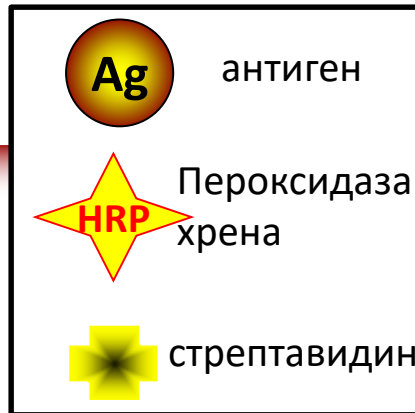
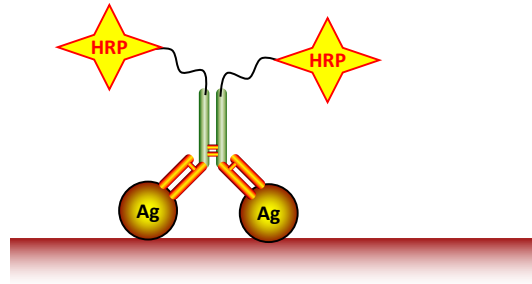
3. по количеству фаз при постановке ИФА

- **гомогенный** ИФА (все три стадии проходят в растворе и между основными стадиями нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов)
- **гетерогенный** ИФА (проводят в двухфазной системе с участием твердой фазы - носителя), присутствует обязательная стадия разделения иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов (отмывка), которые находятся в разных фазах (образовавшиеся иммунные комплексы находятся на твердой фазе, а непрореагировавшие комплексы в растворе). Гетерогенный метод, в котором формирование иммунных комплексов на первой стадии протекает на твердой фазе, называют твердофазным ТИФА (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)
- **гомогенно-гетерогенный** ИФА (на первой стадии образование специфических комплексов происходит в растворе, а затем для разделения компонентов используют твердую фазу с иммобилизованным реагентом)

Типы иммуноферментного анализа

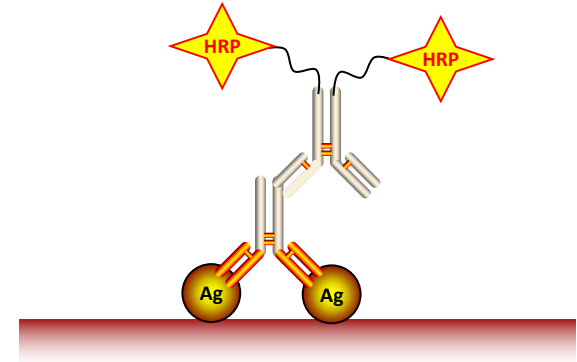
1. Прямая иммунодетекция

АТ первого порядка конъюгируют с Ферментом



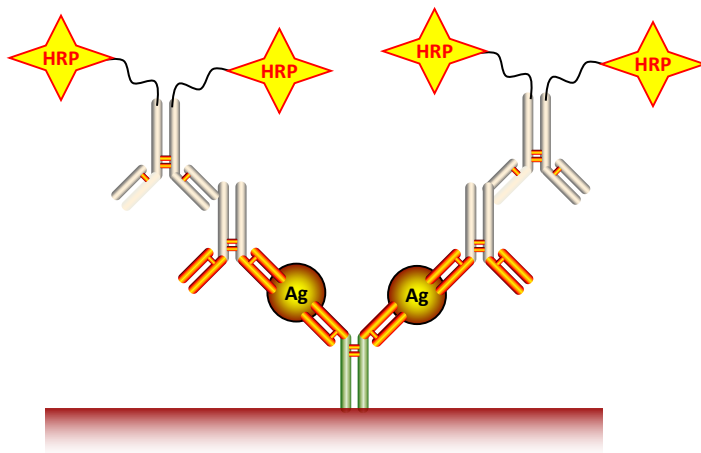
2. Непрямая иммунодетекция

АТ второго порядка конъюгируют с Ферментом



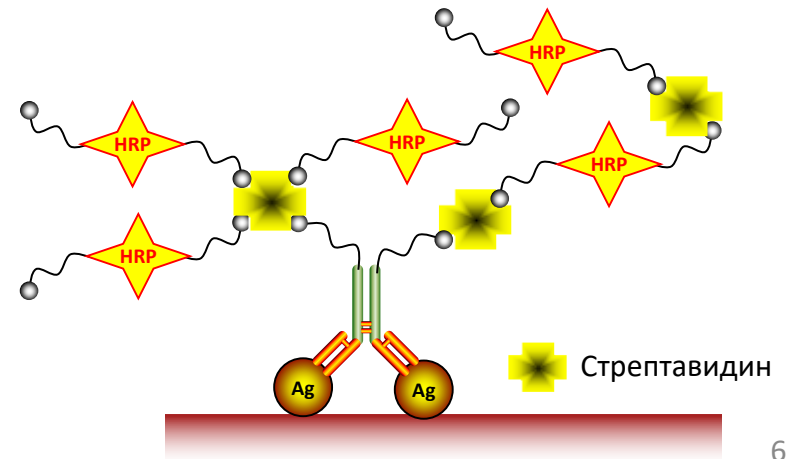
3. Непрямой сэндвич-вариант

АГ наносится на твердой фазе



4. Прямой вариант с биотиновой меткой

АТ биотинилируются



Характеристика ферментов, используемых В ИФА

А) Преимущества применения ферментов в качестве меток:

- ферментные метки обладают чрезвычайно мощным каталитическим действием, одна молекула фермента может реагировать с большим количеством молекул субстрата. Таким образом, фермент, присутствующий в ничтожно малых количествах, можно выявить и количественно определить по образованию продуктов катализируемой им реакции.
- наличие в молекуле фермента различных функциональных групп (сульфгидрильных, карбоксильных и др.), через которые можно ковалентно присоединить молекулы лиганда.

Б) Требования к ферментным маркерам:

- высокая активность и стабильность фермента во время анализа, при модификации и в конъюгате с антителами или другими белками
- наличие чувствительных субстратов и простота метода определения продуктов или субстратов ферментативной реакции
- возможность адаптации субстратных систем к дальнейшему усилению
- отсутствие фермента или его ингибиторов в исследуемой биологической жидкости

Характеристика твердых носителей

В качестве **твердой фазы** для проведения ИФА можно применять различные материалы: полистирол, поливинилхлорид, полипропилен и другие вещества. Твердой фазой могут служить стенки пробирки, 96-луночные и др. планшеты, шарики, бусины, а также нитроцеллюлозные и другие мембраны, активно сорбирующие белки.

Иммобилизация антигена или антител на твердой фазе возможна тремя путями:

- пассивная адсорбция, основанная на сильных гидрофобных взаимодействиях между белками и синтетической поверхностью
- ковалентное прикрепление к твердой фазе
- иммунохимическое (нековалентное и неадсорбционное) присоединение

Характеристика твердых носителей

Пассивная адсорбция белков широко используется при проведении ИФА на платах для титрования, на нитроцеллюлозных мембранах. Пассивная адсорбция идет по принципу насыщения и коррелирует с молекулярной массой адсорбируемого вещества. Адсорбционная поверхность мембран различного типа (нитроцеллюлоза, нейлон и др.) в 100-1000 раз выше, чем у пластика.

Полисахариды и сильно гликозилированные белки часто имеют низкую аффинность для полистирола. Необходимы другие методы для их иммобилизации, например, **ковалентное присоединение** с помощью глутарового альдегида. Ковалентное присоединение эффективно, если в качестве твердой фазы используются гидрофильные бусы (агароза) и полистироловые бусы.

Иммунохимические методы основываются на использовании предварительно адсорбированных «ловушечных» антител для иммобилизации антигена или антител. Антиген, иммобилизованный иммунохимически, в 10 раз активнее, чем пассивно адсорбированный антиген. Могут использоваться лектины или иммуноглобулин-связывающие белки бактерий, которые легко адсорбируются на пластике или других гидрофобных поверхностях, например конканавалин А (Кон А) или стаффилококковый белок А. Кон А способен иммобилизовать gp 120 - белок вируса ВИЧ.

Свободные сайты на поверхности твердой фазы, не связавшиеся с сорбируемым агентом, могут фиксировать в ходе теста другие молекулы, в том числе и конъюгаты, что приводит к повышению фонового сигнала. Для предотвращения неспецифического связывания после иммобилизации на твердую фазу основного материала проводят обработку нейтральными для теста веществами. Наиболее популярные **блокирующие агенты** - бычий сывороточный альбумин (БСА), казеин и др. Выбор блокирующего агента и условия проведения этого этапа зависят от типа твердой фазы, чувствительности системы.

Характеристика субстратов, используемых в ИФА

А) **Выбор субстрата** определяется используемым в качестве метки ферментом, т.к. реакция фермент-субстрат высокоспецифична.

Б) **Требования к субстрату:**

- обеспечение высокой чувствительности метода при выявлении фермента в конъюгате
- образование хорошо учитываемых (например, окрашенных) продуктов реакции фермент-субстрат
- субстрат должен быть безопасным, дешевым, доступным и удобным для применения

Чаще используют **хромогенные** субстраты, которые, разрушаясь, образуют окрашенное вещество. Перспективным является использование высокоэнергетических субстратов - **флуоресцентных, хемилюминесцентных**. Применение таких субстратов позволяет теоретически повысить чувствительность ИФА на два порядка.

Характеристика субстратов, используемых В ИФА

Фермент	Источник получения	м.м. (кДа)	Субстрат	Стоп-реагент	Длина волны, нм
пероксидаза хрена	хрен	40	о-фенилендиаминди- гидрохлорид (ОФД)	5 М HCl	492
			5-аминосалициловая кислота	2 М Na ₂ SO ₄	405
			диаминобензидин	1 М NaOH	450
о-дианизидин					
тетраметилбензидин (ТМБ)					
бета-D- галактозидаза	<i>E. coli</i>	540	о-нитрофенил-D- галактозид		366
щелочная фосфатаза	<i>E. coli</i> слизистая кишечника теленка	84-150	р-нитрофенилфосфат	1 М NaOH	402
			5-бром-4-хлоро-3- индолил фосфат		

Характеристика антигенов и антител, используемых в ИФА

А) Антигены:

- должны быть высокоочищенными и высокоактивными
- должны обладать высокой антигенностью, оптимальной плотностью расположения и количеством антигенных детерминант, чужеродностью и гомогенностью

Б) **Антитела:** чувствительность ИФА зависит от концентрации, активности и специфичности используемых антител.

Они могут быть:

- поли- или моноклональными,
- различного класса и подкласса,
- антиаллотипическими (к различным вариантам доменов тяжелых и легких цепей ИГ),
- антиидиотипическими (к вариантам активных центров ИГ).

При низкой аффинности антител распад комплекса АГ-АТ приводит к удалению связанного АГ из системы. Чувствительность и специфичность метода повышается при использовании моноклональных антител. В этом случае появляется возможность определить низкие концентрации АГ (АТ) в исследуемых образцах

Принципы получения конъюгатов

- **Конъюгат** – это антиген или антитело, меченные ферментной меткой. Образование конъюгата – один из важных этапов проведения ИФА.
- При формировании конъюгата подбирают такой оптимальный метод введения ферментной метки, чтобы оба компонента конъюгата сохраняли свою биологическую активность: фермент - способность взаимодействовать с субстратом, а антиген или антитело - антигенность и антигенсвязывающую активность, соответственно.
- Наличие меченого, высокоочищенного антигена позволяет использовать конкурентные методы. В этом случае на конечном этапе можно измерять активность конъюгата, не связанного с иммобилизованными антителами, что позволяет избежать процедуры отмывки и делает анализ более удобным.
- Антигены разнообразны по своим физико-химическим свойствам и строению, поэтому невозможно разработать универсальные методики для получения конъюгата с антигеном. В этом случае получение конъюгата антигена с ферментом представляет собой отдельную сложную задачу.
- Приготовление меченых антител для ИФА методически более доступно.
- Конъюгирование фермента с иммунохимически активными белками производится различными методами: химическая сшивка, ковалентное связывание молекулы фермента с АГ или АТ и образование соединений через нековалентные связи, например, когда связь между ферментом и АГ или АТ осуществляется иммунологически, через взаимодействие антиген-антитело.

Принципы получения конъюгатов

- Наиболее широкое распространение получили **ковалентные способы** приготовления конъюгатов. Выбор реакции связывания определяется типом доступных функциональных групп в данных белковых молекулах. В качестве реагентов, используемых для введения фермента в молекулы антигенов и антител, используют глутаровый альдегид, периодат натрия и др.
- Существуют одноэтапный и двухэтапный методы получения конъюгатов с помощью глутарового альдегида. Могут образовываться конъюгаты различных размеров с редуцированной ферментативной активностью (15 - 60 % от свободного фермента). Образовавшийся конъюгат больших размеров может стерически затруднять определение тестируемого вещества. Конъюгаты с относительно низкой молекулярной массой состоят из Fab-фрагмента и одной молекулы фермента.
- В результате двухэтапного синтеза, который заключается в поэтапном получении сначала модифицированного с помощью сшивающего агента фермента, его выделении, а затем последующем взаимодействии его с антигеном (антителом), образуются молекулы однородного состава, содержащие 1-2 молекулы фермента на молекулу иммуноглобулина и сохраняющие высокую ферментативную и иммунологическую активность. Однако количество таких образовавшихся конъюгатов невелико (для пероксидазы хрена составляет 5 - 10 %).
- Наибольшее практическое применение нашел метод получения **иммунопероксидазных конъюгатов**, основанный на окислении углеводного компонента фермента периодатом натрия (связывание пероксидазы в конъюгат достигает 70-90 % от начального количества фермента).

Требования к конъюгатам

Надежный конъюгат должен обладать следующими свойствами:

- высоким антительным титром и высокой аффинностью к антигену, чтобы его можно было использовать в большом разведении, и таким образом уменьшить неспецифическое связывание
- достаточной специфичностью в рабочем разведении
- преобладанием мономерных форм над полимерными, т.к. полимерные формы имеют тенденцию к неспецифической адгезии на пластике, что приводит к высокому фоновому уровню реакции
- оптимальным молярным соотношением между ферментом и антителами (оптимальное соотношение составляет около 1:1)
- достаточной ферментативной активностью (определяется условиями конъюгации и соотношением молекул фермента и антител в конъюгате)

Системы повышения чувствительности ИФА

При использовании аффинных антител чувствительность отдельных вариантов ИФА очень высока и теоретически позволяет выявить единичные молекулы антигена, но на практике **чувствительность ограничивается** рядом факторов:

- активностью фермента
- интенсивностью сигнала
- методами его учета

Системы повышения сигнала дают возможность повышать чувствительность различных вариантов ИФА. Примеры таких систем рассмотрены ниже.

Системы на основе взаимодействия авидин-биотин

- Молекулы кофермента **биотина** (м.м. 244 Да) конъюгируют с антителами при помощи биотинил-N-гидроксисукцинимиды. Небольших размеров молекулу биотина проще присоединить к иммуноглобулину или другому белку без нарушения его иммунных или ферментативных свойств. Фермент в этом случае связывают с гликопротеином яичного белка - **авидином**. Аффинность связывания авидина с биотином очень высока (константа диссоциации комплекса – 10-15 моль), конъюгат авидин-фермент прочно фиксируется на комплексе антиген-антитело-биотин. После добавления соответствующего субстрата проводят определение продукта реакции спектрофотометрически или по интенсивности люминесценции.
- Одна молекула авидина состоит из четырех идентичных субъединиц, способна взаимодействовать с четырьмя молекулами биотина, что позволяет использовать его как связующую молекулу между двумя биотинсодержащими соединениями. В этом случае фермент тоже биотинилируют, а авидин выполняет функцию мостика, соединяя две молекулы, содержащие остатки биотина. К образовавшемуся комплексу антиген-антитело-биотин добавляют свободный авидин, а затем биотинилированный фермент. Проводят учет реакции.
- Белок авидин может неспецифически сорбироваться на других молекулах, поэтому все чаще используют другой биотинсвязывающий белок - **стрептавидин**, обнаруженный в бактериях *Streptomyces avidinii*. Стрептавидин также образует прочный комплекс с биотином и состоит из четырех идентичных субъединиц.
- Применение авидин-биотинового комплекса позволяет значительно повысить чувствительность ИФА, так как при синтезе конъюгата с одной молекулой АТ можно связать десятки молекул биотина. Получение конъюгатов (антител и ферментов с биотином) осуществляется достаточно легко и сопровождается минимальными изменениями их иммунологической и ферментативной активности. Конъюгаты ферментов с биотином могут быть использованы как универсальные реагенты. 17

Системы с использованием хемилюминесцентных реакций

Хемилюминесцентные реакции можно использовать для получения сигнала в ИФА, при этом повышается чувствительность метода и сокращается время проведения анализа. В качестве метки в ИФА широко применяют пероксидазу хрена, для ее выявления можно использовать и различные хемилюминесцентные реакции, которые основаны на способности **люминола** светиться при окислении перекисью водорода.

В **прямом анализе** при ферментативной реакции образуется перекись водорода и окисляет люминол, катализатором этой реакции выступает пероксидаза хрена.

Для усиления сигнала используются различные соединения, например, люциферин, фенолы, в этом случае интенсивность люминесценции усиливается в 10-100 раз, в отдельных вариантах в 500 раз (**усиленный хемилюминесцентный анализ**). Люминесцентный сигнал очень стабилен, его уровень достигает максимума за 30 с.

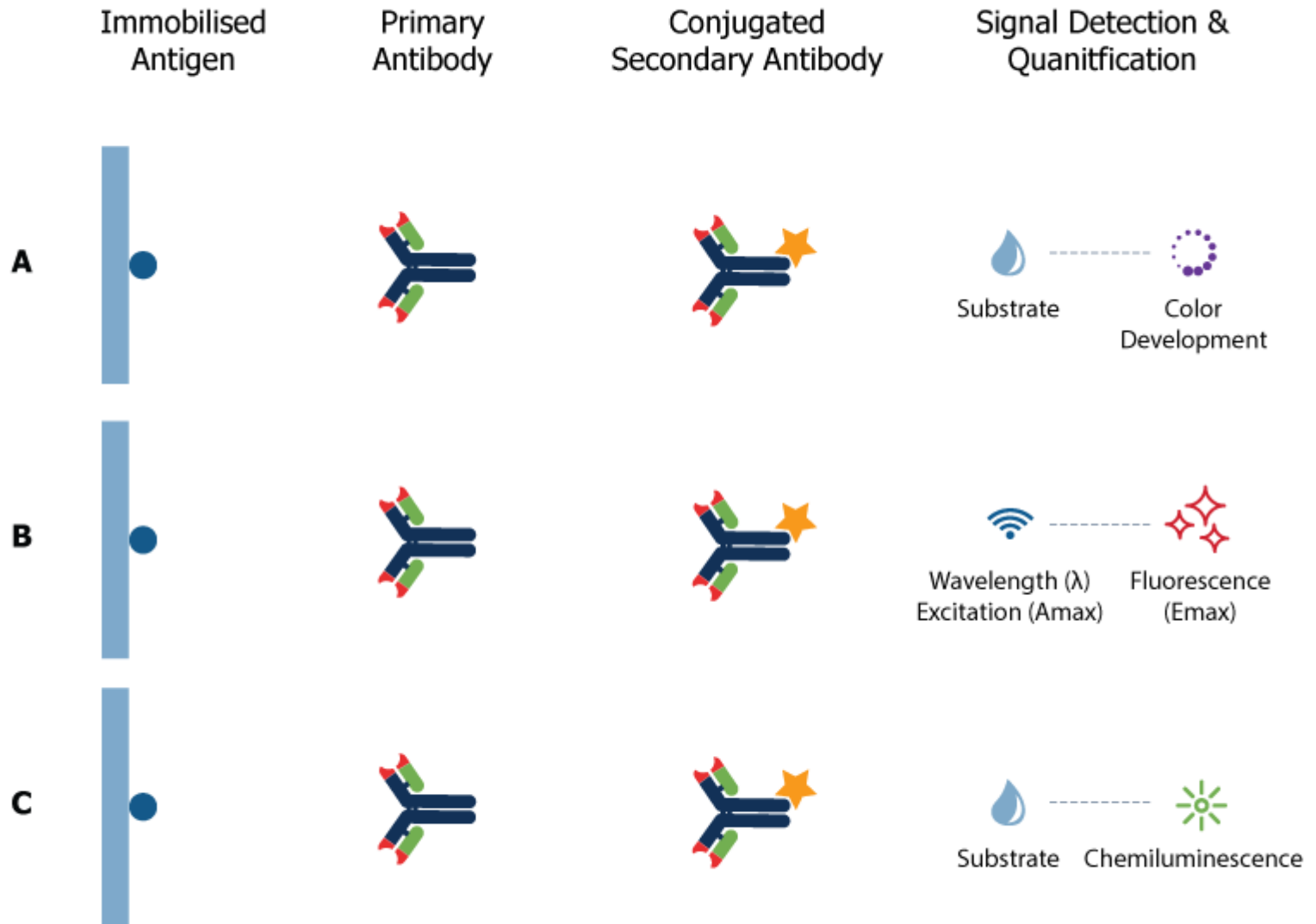
При **непрямом анализе** люминолом или его производными метится антитело. Такая метка в свободном состоянии способна окисляться перекисью водорода с выделением света. Если она образовала комплекс, то теряет способность окисляться.

Реакции на основе каскадных систем

Для повышения чувствительности ИФА можно использовать **ферментные каскадные системы**. В этом случае первый фермент, связанный с антителами, приводит к образованию восстанавливаемого субстрата для второй ферментной системы. Вторая ферментная система может быть субстрат-циклической или редоксициклической. Ферментными метками в этом случае могут служить фосфо глюкоизомераза, альдолаза, щелочная фосфатаза. Конечный продукт реакции определяют визуально или спектрофотометрически.

Системы амплификации в ИФА позволяют добиться высокой чувствительности. Такие ИФА-системы используются для определения уровня гормонов (тиреотропного, прогестерона и др.)

Titrating ELISA

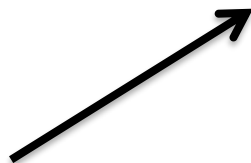


Для проведения ТИФА необходимы:

- полистироловый планшет или другие используемые варианты твердой фазы;
- отмывающий раствор;
- конъюгат (меченные ферментной меткой антигены или антитела);
- смесь используемых субстратов;
- останавливающий раствор (стоп-реагент – раствор для остановки реакции);
- образцы, используемые для заведомо положительного и заведомо отрицательного контролей;
- стандартный антиген (для построения калибровочной кривой);
- одно- и многоканальные пипетки;
- вошер (промыватель);
- оптический прибор для определения оптической плотности исследуемого раствора (ИФА-ридер, считыватель, который последовательно фотометрирует все лунки);
- 5-100 мкл исследуемого биологического материала.



Оборудование



В качестве **твердой фазы** в большинстве коммерческих диагностических препаратов используют полистироловые 96-луночные планшеты или полистироловые шарики [фирмы “ДИА-плюс”, “Рош” (“ROCHE”), “ЭББОТТ” (“ABBOTT”)].

Основные требования, предъявляемые к твердой фазе при проведении ИФА:

- устойчивость к растворам, используемым в реакции;
- наличие высокой специфической емкости, т. е. способности сорбировать на своей поверхности антитела или антигены в количествах, необходимых для проведения реакции в сочетании с как можно меньшей неспецифической сорбцией белков из исследуемых образцов и конъюгатов.

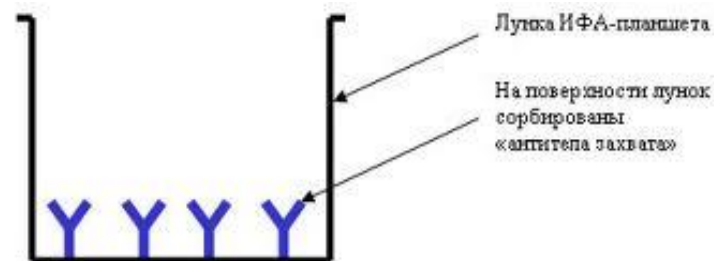
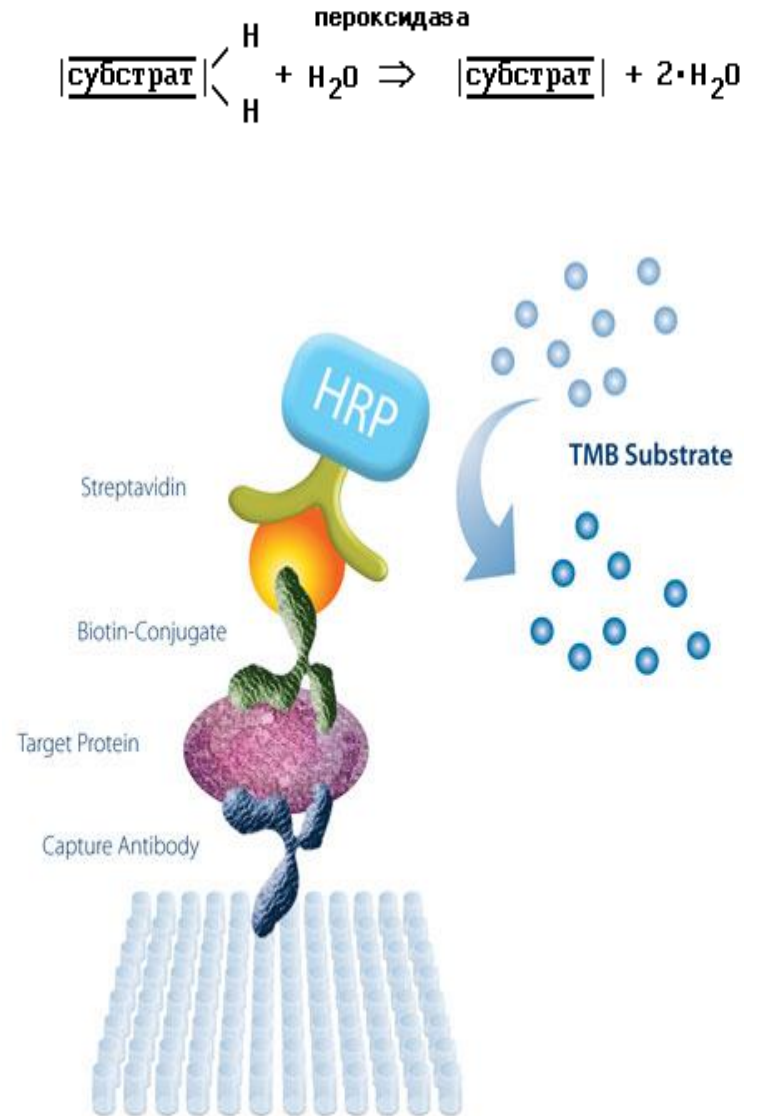


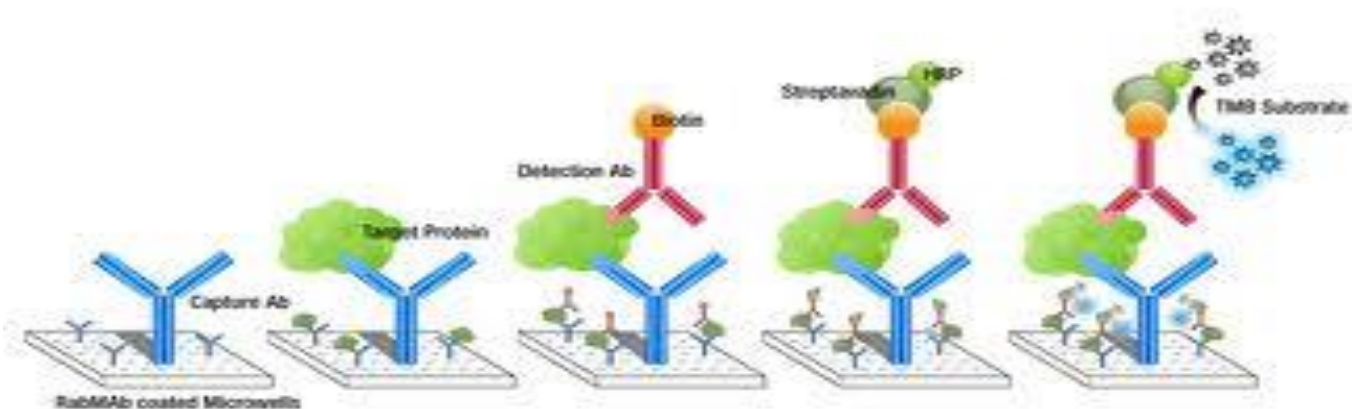
Рисунок 1

Для **ферментативной метки** антигенов или антител могут быть применены разнообразные ферменты: пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза и т. д. Во всех коммерческих тест-системах используется пероксидаза хрена, выбор которой определяется ее высокой удельной каталитической активностью, доступностью, стабильностью, простотой детекции. В качестве субстратного реагента наиболее часто применяется орто-фенилендиамин (ОФД) с перекисью водорода, продукт окисления которого 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. Учет результатов проводят спектрофотометрически при длине волны 490 нм.



Любой вариант ИФА содержит 3 обязательные стадии:

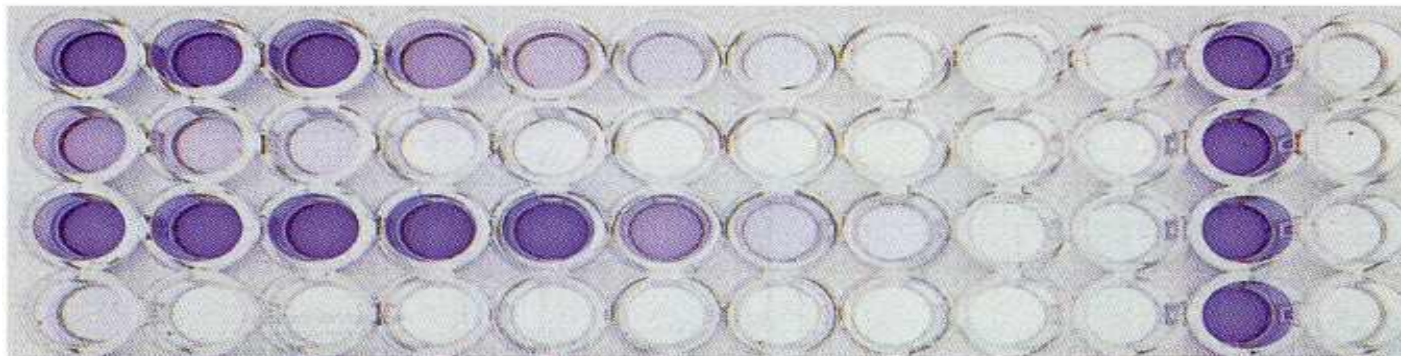
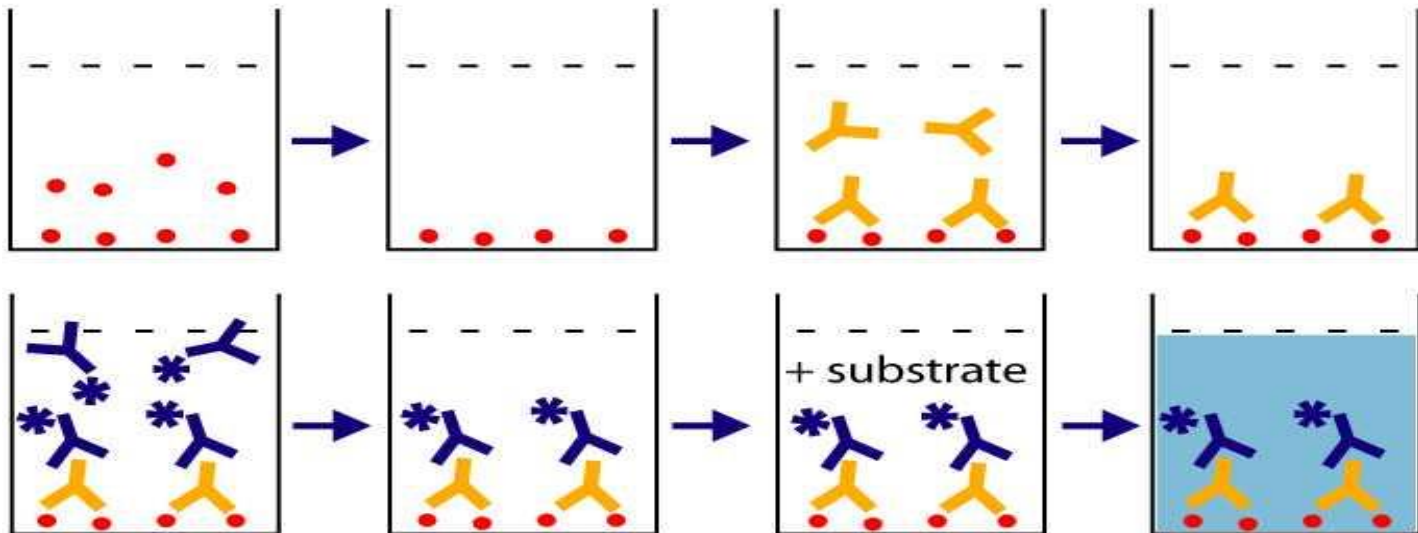
- 1) стадия узнавания тестируемого соединения специфическим к нему антителом, что ведет к образованию иммунного комплекса;
- 2) стадия формирования связи конъюгата с иммунным комплексом;
- 3) стадия проявления ферментной метки в виде регистрируемого сигнала.



Непрямой ТИФМ

- ❖ Белковый антиген добавляют в каждую лунку пластины
- ❖ Инкубация 3 часа при 37° С в термостате или 16 часов в холодильнике
- ❖ Добавляют раствор нейтрального белка для блокировки свободных участков на твердой фазе, которые не покрыл антиген
- ❖ Добавляют исследуемую сыворотку, содержащую АТ (АТ первого порядка)
- ❖ АТ связываются с гомологичным антигеном на подложке
- ❖ Добавляют антитело (второго порядка), меченное ферментом (пероксидаза хрена)
- ❖ Вносят Субстрат, который изменяет цвет в лунке (интенсивность окраски зависит от количества образовавшихся комплексов АГ-АТ)
- ❖ Измеряют адсорбцию (ОП) в каждой лунке для определения присутствия и количества иммунных комплексов

Непрямой ТИФМ

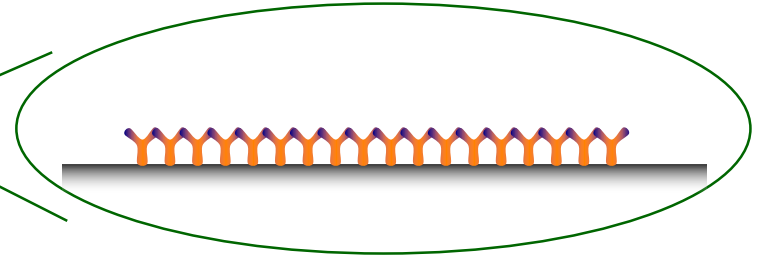
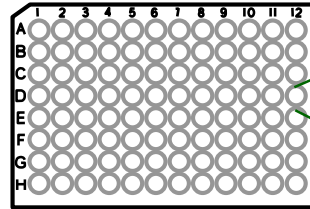


Sandwich ELISA

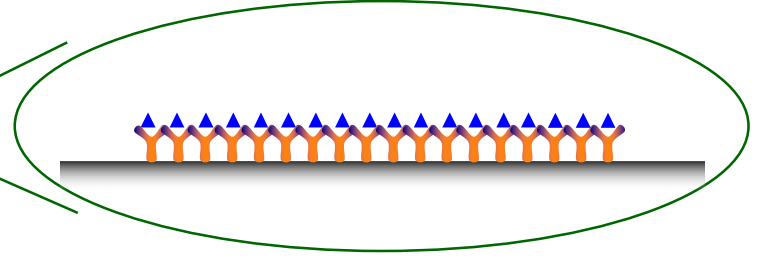
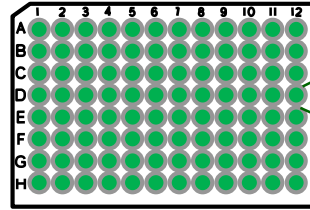
1. Наносят на твердую фазу необходимое количество антител
2. Блокируют несвязавшиеся сайты нейтральным белком
3. Вносят образец, содержащий антиген
4. Промывают пластину
5. Вносят детектирующее антитело (конъюгат), специфически взаимодействующее с АГ
6. Промывают пластину
7. Вносят Субстрат, который изменяет цвет в лунке (интенсивность окраски зависит от количества образовавшихся комплексов АГ-АТ)
8. Измеряют адсорбцию (ОП) в каждой лунке для определения присутствия и количества иммунных комплексов

Протокол сэндвич-ТИФМ

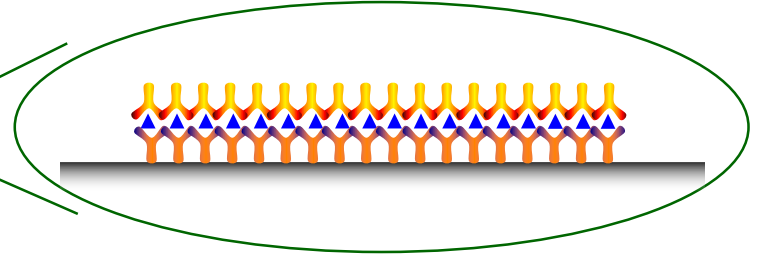
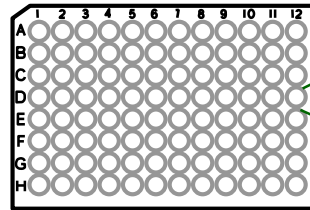
1. Наносят АТ на твёрдую фазу



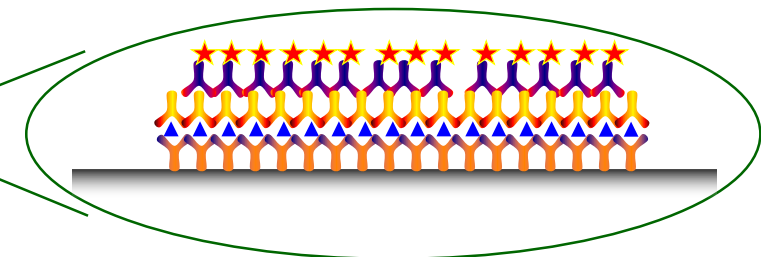
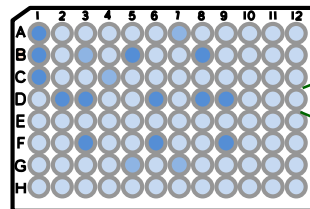
1а. Заблокировать сайты нейтральным белком (BSA)



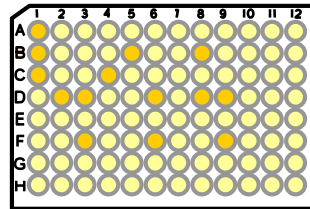
2. Добавляют АГ в каждую лунку. Инкубировать 30 мин при 37° С



3. Добавляют второе антитело против АГ и конъюгат (АТ+ПХ) на 30 мин при 37° С



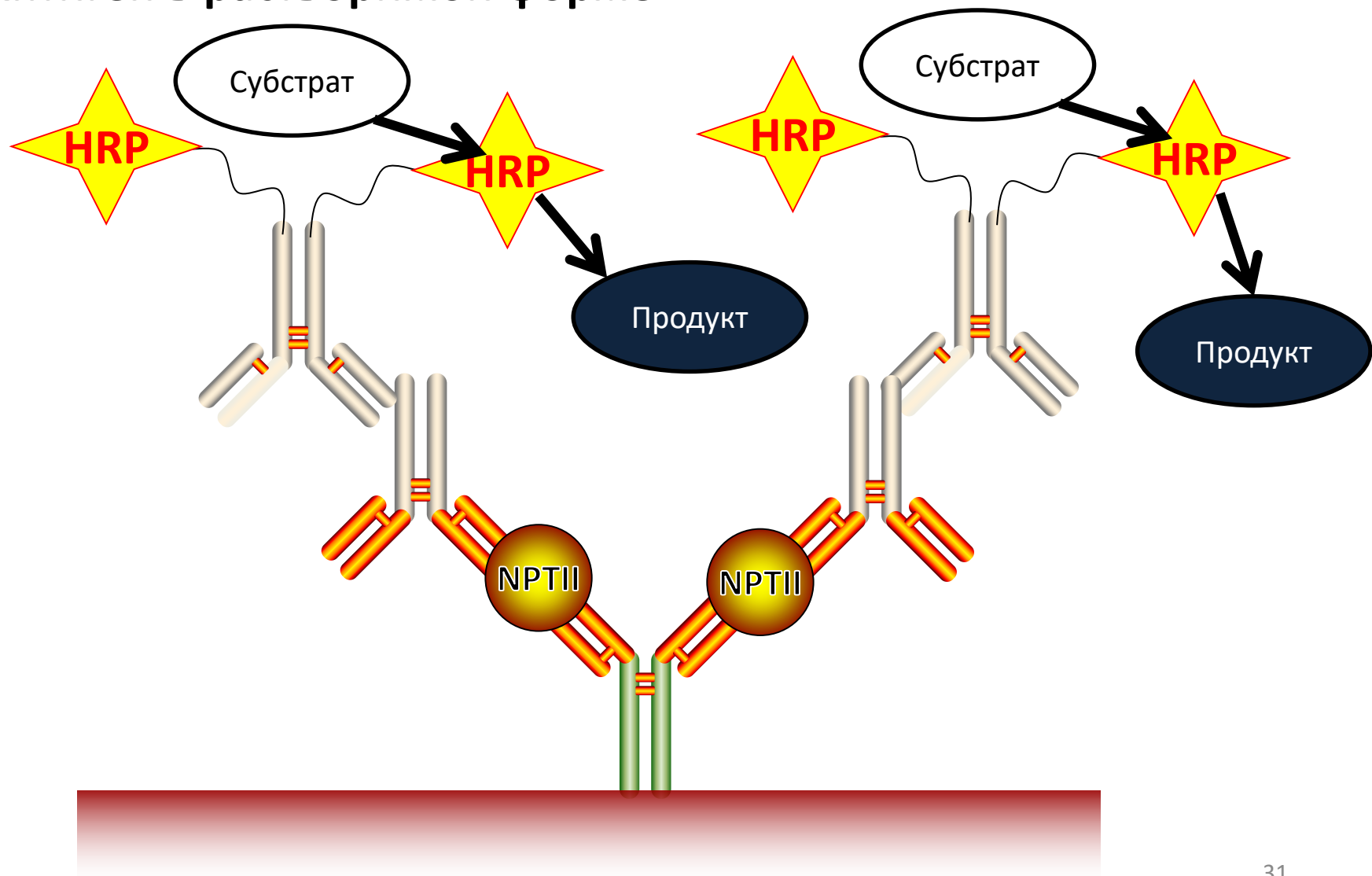
4. Проводят колориметрическую реакцию с субстратом 15 мин комн. темп.



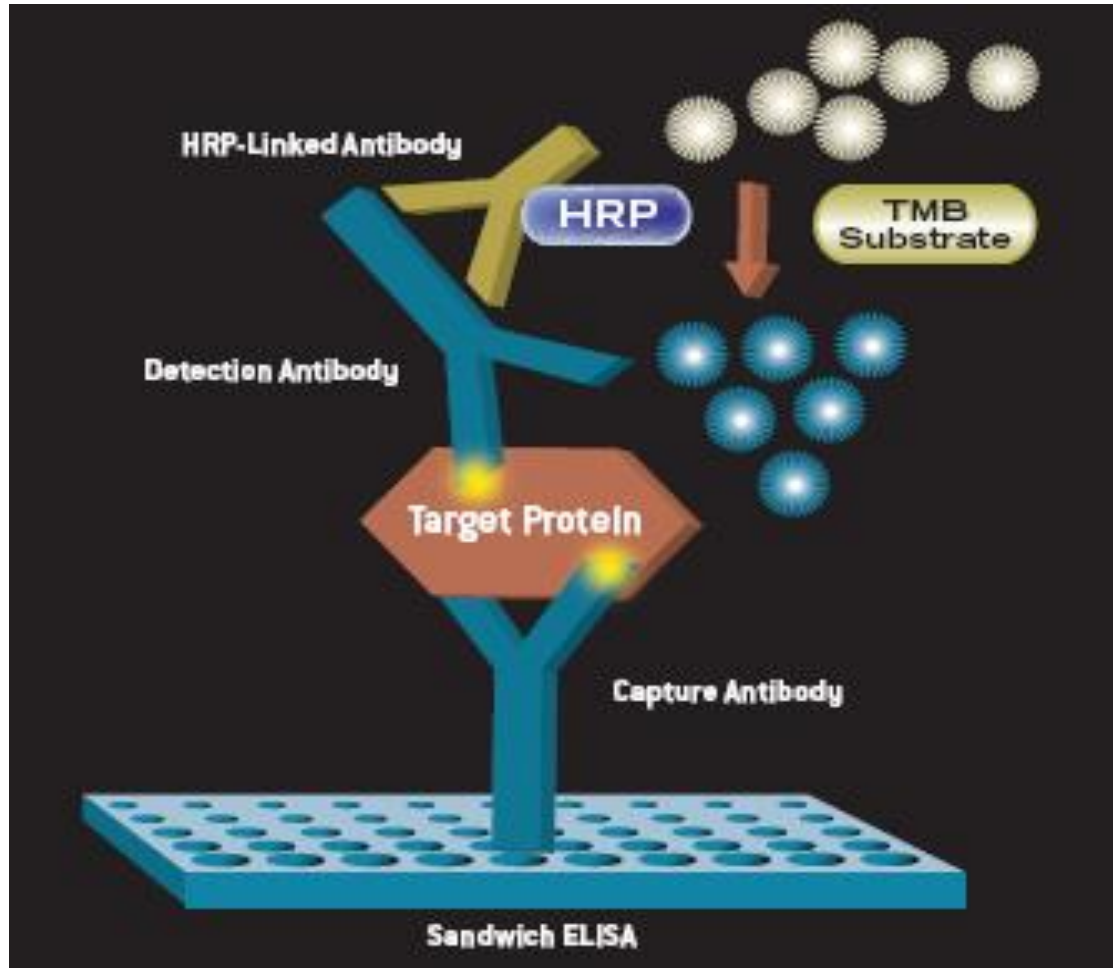
5. Останавливают реакцию 3М H₂SO₄. Учитывают адсорбцию на ридере

Сэндвич-вариант

Антиген в растворимой форме



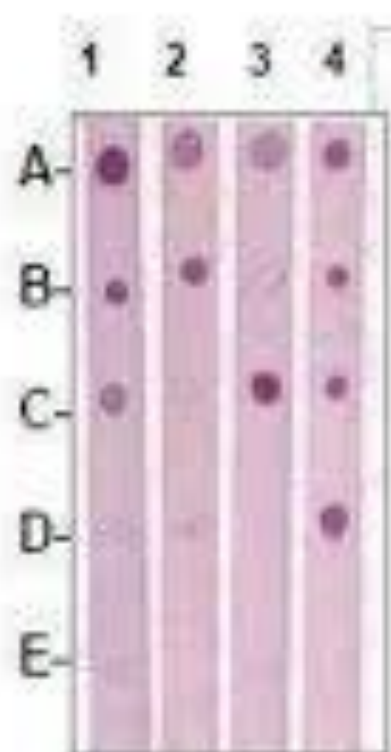
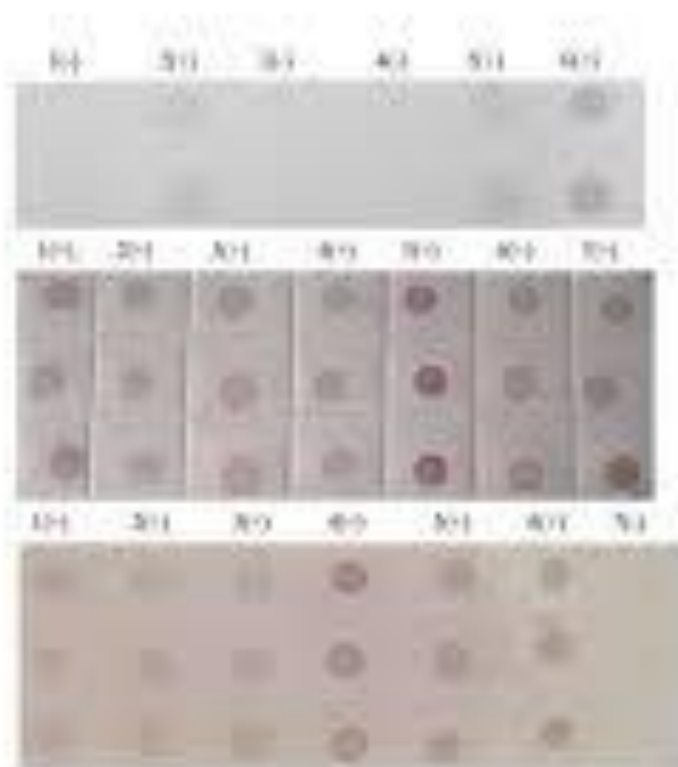
Sandwich ELISA



Dot–ИФА. Метод точечного иммуноферментного анализа

В последние годы преобладает стремление к снижению стоимости диагностических процедур и использованию метода, не требующего дорогого оборудования. В связи с этим разработан более простой и достаточно дешевый вариант ИФА. Такую модификацию называли dot-ИФА (точечный твердофазный иммуноферментный анализ). В dot-ИФА минимальные объемы растворов антигена или антител наносят на нитроцеллюлозную подложку (мембрану) в виде серии точек, что позволяет выполнить гораздо большее число анализов с тем же количеством реагентов. Субстраты, дающие нерастворимые продукты ферментативной реакции, на белом нитроцеллюлозном фильтре образуют легко различимые цветные пятна, в результате чего отпадает нужда в дорогих фотометрах. Белый цвет подложки вокруг пятен помогает контролировать реакции неспецифического связывания (или неспецифической адсорбции). Фильтры с результатами анализа можно хранить в темноте в течении многих лет без потери интенсивности окраски. Кроме того, простота постановки и малые расходы антигена и других компонентов, необходимых для проведения реакции, позволяет ее использовать в полевых условиях.

Dot-ИФА



КОМПЛЕКТ ДЛЯ ТОЧЕЧНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (КТИА-01)

Назначение: индикация с помощью точечного иммуноферментного анализа возбудителей инфекционных заболеваний и бактериальных токсинов в жидких пробах при исследовании их в подвижных медицинских комплексах (автолабораториях)

Комплект иммуноферментных тест-систем для дот-ИФА, позволяет выявлять антигены возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии, натуральной оспы, ВЭЛ, ЛДР, лихорадки КУ и сыпного тифа, а также ботулинического токсина типа А и стафилококкового энтеротоксина типа В.



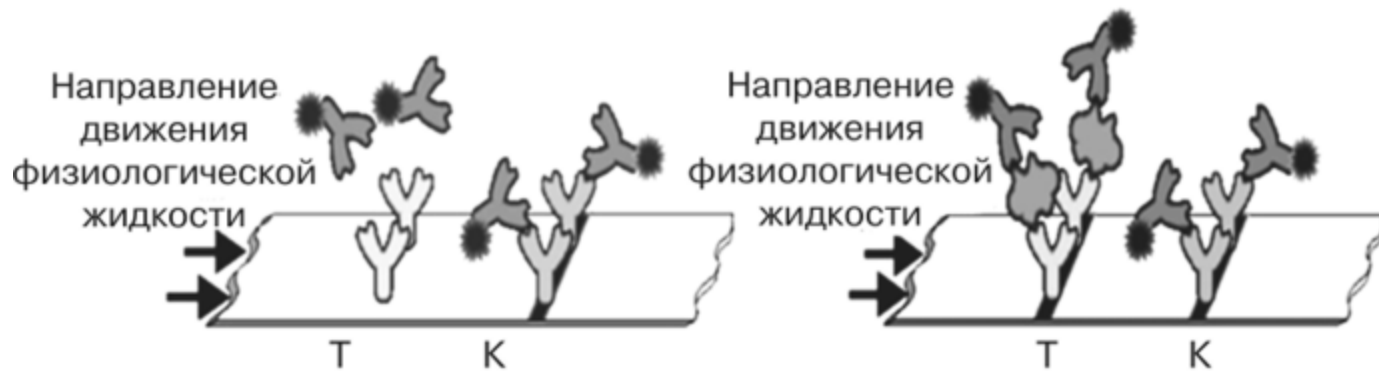
Иммунохроматографические тест-системы





Принцип работы ИХ-систем основан на движении жидкой пробы вдоль мембран (формирующих ИХ-тест-полоску) под действием капиллярных сил, которое приводит к последовательному взаимодействию реагентов на разных участках мембран и окрашиванию определенных участков тест-полоски. В ИХ-тестах используется ряд меток, в том числе и ферменты.

Общая схема иммунохроматографической серодиагностики заключается в следующем: тестируемая проба крови или сыворотки впитывается мембранами тест-полоски. Протекая через различные участки мультимембранного композита, она сначала смешивается с частицами маркера, на поверхности которого иммобилизован иммуноглобулин-связывающий реагент (антивидовые антитела). Этот маркерный конъюгат связывается с иммуноглобулинами пробы. Образовавшийся окрашенный комплекс вместе с жидкостью достигает участка мембраны с иммобилизованным антигеном патогена (аналитическая зона) и, связываясь с антигеном, окрашивает этот участок. Интенсивность окрашивания отражает концентрацию в пробе специфических антител (антител к используемому антигену) и их аффинность.

Иммунохроматографические тест-системы (продолжение)

Для проверки работоспособности используемого конъюгата и сохранения функциональности тест-системы используется расположенная далее контрольная зона, в которой реагент, связывается с иммобилизованными на мембране антивидовыми антителами. Маркерный конъюгат, не связавшийся с антигеном в аналитической зоне полоски, протекает далее и в контрольной зоне взаимодействует с антивидовыми антителами. Окрашивание контрольной зоны подтверждает правильность проведения тестирования и сохранение конъюгатом реакционной способности.



-  — исследуемый материал;
-  — конъюгат антитела, специфичного к исследуемому антигену с красителем, мигрирующим вдоль полоски вместе с жидкостью;
-  — антитело, специфичное к исследуемому, прикрепленное на тест-полоске;
-  — вторичное антитело, специфичное к антителам с красителем, прикрепленное на тест-полоске;
- К — контрольная полоса;
- Т — тест-зона

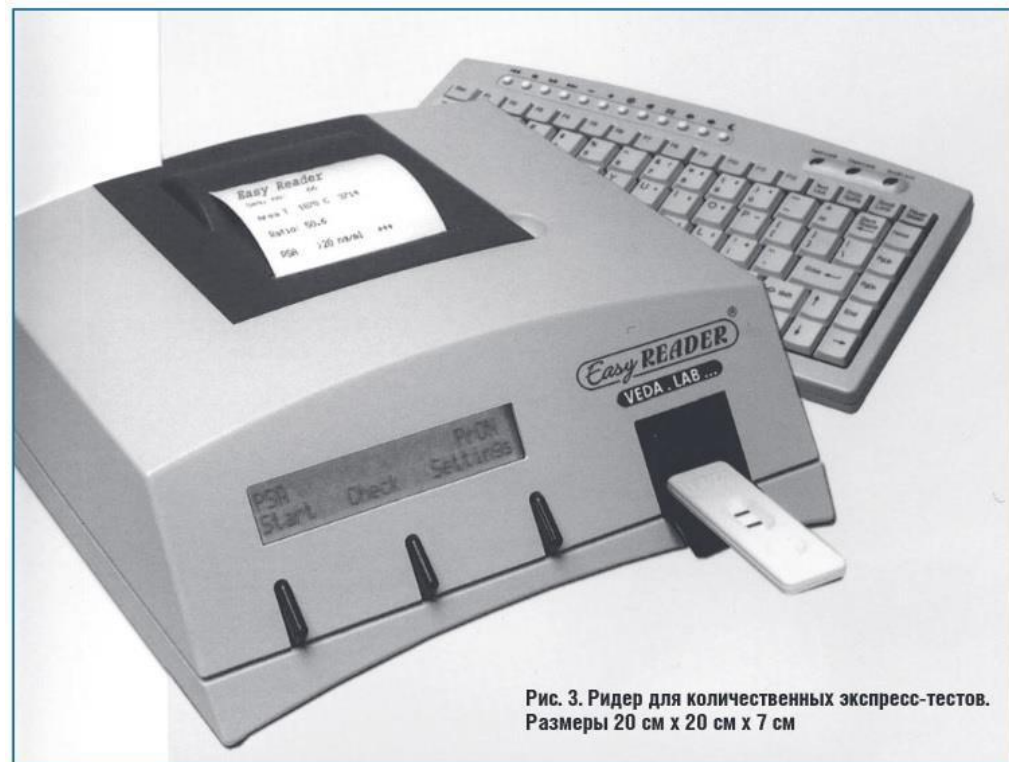


Рис. 3. Ридер для количественных экспресс-тестов.
Размеры 20 см x 20 см x 7 см

Быстрые иммунохроматографические тесты для выявления возбудителей инфекций



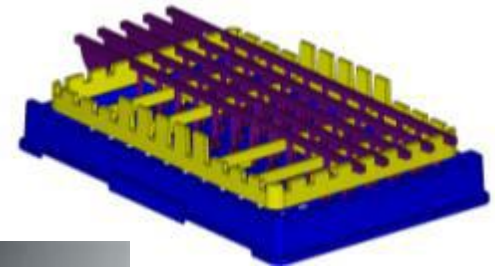
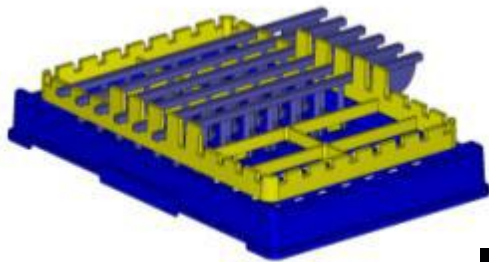
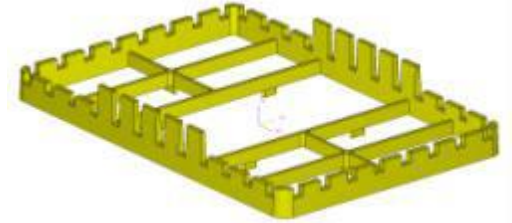
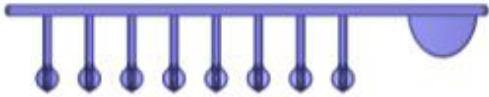
Множественный и переносной (multiple & portable) ELISA

Новая методика, запатентованная в США, использует в качестве твердой фазы гребенку - полистироловый стержень с 8-12 выступами. Все устройство погружается в пробирку, содержащую исследуемый образец, для инкубации. Следующие шаги (отмывка, инкубация с конъюгатами и хромогенами) осуществляются путем погружения гребенки в лунки стандартного микропланшета, заполненные реагентами.

Преимуществами метода являются:

- На каждый выступ могут быть сорбированы различные АГ и/или АТ, что позволит одновременно обнаруживать несколько различных АТ и / или АГ
- Объем образца (кровь, слюна, моча, молоко, яйца, вода), можно увеличить для повышения чувствительности теста
- Один выступ остается несенсибилизированным для измерения неспецифических реакций образца
- Экономичность - использования лабораторных материалов для внесения образца и реагентов в лунки не требуется
- Возможность использования в автоматических высокопроизводительных системах

Множественный и переносной (multiple & portable) ELISA



Интерпретация результатов ИФА

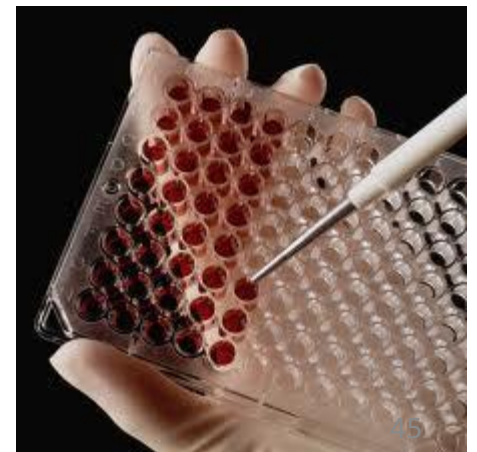
Стадия заболевания	Ig M	Ig A	Ig G
Первичная фаза (2 недели от инфицирования)	-	+	-
Первичная фаза (2,5 - 3 недели от инфицирования)	+	+	-
Первичная фаза (3-4 недели от инфицирования)	+	+	+
Обострение хронической фазы (2 недели от начала обострения)	-	+	+
Хроническая фаза	-	+/-	+
Прошедшая (излеченная инфекция)	-	-	+
Выздоровление	-	снижение титра в 2-4 раза после успешного лечения	снижение титра в 4-8 раз через 1-1,5 мес. после успешного лечения
Отрицательный результат	-	-	-

Достоинства ИФА

- высокая чувствительность, позволяющая выявлять растворимые антигены микроорганизмов в концентрации до 0,05 нг/мл. Такая чувствительность метода обусловлена способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата
- возможность использования минимальных объемов исследуемого материала
- стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более)
- простота проведения реакции
- применение как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета
- возможность автоматизации всех этапов реакции
- экологическая чистота и безопасность для медицинского персонала (в отличие от РИА)
- относительно низкая стоимость диагностических наборов

Для точности воспроизведения метода следует помнить:

- о строгом последовательном проведении всех этапов реакции
- о фоточувствительности реактивов (например, пероксидаза хрена)



Область применения ИФА:

- Диагностика вирусных заболеваний: поиск возбудителей гепатитов, герпесвируса, вируса Эпштейн-Барр, цитомегаловируса и др.
- Диагностика инфекций, передающиеся половым путем: хламидиоз, гонорея, трихомониаз, микоплазмоз, уреаплазмоз, сифилис
- Эндокринология (определение уровня гормонов)
- Обнаружение онкомаркеров (диагностика онкологических заболеваний)
- Иммунология (диагностика иммунодефицита, выявление иммунных комплексов и цитокинов)
- Аллергология (диагностика и лечение аллергий, определение общего IgE и специфических IgE антител)
- Выявление лекарственных препаратов, наркотиков в биологических образцах
- Определение белков сыворотки крови (ферритин, фибронектин и др.)



Заключение

ИФА пришел на смену широко используемым ранее в клинической практике методам агглютинации, преципитации и связывания комплемента. По сравнению с вышеназванными методами ИФА менее трудоемок и продолжителен по времени, удобен для выполнения большого числа однотипных анализов.

В ИФА сочетается уникальная специфичность иммунохимического анализа с высокой чувствительностью определения ферментной метки.

- **Чувствительность метода** (т.е. минимальное выявляемое количество антител или антигена) определяется следующими факторами:
- аффинностью антител, предпочтительнее использовать моноклональные антитела
- специфической активностью фермента
- интенсивностью сигнала
- чувствительностью учета сигнала

Различные варианты ИФА различаются по своей чувствительности. Отдельные варианты твердофазного ИФА позволяют выявлять в образце единичные молекулы. Средняя чувствительность ИФА – 10^{-9} – 10^{-12} моль (или 10^3 – 10^4 м.к./мл).

**Благодарю за
внимание!**