

ТЕМА 7. МЕТОД ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ (ІФА). ІМУНОБЛОТИНГ

Імуноферментний аналіз

Загальні положення

Імуноферментний аналіз – вид імуноаналізу, у якому утворення комплексу антиген-антитіло визначають за активністю мітки-ферменту

Розвиток ІФА визначили два відкриття.

Перше, різні ферменти можна ковалентно приєднувати до антигену або антитілу різними хімічними методами за умови збереження біологічної активності та імунологічної специфічності антигену, антитіл, ферментів.

Друге, більшість антигенів і антитіл мимовільно сорбується на поверхні пластику (полістиролу) і зберігає при цьому здатність до специфічного зв'язування відповідно антитіл та антигену.

Сорбцію антигену або антитіл на поверхні пластику називають сенсibiliзацією. Сорбовані на пластику антиген та антитіло не змиваються буфером, що містить детергент, не пов'язані антиген та антитіло легко віддаляються відмиванням. Пластик з сорбованими на ньому антитілами або антигеном отримав назву імуносорбент. Досліджуваний зразок і стандартні реагенти інкубують в сенсibiliзованих лунках пластикових планшетів. При інкубації на поверхні лунок формуються імунні комплекси антиген-антитіло.

Антиген та антитіло, що не зв'язались, видаляються відмиванням. Ця властивість визначає високу специфічність аналізу. При утворенні імунних комплексів активний центр ферменту – мітки антигену або антитіла залишається вільним і доступним для субстрату. Інкубація ферменту з хромогенним субстратом супроводжується кольоровою реакцією. Реакцію зупиняють при досягненні стандартом певної оптичної щільності. Ступінь фарбування можна оцінювати візуально або за допомогою фотометрії.

Різноманітність об'єктів дослідження від низькомолекулярних з'єднань до вірусів і бактерій, а також надзвичайно широке коло завдань, пов'язаних з різноманіттям умов застосування ІФА, обумовлюють розробку надзвичайно великої кількості варіантів цього методу. Будь – який варіант ІФА містить 3 обов'язкові стадії:

1)стадія впізнавання шуканого з'єднання специфічними до нього антитілом, що веде до утворення імунного комплексу;

2)стадія формування зв'язку кон'югату з імунним комплексом або з вільними місцями зв'язування;

3)стадія перетворення ферментної мітки в реєстрований сигнал.

Класифікація ІФА

В основу класифікації методів ІФА покладено кілька підходів:

1. За типом реагентів, присутніх на першій стадії ІФА, розрізняють конкурентний і неконкурентний методи. У конкурентному ІФА на першій стадії в системі присутні одночасно аналізоване з'єднання та його аналог, мічений ферментом і конкуруючий за центри специфічного зв'язування з аналізованим антигеном або антитілами. Для неконкурентних

методів характерна присутність в системі на першій стадії тільки аналізованого з'єднання і специфічних до нього антигенів або антитіл, що сорбовані.

2. Всі методи ІФА поділяються на гомогенні і гетерогенні. Якщо всі три стадії ІФА проходять в розчині і між основними стадіями немає додаткових етапів поділу імунних комплексів, що утворилися, від компонентів, які не реагували, метод відноситься до групи гомогенних.

Для гетерогенних методом характерно проведення аналізу в двофазній системі за участю твердої фази – носія, і обов'язкова стадія поділу імунних комплексів від компонентів, що не прореагували, (відмивання), які знаходяться в різних фазах (імунні комплекси, що утворилися знаходяться на твердій фазі, а ті, що не прореагували – у розчині). Гетерогенні методи, в яких формування імунних комплексів на першій стадії протікає на твердій фазі, називають твердофазним методами. В сей час у клініко-діагностичних лабораторіях використовують твердофазний ІФА.

Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА

Ферменти

Ферментні мітки володіють надзвичайно потужною каталітичною дією, одна молекула ферменту може реагувати з великою кількістю молекул субстрату. Таким чином, фермент, присутній в незначних кількостях, можна виявити і кількісно визначити за утворенням продуктів, в реакції яку він каталізує.

Інша перевага застосування ферментів в якості міток обумовлена наявністю в молекулі численних функціональних груп (сульфгідрильних, карбоксильних, залишків тирозин та інших), через які можна ковалентне приєднати його молекули до антигені або антитіл.

Ферментні маркери, які використовуються в ІФА, повинні мати наступні властивості:

- наявність економічно доступних джерел отримання ферменту;
- висока активність і стабільність ферменту в умовах аналізу в кон'югаті з антитілами або антигеном;
- наявність економічно доступних субстратів і простота методу визначення продуктів або субстратів ферментативної реакції;
- можливість адаптації систем фермент – субстрат до подальшого посилення;
- відсутність ферменту і його інгібіторів в досліджуваній біологічній рідині.

Вищеназваним вимогами найбільш відповідають пероксидаза хрому (ПХ) та лужна фосфатаза (ЛФ) зі слизової оболонки теля. Обидва ферменту стабільні і каталізують високочутливі реакції. Крім того, продукти, одержувані в результаті реакцій, що каталізуються цими ферментами, в залежності від використовуюваного субстрату, можуть виявлятися не тільки колориметричними методами, але також флуоресцентними.

Субстрати

Поряд з ферментативною активністю кон'югату, великий вплив на чутливість аналізу надає тип субстрату. Продукт ферментативного перетворення субстрату повинен володіти новим фізико-хімічними параметром, що дозволяє детектувати його з високою чутливістю.

Такими параметрами є: поглинання світла у видимій області (хромофорних субстрати), флуоресценція у видимій області (флуоресцентні субстрати) і хемілюменісценція (хемілюменісцентні субстрати).

Хромофорні субстрати. Як хромофорних субстратів можуть бути використані як індивідуальні речовини, так і суміші речовин, що вступають у послідовні реакції один з одним і утворюють, в кінцевому рахунку, пофарбований продукт. Перелік найбільш часто використовуваних ферментів та субстратів наведено в табл.1. Використання таких субстратів дає можливість проводити як інструментальний, так і візуальний облік результатів аналізу.

Флуоресцентні субстрати. До флуоресцентних субстратів відносяться речовини, які стають флуорохромами після ферментативного перетворення. Всі флуоресцентні субстрати забезпечують більш високу чутливість аналізу в порівнянні з хромофорних і, незважаючи на неможливість візуального обліку результатів аналізу, вони отримують в останні роки все більше поширення.

Хемілюменісцентні субстрати. Хемілюменісцентними субстратами, які найбільш широко застосовуються в ІФА, є люмінол і ізолумінол. На стадії вимірювання ферментативної активності вони окислюються перекисом водню в присутності кон'югатів з пероксидазою. Випромінювання світла в результаті люмінол - пероксидазної реакції може бути посилене в кілька сотень разів за рахунок використання підсилювачів хемілюменісценції, якими є 6-гідроксібензотіазол,

п-іодфенол, п-фенилфенол, 1-бром-2-нафтол та ін. Цей підхід забезпечує значне посилення хемілюменісценції і відповідне підвищення чутливості аналізу.

Основні вимоги до субстрату:

–забезпечення високої чутливості методу при виявленні ферменту в кон'югату;

–субстрат повинен бути безпечним, дешевим, доступним і зручним для застосування.

Для ПХ використовують 3,3',5,5'-тетраметілбензидин (англ. ТМВ) та 3,3'-діамінобензидин (англ. DAB). Для ЛФ – Р-нітрофенілфосфат та 5-бром-4-хлоро-3-індоліл фосфат. Субстрати хромогенні, під дією ферментів утворюється фарбований продукт, інтенсивність фарбування розчину прямо пропорційна активності ферменту.

Одним з найбільш важливих компонентів у ІФА є антитіла. Чутливість ІФА залежить від концентрації, активності та специфічності використовуваних антитіл. Використовувані антитіла можуть бути полі – або моноклональними, різного класу (IgG або IgM) та підкласу (IgG1, IgG2)[], антиалотипічними або антиідіотипічними. При низькій афінності антитіл розпад комплексу антиген-антитіло призводить до видалення пов'язаного антигену з системи. Чутливість і специфічність методу підвищується при використанні моноклональних антитіл. У цьому випадку з'являється можливість виявляти низькі концентрації антигену у випробовуваних зразках.

Кон'югат

Надійний кон'югат повинен володіти наступними властивостями: високим антитільним титром і високою афінністю до антигену, щоб його можна було використовувати у великому розведенні, і таким чином, зменшити неспецифічне зв'язування;

– достатньою специфічністю в робочому розведенні;
– переважанням мономерних форм над полімерними, тому що полімерні форми мають тенденцію до неспецифічної адгезії на пластику, що призводить до високого фонового рівня реакції; – оптимальним молярним співвідношенням між ферментом і антитілами (оптимальне співвідношення становить близько 1:1);
– достатньою ферментативною активністю кон'югату. Ця властивість визначається головним чином умовами кон'югації і співвідношенням молекул ферменту і антитіл у кон'югаті.

Тверда фаза

В якості твердої фази для проведення ІФА можна застосовувати різні матеріали: полістирол, полівінілхлорид, поліпропілен і інші речовини. Твердою фазою можуть служити стінки пробірки, 96 – луночні та інші планшети, кульки, намистини, а також нітроцелюлозні та інші мембрани, що активно сорбують білки.

Формування імуносорбенту

Імунохімічні методи ґрунтуються на використанні попередньо адсорбованих «пасткових» антитіл для іммобілізації антигену або антитіл. Антиген, іммобілізований імунохімічно, в 10 разів активніше, ніж пасивно адсорбований антиген. Можуть використовуватися лектини або імуноглобулін – зв'язуючи білки бактерій, які легко адсорбуються на пластику або інших гідрофобних поверхнях, наприклад конканавалін А (Кон А) або стафілококовий білок А. Кон А здатний іммобілізувати gr 120 – білок вірусу ВІЛ. Вільні сайти на поверхні твердої фази, не пов'язані з агентом, можуть фіксувати в ході тесту інші молекули, у тому числі і кон'югати, що призводить до підвищення фонового сигналу. Для запобігання неспецифічного зв'язування після іммобілізації на тверду фазу основного матеріалу проводять обробку нейтральними для тіста речовинами. Найбільш популярні блокуючі агенти – бичачий сироватковий альбумін (БСА), казеїн і ін. Вибір блокуючого агента і умови проведення цього етапу залежать від типу твердої фази, чутливості системи.

Вимірювання ферментативної активності

Останнім компонентом специфічного комплексу на твердій фазі є кон'югат. Його ферментативна активність, а, отже, і концентрація, буде пропорційна концентрації решти компонентів комплексу, один з яких підлягає визначенню. Визначення ведуть з урахуванням кінетичних особливостей ферменту-мітки.

На величину ферментативної активності впливає рН, температура (температурний оптимум лужної фосфатази 37° С, для пероксидази – 15° С), концентрація субстрату та конформаційні зміни в ферменті.

Інтенсивність перемішування розчину навколо твердої фази, як на цій стадії, так і на інших розглянутих стадія ІФА, грає дуже важливу роль.

Інтерпретація результатів ІФА

Залежність величини ферментативної активності специфічного комплексу з ферментної міткою від кількості будь-якого компоненту комплексу зображується у вигляді доза-відповідь кривої, де на осі ординат відкладена інтенсивність сигналу субстрату після його ферментативного перетворення, виміряна в момент часу t , а по осі абсцис концентрація реагенту, визначається в пробі.

Під чутливістю аналізу розуміється та мінімальна концентрація реагенту, що визначається, при якій помітна відмінність сигналу для цієї концентрації та нульового стандарту, тобто зразка, що свідомо не містить визначуваного реагенту. Ця різниця у величинах сигналів повинна становити 2 - 3 величини стандартного відхилення.

Основні принципи постановка твердофазного імуноферментного аналізу

Широке розповсюдження отримали різні варіанти твердофазного імуноферментного аналізу (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Твердофазний ІФА був запропонований у 1971 році. Основні принципи твердофазного ІФА, незалежно від модифікації, полягають в наступному.

1. На 1 етапі адсорбують антиген або антитіла на твердій фазі. При цьому не пов'язані з твердою фазою реагенти легко віддаляються відмиванням.

2. У сенсibiliзованих лунках інкубують досліджуваний зразок. У лунках з позитивним контролем – стандартні реагенти. При цьому на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси. Незв'язані компоненти видаляють відмиванням.

в При додаванні кон'югату антитіло-фермент або антиген-фермент і зв'язуванні його з іммобілізованим імунним комплексом активний центр ферменту залишається доступним для подальшої взаємодії із субстратом. Інкубація субстрату в лунках з іммобілізованим кон'югатом призводить до розвитку кольорової реакції. Цю реакцію можна зупинити на потрібній стадії, ступень фарбування можна оцінити візуально або по оптичній щільності.

Важливий етап будь-якого варіанту твердофазного аналізу – процедура відмивання від незв'язаних реагентів. Важливо не просто сполоснути фіксовані на твердій фазі компоненти, а видалити реагенти з усієї глибини шару. Це найбільш тривалі та трудомісткі етапи аналізу. Промивання проб може проводитися в автоматичному режимі за допомогою спеціального приладу – вошер або вручну за допомогою багатоканальної піпетки.

Для проведення ІФА необхідні:

- полістироловий планшет або інші варіанти твердої фази, що використовуються;
- відмиваючий розчин;
- кон'югат (мічені ферментної міткою антигени або антитіла); – суміш використуваних субстратів;
- розчин, що зупиняє реакцію (стоп-реагент – розчин для зупинення реакції);
- зразки, що використовуються для позитивного та / або негативного контролю;
- стандартний антиген (для побудови калібрувальної кривої); одно - і багатоканальні піпетки;
- вошер (промивач);

оптичний прилад для визначення оптичної щільності досліджуваного розчину (ІФА-зчитувач, який послідовно фотометрирує всі лунки);

5-100 мкл досліджуваного біологічного матеріалу.

Прямий ІФА

1. У лунках панелей адсорбують антигени або антитіла (рис. 24).

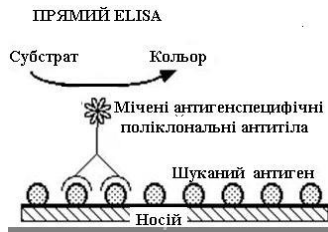


Рис.24. – Схема поставлення прямого ІФА

Вище зазначалося, що антигени істотно розрізняються за здатністю адсорбуватися на різних видах пластику в залежності від того, до якого класу речовин (білків, вуглеводів або ліпопротеїдів) вони належать. Часто в прямому ІФА антиген, іммобілізований на твердій фазі, це клітини та інші корпускулярні антигени. В якості контролю використовують лунки з адсорбованим позитивним контрольним зразком, в якому обов'язково міститься шуканий антиген, і негативним контрольним зразком, що свідомо не містить досліджуваного антигену. При наявності очищеного стандартного антигену реакцію проводять у кількох розведеннях, так щоб можна було побудувати калібрувальну криву.

2. «Блокують вільні місця зв'язування, що залишилися на твердій фазі, за допомогою бичачого сироваткового альбуміну (БСА), казеїну та ін. (для запобігання неспецифічній сорбції кон'югату на твердій фазі).

3. В лунки вносять антигенспецифічні мічені поліклональні антитіла (кон'югат), інкубують. Зв'язування кон'югату з твердою фазою буде відбуватися лише у випадку комплементарності обох компонентів системи. Після інкубації з кон'югатом лунки відмивають, видаляючи, таким чином, частину кон'югату, яка не зв'язалась.

4. Потім в лунки вносять субстрат, специфічний для використовуваного ферменту, і інкубують. По досягненні оптимального рівня забарвлення в лунках з позитивним контролем, ферментативну реакцію зупиняють.

5. Облік реакції. Спочатку результати реакції враховують візуально. Для більш точного обліку результатів інтенсивність фарбування оцінюють на ІФА-зчитувачі з відповідним світлофільтром.

Непрямий ІФА для визначення антитіл. Основні етапи непрямих ІФА для визначення антитіл різних класів

Цей варіант ІФА використовують звичайно для виявлення специфічних антитіл. У лунках панелей адсорбують стандартний антиген і інкубують із зразками сироватки або іншого біологічного матеріалу, отриманого від хворого (спинномозкова рідина, слина та ін.). Специфічні антитіла, зв'язавшись з антигеном на твердій фазі, виявляють за допомогою

антиглобулінового кон'югату. Залежно від мети аналізу використовують різні антиглобулінові реагенти, що виявляють антитіла всіх ізотипів, або специфічні до окремих класів і підкласів імуноглобулінів. Основна перевага методу полягає в універсальності кон'югату. Один і той же кон'югат може служити для виявлення антитіл людини до самих різних антигенів у будь-яких зразках. Реакція методично проста.

Основні етапи непрямого ІФА для визначення антитіл.

Схема постановки непрямого ІФА залежить від класу антитіл, які визначають.

На рис.25 представлена схема виконання ІФА при визначенні антиген специфічних

IgG

1. Імуносорбент готовий, містить антиген відомого збудника
2. В лунки вносять досліджуваний матеріал, інкубують, проводять процедуру відмивання. Паралельно ставлять проби з

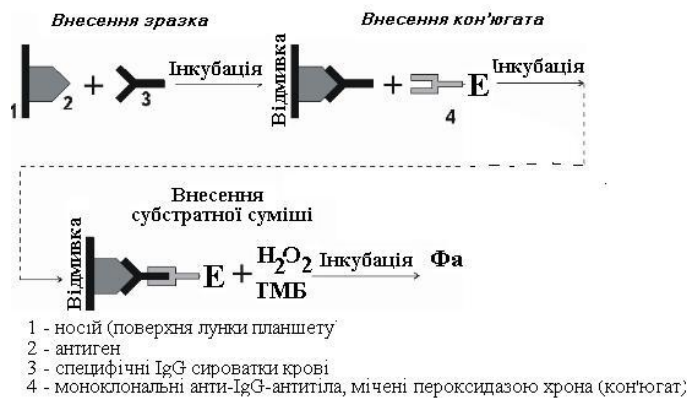


Рис.25. – Схема непрямого ІФА при визначенні IgG у біологічних рідинах.

позитивним і негативним контролюми.

3. Додають анти-IgG кон'югат в робочому розведенні, інкубують, відмивають від незв'язаних компонентів.
4. Вносять субстрат, інкубують. По досягненні оптимального рівня забарвлення в лунках з позитивним контролем реакцію зупиняють, додаючи стоп-розчин.
5. Вимірюють кількість продукту реакції на ІФА-зчитувачі. За оптимальних умов проведення аналізу метод високо специфічний і чутливий. Він дозволяє виявляти нанограмові кількості антитіл у сироватках досліджуваних хворих. Для отримання задовільних результатів необхідна стандартизація реагентів і методичних прийомів. Цей варіант ІФА може також використовуватися для тестування моноклональних антитіл.

Визначення антиген специфічних IgM та IgA. На рис.26.

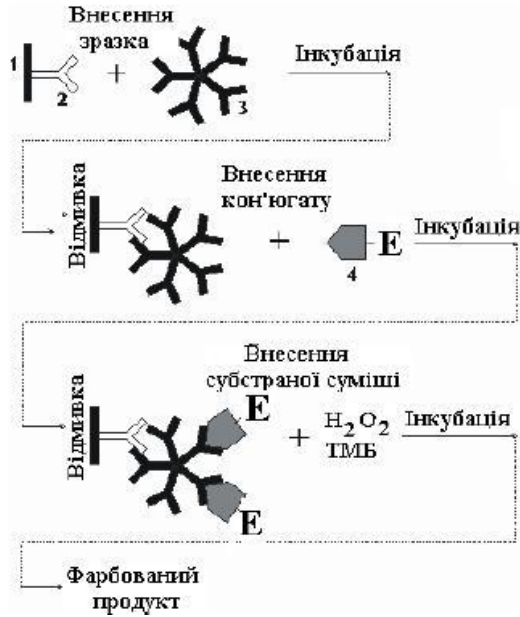


Рис.26. – Схема визначення IgM у сироватці крові.

Позначки:

1 – носій (поверхня лунки); 2 – моноклональні анти-IgM-антитіла; 3 – IgM крові; 4 – антиген, мічений пероксидазою хрому.

Для визначення цього класу імуноглобулінів використовується схема ІФА з фіксованими анти-антитілами або "пастками для антитіл" (Antibody capture ELISA). Метод засновано на тому, що на твердофазному носії фіксуються моноклональні антитіла миші, що реагують специфічно з людськими антитілами певного класу, тобто вторинні антитіла до Fcμ – IgM, Fcα – IgA, Fcγ – IgG. У результаті інкубації тестованої сироватки антитіла відповідного класу зв'язуються з імуносорбентом. Наявність серед них антитіл, специфічних для будь-якого антигену (наприклад, трепонемні), виявляється в ході інкубації з цим антигеном, міченим ферментом. При інкубації з субстратом в тому випадку, коли в досліджуваному зразку були присутні специфічні антитіла, розвивається фарбування розчину. За допомогою цієї ж схеми можна визначати інші класи антитіл при умові, пастки будуть представлені, наприклад, моноклональними анти-IgA-антитілами при визначенні IgA.

Схеми ІФА для виявлення антигенів. «Сендвич» – варіант ІФА для виявлення антигенів. Основні етапи аналізу

Розрізняють одно- та двохстадійний «сендвич» ІФА. На рис. 27 надана схема проведення одно стадійного визначення антигену з використанням «сендвич»-варіанта.

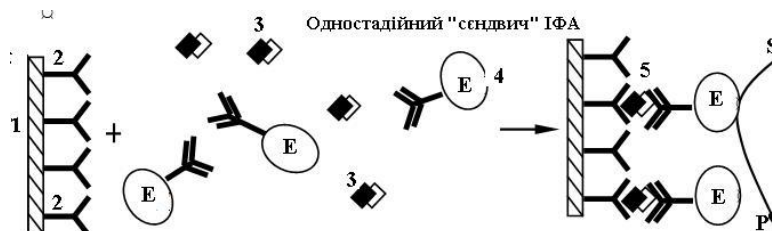


Рис. 27. – Визначення антигену за схемою одностадійного «сендвич» ІФА

Позначки: 1 – носій (поверхня лунки); 2 – моноклональні антитіла; 3 – аналізований зразок (антиген); 4 – кон'югат моноклональних антитіл з пероксидазою; 5 – іммобілізовані комплекси з міченими антитілами; S – субстрат, P - фарбований продукт.

Антигени, що визначаються за допомогою даного варіанту ІФА, повинні мати як мінімум два епітопи, здатних зв'язувати антитіла, або мати повторювання, просторово розділені епітопи з однаковою специфічністю. При проведенні цього варіанту ІФА моноклональні антитіла, адсорбовані на твердій фазі, інкубують з досліджуваним зразком і кон'югатом моноклональних антитіл з пероксидазою хрому. На твердій фазі утворюється Після процедури відмивання в лунки вносять зразок, інкубують, відмивають і додають кон'югат моноклональних антитіл з пероксидазою, інкубують, відмивають і вносять субстрат. Реакцію зупиняють до того ж антигену і далі проводять всі інші етапи реакції. Так як паратопи моноклональних антитіл зв'язують різні епітопи у антигену, то конкуренція виключається. Інтенсивність фарбування пропорційна кількості антигену.

Основною перевагою методу є висока чутливість, що перевершує можливості інших схем ІФА. Ця схема ІФА

використовується при визначенні вмісту гормонів –
 фолікулостимулюючий, лютеїнізуючий та гормон, пролактин, хоріонічний
 гонадотропін, тиреоглобулін, маркері пухлин –
 загальний простат-специфічний антиген; вільний простат-специфічний антиген, а
 також альфа-фетопротеїн та IgE.

На рис. 28 надана схема двох стадійного «сендвич» ІФА.

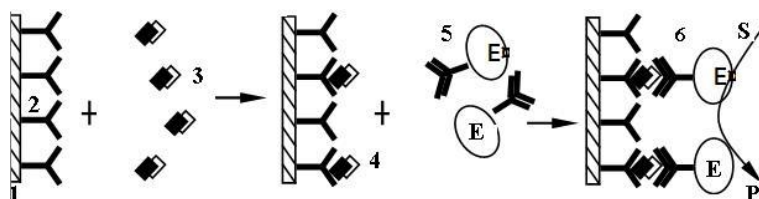


Рис. – Визначення антигену за схемою двохстадійного «сендвич» ІФА

Позначки: 1 - 3 ті ж, що на рис.27, 4 – комплекс антитіло-антиген; 5 – кон'югат моноклональних антитіл; 6 – іммобілізовані комплекси з міченими антитілами; S – субстрат, P – фарбований продукт.

Ця схема ІФА використовується для визначення тиреотропного гормону та антигену лямблій у екстракті фекалій.

Конкурентний ІФА

Конкурентний ІФА відрізняється від неконкурентного, як правило, більшою специфічністю за рахунок того, що в якості конкурента в реакцію вводять реагент, що пройшов спеціальний строгий відбір на специфічність. На рис.29 відображена схема одностадійного конкурентного ІФА визначення антигену.

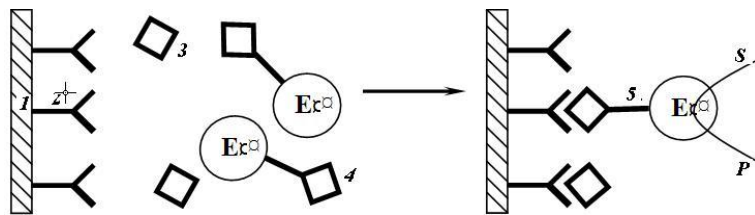


Рис.29. – Схема одно стадійного конкурентного ІФА визначення антигену.

Позначки: 1 – 3 ті ж, що на рис.27, 4 – кон'югат антигену; 5 – іммобілізовані комплекси з міченим антигеном; S – субстрат, P - фарбований продукт.

Основні етапи аналізу для виявлення антигену (рис.29).

1. На твердій фазі іммобілізують специфічні для виявляється антигену моноклональні антитіла.
2. В лунки панелей вносять у відомій концентрації антиген, мічений ферментом, і досліджуваний зразок. Проводять інкубацію і відмивання. Паралельно в сусідніх лунках ставлять позитивний і негативний контролі. Для побудови калібровочної кривої використовують стандартний немічений антиген в різних розведеннях.
3. Додають субстрат, інкубують, зупиняють реакцію при розвитку оптимального забарвлення в лунках з позитивним контролем.
4. Облік реакції на ІФА-зчитувачі. У цьому випадку кількість антигену в досліджуваному зразку оборотне пропорційна ферментативної активності на твердій фазі.

За такою схемою ІФА визначають: вільний тироксин, загальний тироксин, вільний трийотиронін, загальний трийодтрионін, кортизон, оксипрогестерон, естрадіол, дегідроепіандростерон сульфат, мікроальбумін.

Один з варіантів конкурентного ІФА для визначення антитіл к ВІЛ випускається фірмою Wellcome. У якості конкуруючого реагенту використовують поліклональні анти-ВІЛ антитіла, кон'юговані з ферментом. На тверду фазу сорбують антигени ВІЛ. Випробувані проби змішують з конкуруючим реагентом і суміш вносять у лунки з антигеном. Після

відмивання видаляються незв'язані антитіла до не ВІЛ та частина незв'язаних мічених анти-ВІЛ антитіл конкуруючого реагенту. Після додавання субстрату сильне забарвлення розвивається тільки в лунках, у які внесли сироватки, що не містять анти-ВІЛ антитіл. Якщо у випробуваної пробі була деяка кількість анти-ВІЛ антитіл, то розвинеться слабке або нульове забарвлення. Результат бажано реєструвати кількісно за допомогою вертикального спектрофотометра.

При визначенні антитіл цей варіант аналізу заснований на конкуренції мічених (кон'югат) і немічених (досліджуваних) антитіл за зв'язування з антигеном, адсорбованим на твердій фазі. Кількість ферменту, який приєднався до твердої фази, зменшиться пропорційно вмісту в суміші вільних антитіл.

Конкурентний метод вимагає мінімального числа операцій, незначної витрати реагентів і легко може бути автоматизований. При проведенні конкурентного ІФА для виявлення антитіл краще використовувати мічені моноклональні антитіла, тоді конкуренція кон'югату з досліджуваним зразком відбувається за єдиний епітопи адсорбованого на твердій фазі антигену.

Цей варіант ІФА застосовується для визначення різних сполук, таких як імуноглобуліни людини, раково-ембріональний антиген, інсулін, а також гормони небілкової природи. Він дозволяє виявляти антитіла до діагностично значимих епітопів інфекційних агентів.

В Україні виготовлення тест-систем для ІФА здійснює підприємство "Діапроф-Мед".

Методи визначення секреторної активності імунокомпетентних клітин. Метод імуноферментних плям (ELISPOT)

1983 році була розроблена технологія твердофазного ІФА для визначення лімфоїдних клітин, що секретують антитіла або антигени (наприклад, цитокіни), *in vitro*. Метод отримав назву ELISPOT (метод імуноферментних зон або плям).

Основний принцип методу.

1. На поверхні полістиролових лунок (використовують 24-х лункові панелі для культивування клітин) сорбують антигени або антитіла, які служать «пастковими» реагентами.
2. Додають досліджувані лімфоцити, культивують кілька годин при 37°C, даючи їм можливість зайняти певне місце і виконати секреторну функцію. Антитіла або антигени, що секретуються такими клітинами, вловлюються адсорбованими на твердій фазі реагентами.
3. Клітини видаляють, використовуючи для цього розчин для відмивання з детергентом, лізують клітини.
4. Ділянки накопичення секреторних продуктів виявляють, додаючи пов'язані з ферментом антитіла (антиглобуліновий реагент).
5. Додають суміш субстрату з агарозою (використовувані субстрати повинні розчинятися в агарозі і утворювати нерозчинні продукти реакції), на поверхні твердої фази утворюються коричневі або блакитні плями (у залежності від використовуваних ферментів і субстратів), виявляючи ділянки, де розташовувалися клітини. Плями, що утворилися, підраховують під мікроскопом, це й буде кількість клітин, які секретували. В якості твердої

фази може бути використана нітроцелюлозна мембрана У цьому випадку є ряд переваг: через високу адсорбційну здатності нітроцелюлозної мембрани потрібна значно менша кількість антигену, що використовується як «пастковий» реагент, крім того, відпадає необхідність у включенні субстрату в агарозу. Даний метод знайшов широке застосування для оцінки кількості клітин, секретуючих антиген, шляхом уловлювання адсорбованими антитілами: визначення кількості клітин, секретуючих цитокіни (ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІФН- γ , ФНП- α).

Системи посилення сигналу в ІФА

При використанні високоафінних антитіл чутливість окремих варіантів ІФА дуже висока і теоретично дозволяє виявити одиничні молекули антигену, але на практиці чутливість обмежується рядом факторів: активністю ферменту, інтенсивністю сигналу і методами обліку сигналу. Системи посилення сигналу дають можливість підвищувати чутливість різних варіантів ІФА.

Системи на основі взаємодії авідін-біотин (АВС-метод) та стрептавідин-біотин (SaABC-метод)

Біотин (вітамін Н) – з'єднання, стійке до дії високих температур, до кислого і лужного середовищі, добре розчиняється у воді і спирті. Він є коферментом в багатьох реакціях приєднання (карбоксилювання). Біотин легко може вступати в стійке з'єднання з різними білками, в тому числі з ферментами та імуноглобулінами.

Авідін глікопротеїни яєць птиць та рептилій утворює з біотином надзвичайно стійкий комплекс. Зруйнувати такий комплекс можна тільки при температурній обробці, тому що авідін руйнується при нагріванні. Авідін має 4 місця зв'язування, до яких можна приєднати біотин або білки. Таким чином, комплекс біотин-авідін можна використовувати як сполучний місток між антитілами і ферментами. Для цього готується комплекс, що складається з ферменту, пов'язаного з біотином і авідіном. В утвореному комплексі три центри зв'язування авідіну пов'язані через біотин з ферментом, а четвертий залишається вільним. Комплекс формується в три етапи: – – на першому етапі немічені первинні антитіла з'єднуються з антигеном,

- на другому етапі мічені біотином вторинні антитіла з'єднуються з первинними,
 – на третьому додається комплекс авідін-біотин-фермент, який приєднується до біотину вторинних антитіл. Таким чином, з одною молекулою антигену виявляються пов'язаними три молекули ферменту (рис. 30). Даний метод був названий АВС-методом (аббревіатура от англійського Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macro-molecular Complex).



Рис. 30. – Кроки розвитку методів посилення сигналу при вмявленні комплексу антиген-антитіло з ферментною міткою.

Подальший розвиток ця технологія отримала після заміни авідину на стрептавідін – білок, який отримують з мікроорганізмів *Streptomyces avidinii* (SaBC-метод). Стрептавідін володіє такими ж здібностями пов'язувати біотин, як й авідін, але на відміну від нього він не має заряду в нейтральному середовищі, не зв'язується з ендogenousними ферментами і набагато менше з ендogenousним біотином. Заміна авідину на стрептавідін дозволила підвищити чутливість методу приблизно у 8 разів. Подальшим розвитком систем візуалізації стала розробка полімерних систем. Основою систем є декстранова молекула, до якої приєднують до 20 молекул первинних або вторинних антитіл і до 100 молекул ферменту. Таким чином, одна молекула антигену виявляється пов'язаною зі



100 молекулами ферменту, що забезпечує дуже високу чутливість.

Рис. 31 – Схема посилення сигналу в ІФА з використанням молекули декстрану.

Використання хемілюмінесцентних реакцій. Хемілюмінесцентні реакції можна використовувати для отримання сигналу в ІФА, при цьому підвищується чутливість методу і скорочується час проведення аналізу, але вимірювання сигналу здійснюють вже за допомогою люменометру. В якості мітки в ІФА широко застосовують пероксидазу хрому, для її виявлення можна використовувати і різні хемілюмінесцентні реакції. Хемілюмінесцентні реакції засновані на здатності люмінолу світитися при окисленні перекисом водню. У прямому аналізі при ферментативної реакції утворюється перекис водню й окисляє люмінолу, каталізатором цієї реакції виступає пероксидаза хрому. Для посилення сигналу використовуються різні сполуки, наприклад, люциферин, феноли; в цьому випадку інтенсивність люмінесценції посилюється в 10 - 100 разів, в окремих варіантах у 500 разів (посилений хемілюмінесцентний аналіз). Люмінесцентний сигнал дуже стабільний, його рівень досягає максимуму за 30 с (для порівняння: кольорова реакція з ОФД повністю розвивається лише за 30 хв.). При непрямому аналізі люмінолом або його похідними мітяться антитіла. Така мітка у вільному стані здатна окислюватися перекисом водню з виділенням світла. Якщо вона утворила комплекс, то втрачає здатність окислюватися.

Точковий твердофазний імуоферментний аналіз

Останнім часом спостерігається тенденція до зниження вартості медичного обслуговування. У зв'язку з цим серед фізіологів і лікарів найбільшу популярність набувають прості методи аналізу, що не потребують дорогого обладнання. Метод ELISA також зазнав змін, став більш надійним, більш простим у виконанні і прийнятним за ціною. У модифікованому варіанті для адсорбції різних наявних у продажу антигенів замість внутрішніх поверхонь лунок мікротитрувальних планшетів, на яких не дуже ефективно зв'язуються білки, використовують нітроцелюлозні фільтри. Таку модифікацію називають dot-ELISA (крапковий твердофазний імуоферментний аналіз). У dot-ELISA мінімальні обсяги розчинів антигену або антитіл наносять на нітроцелюлозу або подібну підложку у вигляді серії точок, що дозволяє виконати набагато більше число аналізів з тією ж кількістю реагентів. Преципітуючи хромогенні субстрати, зазвичай вживані в імуоблотингу, на білому фоні нітроцелюлозних фільтрів утворюють легко помітні кольорові плями, в результаті чого відпадає потреба в дорогих фотометрах. Білий колір підложки навколо плям допомагає контролювати реакції неспецифічного зв'язування. Фільтри з результатами аналізу можуть зберігатися в темряві протягом багатьох років без втрати забарвлення. Крім того, простота і економічність відносно витрати антигенів та реагентів дозволяють здійснювати аналізи типу dot-ELISA за межами лабораторії, наприклад в домашніх або польових умовах.

Антигени. У dot-ELISA можна застосовувати різні препарати антигенів. Так, на нітроцелюлозних мембранах можна сорбувати як життєздатні або фіксовані формаліном найпростіші, так і супернатанти, отримані після руйнування клітин ультразвуком і заморожуванням-розморожуванням. З нітроцелюлозними мембранами можна пов'язувати етанольні екстракти бактеріальних препаратів, екстракти екскреторно-секреторного антигену цестод, антиген ехінококової кісти, антигени слинних залоз кліща і синаптосомальні мембрани мозку щура. На пластиковому підложці також можна сорбувати екстракти ядер вірусів.

Нанесення антигенів на мембрану. Технологія dot-ELISA сприяє збереженню антигенності препаратів і дозволяє проводити велику кількість аналізів з обмеженою кількістю антигену. Концентровані препарати антигену, нанесені на тверду підкладку, дають чітку кольорову реакцію. Пляму антигену наносять в обсязі від 0,1 до

3 мкл. Для цієї мети найкраще підходять скляні гамільтоновські шприци об'ємом до 10 мкл і ціною поділки 0,1 мкл, що забезпечує сталість діаметра плями. У разі препаратів солюбілізованих антигенів краще використовувати мембрани з малим діаметром пір, так як на них білки зв'язуються в основному з поверхнею. Навпаки, при застосуванні цілих клітин найпростіших, що мають розміри 5-10 мкм, величина пір не грає великої ролі.

Послідовність операцій. Dot-ELISA дозволяє визначати як антигени, так і антитіла. Усі стадії інкубації і промивання виконують при кімнатній температурі. Спочатку диски з антигеном обробляють блокуючим розчином. Для цієї мети краще всього підходить 3 - 5%-вий розчин очищеного бичачого сироваткового альбуміну в сольовому триетано-ламіновому буферному розчині (БСА-СТБ). Можна успішно застосовувати і цілісну кінську сироватку або 1%-ний розчин нормальної сироватки кролика в фосфатному буферному розчині з NaCl (ФСБ). При виявленні антитіл 50 мкл сироватки пацієнта в 1%-вому розчині БСА-СТБ інкубують на

диску; при цьому антитіла специфічно зв'язуються з антигеном, сорбованим на диску. Потім диски тричі промивають у розчині детергенту. Для цієї мети використовують 0,05% розчин твін-20 в сольовому розчині трис-НС1. Після промивання диски інкубують з 50 мкл кон'югату афінно очищених антивидових антитіл (вторинних антитіл) з ферментом. У імуноаналізу широко використовуються кон'югати антитіл з пероксидазою, оскільки молекули цього ферменту менше молекул лужної фосфатази та їх надлишок набагато легше вимивається з реакційної суміші. Однак пероксидаза інактивується азидом натрію, використовуваним як консервант, а також ароматичними вуглеводнями, що містять хлор, присутніми в деіонізованій полістирольними смолами воді. Кон'югати з лужною фосфатазою меншою мірою схильні до дії різних речовин, але з-за великого розміру молекули ферменту вони дають більш високий фоновий сигнал.

Після відмивання незв'язаного матеріалу додають хромогенний субстрат, що преципітує. При окисленні субстрату ферментом у присутності пероксиду водню утворюється чітка пляма. У разі пероксидази субстрат, що преципітує, використовують 4-хлор-1-нафтол (4ХН), який дає блакитне забарвлення і діамінобензідін, який утворює продукт коричневого кольору. У разі лужної фосфатази в dot-ELISA застосовують 5-бром-4-хлоріндоліл-3-фосфат (БХІФ), який утворює блакитний осад. У всіх випадках інтенсивність забарвлення пропорційна кількості неспецифічно зв'язаних антитіл. При визначенні антигенів проби наносять безпосередньо на підкладку, після чого проводять імунологічну реакцію або зі специфічними антитілами і потім з кон'югатом вторинних антитіл з ферментом і хромогенним субстратом, або з кон'югатом специфічних антитіл з ферментом-маркером і субстратом. Останній спосіб дає більш чітку позитивну реакцію, особливо якщо концентрація антигену в пробі дуже мала. У двохсайтовому dot-ELISA при визначенні антигенів спочатку на підкладку наносять специфічні антитіла. Антигени в пробі зв'язуються цими антитілами. Потім додають мічені специфічні антитіла проти іншого епітопу антигену і проводять реакцію з субстратом, що преципітує. Для таких методик характерна висока специфічність, так як при промиванні видалюються непов'язані антигени, що заважають визначенню.

Межа виявлення. Метод dot-ELISA характеризують висока чутливість, специфічність і відтворюваність. Межа виявлення специфічно пов'язаних антитіл (IgG) становить до 1 нг в пробі

Чутливість і специфічність dot-ELISA Чутливість методу складає 98%; діагностична специфічність 98%. *Відтворюваність.* Трохи вище в порівнянні зі звичайним ELISA і значно краще, ніж у реакції зв'язування комплементу (РЗК).

Поточну патогенну інфекцію можна відрізнити від минулої інфекції за допомогою dot-ELISA з клас-специфічним імуноглобуліном. IgM-специфічний dot-ELISA на лептоспіроз дозволяє виявити захворювання на кілька днів раніше, ніж застосовуваний у даний час метод мікроскопічної аглютинації. При визначенні імуноглобулінів IgM до *Toxoplasma gondii* чутливість dot-ELISA, звичайного ELISA і флуоресцентного імуноаналізу (ІФЛА) однакова.

Смужки мембран на пластиковій підкладці (dip-стіки.) Для скринінгу великого числа проб або в дрібносерійних аналізах запропоновано для dot-ELISA смужки нітроцелюлозних

мембран на пластиковій підкладці (діпстіки). Діпстіки менше за розміром, ніж мікропланшети, і їх зручніше використовувати за межами лабораторії. Однак нітроцелюлозні смужки дуже неміцні і легко ламаються, що значно обмежує їх застосування поза лабораторією. Для подолання цього недоліку нітроцелюлозні фільтри після нанесення антигену стали наклеювати на гнучкі пластикові смужки. Отримані таким чином діпстіки зручні у користуванні і не ламаються. Діпстіки послідовно інкубують з невеликим обсягом (300 мкл) розведеної сироватки пацієнта, кон'югатом вторинних антитіла - фермент і хромогенним субстратом. Dot-ELISA на діпстіках є досить чутливий для виявлення хворих та специфічним, дозволяючи виключати з аналізу здорових людей того ж географічного регіону при масових обстеженнях.

Для обстеження великого числа людей одночасно на кілька хвороб на діпстіки наносять кілька різних антигенів. Діпстіки з чотирма різними антигенами інкубують з набором сироваток, кожна з яких дає позитивну реакцію в інших тестах тільки на одну хворобу. Мультиантигенні діпстіки володіють високою реактивністю й діагностичної чутливістю.

Пластикові картки – це третій вид оформлення dot-ELISA. У цьому методі антиген наносять на білі непрозорі пластикові картки у вигляді точок, розташованих, як на звичайному мікротитрувальному планшеті. Картки можна обрізати, якщо передбачається аналізувати невелику кількість проб. Картки забезпечують високу відтворюваність результатів, а оброблені картки можна зберігати як завгодно довгий час. Попередні дані показують, що dot-ELISA на пластикових картках можна успішно застосовувати для діагностики амебіазу, токсоплазмозу, сифілісу, вірусів.

Представлені дані свідчать про можливість широкого застосування методу dot-ELISA для оцінки імунної реакції організму на інфекції та для виявлення відповідних антигенів у пробах хворих. Цей метод можна застосовувати як для аналізу сироватки однієї людини, так і для великомасштабного скринінгу проб крові. Найбільш популярною підкладкою для зв'язування антитіл або антигенів є нітроцелюлозна мембрана, яка володіє високою адсорбційною ємністю і великою площею поверхні, що дозволяє підвищити чутливість й відтворюваність аналізу в порівнянні зі звичайним ELISA на стандартних пластикових мікротитрувальних планшетах. В даний час спеціально для цього методу аналізу розробляються нові види мембран і пластиків, які мають ще більше підвищити чутливість аналізу і спростити його проведення. Великі можливості dot-ELISA і подібних імунозв'язуючих методів у визначенні антигенів або антитіл роблять ці методи перспективними для одночасного виявлення серії алергенів або венеричних захворювань. Важливою перевагою методу dot-ELISA є можливість його застосування для найрізноманітніших медичних цілей. При обстеженні населення окремих регіонів, наприклад в епідеміологічних дослідженнях, на одній нітроцелюлозній мембрані розміром з мікротитрувальний планшет можна одночасно проаналізувати сотні і тисячі проб при мінімальному витраті реагентів. При дослідженні одиничних зразків аналіз можна проводити на діпстіках або маленьких картках. Крім того, діпстіки і картки дуже зручні для аналізів в польових умовах. Мембрани з антигенами декількох типів дозволять проводити в країнах, що розвиваються, швидке, недороге і просте обстеження населення на декілька захворювань. Всі модифікації dot-ELISA відрізняються економічною витратою реагентів, не вимагають приладів

з електроживленням для реєстрації результатів, а відповідні набори дуже компактні. Dot-ELISA, мабуть, найбільш перспективний для проведення аналізів у географічно віддалених районах, де застосування більшості інших імунодіагностичних тестів неможливо через відсутність електрики, холодильної апаратури і чистої води. Подальше підвищення чутливості та ефективності аналізу можливо за рахунок застосування антигенів, отриманих генно-інженерним шляхом. Завдяки численним позитивним якостям dot-ELISA знайшов широке застосування у вигляді готових, доступних і дешевих наборів в клінічній діагностиці, ветеринарії та сільському господарстві.

Сфера застосування розробленої технології величезна. В останні роки досягнення в області виробництва моноклональних антитіл сприяло виявленню практично будь-якого бажаного аналіту, від важких металів з наркотиками, і клінічних маркерів на продовольство патогенів використанням імуноферментного.

Практичне застосування ІФА

ІФА знайшов широке застосування в різних областях медицини і біології завдяки відносній простоті і високій чутливості методу. ІФА успішно застосовується для:

масової діагностики інфекційних захворювань (виявлення різних специфічних антигенів або антитіл до них); виявлення і визначення рівня гормонів і лікарських препаратів у біологічних зразках;

визначення ізотипів (IgG, IgM та інші) антитіл проти конкретного антигену; виявлення імунних комплексів; виявлення онкомаркерів;

визначення білків сироватки крові (феритину, фібронектину та ін); визначення загального IgE і специфічних IgE антитіл;

скринінгу моноклональних антитіл; визначення цитокінів в біологічних рідинах.

Чутливість методу. ІФА прийшов на зміну широко використовуваним раніше в клінічній практиці методам аглютинації, преципітації і РІА. У порівнянні з вищеназваними методами ІФА менш трудомісткий і менш тривалий за часом, зручний для виконання великого числа однотипних аналізів. У ІФА поєднується унікальна специфічність імунохімічних аналізів з високою чутливістю визначення ферментної позначки. Чутливість методу (під чутливістю мають на увазі мінімальну кількість антитіл або антигену, що виявляються) визначається наступними факторами: афінності антитіл, переважніше використання моноклональних антитіл; специфічною активністю ферменту; інтенсивністю сигналу; чутливістю обліку сигналу. Різні варіанти ІФА розрізняються за своєю чутливістю. Окремі варіанти твердофазного ІФА дозволяють виявляти в зразку поодинокі молекули. Середня чутливість ІФА – 10^{-9} - 10^{-12} моль/л.