

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод иммуноферментного анализа (ИФА). Метод ИФА является высокочувствительным и высокоспецифичным иммунодиагностическим методом, с помощью которого проводят качественное и количественное определение различных веществ, обладающих свойствами антигена, гаптена (неполноценного антигена) или антитела. Метод ИФА широко используется для диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний человека и животных и может также применяться для подтверждения качества иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП).

Принцип метода заключается в реакции специфического взаимодействия антигена с антителом с образованием иммунного комплекса и последующей детекции полученного комплекса с помощью спектрофотометрии, хемилюминесценции и других адекватных методик. Детекция может быть как прямой (когда исследуемое вещество само обладает ферментативной активностью, либо оно помечено ферментной меткой), так и косвенной или непрямой (когда исследуемое вещество, связавшееся с иммобилизованными на твердой фазе антителами, инкубируется с антителами, мечеными ферментом). Качественный анализ позволяет получить информацию о содержании антигена или антитела в исследуемом материале по принципу "есть/нет". При проведении количественного анализа определяют концентрацию антигена или антитела в исследуемом материале с использованием калибровочного графика.

Общие положения

Метод ИФА включает 3 основных этапа: 1) образование иммунного комплекса "антиген (исследуемое вещество) - специфическое к нему антитело" или наоборот; 2) формирование связи конъюгата с образовавшимся на предыдущем этапе иммунным комплексом или со свободными местами связывания (детерминантами); 3) преобразование субстрата под действием ферментной метки в регистрируемый сигнал в результате биохимической реакции.

Все методики выполнения иммуноферментного анализа классифицируются как гомогенные или гетерогенные.

Методики, в которых все 3 стадии ИФА проходят в растворе, и между основными стадиями нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов, относятся к группе гомогенных методов ИФА. В основе гомогенного ИФА, применяемого, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций, лежит процесс ингибирования активности фермента при его соединении с антигеном или антителом. В результате реакции антиген-антитело активность фермента восстанавливается. При образовании иммунного комплекса антиген-антитело, содержащего ферментную метку, происходит ингибирование активности фермента на 95% по отношению к высокомолекулярному субстрату, что обусловлено стерическим исключением субстрата из активного центра фермента. По мере увеличения концентрации антигена происходит связывание все больше антител, и сохраняется все больше свободных конъюгатов "антиген-фермент", способных гидролизовать высокомолекулярный субстрат. Гомогенный метод ИФА проводится очень быстро. На анализ одного определения требуется 1 мин. Чувствительность метода достаточно высока. С его помощью можно определить вещество на уровне пикомолей.

Для гетерогенных методов характерно проведение анализа в двухфазной системе с участием твердой фазы - носителя и обязательна стадия разделения иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов (отмывка), которые находятся в разных фазах (образовавшиеся иммунные комплексы находятся на твердой фазе, а непрореагировавшие комплексы - в растворе). Гетерогенные методы, в которых формирование иммунных комплексов на первой стадии протекает на твердой фазе, называют твердофазными методами.

Методы относятся к гомогенно-гетерогенным, если 1 стадия - образование специфических комплексов - происходит в растворе, а затем для разделения компонентов используют твердую фазу

с иммобилизованным реагентом.

Метод гетерогенного ИФА состоит из 3 основных этапов:

- 1) иммобилизация антигена или антитела на твердой фазе, полученный комплекс называется иммуносорбентом;
- 2) удаление несвязавшегося реагента и блокирование сайтов связывания на твердой подложке с помощью блокирующих белков, таких, например, как альбумин, казеин: инкубация анализируемого препарата с иммуносорбентом для того, чтобы произошло их связывание;
- 3) детекция благодаря ферментативной активности самого исследуемого вещества или благодаря связанной с анализируемым препаратом ферментативной метке (прямой вариант). В некоторых случаях производится дополнительная инкубация комплекса "иммуносорбент-исследуемое вещество" с вторичными антителами, конъюгированными с ферментативной меткой (непрямой вариант).

Количественное определение исследуемого вещества осуществляется путем добавления подходящего для используемого детектора субстрата и сравнения сигнала исследуемого вещества со стандартным образцом.

Метод гетерогенного ИФА подразделяют на неконкурентный ИФА и конкурентный ИФА. Схемы анализа могут быть модифицированы в процессе разработки лекарственного препарата в соответствии с необходимыми требованиями. Изменения должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации. Выбор способа постановки ИФА зависит от природы исследуемого вещества и его количества, так как разные виды ИФА обладают различной чувствительностью. Для оценки качества веществ, содержащих антитела, возможно использование специфичных аитиидиотипических антител.

Неконкурентный метод ИФА

Неконкурентный метод ИФА подразделяется на несколько видов по типу детекции (прямой конкурентный, косвенный (непрямой) конкурентный) и по типу иммобилизованного на твердой фазе вещества (антиген или антитело).

Прямой вариант ИФА

Может выполняться 2 способами. В первом случае исследуемое вещество (антиген) непосредственно иммобилизовано на твердой фазе; тогда связавшееся с антигеном меченое антитело является детектором. При выполнении теста иным способом используют иммобилизованные на твердой фазе антитела. В этом случае детектором является исследуемое вещество, меченное ферментом.

Косвенный (непрямой) вариант ИФА

При выполнении непрямого варианта ИФА антиген иммобилизован на твердой фазе. После блокировки к антигену прибавляют раствор специфических к нему антител. После инкубации образовавшийся комплекс антиген-антитело отмывают от несвязавшихся антител и добавляют меченый ферментом анти-иммуноглобулин (анти-Ig), выступающий в роли детектора. Анти-Ig детекторы коммерчески доступны для конкретных классов и подклассов Ig, что делает этот формат анализа удобным для изотипирования антител. Кроме того, использование меченого анти-Ig усиливает сигнал по сравнению с прямым методом иммуноферментного анализа, тем самым увеличивая чувствительность анализа.

Метод "сэндвича" как вариант постановки ИФА

Наиболее распространенным неконкурентным методом является "сэндвич" метод. При его выполнении на твердой фазе иммобилизуют первичные антитела с их последующей блокировкой. Затем к ним прибавляют исследуемое вещество, содержащее антиген, и инкубируют. После инкубации комплекс антиген-антитело отмывают от несвязавшегося антигена и добавляют

вторичные антитела, меченные ферментом, и проводят детекцию.

Конкурентный метод ИФА

Конкурентный метод ИФА подразделяется на несколько видов: по типу детекции (прямой конкурентный, косвенный (непрямой) конкурентный) и по типу иммобилизованного на твердой фазе вещества (антиген или антитело).

Прямой конкурентный вариант ИФА

Для обнаружения или количественного определения растворимых антигенов применяют прямой конкурентный вариант ИФА с иммобилизованным на твердой фазе антигеном. Для этого используют антиген-специфические антитела, конъюгированные с соответствующим детектором (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, рутений или флуоресцеин). На твердую фазу иммобилизуют стандартный антиген с последующей блокировкой. Конъюгированное с ферментативной меткой антитело инкубируют с исследуемым веществом (растворимым антигеном). Затем эту смесь добавляют к иммобилизованному антигену, инкубируют, а потом отмывают от несвязавшегося комплекса антиген-антитело. Следующий шаг заключается в добавлении подходящего субстрата для используемого в качестве метки фермента. Ингибирование реакции, обусловленное наличием 2 антигенов в системе, по сравнению с контрольным образцом без конкурентного растворимого антигена, является обратно пропорциональным значению количества исследуемого вещества.

Выполнение прямого конкурентного варианта ИФА с иммобилизованным на твердой фазе антителом аналогично прямому конкурентному ИФА с иммобилизованным на твердой фазе антигеном, однако используется для обнаружения или количественного определения антител.

Косвенный (непрямой) конкурентный вариант ИФА

Этот способ постановки ИФА аналогичен прямому конкурентному варианту, однако вместо меченого антитела или антигена при детекции используется меченый анти-Ig реагент или меченые вторичные антитела, соответственно.

Общие условия проведения метода ИФА

В качестве твердой фазы для проведения иммуноферментного анализа применяют различные материалы: силикон, нитроцеллюлоза, полиамиды, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, акрил и другие. Твердой фазой могут служить стенки пробирки, 96-луночные и другие планшеты, шарики, бусины, а также нитроцеллюлозные и другие мембраны, активно сорбирующие белки. От выбора твердой фазы зависит принцип иммобилизации (гидрофобное, гидрофильное, ковалентное взаимодействие). Чаще других в качестве твердой фазы используют 96-луночные пластиковые планшеты для микротитрования. Количество лунок в планшете может варьироваться. Планшет может быть прозрачным (колориметрическая детекция) и матовым (хемилюминесцентная детекция, флуориметрия).

Иммобилизацию необходимо проводить без пузырьков воздуха в лунке, так как их присутствие изменяет показание оптической плотности. Возможно использование биотинилированных иммобилизованных реагентов. В этом случае в реакции используют стрептавидин и биотинилированную ферментативную метку. Данный метод используется для усиления сигнала. Время и температура иммобилизации, зависящие от кинетической природы, стабильности и концентрации реагента, должны быть указаны в фармакопейной статье и нормативной документации.

Все стадии иммуноферментного анализа, промывочные и блокирующие растворы, временные промежутки и температурные условия для каждой стадии, количество оборотов в минуту для

инкубации на шейкере, условия детекции также должны быть указаны в фармакопейной статье и нормативной документации.

Примеры методик для некоторых видов ИФА

Косвенный неконкурентный метод ИФА

1. Сорбция антигена. В каждую лунку 96-луночного планшета вносят 0,1-0,5 мкг антигена и 100 мкл 0,05 М карбонат-бикарбонатного буферного раствора (pH 9,6), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, и далее проводят сорбцию при температуре 4°C в течение 16 ч. Возможно использование других буферных растворов с высокими значениями pH. Инкубация проводится при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка (двукратная) несвязавшихся молекул антигена осуществляется фосфатно-солевым буферным раствором (pH 9,0), содержащим 0,1% твин-20 (по 300 мкл на лунку), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

II. Блокировка. Для блокирования мест неспецифического связывания антигенов или антител лунки планшета заполняют фосфатно-солевым буферным раствором (pH 9,0) или другим буферным раствором, указанным в фармакопейной статье или в нормативной документации, содержащим 1% раствор бычьего сывороточного альбумина или других белков (казеина, желатина, сухого молока и др.), и инкубируют в течение 10-15 мин при комнатной температуре (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации).

III. Титрование специфических антител. При необходимости количественной оценки исследуемое вещество (антиген или антитело) титруют в серийных разведениях параллельно со стандартным образцом (СО).

Титрование можно проводить как в горизонтальных, так и в вертикальных рядах планшета. Необходимо отметить, что титрование антител проводится в том случае, если необходимо подобрать оптимальную концентрацию антител или определить их титр. В том случае, если оптимальная концентрация и/или титр антител определены, то используют рекомендованное для данных антител (сыворотки) разведение.

При титровании в первую лунку ряда вносят готовое разведение антител - в среднем 1-10 мкг на лунку, далее производят последовательное разведение антител в лунках. Инкубацию со специфическими антителами проводят в течение 30 мин при комнатной температуре при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка осуществляется не менее 3-4 раз с помощью фосфатно-солевого буферного раствора pH 9,0, содержащего 0,1% твин-20.

IV. Добавление антивидовых (антиглобулиновых) антител, конъюгированных с ферментной меткой. В качестве детекторных (вторичных) антител используются антивидовые поликлональные антитела, конъюгированные с ферментативной меткой. Чаще всего используются козы или кроличьи антитела, специфичные к целой молекуле или к Fc-фрагментам специфических антител. Концентрация детекторных антител, как правило, указывается производителем в виде разведения исходного раствора (например, 1:1000).

Инкубация с вторичными мечеными антителами проводится в течение 30 мин при комнатной температуре при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка осуществляется не менее 3-4 раз с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (pH 9,0), содержащего 0,1% твин-20.

Инкубация проводится в течение 10 мин при комнатной температуре и встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

V. Проведение ферментативной реакции, сопровождающейся появлением окрашенного продукта. В лунки вносят по 100 мкл раствора субстрата и инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. 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.

Прямой неконкурентный метод ИФА

Методика прямого ИФА имеет лишь небольшие отличия от методики непрямого неконкурентного ИФА. Так, I и II стадии одинаковы в обоих типах анализа. Отличие заключается в том, что в прямом варианте ИФА на стадии III используют специфические исследуемому антигену антитела, конъюгированные с ферментной меткой, и они прямо взаимодействуют с исследуемым веществом. При необходимости также можно проводить титрование конъюгатов аналогично принципу, описанному ранее для неконъюгированных антител. Стадия IV в рамках прямого неконкурентного ИФА не проводится.

"Сэндвич" метод ИФА

В данном варианте ИФА используется пара антител (первичные и вторичные), специфичных к пространственно удаленным эпитопам исследуемого антигена.

I. Сорбция антител на твердой фазе. Методика сорбции антигена аналогична методике сорбции антител в [разделе](#) "Косвенный неконкурентный метод ИФА".

II. Блокировка. Методика блокировки мест неспецифического связывания на подложке (твердой фазе) аналогична методике блокировки, описанной в [разделе](#) "Косвенный неконкурентный метод ИФА".

III. Инкубация с антигеном. В лунки планшета с преадсорбированными антителами вносят по 50 мкл исследуемого вещества и стандартных разведений антигена, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Разведения антигена должны быть приготовлены на основе фосфатно-солевого буферного раствора (pH 9,0), содержащего 0,1% твин-20, поскольку твин-20 снижает неспецифическое связывание белковых молекул друг с другом и с поверхностью планшета. И исследуемое вещество, и стандартные разведения антигена вносят попарно в соседние в горизонтальном ряду лунки (либо по 3 повторности), используя по 2 (3) лунки на каждое разведение белка.

Инкубацию проводят при комнатной температуре в течение 30 мин при постоянном перемешивании. Отмывка осуществляется не менее 3-4 раз фосфатно-солевым буферным раствором (pH 9,0), содержащим 0,1% твин-20, или другим буферным раствором, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

IV. Инкубация с антителами, конъюгированными с ферментной меткой. В лунки планшета вносят по 100 мкл раствора специфических антител, конъюгированных с ферментной меткой. Оптимальная концентрация конъюгированных антител, как правило, указывается в фармакопейной статье или нормативной документации (обычно используют концентрацию 2-4 мкг/мл).

Инкубация с антителами, содержащими ферментную метку, проводится в течение 30 мин при комнатной температуре при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка осуществляется не менее 3-4 раз с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (pH 9,0), содержащего 0,1% твин-20, или другим буферным раствором, указанным в фармакопейной

статье или нормативной документации.

V. Проведение ферментативной реакции, сопровождающейся появлением окрашенного продукта. Методика проведения ферментативной реакции аналогична методике, описанной в [разделе](#) "Косвенный неконкурентный метод ИФА".

Детекция

Как было указано выше, для детекции используются меченные ферментной меткой или другим реагентом антитела. В качестве ферментной метки могут выступать, например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза или галактозидаза. В качестве детектора могут быть использованы антитела или антигены с другими метками. Выбор реагента-детектора зависит от типа метки, конъюгированной с антителом или антигеном и способа детекции.

В качестве методов детекции могут быть использованы спектрофотометрия, хемилюминесценция, флуориметрия и другие методы, исходя из выбора метки.

Результаты количественного метода ИФА

Результаты количественного метода ИФА рассчитывают по линейной калибровочной кривой с обратной регрессией или с помощью комплексного метода, использующего нелинейную калибровочную кривую с обратной регрессией. Методика интерпретации результатов зависит от используемого способа постановки ИФА. Например, по результатам испытания с помощью калибровочной кривой можно оценивать концентрацию неизвестного образца, проводить оценку полумаксимальной концентрации ингибирования или эффективной концентрации. Это позволяет определять количество исследуемого вещества или его активность в сравнении с эталонным/калибровочным стандартным образцом (СО). Обычно вид калибровочной кривой при выполнении количественного метода ИФА, характеризующий концентрацию анализируемого препарата, зависит от рассчитанного среднего значения нелинейно. В связи с этим, рекомендуется использовать различные математические модели для анализа полученной кривой. В остальных случаях метод ИФА используют как качественный метод, позволяющий оценить наличие того или иного исследуемого вещества в пробе в пределах чувствительности методики.

Примечание.

Приготовление карбонат-бикарбонатного буферного раствора (pH 9,6). В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл вносят 1,59 г натрия карбоната (безводного) или 4,29 г натрия карбоната 10-водного и 2,93 г натрия гидрокарбоната, растворяют в 800 мл воды очищенной, доводят pH до 9,6, перемешивают, далее доводят объем раствора до метки водой очищенной и вновь перемешивают.