

СЕКЦІЯ Х. БІОЛОГІЯ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ (ІФА): СУТНІСТЬ, РОЛЬ, ЗНАЧЕННЯ, ПЕРЕВАГИ, НЕДОЛІКИ

Сидорчук Павло Сергійович

здобувач вищої освіти

Національний технічний університет «Дніпровська політехніка», Україна

Науковий керівник: Воронкова Юлія Сергіївна

ORCID ID: 0000-0002-4079-8294

канд. біол. наук, доцент, доцент кафедри екології
та технологій захисту навколишнього середовища

Національний технічний університет «Дніпровська політехніка», Україна

Імуноферментний аналіз (скорочено ІФА, англ. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) - лабораторний імунологічний метод якісного або кількісного визначення різних низькомолекулярних сполук, макромолекул, вірусів та ін.

В основі ІФА лежить *специфічна реакція антиген-антитіло*. Теоретичні основи ІФА спираються на сучасну імунохімію і хімічну ензимологію, знання фізико-хімічних закономірностей реакції антиген-антитіло, а також на основні принципи аналітичної хімії [1 - 6].

ІФА є одним з напрямків, що найбільш активно розвивається і широко використовується в клінічній біохімії та лабораторній діагностиці. Через розмаїття об'єктів дослідження існує велика кількість варіантів цього методу для визначення: від низькомолекулярних сполук, пептидних та стероїдних гормонів, фармакологічних препаратів, пестицидів до вірусів і бактерій, і навіть до інших антитіл; різноманіття принципів зв'язування і різноманіття умов проведення ІФА.

За одним лише варіантів реєстрації ферментативної активності можливе застосування фотометричних, флуориметричних, біо- і хемілюмінесцентних методів.

До теперішнього часу розроблено велику кількість різних варіантів проведення ІФА, що мають як принципові, так і другорядні відмінності.

Увесь процес імуноферментного аналізу умовно можна розділити на декілька основних етапів:

- 1) формування специфічного комплексу «антиген-антитіло»;
- 2) введення в утворений комплекс мітки;
- 3) візуалізація зв'язаної мітки.

Стосовно способу виконання всі варіанти ІФА можна розділити на дві групи: 1) системи, що не потребують розділення компонентів реакційної суміші (*гомогенні методи*); 2) системи, для яких розділення необхідне (*гетерогенні методи*).

Гетерогенний ІФА в мікропланшетному варіанті

Для здійснення аналізу ефективності комплексоутворення необхідно провести повну очистку комплексів від вільних компонентів. Це завдання виявилось легко вирішити, якщо один з компонентів пари антиген-антитіло міцно зв'язати

(імобілізувати) на твердому носії.

Використання імобілізації антитіл на твердому носії дало початок методам твердофазного (гетерогенного) ІФА. Гетерогенний (твердофазний) ІФА в мікропланшетному варіанті набув найбільшого поширення в тест-системах для клінічних лабораторних досліджень. Для твердої фази використовують поверхню лунок полістиролового мікропланшета, на який адсорбовані відомі антигени або антитіла (імуносорбент). В ході специфічної реакції імуносорбенту з обумовленими в досліджуваному зразку антитілами або антигенами утворюються імунні комплекси, які виявляються фіксованими на твердій фазі. Субстанції, які не брали участі в реакції, а також надлишки реагентів, видаляються при багаторазовому промиванні. Така схема дозволяє спростити процес ефективного поділу компонентів реакції [1 - 6].

Існує *прямий й непрямий гетерогенний ІФА*.

Прямий гетерогенний ІФА

У прямому імуноферментному аналізі внесений матеріал (антиген) закріплюється під час інкубації на поверхні чистих лунок. Кількість досліджуваного матеріалу детектується за допомогою антитіл до виявлення антигену, з'єднаних із специфічною міткою, що забезпечує ферментативну реакцію.

Структура аналізу.

Біологічний матеріал (кров, букальний зішкріб зі слизової, мазки) поміщається в чисті лунки на деякий час (зазвичай 15-30 хвилин), достатньо, щоб антигени могли приклеїтися до поверхні лунок. Далі в лунки додають антитіла до виявленого антигену. Це означає, що виявляючи антигени, наприклад, сифілісу, додаються антитіла проти антигенів сифілісу. Дану суміш досліджуваного матеріалу і антитіл залишають на деякий час (від 30 хвилин до 4-5 годин), щоб антитіла змогли знайти і зв'язатися з відповідним антигеном. Чим більше в біологічній пробі антигенів, тим більше антитіл зв'яжеться з ними. Оскільки антитіла додаються в надлишку, то не всі вони зв'яжуться з антигенами, а якщо антигену взагалі немає в пробі, то, відповідно жодне антитіло не зв'яжеться з антигеном. Для того, щоб прибрати «зайві» антитіла, вміст з лунок виливають (або вимивають методом декантації). В результаті цього всі «зайві» антитіла прибираються, а залишаються ті, які зв'язалися з антигенами, оскільки антигени «приклеєні» до поверхні лунок.

Наступний етап - ферментативна реакція. У промиті лунки додають розчин з ферментом і залишають на 30-60 хвилин. Даний фермент має спорідненість до речовини (специфічної мітці), з яким зв'язані антитіла. Фермент каталізує реакцію, в результаті якої ця специфічна мітка (субстрат) перетворюється в забарвлену речовину (продукт).

Оскільки додана специфічна мітка зв'язана з антитілами, значить, концентрація пофарбованого продукту реакції дорівнює концентрації антитіл, а концентрація антитіл дорівнює концентрації антигенів [1 - 6].

Непрямий гетерогенний ІФА

У непрямому імуноферментному аналізі використовують антитіла до виявленого антигену, з'єднані зі специфічною міткою. Ця специфічна мітка і є субстратом ферментативної реакції.

За типом імунохімічної взаємодії на першій стадії аналізу серед гетерогенних методів розрізняють *неконкурентний* і *конкурентний варіанти аналізу*.

Якщо в системі присутні тільки аналізовані з'єднання і відповідні йому центри зв'язування (антиген і специфічні антитіла), то метод є *неконкурентним*.

Якщо ж на першій стадії в системі одночасно присутні аналізована речовина і її

аналог (мічена ферментом аналізоване з'єднання або аналізоване з'єднання, іммобілізованих на твердій фазі), конкуруючі за обмежену кількість центрів специфічного зв'язування, то метод є *конкурентним* [1 - 6].

Гомогенний ІФА

У 1972 р. учені розробили новий підхід з проведенням всього аналізу *без твердої фази*. Метод отримав назву *гомогенного ІФА* (англ. «ЕМІТ» - enzyme multiplied immunoassay technique) і був заснований на обліку відмінностей каталітичних властивостей ферментної мітки у вільному вигляді і в імунохімічному комплексі. На основі даного підходу були розроблені набори для визначення широкого кола токсичних, наркотичних і лікарських засобів. Істотною перевагою ЕМІТ-аналізу є можливість використання малих обсягів аналізованого зразка (5-50 мкл) і висока швидкість визначення (2-5 хв), обумовлена відсутністю стадії поділу вільного і міченого аналізованого з'єднання. До недоліків методу слід віднести меншу чутливість, ніж в гетерогенному ІФА (~ 1 мкг/мл), і можливість визначення тільки низькомолекулярних антигенів [1 - 6].

Безумовно, метод ІФА, як будь-які імунохімічні методи аналізу, може давати хибно позитивні і помилково негативні результати.

Наприклад, хибно позитивні результати при визначенні антитіл до різних інфекцій можуть виникати за рахунок ревматоїдного фактору, що представляє собою імуноглобулін М проти власних імуноглобулінів G людини; за рахунок антитіл, що утворюються при різних системних захворюваннях, порушеннях обміну або прийомі лікарських препаратів; у новонароджених такі хибно позитивні реакції можуть виникати за рахунок утворення в організмі дитини М-антитіл до імуноглобуліну G матері.

Помилково негативні результати при визначенні антитіл можуть бути обумовлені станами імунодефіциту, а також технічними помилками при постановці реакції [1 - 6].

Але, за рахунок безсумнівних переваг, а саме:

- зручності в роботі;
- швидкості;
- об'єктивності за рахунок автоматизації обліку результатів;
- можливості дослідження імуноглобулінів різних класів (що важливо для ранньої діагностики захворювань та їх прогнозу) в даний час ІФА є одним з основних методів лабораторної діагностики.

Метод ІФА може застосовуватися для діагностики:

- вірусних захворювань (ВІЛ-інфекції, вірусних гепатитів, цитомегаловірусної інфекції, вірусу Епштейн-Барр, герпетичної інфекції, коронавірусної хвороби);
- для діагностики інфекцій, що передаються статевим шляхом (сифілісу, хламідіозу, трихомоніазу, гонореї, уреаплазмозу);
- рівня гормонів в ендокринології;
- аутоантитіл та маркерів онкологічних захворювань в онкології;
- загального IgE та специфічних IgE антитіл в алергології.
- лікарських препаратів, наркотиків у біологічних зразках.
- білків сироватки крові (феритину, фібрoneктину та ін).

Список використаних джерел:

1. Іванська, Н.В. (2005). Практичний посібник з імуноферментного аналізу. К.: Діапроф-Мед.
2. Філіпова, Т.О., Гудзенко, Т.В., Галкін, М.Б., Зінченко, О.Ю., Ямборко, Г.В. & Русакова, М.Ю.

- (2018). Імунологічні методи: метод. вказівки до проведення лабораторних занять з курсу «Імунологія». Одеса: Одес. нац. ун-т ім. І.І. Мечникова.
3. Chaudhari, G.N., Kavil, S.P. & Ullal, D.P. (2014). An overview on ELIAS techniques for analyte detection to new levels: a review. *Inter J of Multidisciplinary Edu Res* (3, 6 (1)). 172-206.
 4. Suleyman Aydin (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. (72) 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>.
 5. Waritani, T. (2017). An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays. *Methods X*. (4). 153-165. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.03.002>.
 6. Mandy Alhajj; Muhammad Zubair; Aisha Farhana (2023). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books / NBK555922>.