

ПЦР И ИФА В НЕВРОЛОГИИ.

- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод высокой точности в области диагностирования наследственных патологий, инфекций, вирусных болезней в любой стадии (острой или хронической), а также — на раннем этапе — до очевидных проявлений болезни путем идентификации возбудителей, на основе их ДНК, РНК, являющихся генетическим материалом, в пробах, которые получают от пациента.

• Показания для проведения

- Процедура ПЦР применяется в клинике инфекционных болезней, неонатологии, акушерстве, педиатрии, урологии, гинекологии, венерологии, неврологии, нефрологии, офтальмологии.
- Показания для назначения анализа:
 - выяснение риска развития генетических отклонений у ребенка при вероятности наследственных патологий;
 - диагностирование обоих родителей при планировании беременности или тяжелом состоянии матери при протекающей беременности;
 - трудности с зачатием, выявление причин бесплодия;
 - подозрение на половые инфекции в острой стадии и при симптоматике перехода их в хроническую;
 - обнаружение причин воспалительных процессов неясного происхождения;
 - незащищенные случайные и постоянные половые контакты;
 - определение чувствительности патогенного микроорганизма к конкретным антибиотикам;
 - пациентам с подозрением на скрытую инфекцию для обнаружения патогенов до развития явной симптоматики (доклиническое диагностирование);
 - больным для подтверждения выздоровления после болезни (ретроспективная диагностика);;

- Также используется диагностика при необходимости точного выявления следующих возбудителей::
- вирусы гепатита (А В С G), иммунодефицита человека, цитомегаловирус;
- вибрион холерный;
- вирус простого герпеса, герпетиформные виды;
- ретро – адено – и риновирусы;
- вирусы краснухи, Эпштейна-Барр, варицелла (Зостер – вирус);
- парво – и пикорновирусы;
- вирус папилломы;
- онкогенные вирусы;
- бактерия *Helicobacter pylori*;
- легионеллы, патогенные типы палочки кишечной;
- стафилококк золотистый;
- возбудитель менингита;
- клостридии, дифтерийная и гемофильная палочка;

ИСПОЛЬЗУЕТСЯ И ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ:

- инфекционный мононуклеоз;
- боррелиоз, листериоз, клещевой энцефалит;
- кандидоз, вызываемый грибами *Candida*;
- половые инфекции – трихомониаз, уреаплазмоз, бледная трепонема, гарднереллез, гонорея, микоплазмоз, хламидиоз;
- туберкулез.

- Как проходит процедура
- При выполнении исследования ПЦР раз за разом в реакторе (амплификаторе или термоциклере) повторяются определенные циклы:
- Первый шаг – денатурация. Слюну, кровь, биоптат, гинекологические пробы, мокроту, в которых подозревается присутствие ДНК (или РНК) патогена, помещают в амплификатор, где происходит нагревание материала и расщепление ДНК на две отдельные цепочки.
- Второй шаг – отжиг или небольшое охлаждение материала и добавление к нему праймеров, способных распознавать нужные участки в молекуле ДНК и связываться с ними.
- Третий шаг – элонгация – происходит после присоединения 2 праймеров к каждой из цепочек ДНК. В ходе процесса фрагмент ДНК патогена достраивается, и формируется его копия.
- Эти циклы повторяются по типу «цепной реакции», каждый раз приводя к удвоению копий специфичного фрагмента ДНК (например, отрезка, где запрограммирован определенный вирус). За несколько часов образуется множество копий фрагмента ДНК, и выявляется их присутствие в образце. После этого проводят анализ и сравнение результатов с данными базы различных видов патогенов, чтобы определить вид инфекции.

- ИФА-лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело.

- Показания для проведения
- Обычно ИФА анализ назначается врачом при необходимости получения развернутой картины текущего заболевания, проходящего в любой форме: хронической, вялотекущей либо острой. И показаниями к проведению данного вида анализа могут считаться следующие состояния и лечебные цели:
 - поиск антигенов определенных заболеваний;
 - определение гормонального статуса;
 - выявление в организме вируса гепатита;
 - исследование на наличие онкомаркеров;
 - поиск антител к любому виду инфекционного заболевания;
 - обследование на наличие аутоиммунных поражений организма.
- Также иммуноферментный анализ назначается для выявления наличия поражения организма гельминтами и кишечными паразитами и имеющих аллергических проявлений. При проведении выбранного метода лечения имеющегося заболевания этот анализ позволяет увидеть динамику процесса излечения, а также внести в него необходимые корректировки.

- ПОКАЗАНИЯ К НАЗНАЧЕНИЮ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА КРОВИ
- Определение антител к наличию в организме болезнетворных микробов, вызывающих:
 - сифилис;
 - трихомоноз;
 - уреаплазмоз и микоплазмоз.

- Имеется рост количества иммуноглобулинов и при глистных инвазиях.
 - Диагностика проводится для обнаружения:
 - герпетических заболеваний;
 - группы вирусных гепатитов;
 - вируса Эпштейна-Барра;
 - цитомегаловируса.
 - При помощи ИФА можно определять наличие антител к 600 видов аллергенов, обнаруживать состояние иммунодефицита, проводить комплексное обследование перед трансплантологическими операциями, проводить комплексный анализ на предмет эффективности лечения.
 - ИФА является дополнительным методом обнаружения онкологических клеток.
-

- Прямой иммуноферментный анализ – этапы проведения
- В прямом иммуноферментном анализе используют антитела к выявляемому антигену, соединенные со специфической меткой. Эта специфическая метка и есть субстрат ферментативной реакции.
- Прикрепление антигенов к поверхности лунки и соединение антигена с антителом
- Берется биологический материал (кровь, соскобы со слизистых, мазки) и помещается в специальные лунки. Биологический материал оставляют в лунках на 15-30 минут, чтобы антигены могли приклеиться к поверхности лунок. Далее в эти лунки добавляют антитела к выявляемому антигену. Это значит, что выявляя антигены, например, сифилиса, добавляются антитела против антигенов сифилиса. Эти антитела получают промышленным способом, а лаборатории покупают уже готовые наборы. Данную смесь исследуемого материала и антител оставляют на некоторое время (от 30 минут до 4-5 часов), чтобы антитела смогли найти и связаться со «своим» антигеном. Чем больше в биологической пробе антигенов, тем больше антител свяжется с ними.

- Удаление «лишних» антител
- Как было указано, антитела к тому же связаны со специфической меткой. Поскольку антитела добавляются в избытке, то не все они свяжутся с антигенами, а если антигена вообще нет в пробе, то, соответственно, ни одно антитело не свяжется с искомым антигеном. Для того чтобы убрать «лишние» антитела, содержимое из лунок просто выливают. В результате этого все «лишние» антитела убираются, а остаются те, которые связались с антигенами, поскольку антигены «приклеены» к поверхности лунок. Лунки несколько раз ополаскивают специальным раствором, который позволяет вымыть все «лишние» антитела.
- Ферментативная реакция – образование окрашенного соединения
- Далее начинается второй этап – ферментативная реакция. В промытые лунки добавляют раствор с ферментом и оставляют на 30-60 минут. Данный фермент имеет сродство к веществу (специфической метке), с которым связаны антитела. Фермент проводит реакцию, в результате которой эта специфическая метка (субстрат) превращается в окрашенное вещество (продукт). Затем методом колориметрии находят концентрацию этого окрашенного вещества. Поскольку данная специфическая метка связана с антителами, значит, концентрация окрашенного продукта реакции равна концентрации антител. А концентрация антител равна концентрации антигенов. Таким образом, в результате проведенного анализа мы получаем ответ, какова концентрация выявляемого микроба или гормона.
- Именно так проходит прямой иммуноферментный анализ. Однако сегодня чаще используют непрямой иммуноферментный анализ, поскольку чувствительность и точность непрямого выше, чем прямого. Итак, перейдем к непрямому иммуноферментному анализу.

- Непрямой иммуноферментный анализ – этапы проведения
- В непрямом иммуноферментном анализе два этапа. При проведении первого этапа используют немеченые антитела к выявляемым антигенам, а во втором этапе применяют меченые антитела к первым немеченым антителам. То есть получается не прямое связывание антитела с антигеном, а двойной контроль: связывание антител с антигеном, после чего связывание вторых антител с комплексом антитело + антиген. Как правило, антитела для первого этапа – мышинные, а для второго – козы.
- Фиксация антигенов на поверхности лунки и связывание антигена с немеченым антителом
- Так же как и для прямого иммуноферментного анализа производится забор биологического материала – кровь, соскобы, мазки. Исследуемый биологический материал вносят в лунки и оставляют на 15-30 минут для приклеивания антигенов к поверхности лунок. Затем в лунки вносят немеченые антитела к антигенам и оставляют на промежуток времени (1-5 часов), чтобы антитела связались со «своими» антигенами и образовали иммунный комплекс (первый этап). После чего удаляют «лишние», не связавшиеся антитела, путем выливания содержимого лунок. Производят промывку специальным раствором для полного удаления всех не связавшихся антител.
- Связывание меченого антитела с комплексом антиген + немеченое антитело

- После чего берут вторые антитела – меченые, добавляют в лунки и опять оставляют на некоторое время – 15-30 минут (второй этап). За это время меченые антитела связываются с первыми – не мечеными и образуют комплекс – антитело + антитело + антиген. Однако и меченые, и не меченые антитела вносятся в лунки в избытке. Поэтому нужно опять удалить «лишние», уже меченые антитела, которые не связались с немечеными антителами. Для этого повторяют процедуру выливания содержимого лунок и промывки специальным раствором.
- Ферментативная реакция – образование окрашенного соединения
- После чего вносят фермент, осуществляющий реакцию превращения «метки» в окрашенное вещество. Окраска развивается в течение 5-30 минут. Затем проводят колориметрию и вычисляют концентрацию окрашенного вещества. Поскольку концентрация окрашенного вещества равна концентрации меченых антител, а концентрация меченых равна концентрации немеченых антител, которая, в свою очередь равна концентрации антигена. Таким образом, получаем концентрацию выявляемого антигена.
- Такой двойной контроль в виде использования двух видов антител позволил повысить чувствительность и специфичность метода иммуноферментного анализа. Несмотря на удлинение времени проведения анализа и включение дополнительных этапов, эти потери компенсируются точностью результата. Именно поэтому в настоящее время подавляющее большинство методик иммуноферментного анализа – это непрямой иммуноферментный анализ.

- Спасибки за терпение!