

Иммуноферментный анализ.

Иммуноферментный анализ (сокращённо **ИФА**, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) — лабораторный иммунологический метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса «антиген-антитело» за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску. Основой проведения любого варианта ИФА служит определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с негативными и позитивными контролями.

Различают несколько десятков модификаций ИФА:

1. **ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay)** - метод определения с помощью иммуносорбентов, связанных с ферментами;
2. **EIA (enzyme immunoassay)** - метод на основе фермент-иммуноопределения;
3. **EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique)** - способ, основанный на связи с ферментами.

ELISA и EIA - это методы гетерогенного или твердофазного анализа (тИФА), **EMIT** является гомогенным ИФА.

Для определения антигенов и антител применяются твердофазный (гетерогенный) вариант иммуноферментного анализа. Использование твердой фазы позволяет упростить процесс разделения компонентов реакции за счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, не участвующих в реакции.

тИФА основан на двух принципиальных научных открытиях. **Первое** заключается в способности энзимов и антител, ковалентно или нековалентно связанных с твердой основой, сохранять свою функциональную активность, т.е. расщеплять субстрат (ферменты) и связывать антигены/антитела; **второе** базируется на создании комплекса антитело-фермент (Ab-F) в виде конъюгата, сохраняющего свою биологическую активность в растворе. Ab-F-конъюгаты характеризуются высочайшей специфичностью и чувствительностью, достигающей 97-99%.

Иммунохимические методы анализа, основанные на специфическом связывании определяемого соединения соответствующими антителами, широко вошли в аналитическую практику и используются в различных областях медицины, сельского хозяйства, микробиологической и пищевой промышленности, для целей охраны окружающей среды. Индикация образующегося комплекса антиген-антитело может быть осуществлена, если в один из исходных компонентов реакционной системы ввести метку, которая легко детектируется соответствующим высокочувствительным физико-химическим методом. Весьма удобными для этой цели оказались изотопные, ферментные, флуоресцентные, парамагнитные и др. метки, использование которых дало возможность увеличить чувствительность классических иммунохимических методов анализа в миллионы раз, а время анализа уменьшить до нескольких минут.

Исторически первым среди них был радиоиммунологический анализ (РИА), предложенный в конце 50-х годов прошлого века. Благодаря возможности определять метку, которой являлся изотоп ^{125}I , в очень малых концентрациях, удалось достигнуть высокой чувствительности анализа (на уровне пкг/мл). В середине 60-х годов для идентификации и локализации антигенов в гистохимических препаратах и выявления полос преципитации в иммунодиффузных и иммуноэлектрофоретических методах в качестве высокочувствительной метки было предложено использовать молекулы ферментов. Являясь по своей природе мощными химическими катализаторами, ферменты способны эффективно осуществлять наработку легко детектируемого продукта, что делает возможным определение ферментной метки в весьма малых концентрациях (до 10^{-12} М и ниже). На протяжении последних трех десятилетий иммунофер-

ментные методы анализа интенсивно развивались как в теоретическом, так и практическом плане и к настоящему времени они сформировались в самостоятельное научное направление, имеющее важное прикладное значение. Наибольшее распространение получили гетерогенные методы иммуноферментного анализа, основанные на использовании полистирольных планшетов для иммобилизации антител или антигенов, специфическом связывании определяемого вещества на стенках лунок планшета и последующем выявлении образовавшихся иммунокомплексов с помощью меченных ферментами компонентов.

Иммуноферментный анализ по сравнению с другими методами детекции антигенов и антител обладает следующими преимуществами:

- высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации до 0,05 нг/мл. Такая чувствительность метода определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата;
- возможностью использовать минимальные объемы исследуемого материала;
- стабильностью при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более);
- простотой проведения реакции;
- наличием как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета;
- возможностью автоматизации всех этапов реакции
- относительно низкой стоимостью диагностических наборов.

Благодаря своей невысокой стоимости и экологической безопасности, тИФА перешел в ряд стандартных, «рутинных» анализов.

Принцип метода.

Структура и свойства антигенов и антител.

Генетически чужеродные вещества, попадая в организм высших животных и человека, способны вызывать в них ряд специфических процессов, направленных на их удаление из организма. Система организма, выполняющая эту функцию, называется *иммунной системой*, а сами процессы – *иммунологическими*. К важнейшим из них следует отнести образование специфических белков крови – *антител (иммуноглобулинов)*. Вещества, способные вызывать специфические иммунологические реакции в организме, получили название *антигенов*. Способность антигенов вызывать иммунный ответ называется *иммуногенностью*, а способность образовывать комплексы с антителами – *антигенностью*. К антигенам относятся белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты как в очищенном виде, так и в виде компонентов различных биологических структур (клеток, тканей, вирусов и т.д.).

На поверхности молекулы сложного антигена можно выявить функциональные группы или остатки, обуславливающие *антигенную специфичность*, называемые *антигенными детерминантами* или *эпитопами*. Число эпитопов на поверхности сложной молекулы опре-

деляет валентность антигена. Понятие антигенная детерминанта включает в себя последовательность образующих ее химических функциональных групп и их пространственное расположение. В молекулах белков антигенная детерминанта образуется совокупностью аминокислотных остатков (может варьировать от 5 до 20). Антигенные детерминанты белков бывают двух типов – *секвенциальные*, т.е. представляющие собой последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи, и *конформационные*, образованные аминокислотными остатками из различных частей белковой глобулы. Во многих случаях единичная замена аминокислоты в структуре антигенной детерминанты или изменение конформации белковой глобулы являются достаточными для изменений антигенной специфичности макромолекулы. Если два антигена имеют только часть одинаковых антигенных детерминант, их называют перекрестно реагирующими антигенами.

Низкомолекулярные вещества, не способные сами вызывать образование антител, но приобретающие иммуногенные свойства после конъюгирования с высокомолекулярными носителями, например, бычьим сывороточным альбумином, называются *гаптенами*. К гаптенам относится широкий круг природных соединений: пептидные и стероидные гормоны, различные лекарственные препараты, антибиотики, витамины, олигосахариды и т.д.

Биологическая функция антител заключается в защите организма от проникновения чужеродных веществ путем образования прочных специфических иммунных комплексов с соответствующими антигенами и последующего удаления их из организма. Способность антител образовывать высокоспецифичные прочные иммунокомплексы с различными веществами и возможность получения антител в необходимых количествах являются основой иммунохимических методов анализа.

В организме антитела вырабатываются специфическими клетками крови - В-лимфоцитами, каждый из которых имеет на своей поверхности до 100 000 рецепторов одинаковой специфичности, способных узнавать любой чужеродный антиген. Антиген, встречаясь в кровотоке с комплементарным ему рецептором, проводит отбор (селекцию) соответствующего В-лимфоцита, который затем, трансформируясь в плазматическую клетку и многократно делясь, образует клон клеток. Каждый клон плазматических клеток секретирует гомогенные по своей структуре антитела. Однако так как антиген активирует в крови сразу большое количество типов В-лимфоцитов, которые содержат рецепторы различной степени специфичности по отношению к исходному антигену, такой иммунный ответ и антитела называются поликлональными. Сыворотку животного, содержащую специфические к данному антигену антитела, называют антисывороткой, при этом обычно указывают против какого антигена

и каким животным она выработана (например, антисыворотка кролика против эритроцитов человека). Принципиально важным является то, что поликлональные антитела даже против одной-единственной антигенной детерминанты гетерогенны как по структуре активного центра, так и по физико-химическим свойствам. В том случае, если антиген поливалентен, например, белок, то в сыворотке крови образуются антитела, направленные против каждой индивидуальной антигенной детерминанты, что еще более усложняет состав антител.

В середине 70-х годов был разработан принципиально новый путь получения антител, основанный на слиянии (гибридизации) лимфоцитов иммунизированного животного с миеломными клетками с образованием новых клеток – гибридом. Особенностью таких клеток является их способность размножаться и продуцировать антитела в искусственных условиях вне организма. С помощью специальных методов клонирования можно выделить одну гибридную клетку, которая, размножаясь, будет секретировать в неограниченных количествах антитела только одного вида – моноклональные антитела, которые являются гомогенными как по специфичности, так и по физико-химическим свойствам.

Структура антител.

Имуноглобулины по своей химической структуре относятся к большому классу природных соединений – *гликопротеидам*, т.е. белкам, содержащим в своей структуре олигосахариды. Несмотря на огромное разнообразие антител и их гетерогенность, все они обладают некоторыми общими структурными элементами, обеспечивающими выполнение их основных функций.

По своим антигенным, эффекторным свойствам и структурным особенностям иммуноглобулины подразделяются на пять основных *классов*: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM (Ig обозначает *иммуноглобулин*).

Общей структурной единицей всех иммуноглобулинов является комплекс из четырех полипептидных цепей – двух идентичных между собой *легких* цепей с молекулярной массой 23 кД каждая (L-цепи, от английского слова light- легкий) и *тяжелых* с молекулярной массой по 53000 (H-цепи, от английского heavy- тяжелый). Каждая из легких цепей прочно соединена с NH₂-концевыми участками тяжелых цепей благодаря наличию межцепочечных дисульфидных связей и множеству слабых гидрофобных, электростатических и других межатомных взаимодействий. Аналогичные связи существуют и между свободными участками

тяжелых цепей. В целом структура такого комплекса напоминает латинскую букву Y (или T) и характерна для иммуноглобулинов классов IgG, IgD, и IgE (рис.1).

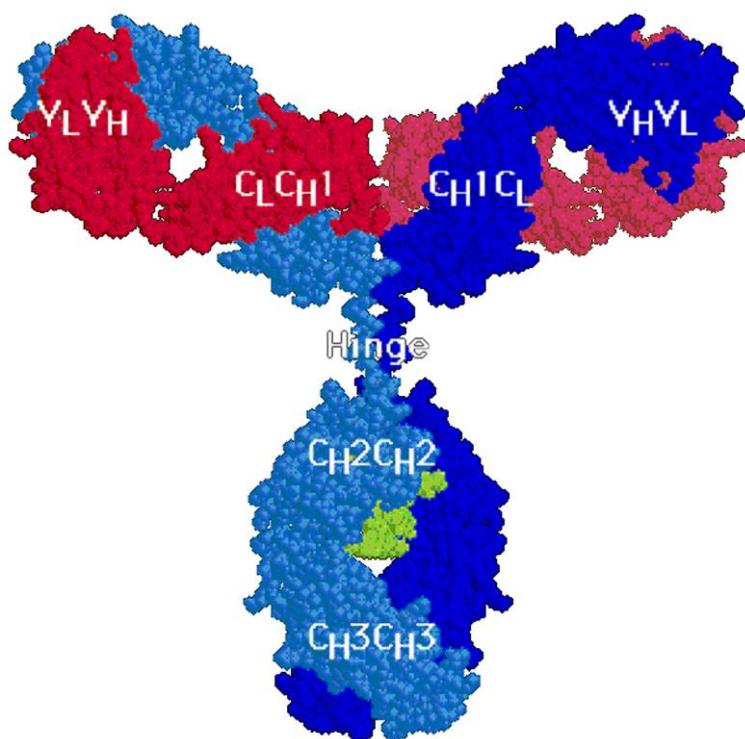


Рис.1. Пространственная структура молекулы IgG

При действии протеолитического фермента папаина молекула IgG распадается на три фрагмента, два из которых идентичны и сохраняют способность связывать антигены (так называемые *Fab-фрагменты*) и третий, способный к кристаллизации (*Fc-фрагмент*), отвечающий за эффекторную функцию антител (Рис.2). Другой протеолитический фермент пепсин разрывает пептидную связь, расположенную ближе к COOH-концу цепи от S-S связи между Н-цепями в Fc-фрагменте. В результате образуются так называемый pFc'-фрагмент, представляющий остатки тяжелых цепей и соединенные дисульфидными связями два Fab-фрагмента, обозначаемые как *F(ab')₂-фрагмент*.

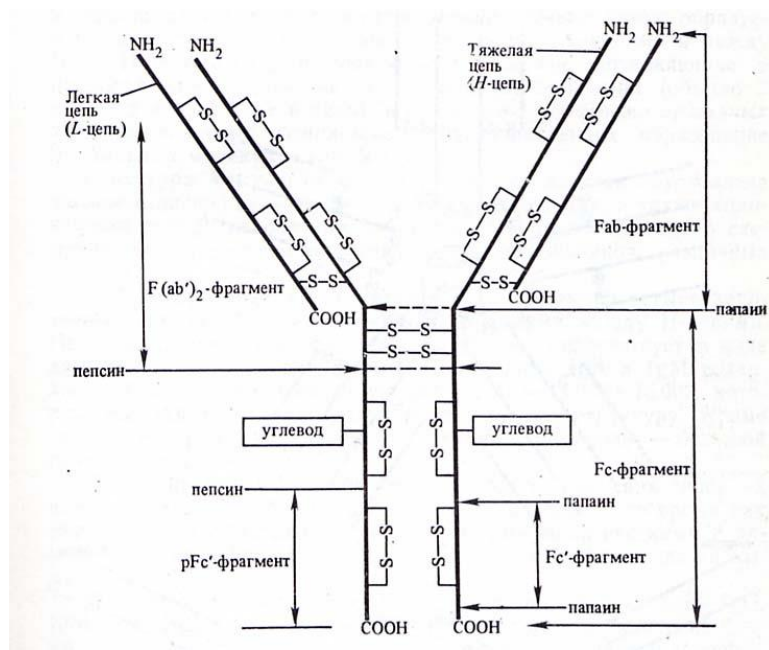


Рис.2. Схематическое изображение структуры молекулы IgG.

Антигенсвязывающий центр расположен в NH_2 -концевых частях H- и L-цепей. Таким образом каждая молекула IgG, а также $\text{F}(\text{ab}')_2$ -фрагменты содержат по два одинаковых антигенсвязывающих центра, а Fab-фрагмент – один.

Молекулы антител имеют большое число S-S –связей, которые можно разделить на 3 категории – межцепочечные, внутрицепочечные и связи между H-цепями отдельных четырехцепочечных комплексов, обуславливающих образование полимерных молекул – IgM и IgA. Структура иммуноглобулинов различных классов обусловлена числом и расположением S-S связей в молекулах, а также количеством четырехцепочечных элементов. IgM присутствует в сыворотке в виде пентамера четырехцепочечных комплексов, соединенных S-S связями между H-цепями. Некоторое количество IgA сыворотки также присутствует в виде димерной и тетрамерной формы (Рис. 3).

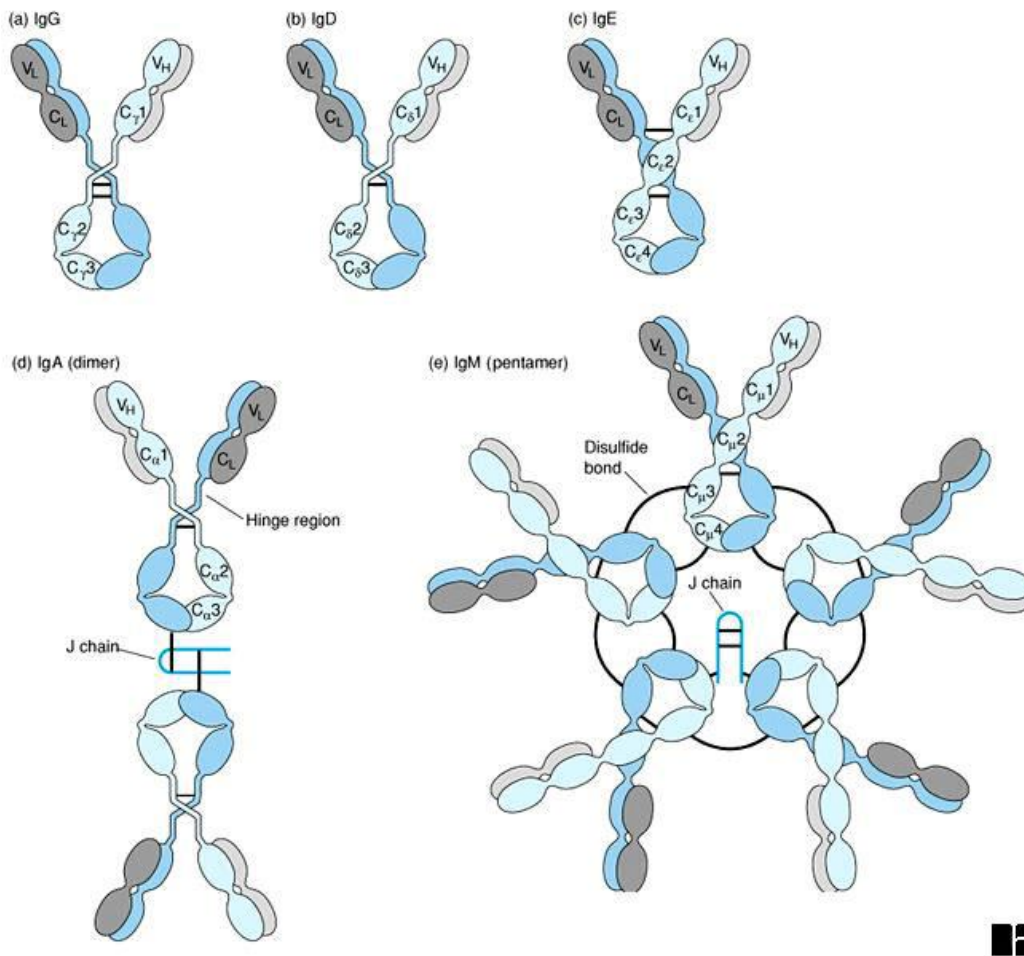


Рис.3. Схематическое изображение структуры молекул иммуноглобулинов различных классов

Легкие цепи иммуноглобулинов бывают только двух типов - λ или χ , и являются общими для всех пяти классов, в то время как тяжелые цепи обладают структурными, иммунологическими и химическими особенностями, характерными для каждого класса иммуноглобулинов. При исследовании аминокислотной последовательности было обнаружено, что все легкие и тяжелые цепи имеют одну принципиальную структурную особенность: они состоят из двух частей – *вариабельной (V) и константной (C)* (Рис.4).

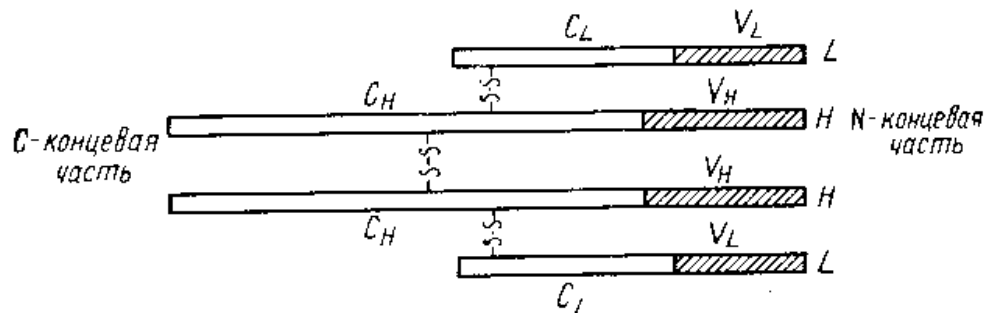


Рис.4. Схематическое изображение расположения константных и переменных участков в молекуле IgG.

Постоянная или константная часть легких цепей (C_L) включает 107 аминокислотных остатков COOH -концевого участка, константная часть тяжелой цепи приблизительно в три раза (или в четыре в случае IgM и IgA) длиннее переменной. Оставшиеся последовательности аминокислотных остатков в NH_2 -концевой половине легких и тяжелых цепей образует так называемые переменные области (V_C и V_H). В каждой из легких цепей молекул антител существуют две внутрицепочечные дисульфидные связи, число таких связей в тяжелых цепях различно (4-6). Каждый из внутрицепочечных дисульфидных мостиков образует петлю из 55-70 аминокислотных остатков.

По данным рентгеноструктурного анализа, участки пептидных цепей вблизи петли образуют глобулярную структуру, в которую включается около 110 аминокислотных остатков (Рис.5). Такие глобулы в структуре молекул антител получили название *доменов*. NH_2 -концевой домен тяжелой цепи обозначают как V_H , а три последующих в константной области тяжелой цепи – как C_H1 , C_H2 и C_H3 (для легкой цепи, соответственно V_L и C_L).

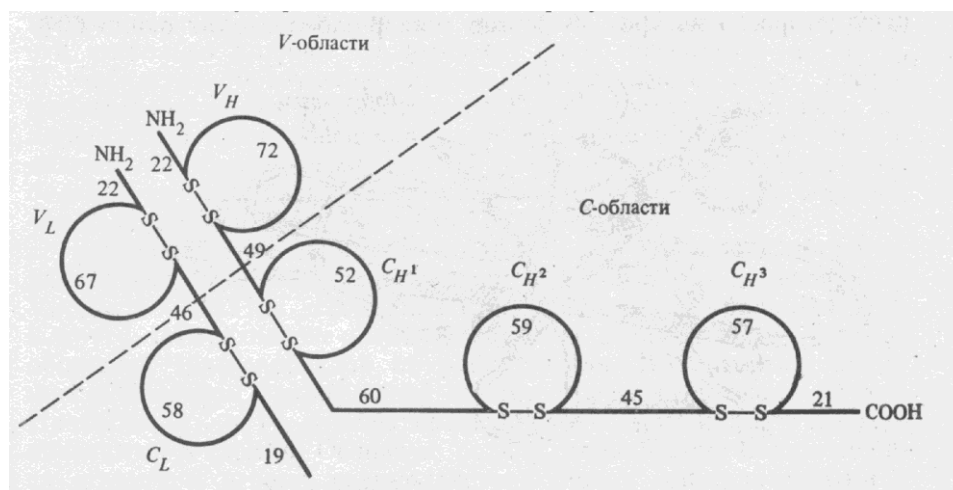


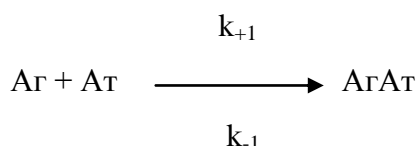
Рис.5. Схематическое изображение локализации доменных участков в легкой и тяжелых цепях иммуноглобулинов.

Связывание антигена происходит в доступной растворителю щели активного центра, образованной переменными доменами в NH_2 -концевой части легкой и тяжелой цепей. Способность связывать антигены с той же эффективностью, что и нативные молекулы антител, обладают Fab и $F(ab')_2$ -фрагменты иммуноглобулинов. Основным принципом организации антигенсвязывающих центров иммуноглобулинов является полицентровая структура. Малые

антигенные детерминанты связываются на ограниченном участке активного центра, комплементарном данной детерминанте. Большие детерминанты могут занимать практически всю область связывания.

Физико-химические закономерности взаимодействия антиген-антитело.

Антитела, образуемые в ответ на введение в организм антигенов, специфически взаимодействуют с этими антигенами. В основе первичного взаимодействия лежат общие принципы любой бимолекулярной реакции. Так как в данном случае продуктом реакции является комплекс антиген-антитело, иммунная реакция является обратимой и описывается теми же кинетическими и термодинамическими параметрами, что и любой процесс комплексообразования.



Степень соответствия между антигенной детерминантой и антигенсвязывающей областью активного центра антитела (*иммунологическая специфичность*) определяется химической и пространственной комплементарностью, которая обусловлена, с одной стороны, взаимодействием электронных облаков реагирующих химических групп, с другой – стерическими силами отталкивания. С количественной стороны специфичность взаимодействия антиген-антитело характеризуется через *аффинность* антител или *равновесную константу образования иммунного комплекса* (K_a , размерность л/моль) или его распада ($K_d = 1/K_a$, размерность моль/л).

$$K_a = k_{+1} / k_{-1}$$

Обычный диапазон изменения аффинности антител (K_a) составляет $10^5 - 10^{11} \text{ M}^{-1}$. максимальные значения констант связывания характерны для антигенов, обладающих ярко выраженными гидрофобными свойствами или же взаимодействующих с активным центром антитела достаточно большой областью молекулы. Так как молекула антитела имеет два и более антигенсвязывающих центров, и кроме того, способна взаимодействовать с несколькими антигенными детерминантами молекулы антигена, реально существующий процесс взаимодействия поливалентного антитела с поливалентным антигеном является более сложным и

характеризуется *функциональной аффинностью* или *авидностью*. С количественной точки зрения бивалентные взаимодействия являются почти на три порядка более прочными, чем моновалентные.

Трудность определения аффинности (или константы связывания антител) обусловлены следующими причинами: гетерогенностью антител по физико-химическим свойствам, в том числе, сродству к антигену, сложностью определения общего количества специфических антител, возможностью образования комплексов сложного состава в случае поливалентных антигенов. Однако для практических целей, в частности для целей использования в иммуноферментном анализе, достаточно знать эффективные значения, характеризующие суммарные свойства используемых антител. Для моноклональных антител определяемые значения констант аффинности носят истинные значения.

Все методы, позволяющие определять концентрации свободного и связанного антигена, можно условно разбить на две большие группы. К первой относятся методы, в которых стадия разделения свободного и связанного антигена осуществляется путем избирательного осаждения, аффинного связывания (иммобилизации) или гель-фильтрации. Для низкомолекулярных антигенов (гаптенов) используется равновесный диализ. Вторая группа включает методы, базирующиеся на изменении физико-химических свойств антигенов (или меток, связанных с антигеном) при комплексообразовании с антителами: тушении или усилении флуоресценции, изменении степени флуоресценции, ингибировании ферментативной активности.

Для количественного способа расчета констант комплексообразования реакции антиген-антитело наиболее распространенными являются способы, основанные на измерении равновесных концентраций комплекса при постоянной концентрации одного из реагентов и варьировании концентрации второго. В координатах Скэтчарда $[AgAt]/[Ag]$ от $[AgAt]$ (или V/F от V , V – bound, F – free) получаем прямую линию, тангенс угла наклона которой равен величине $-K_a$, а отрезок, отсекаемый на оси абсцисс – постоянную концентрацию одного из реагентов.

Образование комплекса антиген-антитело является обратимым процессом, т.е. равновесная константа связывания (аффинности) данного комплекса определяется отношением константы скорости ассоциации k_1 к константе скорости диссоциации комплекса k_{-1} . Значения константы скорости реакции ассоциации для большинства антигенов велики и приближаются к диффузионно контролируемому пределу до $(10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$. В случае белковых антигенов их значения приблизительно на два порядка меньше и варьируют от 10^5 до $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Наблюдаемые различия в аффинности антител обусловлены в основном, различиями в значениях константы скорости диссоциации ($10^{-3} - 10^{-7} \text{ с}^{-1}$).

Для экспериментального определения константы скорости ассоциации можно воспользоваться одним из следующих подходов: изучение начальных скоростей реакции при известных начальных концентрациях каждого из реагентов, изучение зависимости скорости образования продукта (комплекса) при избытке одного из реагентов и варьировании концентрации второго. Определение константы скорости диссоциации комплекса продят путем прямого измерения скорости процесса диссоциации комплекса в условиях его необратимости. Для этого используют один из следующих подходов.

1. После установления равновесия в системе проводят разбавление большим избытком буфера. При этих условиях ($V_{\text{дисс}} \gg V_{\text{асс}}$) процесс диссоциации комплекса будет описываться экспоненциальной кривой, спрямление которой позволяет определить численное значение k_{-1} .
2. В систему вводят вещества, способные быстро и полностью связывать или удалять свободный лиганд. Если скорость удаления свободного лиганда существенно больше скорости диссоциации комплекса, то наблюдаемая скорость распада комплекса описывается реакцией первого порядка и характеризуется константой k_{-1} .
3. После установления равновесия в системе антитела-меченый антиген в нее вводят избыток свободного немеченого антигена. В этих условиях процесс изменения концентрации комплекса меченый антиген-антитело описывается кинетикой первого порядка, константа скорости которого соответствует k_{-1} .

Реактивы:

Иммуноглобулины, применяемые в таких тест-системах, так называемый конъюгат может быть получен на основе антивидовых антител (например, кроличьи антитела против иммуноглобулинов человека) или на основе антител, направленных против человеческих иммуноглобулинов определённого класса (M, G, A).

В зависимости от того, какие антитела использованы, тест-система будет выявлять в исследуемом образце или специфические антитела независимо от их класса, или антитела лишь определённого класса (например, только иммуноглобулин G или только иммуноглобулин M).

В зависимости от того, какие антигены используются, все иммуноферментные тест-системы для выявления антител подразделяются на:

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

Общее направление развития ИФА-диагностикумов — это направление от лизатных тест-систем, которые принято называть тест-системами первого поколения, к рекомбинантным и пептидным.

В качестве твердой фазы в большинстве коммерческих диагностических препаратов используют полистироловые 96-ти луночные планшеты или полистироловые шарики [фирмы “ДИА-плюс”, “Рош” (“ROCHE”), “ЭББОТТ” (“ABBOTT”)]. Основные требования, предъявляемые к твердой фазе при проведении ИФА, включают:

- 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.

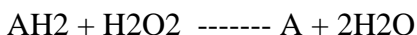
Наиболее распространенным способом иммобилизации антител или антигенов является адсорбция, когда часть молекул за счет ионных и гидрофобных взаимодействий, а также образования водородных связей присоединяется к поверхности твердой фазы.

Ферменты как метки в иммуноанализе.

Принципиальная возможность применения ферментов в качестве меток в иммуноферментном анализе обусловлена чрезвычайно высокой чувствительностью регистрации ферментов в растворе. Известны усилительные системы, позволяющие регистрировать наличие всего нескольких сотен молекул ферментов в 1 мл раствора. Основными требованиями к молекулам ферментов для возможности их использования в качестве меток являются следующие: высокая удельная каталитическая активность, доступность, возможность получения фермента в высоко очищенном состоянии, сохранение каталитической активности после химической модификации при получении *конъюгатов* фермент-антитело (антиген), стабильность, простота и чувствительность метода определения концентрации (активности) фермента.

Для ферментативной метки антигенов или антител могут быть применены разнообразные ферменты: пероксидаза хрена, щелочная фосфотаза, бета-галактозидаза и т. д.

Пероксидаза катализирует реакцию



В качестве AH₂ могут быть разные соединения. Так, восстановленный бесцветный о-фенилендиамин в пероксидазной реакции превращается в окисленную окрашенную форму с максимумом оптического поглощения при 435 нм, регистрируемую фотометрически.

Щелочная фосфатаза катализирует гидролиз фосфорных эфиров: 4-нитрофенилфосфат превращается в 4-нитрофенол, регистрируемый по оптической плотности при 405 нм; 4-метилумбеллиферилфосфат превращается в 4-метилумбеллиферон, флуоресцирующий с высоким квантовым выходом при 450 нм (флуоресценцию возбуждают при 365 нм).

β -Галактозидаза катализирует гидролиз лактозы с образованием глюкозы и галактозы. Если вместо природного субстрата взять 4-метилумбеллиферил- β -D-галактозид, при гидролизе образуются галактоза и 4-метилумбеллиферон, регистрируемый флуориметрически.

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.

Методы иммуноферментного анализа.

Первичным процессом в иммуноферментном (или иммунохимическом) анализе является стадия «узнавания» анализируемого соединения специфическим к нему антителом. Так как процесс образования иммунохимических комплексов происходит в строго количественном соотношении, обусловленном аффинностью, концентрациями компонентов и условиями реакции, то достаточным для определения исходной концентрации анализируемого соединения является количественная оценка образовавшихся иммунных комплексов. Для такой оценки возможно либо прямое определение концентрации образующихся иммунокомплексов (*тип 1*), либо количественная оценка оставшихся свободными мест специфического связывания (*тип 2*). Второй общей стадией любого метода иммуноферментного анализа является формирование связи меченого ферментом соединения со специфическим комплексом или свободными центрами связывания. И наконец, заключительным обязательным процессом в иммуноферментном анализе является трансформация ферментной метки в соответствующий сигнал, измеряемый каким-либо физико-химическим методом (спектрофотометрическим, флуориметрическим, люминесцентным и т.д.), что достигается путем измерения скорости превращения субстрата или количества продукта, образующегося за фиксированный промежуток времени.

Принимая во внимание вышеописанные подходы для определения специфических комплексов, дальнейшую классификацию методов иммуноферментного анализа, можно осуществить по типу реагентов, используемых на первой стадии анализа. Если на первой стадии в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры

связывания (антиген и специфические антитела), то метод является *неконкурентным*. Для неконкурентного анализа типа 1 оптимальным является соотношение компонентов, при котором концентрация центров связывания значительно превышает концентрацию определяемого соединения. Необходимым условием для неконкурентного анализа типа 2 является соблюдение соотношения избытка или сравнимой концентрации определяемого соединения (антигена) и мест специфического связывания, так как в этом случае определяется разность общего числа мест связывания и числа образовавшихся иммунных комплексов. Если на первой стадии анализа в системе одновременно присутствуют анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за имеющиеся в относительном недостатке центры специфического связывания, то метод является *конкурентным*. Необходимым условием конкурентного метода является недостаток центров специфического связывания по отношению к суммарной концентрации анализируемого соединения и его аналога.

Следующим принципом классификации методов иммуноферментного анализа является их разделение по типу проводимых на каждой из иммунохимических стадий реакций. В соответствии с этим все методы можно разделить на две группы – *гомогенные* и *гетерогенные*.

В настоящее время разработаны различные варианты **твердофазного иммуноферментного анализа**:

1. **“Сэндвич”-метод.** Общая схема проведения метода заключается в следующем. На твердой фазе адсорбированы антитела к исследуемому антигену. После инкубации исследуемого материала и образования комплекса «антитело — антиген» проводится удаление несвязавшихся компонентов, добавляется конъюгат, т.е. антитела к искомому антигену, меченые ферментом. По завершении инкубации, с последующим удалением непрореагировавшего конъюгата промывкой, образуется комплекс, в котором антиген как бы заключен между двумя слоями антител. Наличие меченных ферментом антител определяется при помощи соответствующего субстрата. “Сэндвич”-метод используется для выявления HBsAg, HBeAg, антигена вируса гепатита А.

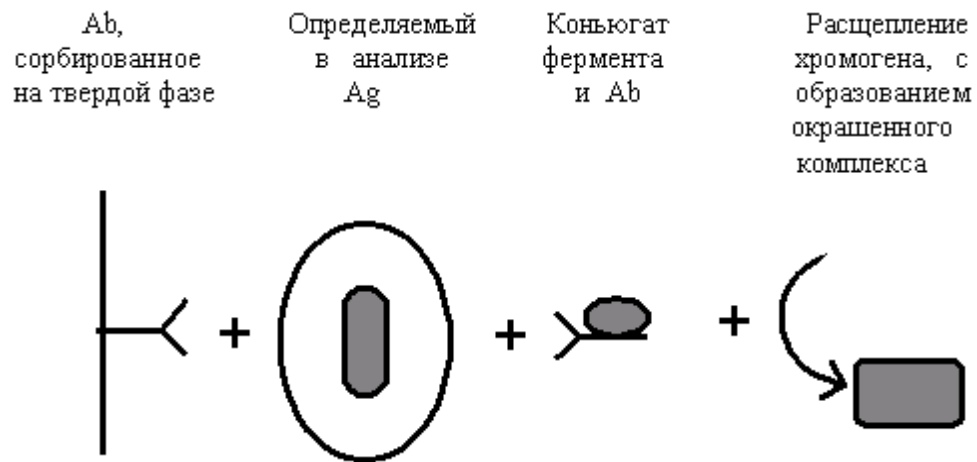


Рис. 2.а. Определение антигена.
Последовательность анализа

2. **Непрямой ИФА.** На твердой фазе иммобилизуют антиген, после инкубации исследуемого материала и удаления несвязавшихся компонентов добавляют меченые ферментом антитела к иммуноглобулинам человека класса IgG, которые взаимодействуют с Fc-фрагментом к IgG. После проведения субстрат-ферментативной реакции проводят учет полученных результатов. При наличии антител уровень оптической плотности прошедшей реакции превосходит показатели отрицательных образцов. Этот метод применяется для определения антител к вирусу гепатита С.

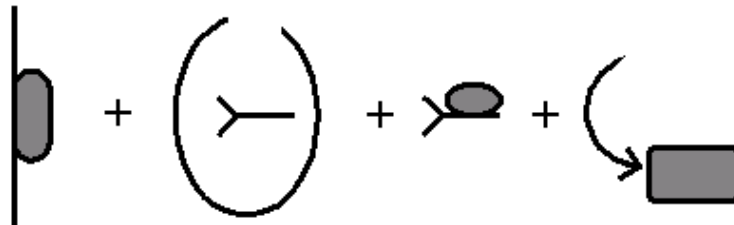
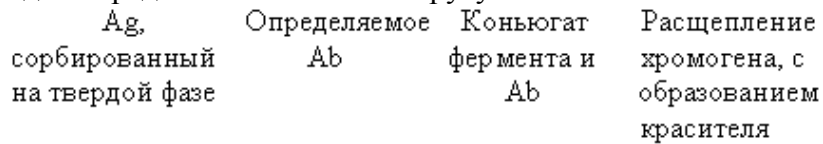


Рис. 1.а. Определение специфических антител.
Последовательность анализа

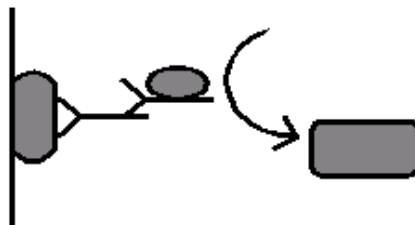


Рис. 1.б. Определение иммунного комплекса.
Положительный результат теста.

3. **Конкурентный метод.** К антигену, иммобилизованному на твердой фазе одновременно добавляют исследуемый материал и конъюгат. При проведении реакции мече-

ные и исследуемые антитела конкурируют за активные центры антигена, иммобилизованного на твердой фазе. После завершения инкубации и удаления не прореагировавших компонентов проводится ферментативная реакция, результаты которой обратно пропорциональны количеству антител в исследуемом образце.

4. Ингибирующий ИФА. На полистироловом шарике адсорбирован стандартный АГ, после инкубации с исследуемым материалом и удаления непрореагировавших компонентов добавляется АГ, меченный ферментом, который взаимодействует со свободными центрами связывания антител, прореагировавшими с антигеном, сорбированным на твердой фазе. При наличии антител в исследуемой пробе уровень оптической плотности прошедшей реакции превосходит показатели отрицательных контрольных образцов.

5. Прямой ИФА. На первом этапе реакции исследуемый образец фиксируют на твердой фазе. Затем к нему добавляют конъюгат. После удаления непрореагировавших компонентов реакции проводится ферментативная реакция, интенсивность которой прямо пропорциональна содержанию исследуемых антигенов в образце и вообще говорит об их наличии в исследуемом материале.

Конкурентные твердофазные методы обладают меньшей чувствительностью по сравнению с неконкурентными. Предел обнаружения различных соединений для них ограничен как чувствительностью регистрации ферментной метки, так и аффинностью антител, в то время, как для неконкурентных методов, при отсутствии неспецифических взаимодействий, - только чувствительностью определения фермента. Поэтому для достижения высокой чувствительности анализа конкурентным методом необходимо использовать высокоаффинные антитела.

Гомогенный ИФА

К *гомогенным* относятся методы, осуществляемые в однофазной системе, и не требующие стадии механического разделения образовавшихся комплексов. Во всех схемах проведения гомогенного иммуноферментного анализа регистрируется концентрация не образующегося специфического комплекса антитело-антиген, а оставшихся свободными центров специфического связывания. Однако, в противоположность гетерогенным схемам, наблюдаемая ферментативная активность, соответствующая концентрации незанятых мест специфического связывания, может как уменьшаться, так и увеличиваться, что обусловлено различной природой воздействия связывания лигандов на ферментативную активность. Введение метки в молекулу антигена является одним из наиболее распространенных подходов в гомогенных методах иммуноферментного анализа. Все *гомогенные* методы относятся к *конкурентным* и основаны на одновременном взаимодействии с антителами анализируемого и меченого антигенов. После образования в растворе соответствующего иммунохимического комплекса про-

водят измерение ферментативной активности, которая пропорциональна концентрации свободного или связанного меченого лиганда.

Антитело, образуя комплекс с антигеном, подавляет активность связанного фермента.

Комплекс Аг-Е, подобно свободному Е, катализирует превращение субстрата S в продукт реакции P: $S \rightarrow P$, тогда как комплекс Ат-Аг-Е теряет активность: $S \rightarrow *P$

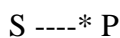
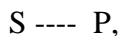
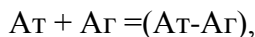
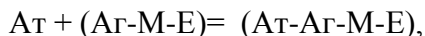
Потеря активности может быть вызвана изменением конформации молекулы фермента, ведущим к нарушению структуры его активного центра. Другая причина - фермент не может проявить активность, поскольку антитело закрыло доступ субстрата к активному центру фермента.

Если добавить свободный антиген, то он, конкурируя за Ат, вызывает регенерацию Аг-Е и появляется активность фермента:



При наличии калибровочной кривой, построенной с применением известных концентраций меченого и немеченого антигена (график будет представлять собой линейную зависимость между концентрацией Аг и ферментативной активностью Аг-Е), таким методом (конкурентного, гомогенного ИФА) можно определить концентрацию антигена в исследуемом образце.

Наряду с ферментами, в гомогенном ИФА в качестве метки могут быть использованы модуляторы (М) ферментов - вещества, способные подавлять или стимулировать активность ферментов:



Комплекс Аг-М-Е каталитически активен, а будучи связанным с Ат, неспособен катализировать реакцию. Свободный Аг, находящийся в тестируемом образце, конкурируя с Аг-М-Е за связывание с Ат, добавленным в лимитированном количестве, ведет к увеличению концентрации Аг-М-Е и тем самым способствует протеканию ферментативной реакции. Это вариант с положительным модулятором фермента. Напротив, с отрицательным модулятором активность фермента будет снижаться по мере возрастания свободного Аг в тестируемом образце.

Существует много других модификаций гомогенного ИФА. Назовем еще три из них:

- применение в качестве метки простетической группы ферментов, ковалентно связанной с Аг;

-применение комплексов флуорогенных субстратов (S) фермента с Ag (в отличие от Ag-S комплекс At-Ag-S не может служить субстратом фермента, в результате ферментативной реакции образуется интенсивно флуоресцирующий продукт);

- применение антител, которые, связываясь с активным центром фермента, ингибируют его активность.

Время, за которое проводится гомогенный ИФА, не превышает 5 мин. Хотя гомогенному ИФА присущи быстрота и малая трудоемкость, он характеризуется более низкой чувствительностью в сравнении с гетерогенным ИФА.

Применение ИФА: Чувствительность ИФА такова, что определение веществ в концентрациях 1,0 – 0,001 нМ или белка в микрограммах-нанogramмах в 1 мл - это обыденное дело. Подобно тому, как глаз человека регистрирует одиночный световой квант, ИФА можно усовершенствовать так, что он с помощью каскадных систем усиления позволит обнаруживать одиночные молекулы анализируемого вещества. Возможности увеличения чувствительности ограничиваются фоном анализируемого соединения, (то есть его наличием не только в анализируемом образце, но и в используемых реактивах и растворителях), субстратной специфичностью фермента и аффинностью антител. К ограничениям ИФА относится также наличие в тестируемых образцах кофакторов, ингибиторов и стимуляторов активности ферментов. Еще один недостаток - ИФА не позволяет различать нативные белки и их биологически неактивные фрагменты, сохранившие антигенные детерминанты. Помехой для ИФА может быть изменение каталитической активности фермента при его конъюгировании с антигеном. Ограничением ИФА является его применимость лишь к хорошо изученным системам, где есть очищенные антигены и высокоспецифические антитела.

В основном метод применяется для диагностики сифилиса (в комплексе с другими реакциями), ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов. Имеет ограниченное значение для диагностики хламидийной инфекции, цитомегаловирусной инфекции и других герпетических инфекций. Метод ИФА используется также для определения антител при различных инфекционных заболеваниях, уровня гормонов, аутоантител и различных маркеров онкологических заболеваний, возможно определение иммуноглобулинов (видовая принадлежность, субклассы, специфичность), а также субпопуляционная идентификация лимфоцитов.

Однако следует отметить, что иммуноферментный анализ может давать и ложные результаты. Ложноположительные могут возникнуть за счет ревматоидного фактора, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека; за счёт антител, образующихся при различных системных заболеваниях, нарушениях обмена или приёме лекарственных препаратов; у новорожденных такие ложноположительные реакции могут возникать за счёт образования в организме ребёнка M-антител к иммуноглобулину G матери. Ложноотрицательные результаты реакции обусловлены конкуренцией между иммуноглобулинами М и G, а также техническими ошибками при постановке реакции.

Динамика изменений показателей ИФА-тестов

При инфицировании

В связи с тем, что различные тест-системы дают возможность получить информацию о различных сторонах взаимодействия инфекционного агента и организма человека, возникает вопрос: каким образом значения отдельных показателей связаны с развитием исследуемых процессов. Всегда ли справедлива простая логика — чем ниже показатель, тем лучше?

На рис. 3 схематически показана возможная динамика различных показателей при развитии острого инфекционного процесса. Предположим, что инфекция быстро развивается и заканчивается полным уничтожением инфекционного агента, что отражено на рис. 3а. Кривая 1 соответствует изменению числа бактерий, кривая 2 — уровню поверхностных Ag, определяемых методом ИФА. На рисунке видно, что эти кривые не совпадают во времени. Увеличение уровня поверхностных Ag может существенно отставать от роста числа бактерий. Некоторое запаздывание этой кривой может объясняться и тем, что чувствительность методов не бесконечно высокая, и ограниченной доступностью инфекционного агента в исследуемом материале, и рядом других причин. Возможно, сказывается то, что тест-системы, как правило, лучше реагируют на антигенноактивные фрагменты, в то время как Ag непосредственно на поверхности живой клетки могут оставаться недоступными для тест-системы. Даже при адекватном заборе материала для лабораторного исследования с соблюдением всех предосторожностей, как правило, отмечается подобного рода несовпадение.

Таким образом, далеко не всегда результат лабораторного теста по определению поверхностного Ag инфекционного агента полностью соответствует содержанию биологически активного инфекционного материала. Результат теста зависит от многих составляющих инфекционного процесса и от конкретной реализации тест-систем. Имеют значение технология получения диагностических Ag и некоторые другие факторы, в том числе описанные выше.

Еще более неоднозначной может быть трактовка результатов теста на наличие Ab к антигенам инфекционного патогена. Часто результаты такого теста могут, в общем, достаточно хорошо описываться известной кривой иммунного ответа на иммунизацию чужеродными Ag (рис.3б). На рисунке кривая 1 отражает содержание инфекционного агента, кривая 2 — результаты вышеописанных тестов.



Рис. 3.а Динамика изменений уровня антигена инфекционного агента. Метод – ИФА

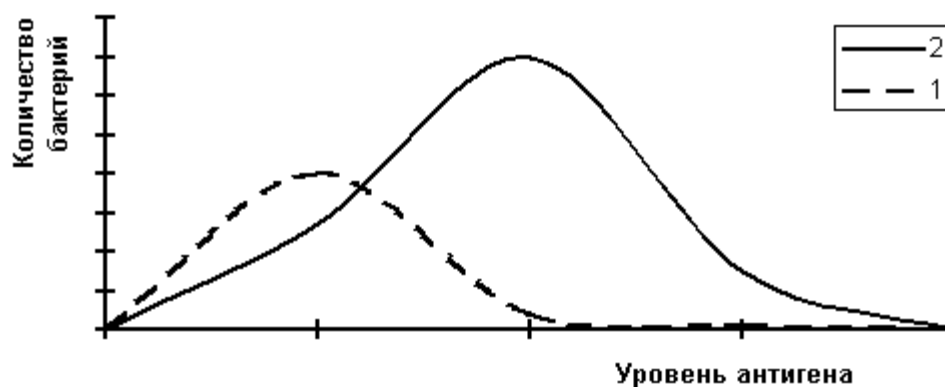


Рис.3.б. Динамика изменений уровня антител, специфичных к инфекционному агенту

Отметим две особенности этих кривых. Во-первых, кривая 2, которая, по сути, является кривой иммунного ответа, запаздывает по отношению к кривой, отражающей содержание инфекционного агента. Иногда это бывает очень существенно. Во-вторых, уровень специфичных иммуноглобулинов (Ig), который собственно и определяется в нашем тесте, может сохраняться высоким и после подавления инфекции. Хотя это и не является абсолютным правилом. Кроме того, при анализе результатов такого теста необходимо помнить о том, какого класса Ig определялись в применявшемся тесте, поскольку при развитии иммунного ответа происходит закономерная смена классов Ig. В типичных случаях Ig класса М (первичный иммунный ответ) сменяются на Ig класса G (вторичный иммунный ответ). Вместе с тем, при реактивации хронической инфекции, “серологический профиль” пациента может имитировать первичный иммунный ответ (рис.4).

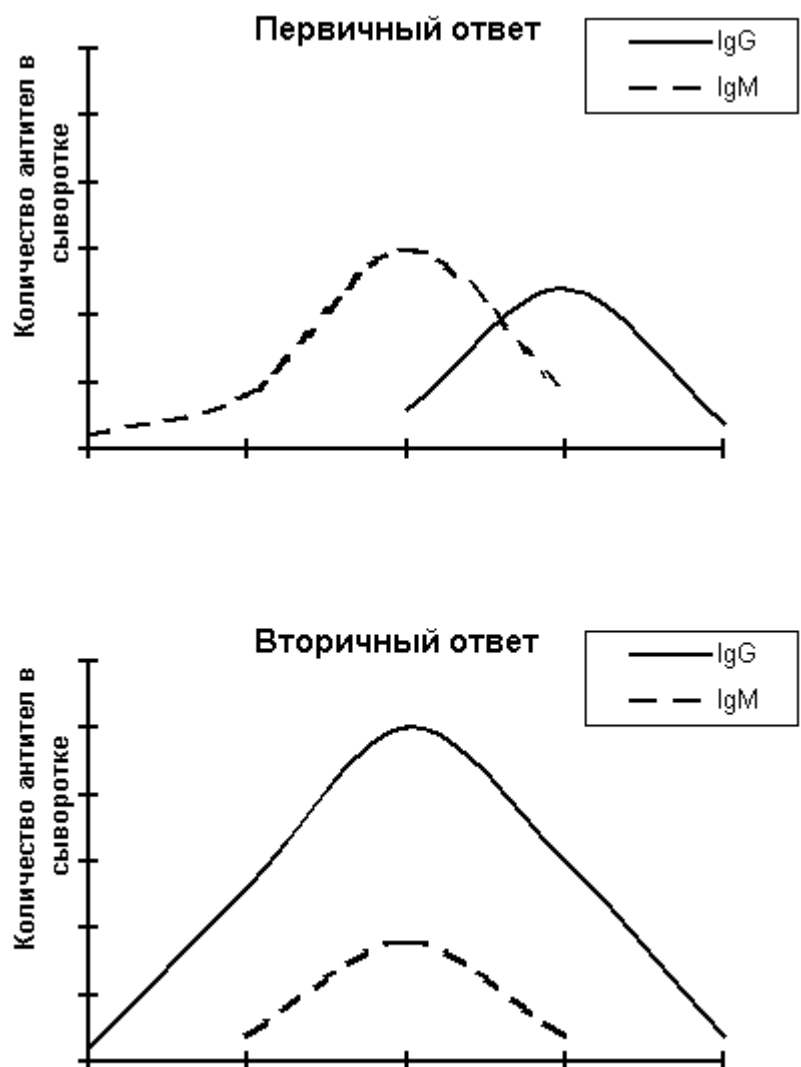


Рис. 4. Динамика образования антител

Из всего вышесказанного для практического врача важно следующее. Тесты, определяющие непосредственно уровень Ag в исследуемом материале, более адекватно отражают уровень содержания инфекционного патогена или другого агента, однако результаты анализа сильно зависят от выбора материала для исследования, условий его забора и др. Причем невозможность забора необходимого материала может поставить под вопрос и применимость теста вообще. Особенно важно, что во многих случаях при исследовании наиболее доступного биологического материала, которым является сыворотка крови - такие тесты закономерно дают отрицательные результаты.

Вторая группа тестов, достоинство которых заключено в возможности определения инфекции или опухоли вне зависимости от локализации патологического процесса, основана на выявлении Ab различного класса, а также их субпопуляций к антигенам инфекционного агента, раковой клетки, гормона и т.п. В клиническом понимании эта информация дает сведения о стадии иммунного ответа.

При лечении

Рассмотрим возможные варианты результатов определения Ag и Ab методом тИФА на примере успешного лечения бактериальной инфекции (рис. 5). Начало графика соответствует началу лечения. На рисунке видно, что через некоторое время содержание поверхностных антигенов начинает увеличиваться, иногда значительно. Затем уровень медленно падает до низких значений. Показатели тестов, определяющих содержание Ig, вообще не имеют на начальном этапе лечения четких тенденций. Может наблюдаться как снижение, так и увеличение уровня. Область, в которой могут лежать возможные значения, на рисунке заштрихована. В различных случаях может наблюдаться как увеличение значений, так и их снижение. Причем это зависит не только от применявшегося препарата, но и от других факторов. Хотя можно отметить, что при использовании некоторых препаратов имеется тенденция к снижению данного показателя, в то время как при назначении других – нет.

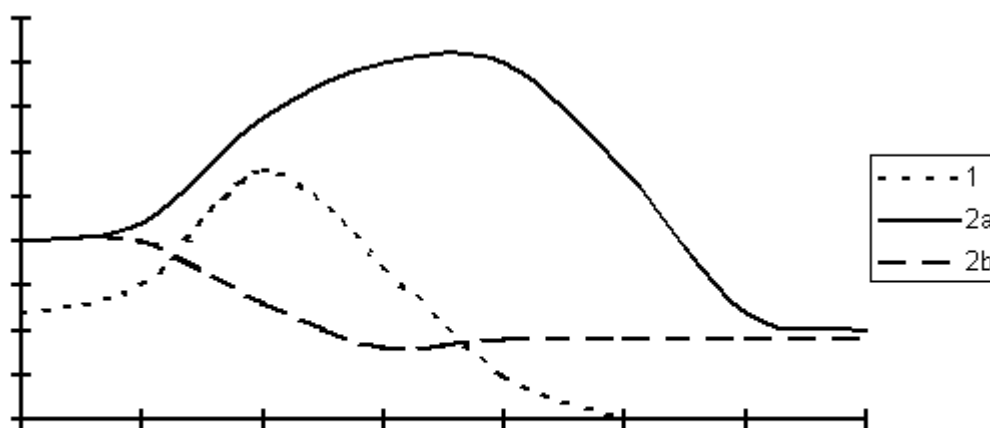


Рис. 5. Изменения уровня антигена (кривая 1) и антител (кривые 2), определяемых ИФА, после начала лечения

Необходимо подчеркнуть, что в указанном случае речь идет только об изменении отдельных показателей, полученных определенным методом. Изменение содержания Ag инфекционного агента в исследуемом материале не обязательно коррелирует, а часто — вовсе не совпадает с содержанием патогена в организме пациента.

Уровень специфических Ab к Ag инфекционного агента не отражает состояние общего иммунного статуса, и тем более динамику изменения концентрации специфических Ab нельзя рассматривать в качестве показателя эффективности терапии, т.е. элиминации или сохранения в организме инфекционного агента.

Оценка результатов любых лабораторных исследований должна проводиться врачом с учетом особенностей метода диагностики, своеобразия патогенеза болезни и индивидуальных особенностей конкретного пациента. Таким образом, современные лабораторные технологии предъявили новые требования к квалификации врача и ещё более повысили значимость клинического мышления в понимании результатов лабораторных анализов.

Как интерпретировать результаты ИФА

Исследование наличия и уровня антител различных классов в некоторых случаях помогает определить стадии инфекционного процесса

Стадия заболевания	IgM	IgA	IgG
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 лече- ния	снижение титра в 4-8 раз через 1- 1.5 мес. после успешного лече- ния
Отрицательный результат	-	-	-

К сожалению, такое важное преимущество ИФА, как количественное определение антител не имеет большого значения в практической работе, т.е. не позволяет точно установить диагноз и не влияет на дозировку и сроки назначения лекарственных средств.