

Номер. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Иммунохимические методы основаны на селективном, обратимом и нековалентном связывании антигенов антителами. Данные методы используют для обнаружения или количественного определения как антигенов, так и антител. Комплекс антиген-антитело можно идентифицировать и количественно определить различными методами. Положения настоящей общей фармакопейной статьи относятся к иммунохимическим методам с использованием реактивов с меткой или без метки.

Результаты, получаемые иммунохимическими методами, зависят от экспериментальных условий, характера и качества используемых реактивов. Важно стандартизировать компоненты иммунохимического анализа и, по возможности, использовать для количественных определений международные стандартные образцы.

Для проведения иммунохимических исследований обычно используют коммерчески доступные наборы, включающие реактивы (в частности, антиген или антитело) и материалы, предназначенные для оценки *in vitro* конкретной субстанции, а также инструкции по их надлежащему применению. Наборы используют в соответствии с инструкциями производителя. Перед использованием необходимо убедиться, что селективность и чувствительность наборов являются подходящими для анализа конкретной субстанции.

МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНОГО АНТИГЕНА ИЛИ АНТИТЕЛА

В методах с использованием меченых антигенов или антител могут применяться различные метки, например, ферментные, флуоресцентные, люминесцентные и радиоизотопные.

При использовании в качестве метки радиоизотопа метод называют радиоиммунным. Рекомендации по измерению радиоактивности, приведенные в ОФС *Радиофармацевтические лекарственные препараты (номер)*, подходят также и для иммунологических методов с использованием радиоизотопов. Все работы с радиоактивными материалами должны выполняться в соответствии с национальным законодательством и международными документами по защите от радиационной опасности.

МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕМЕЧЕНОГО АНТИГЕНА ИЛИ АНТИТЕЛА

Методы иммунопреципитации

Методы иммунопреципитации включают флоркуляцию и преципитацию. При смешивании раствора антигена с соответствующим антителом в определенных условиях образуются флоркулирующие или преципитирующие агрегаты. Соотношение концентраций реагентов, обеспечивающие наименьшее время флоркуляции или наиболее выраженную преципитацию, называют оптимальным соотношением. Такое соотношение обычно образуется при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах. Иммунопреципитацию оценивают визуально или с помощью методов светорассеяния (нефелометрия или турбидиметрия). Для повышения чувствительности в качестве реагентов можно использовать частицы (например, из латекса), покрытые антигенами или антителами.

В методах флоркуляции обычно используют пошаговое разбавление одного из реактантов, а в методах иммунодиффузии разбавление происходит в процессе диффузии в гель и, таким образом, достигают градиента концентраций одного или обоих реактантов. При этом в геле образуются зоны с соотношением реактантов, оптимальным для преципитации. Постановку реакции флоркуляции выполняют в пробирках, тогда как в методах иммунодиффузии используют различные носители: пробирки, планшеты, предметные стекла, ячейки или камеры.

Системы иммунопреципитации могут быть простыми, комплексными и множественными. «Простая» система состоит из одного антигена в сочетании с соответствующим антителом; «комплексная» – из родственных, но серологически неидентичных реактантов, «множественная» – из нескольких серологически неродственных реактантов.

В методах простой диффузии градиент концентрации устанавливают только для одного реактанта, диффундирующего из внешнего источника в гель, который содержит соответствующий реактант в сравнительно низкой концентрации.

Простая (одиночная, радиальная) иммунодиффузия - количественный метод, при котором антиген, диффундируя в геле, образует кольцо преципитации с соответствующим ему антителом. При достижении равновесия между реактантами, площадь образовавшегося кольца преципитации прямо пропорциональна содержанию антигена и обратно пропорциональна концентрации антитела в геле.

В *методах двойной диффузии* градиенты концентрации устанавливают для обоих реактанов. И антиген, и антитело из различных участков диффундируют в первоначально иммунологически нейтральный гель.

Методы сравнительной двойной диффузии используют для качественного сравнения различных антигенов по отношению к подходящему антителу или наоборот. Сравнение основано на наличии или отсутствии взаимодействия между компонентами преципитации. Реакции идентичности, не идентичности и частичной идентичности антигенов/антител могут быть различными.

Иммуноэлектрофоретические методы

Иммуноэлектрофорез (ИЭ) - качественный метод, сочетающий гель-электрофорез с последующей иммунодиффузией.

Перекрестный иммуноэлектрофорез является модификацией метода иммуноэлектрофореза и подходит как для количественного, так и качественного анализа. Первая часть метода представляет собой гель-электрофорез, после которого продольные полосы геля, содержащие разделенные фракции, вырезают и переносят на другую пластину. Электрофорез во втором направлении проводят перпендикулярно к предыдущему электрофоретическому процессу в геле, содержащем сравнительно низкие концентрации антител, соответствующих антигену. Зависимость между площадью пиков преципитации и количеством соответствующего антигена является линейной для данной концентрации антитела и толщины геля.

Электроиммунный анализ, часто называемый *ракетным иммуноэлектрофорезом*, является быстрым методом количественного определения антигенов с зарядом, отличным от заряда антител, и наоборот. Электрофорез определяемого антигена выполняют в геле, содержащем относительно низкие концентрации соответствующих антител. Испытуемый образец и разведения стандартного антигена, используемые для калибровки, вносят в разные лунки в геле. В процессе электрофореза образуются мигрирующие зоны преципитации в виде пиков, которые увеличиваются до тех пор, пока сохраняется избыток соответствующего антигена. Для данной концентрации антител зависимость между высотой пика преципитации и количеством антигена является линейной.

Встречный иммуноэлектрофорез - быстрый метод количественного определения, при котором градиент концентрации устанавливается между вносимыми антителом и антигеном, в зависимости от заряда, под действием

постоянного электрического поля. Стандартные растворы для калибровки и разведения испытуемого образца вносят в лунки одного ряда в геле, а в лунки противоположного ряда вносят разведения соответствующего реактанта с известной концентрацией. Титром испытуемого образца считают наибольшее разведение, при котором образуется линия преципитации.

Существует ряд модификаций методов перекрестного иммуноэлектрофореза и электроиммунного анализа.

Другие методы сочетают разделение антигенов по размеру молекул и серологическим свойствам.

Обнаружение и характеристика линий иммунопреципитации

Выявление и характеристику линий иммунопреципитации выполняют путем селективного или неселективного окрашивания с использованием флуоресцентных, ферментных или изотопных меток или другими подходящими методами. Методы селективного окрашивания в преципитатах обычно используют для определения характеристик веществ не белковой природы.

При подходящей концентрации каждого из реактантов в полупрозрачных гелях, например, агаре или агарозе, линии преципитации четко различимы невооруженным глазом.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК

Критерии приемлимости

Методики считаются приемлемыми, если:

1) Антитело и антиген не имеют существенных отличий в стандартном и испытуемом образцах. В случае меченых реагентов, различия между меченым и немеченым компонентом соответствующего реагента незначительны.

2) На результат испытания не оказывает влияние матрица, т.е. любой компонент испытуемого образца или вспомогательных веществ, которые могут отличаться в разных образцах.

3) Результат количественного определения не выходит за пределы критериев приемлемости, указанных в частной фармакопейной статье или нормативном документе по качеству.

4) Прецизионность количественного определения достаточна для выполнения требований, указанных в частной фармакопейной статье или нормативном документе по качеству.

5) Алгоритм количественного определения не увеличивает систематические ошибки.

Методики валидации

Для подтверждения соответствия критериям приемлимости валидация должна включать:

- 1) Испытание проводят не менее чем в трех повторностях;
- 2) Испытание проводят не менее чем на трех различных разведениях стандартных образцов и трех разведениях испытуемых образцов, предполагаемая активность которых равна активности стандартного образца;
- 3) Используют рандомизацию;
- 4) Если испытуемый образец находится в сыворотке или в смеси с другими компонентами, то стандартный образец готовят аналогичным образом;
- 5) Испытание включает измерение неспецифического связывания меченого реактанта;
- 6) Для заместительного иммунного анализа:
 - а) определяют максимальное связывание (нулевое замещение);
 - б) разведения должны охватывать весь диапазон откликов от значений, близких к неспецифическому связыванию, до максимального связывания как для стандартных образцов, так и испытуемого образца.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА

Для анализа результатов испытаний могут быть использованы методы, представленные в *ОФС Статистическая обработка результатов биологических испытаний лекарственных средств (номер)*.

Существенное отклонение от параллелизма указывает на то, что между антителом и антигеном в испытуемом и стандартном образцах имеются различия, и результаты испытания являются незначимыми.

Для заместительного иммунологического анализа не должно быть существенных различий между значениями неспецифического связывания и максимального замещения при высокой концентрации испытуемого и стандартного образцов. Различия могут указывать на наличие эффектов, обусловленных матрицей, или ингибированием связывания или стабильностью метки.

Глоссарий

набор (реактивов): Комплект специально подобранных реактивов, составных частей и инструкций по проведению анализа, предназначенный для определения *in vitro* одного конкретного вещества, возбудителя (или активности фермента), нескольких конкретных веществ, возбудителей (или суммарной активности ферментов), а также для детекции участка генома. Совокупность компонентов, которые упакованы вместе и предназначены для выполнения специфического исследования *in vitro*. Компоненты набора реактивов могут включать в себя реактивы (антитела, ферменты, буферные и питательные растворы, разбавители), калибраторы, контрольные материалы и другие материалы.