Методы в микробиологии

Объект изучения медицинских микробиологических лабораторий

- патогенные биологические агенты (ПБА) — патогенные для человека микроорганизмы (вирусы, бактерии, грибы, простейшие)
- генно-инженерно модифицированные микроорганизмы
- яды биологического происхождения (токсины)
- Гельминты
- материал, подозрительный на содержание ПБА (включая кровь, биологические жидкости и экскременты организма человека)

The Point-of-Care Laboratory in Clinical Microbiology

Michel Drancourta, Audrey Michel-Lepagea,b, Sylvie Boyerb and Didier Raoulta

aAix Marseille Université, URMITE, UMR CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

bAix Marseille Université, Aix Marseille School of Economics-SESSTIM UMR 912, INSERM IRD, Marseille, France

- SUMMARY
- Point-of-care (POC) laboratories that deliver rapid diagnoses of infectious diseases were invented to balance the centralization of core laboratories.
- POC laboratories operate 24 h a day and 7 days a week to provide diagnoses within 2 h, largely based on immunochromatography and real-time PCR tests. In our experience, these tests are conveniently combined into syndrome-based kits that facilitate sampling, including self-sampling and test operations, as POC laboratories can be operated by trained operators who are not necessarily biologists.
- POC laboratories are a way of easily providing clinical microbiology testing for populations distant from laboratories in developing and developed countries and on ships. Modern Internet connections enable support from core laboratories. The cost-effectiveness of POC laboratories has been established for the rapid diagnosis of tuberculosis and sexually transmitted infections in both developed and developing countries.

Сеть бактериологических лабораторий

- В системе Министерства здравоохранения и Государственного комитета санитарно-эпидемиологического надзора РФ наиболее разветвлена сеть бактериологических лабораторий. В соответствии с выполняемыми задачами выделяют:
- бактериологические лаборатории в составе ЛПУ;
- бактериологические лаборатории в составе комитетов Госсанэпиднадзора;
- учебные бактериологические лаборатории вузов;
- проблемные и отраслевые бактериологические лаборатории научно-исследовательских институтов и предприятий по выпуску бактерийных препаратов;
- специализированные бактериологические лаборатории по контролю за особо опасными инфекциями;
- специализированные бактериологические лаборатории по контролю за отдельными группами бактерий: микобактериями, риккетсиями, лептоспирами и др.
- Большая часть микробиологических лабораторий работает с ПБА групп III и IV, а изучением возбудителей особо опасных инфекций (группы I и II) занимаются только специализированные лаборатории.
- Требования к организации работы с ПБА групп опасности III и IV

Микробиологические лабо ратории

- диагностические
- производственные
- научно-исследовательские.

В соответствии с типами микроорганизмов, изучаемых в них выделяют:

бактериологические,

вирусологические,

микологические и

протозоологические лаборатории.

Лаборатории разных групп риска

- В зависимости от уровня безопасности работы с микроорганизмами лаборатории подразделяют на четыре группы риска.
- **Первая группа риска**: лаборатории особого режима (максимально изолированные) с высоким индивидуальным и общественным риском.
- **Вторая группа риска**: режимные лаборатории (изолированные) с высоким индивидуальным и низким общественным риском.
- **Третья группа риска**: базовые (основные) лаборатории с умеренным индивидуальным и ограниченным общественным риском.
- **Четвёртая группа риска**: базовые (основные) лаборатории с низким индивидуальным и общественным риском.

Группы возбудителей инфекционных заболеваний

- Регламентация условий работы с возбудителями инфекционных заболеваний произведена в соответствии со степенью опасности микроорганизмов для человека. По этому признаку выделено четыре группы возбудителей.
- **Группа I**: возбудители особо опасных инфекций: чума, натуральная оспа, лихорадки Ласса, Эбола и др.
- **Группа II**: возбудители высококонтагиозных бактериальных грибковых и вирусных инфекций: сибирская язва, холера, лихорадка Скалистых гор, сыпной тиф, кокцидиоидомикоз, бластомикоз, бешенство и др. В эту группу также включён ботулотоксин (но не сам возбудитель ботулизма).
- **Группа III**: возбудители бактериальных грибковых, вирусных и протозойных инфекций, выделенных в отдельные нозологические формы (возбудители коклюша, столбняка, ботулизма, туберкулёза, кандидоза, малярии, лейшманиоза, гриппа, полиомиелита и др.). В эту группу также включены аттенуированные штаммы бактерий групп I, II и III.
- **Группа IV**: возбудители бактериальных, вирусных, грибковых септицемии, менингитов, пневмоний, энтеритов, токсикоинфекций и острых отравлений (возбудители анаэробных газовых инфекций, синегнойной инфекции, аспергиллёза, амебиаза, аденовирусы, герпесвирусы и др.).

ПРИНЦИПЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Методы в микробиологии:

- **микроскопия:** световая, фазово-контрастная, темнопольная, флуоресцентная, электронная;
- **культуральный метод** (бактериологический, вирусологический,микологический);
- **биологический метод** (заражение лабораторных животных с воспроизведением инфекционного процесса на чувствительных моделях);
- **серологический метод** — выявления антигенов микроорганизмов или антител к ним
- **молекулярно-генетический метод** (ПЦР, биочипы, секвенаторы и др.);

Методы микробиологической диагностики

1. ***Микроскопический***- с использованием приборов для микроскопии. Определяют форму, размеры, взаиморасположение микроорганизмов, их структуру, способность окрашиваться определенными красителями.
2. ***Микробиологический*** (бактериологический и вирусологический) - выделение чистой культуры и ее идентификация.
3. ***Биологический*** - заражение лабораторных животных с воспроизведением инфекционного процесса на чувствительных моделях (биопроба).
4. ***Иммунологический*** (варианты - серологический, аллергологический) - используется для выявления антигенов возбудителя или антител к ним.
5. ***Молекулярно-генетический*** - ДНК- и РНК- зонды, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многие другие.

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ:

1. Микроскопический метод.
2. Микробиологический (бактериологический) метод.
3. Биологический метод.
4. Иммунологический метод.
   - серологический,
   - аллергологический
5. Молекулярно-генетический метод.

Цель микробиологических исследований — установить факт наличия или отсутствия возбудителя в организме больного и на объектах окружающей среды.

Задачи микробиологических исследований —

1. идентифицировать микроорганизмы в исследуемом материале и определить их видовую принадлежность по морфологическим, биохимическим, токсигенным и антигенным свойствам,
2. установить чувствительность выделенных микроорга низмов к антимикробным препаратам.

Проведение микробиологических исследований относится к компетенции микробиологов,но каждый врач, имеющий дело с инфекционными заболеваниями, должен знать, как и когда необходимо отбирать материал для исследований, на какие исследования его направлять и как интерпретировать полученные результаты.

Адекватная микробиологическая диагностика

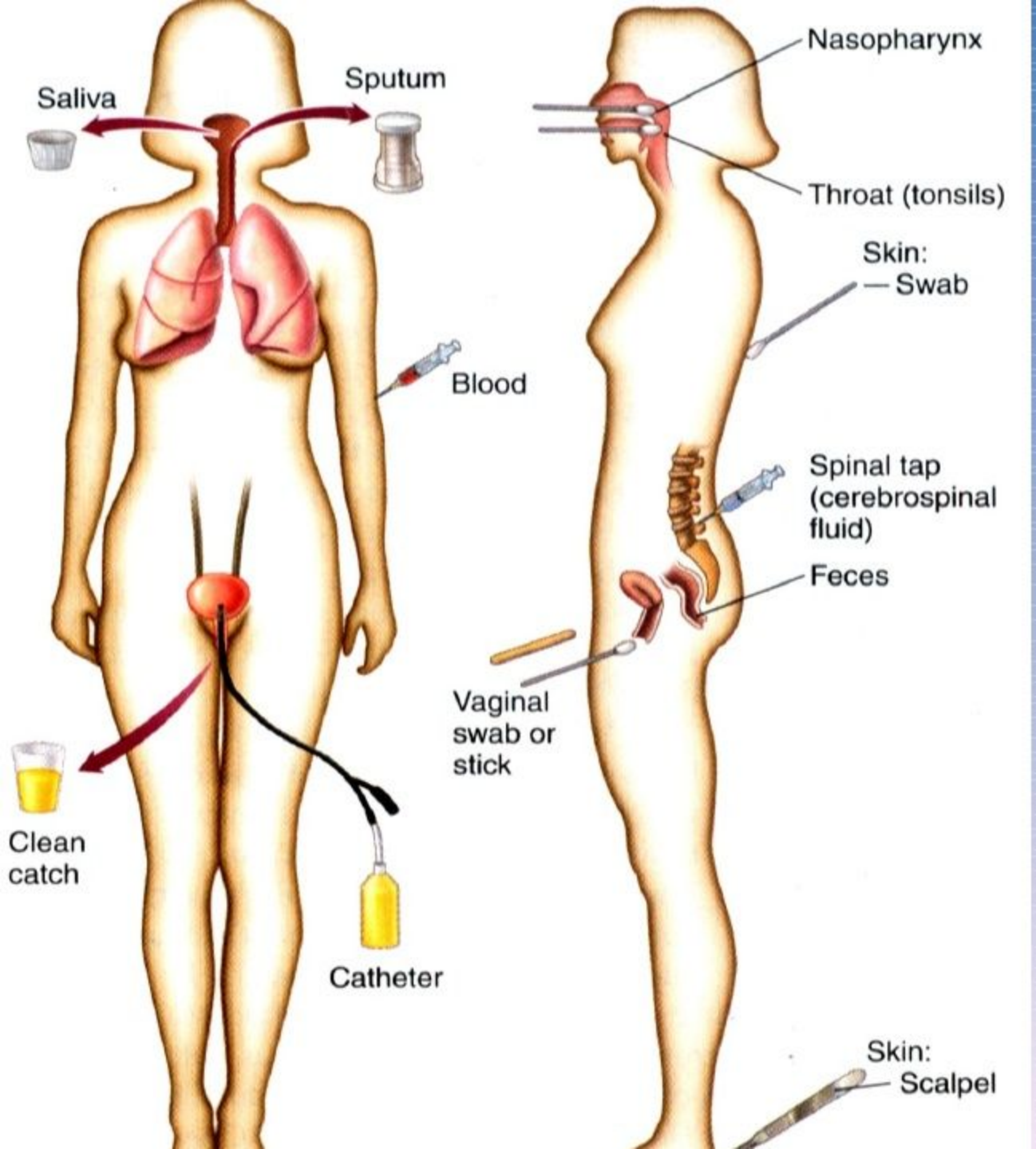
- Взятие материала для бактериологического исследования
  - До начала АБТ
  - Из локуса, максимально приближенного к предполагаемому очагу инфекции
  - Адекватный метод забора материала
  - Соблюдение условий, препятствующих контаминации образца сапрофитной флорой
  - Гемокультура: минимум 2 пробы с интервалом 0,5-1 ч
  - Обеспечение немедленной доставки материала в лабораторию или использование транспортных сред

MyShared

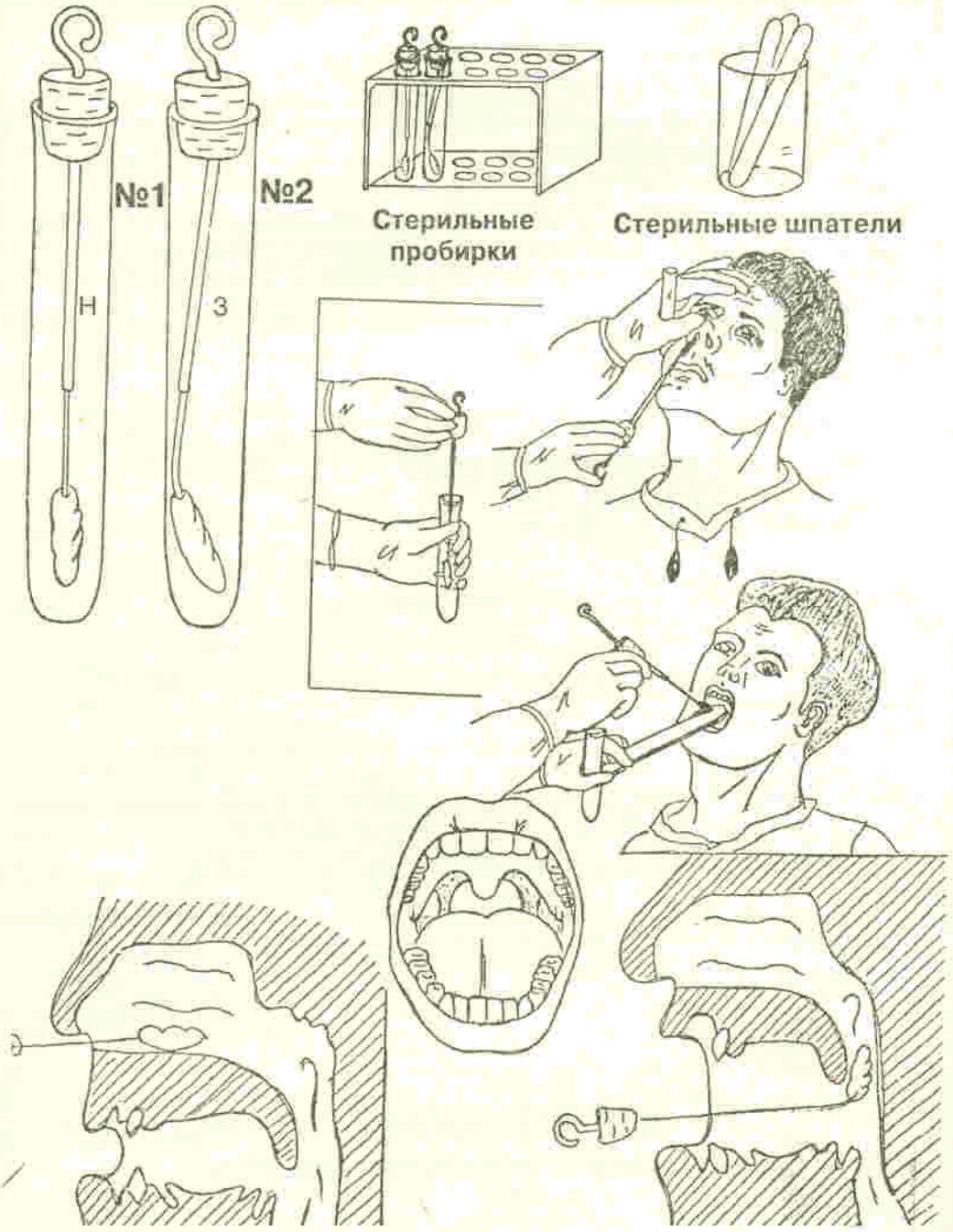
Взятие материала

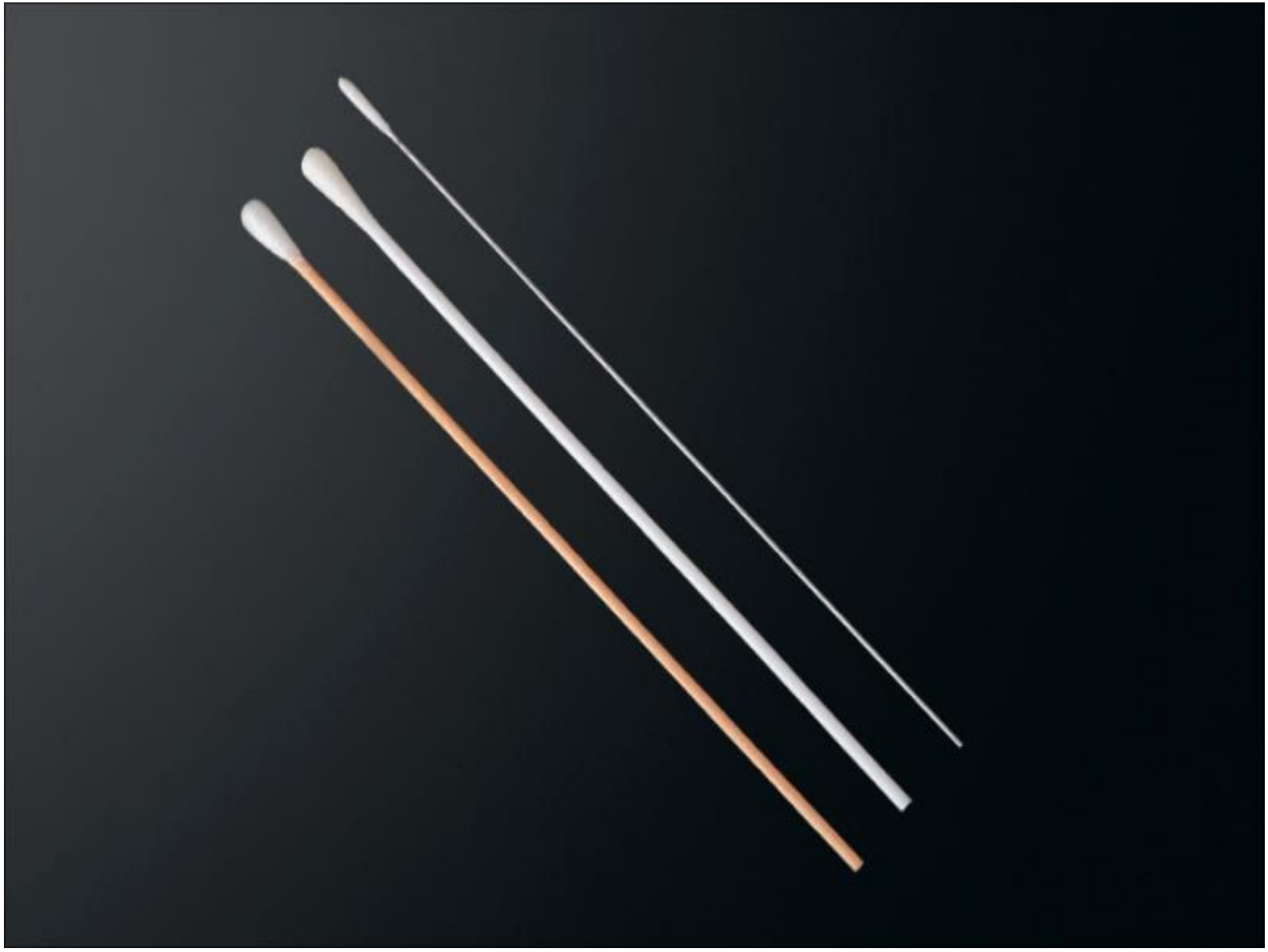
- Первый этап любого микробиологического исследования составляет правильный выбор материала для исследования. Его определяют свойства возбудителя и патогенез вызываемого им заболевания. При поражениях отдельных органов и систем целесообразно отбирать материал соответствующей локализации. При отсутствии поражений исследуют кровь, а затем отбирают образцы с учётом клинической картины заболевания и доступности материала для исследования. Так, при лихорадке неясного генеза первоначально проводят посев крови; затем, при появлении симптомов более конкретных проявлений, например пневмонии, проводят забор мокроты.
- Образцы следует забирать до назначения антимикробной терапии, с соблюдением правил асептики для предупреждения загрязнения материала. Каждый образец следует рассматривать как потенциально опасный. При заборе, транспортировке, хранении и работе с ним необходимо соблюдать правила биологической безопасности. Материал собирают в объёме достаточном для всего комплекса исследований. Микробиологические исследования следует начинать немедленно после поступления образца в лабораторию.
- Выбор материала для исследования должен соответствовать характеру инфекционного процесса. Так, например, при установлении этиологии пневмонии материалом должна быть мокрота, а не слюна, а при раневых инфекциях отделяемое следует забирать из глубины раны, а не с её поверхности.

Specimen Collection

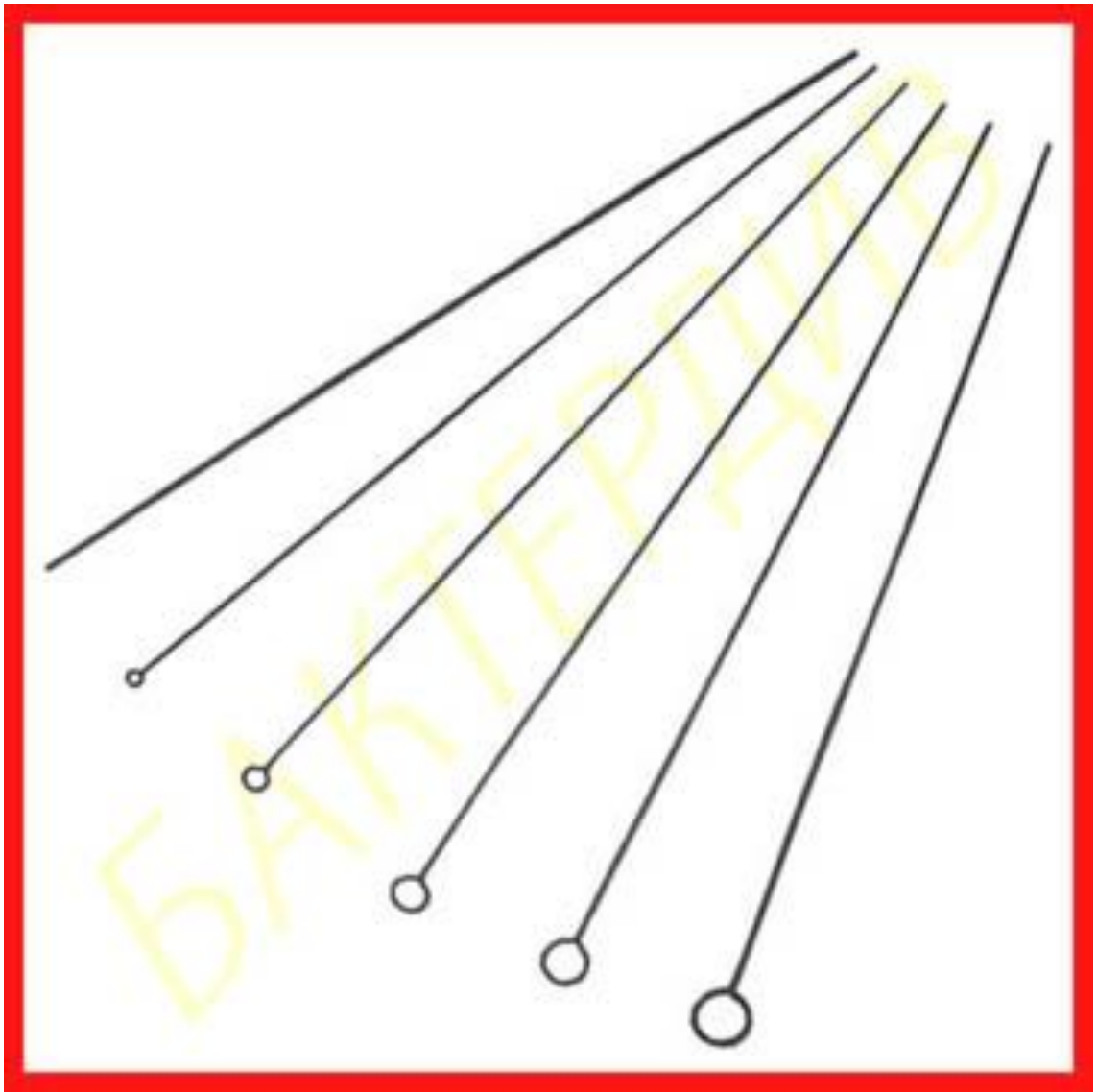


Specimen Collection


№1
№2
Н
З
Стерильные пробирки
Стерильные шпатели

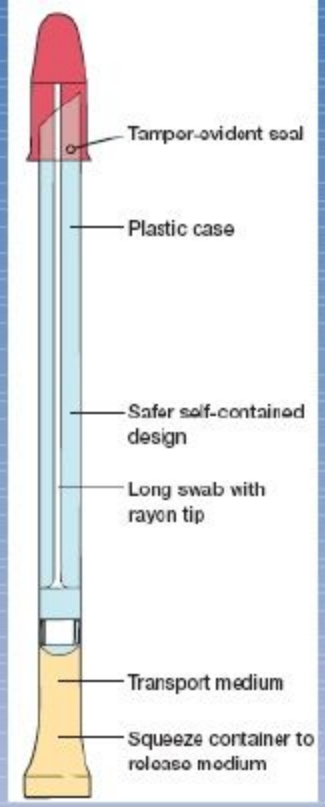


Бактериологические петли



Контейнеры для взятия материала

Рис. 6. Набор инструментов для взятия биоматериала с поверхности роговицы и конъюнктивы



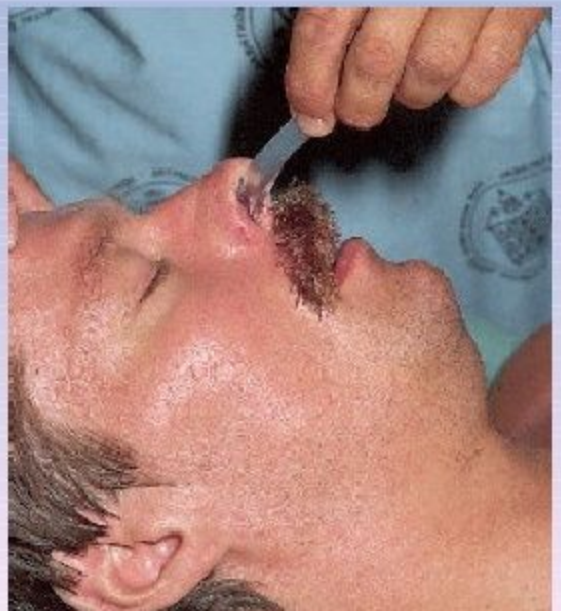
- **A drawing of a sterile swab with a specific transport** medium.

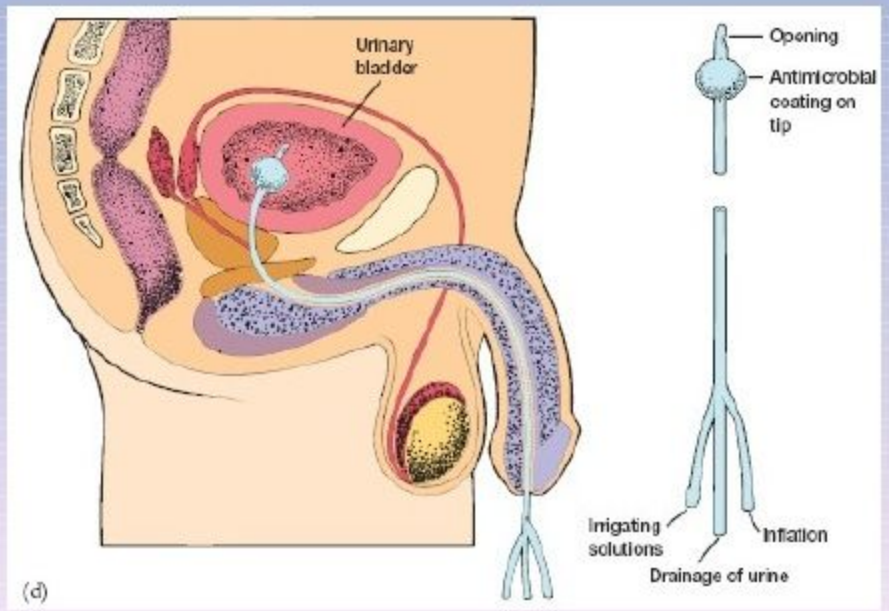
(b) Sterile Vacutainer tubes for the collection o blood.

(c) Nasotracheal intubation.

(d) A drawing of a Foley catheter.

(e) This specially designed sputum cup allows the patient to expectorate a clinical specimen directly into the cup.





Выбор метода лабораторных исследований

Основу микробиологической диагностики инфекционных заболеваний составляют:

- микроскопические
- микробиологические
- биологические
- серологические
- аллергологические методы.

Дополнительные экспрессные методы:

- определение антигена
- ПЦР

МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

- Результаты микроскопических исследований носят ориентировочный характер так как многие микроорганизмы лишены морфологических и тинкториальных особенностей.

Тем не менее микроскопией материала можно определить некоторые морфологические признаки возбудителей а также установить факт наличия или отсутствия микроорганизмов в присланных образцах.

Микроскопические методы

Микроскопические методы включают приготовление мазков и препаратов для микроскопирования. В большинстве случаев результаты микроскопических исследований носит ориентировочный характер. Микроскопией материала можно определить наличие или отсутствие микроорганизмов в присланных образцах, а также определить морфологические,тинкториальные и структурные признаки возбудителей.

Микроскопы:

- **1. Световые (разрешающая способность – 200 нм).**
- * иммерсионный;
- * фазово-контрастный;
- * темнопольный;
- * люминесцентный.
- **2. Электронный (разрешающая способность – до 0,0001 нм).**

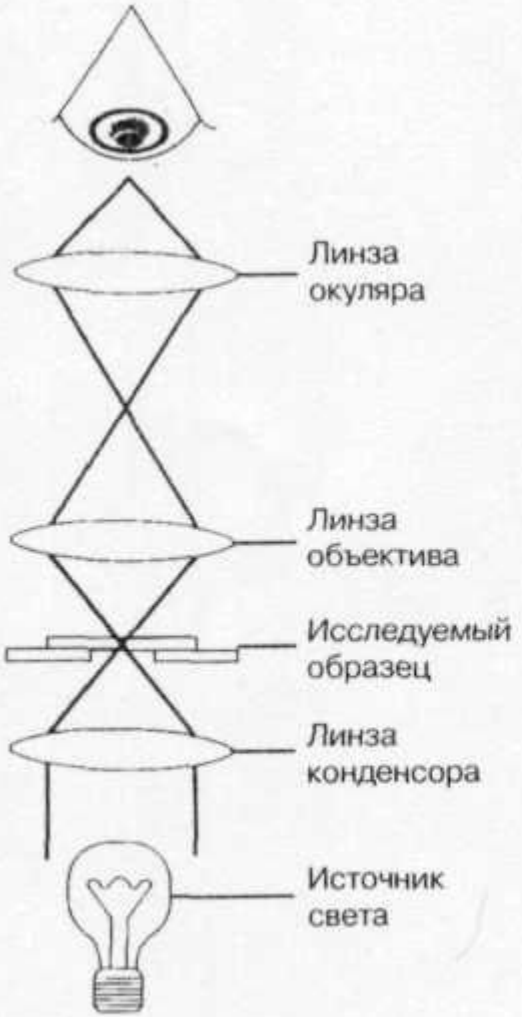


Рис. 11–1. Схема светового микроскопа. Пояснения в тексте.

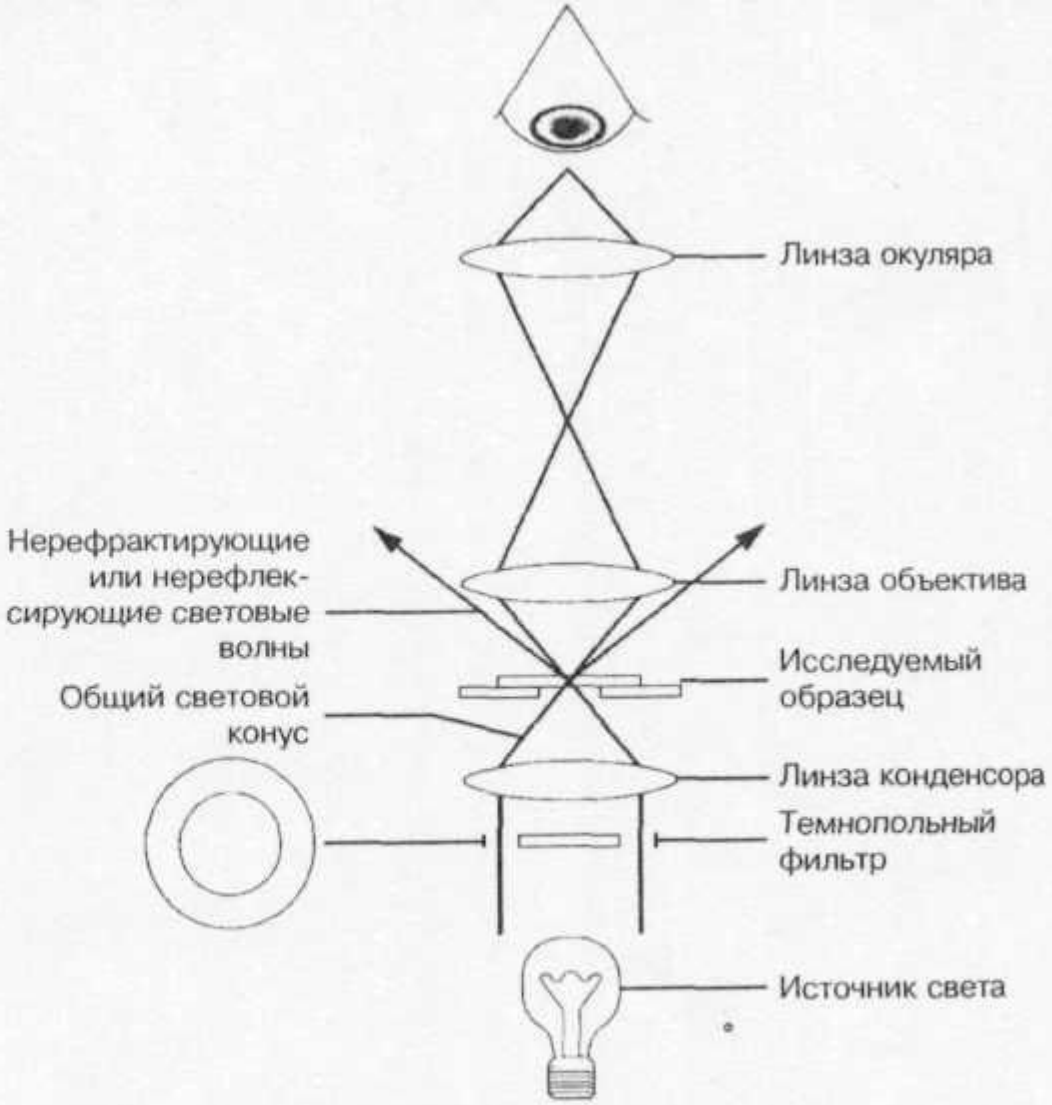
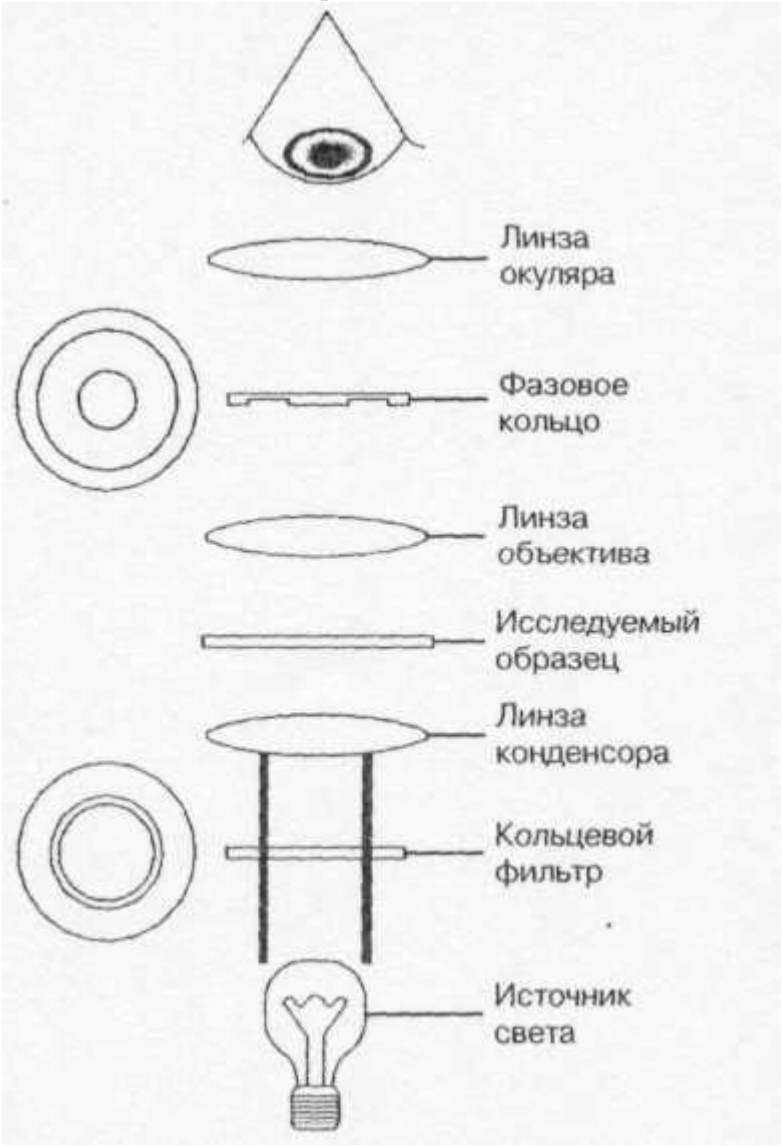


Рис. 11–2. Схема светового микроскопа с темнопольным конденсором. Пояснения в тексте.

Схема фазово-контрастного микроскопа



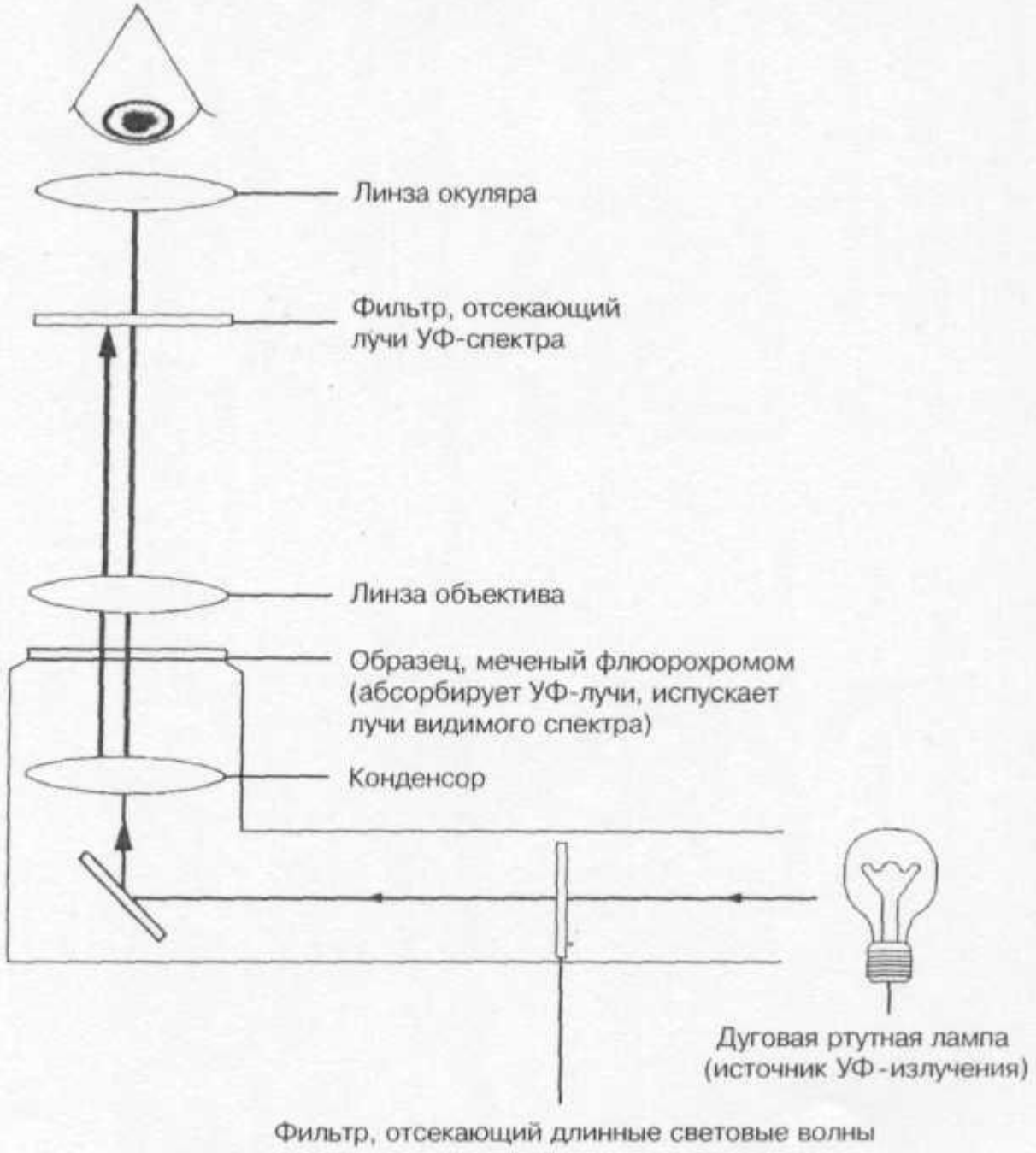


Рис. 11–4. Схема люминесцентного микроскопа. Пояснения в тексте.

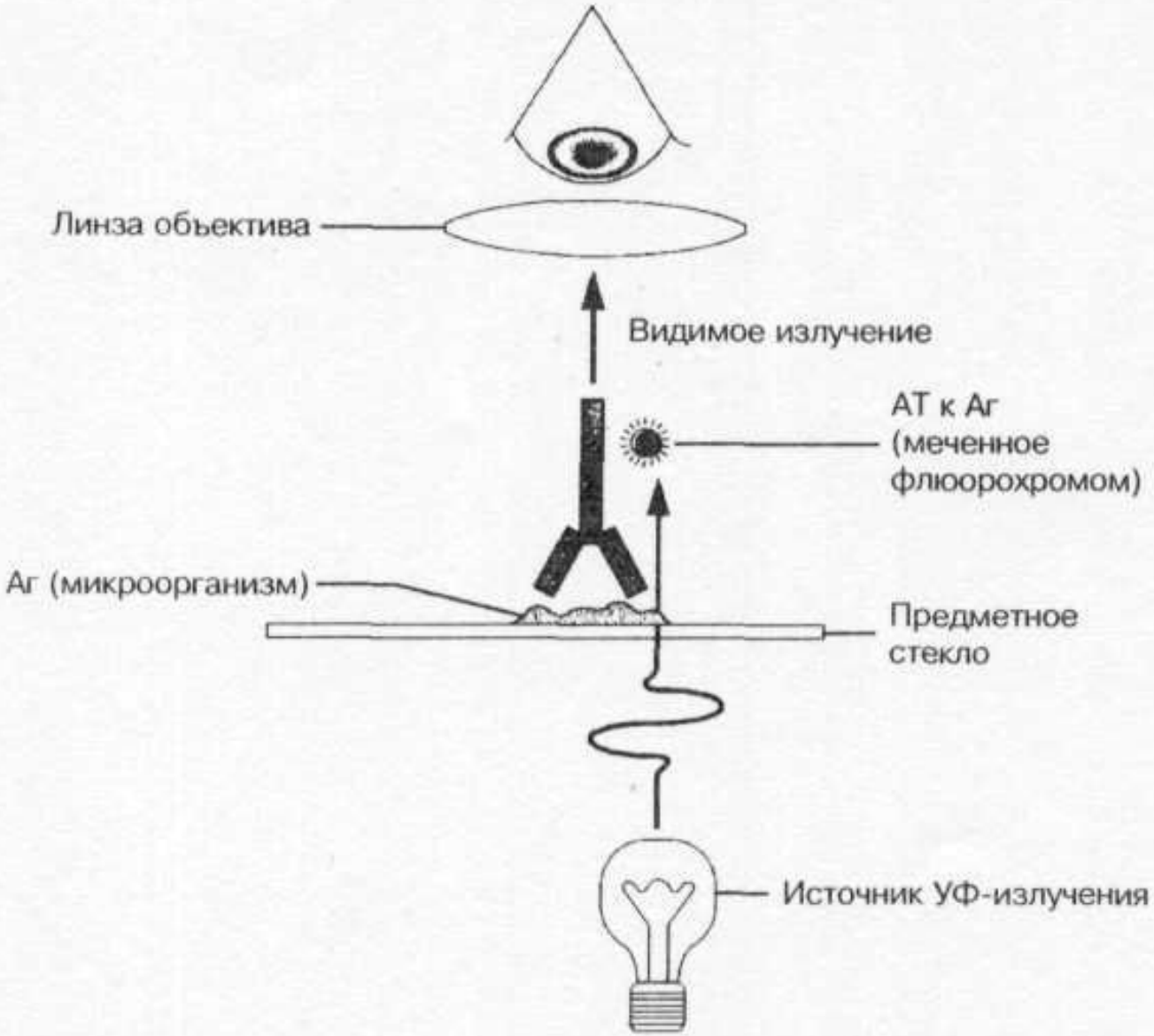


Рис. 11–5. Прямая иммунофлюоресценция. Прямой метод предполагает использование помеченных флюоресцирующим красителем АТ к интересующему Аг; АТ взаимодействуют с Аг в местах их локализации, что и позволяет визуализировать метка.

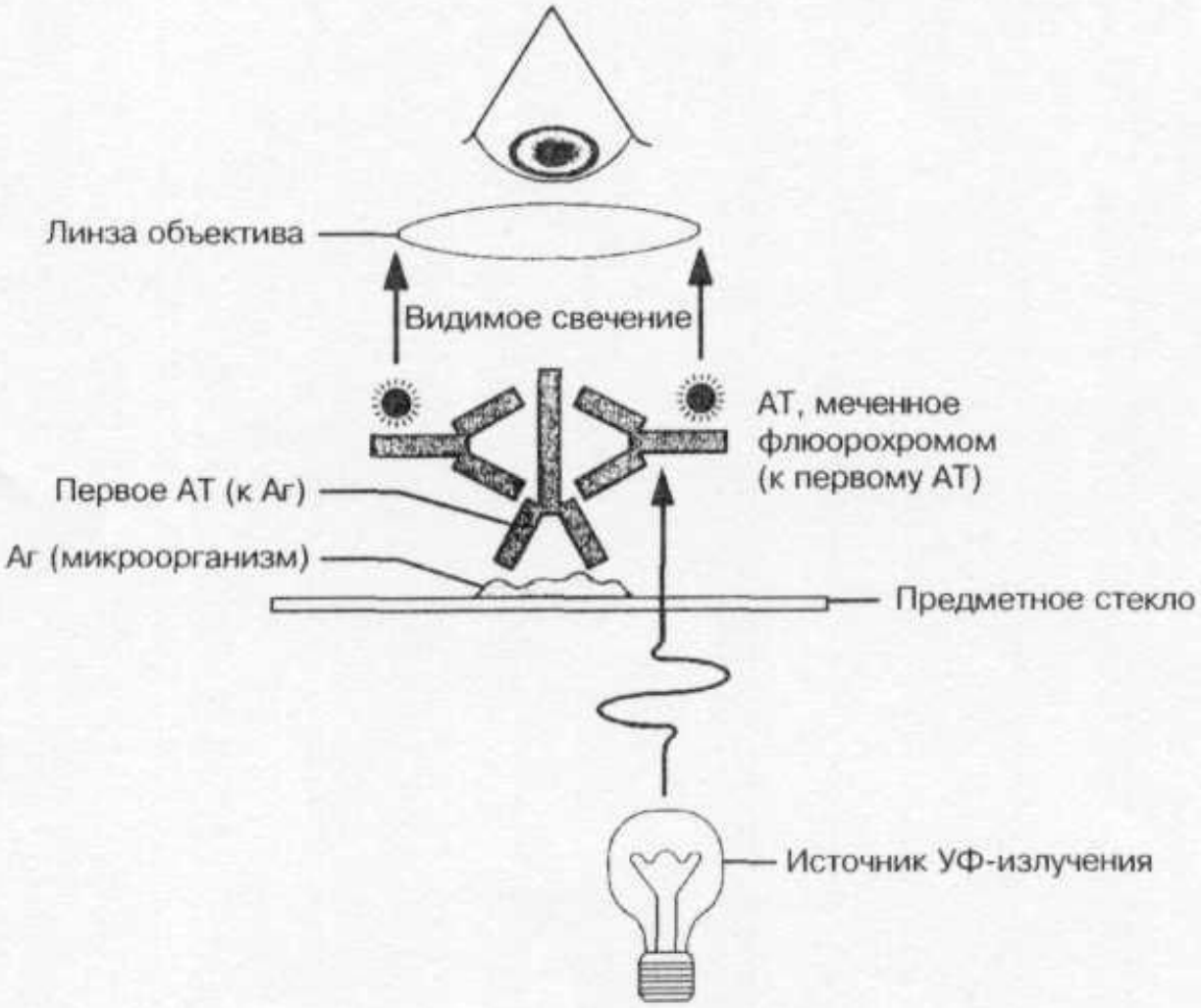


Рис. 11–6. Непрямая иммунофлюоресценция. Непрямой метод предполагает использование двух различных АТ. Первые АТ реагируют с Аг микроорганизма, вторые АТ (связанные с меткой) специфически взаимодействуют с первыми АТ, являющимися Аг ко вторым АТ. Метод значительно чувствительнее, чем прямая иммунофлюоресценция, так как с каждой молекулой первых АТ связывается несколько молекул вторых АТ.

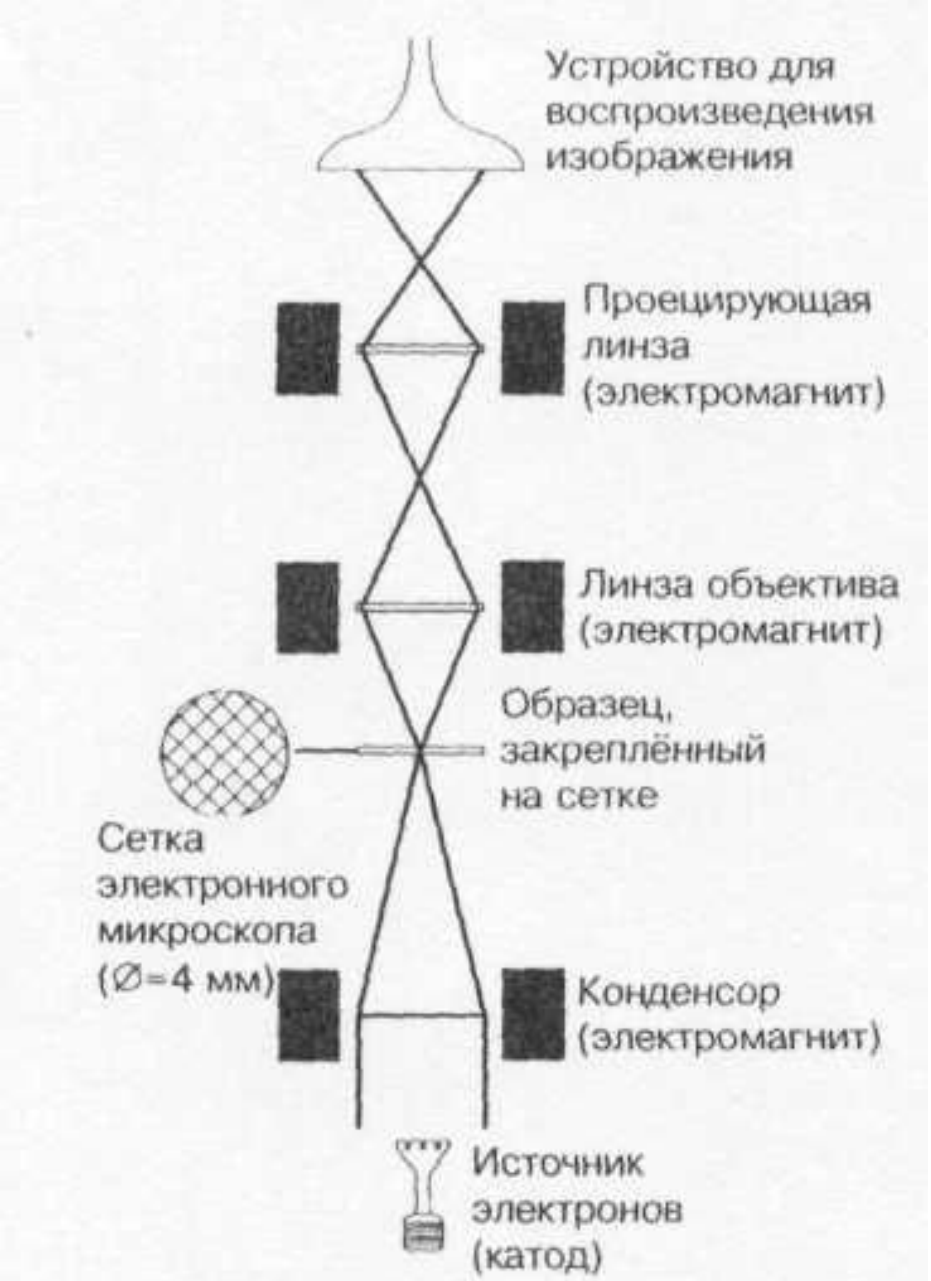


Рис. 11–7. Схема электронного микроскопа. Пояснения в тексте.

Подготовка материала к микроскопии

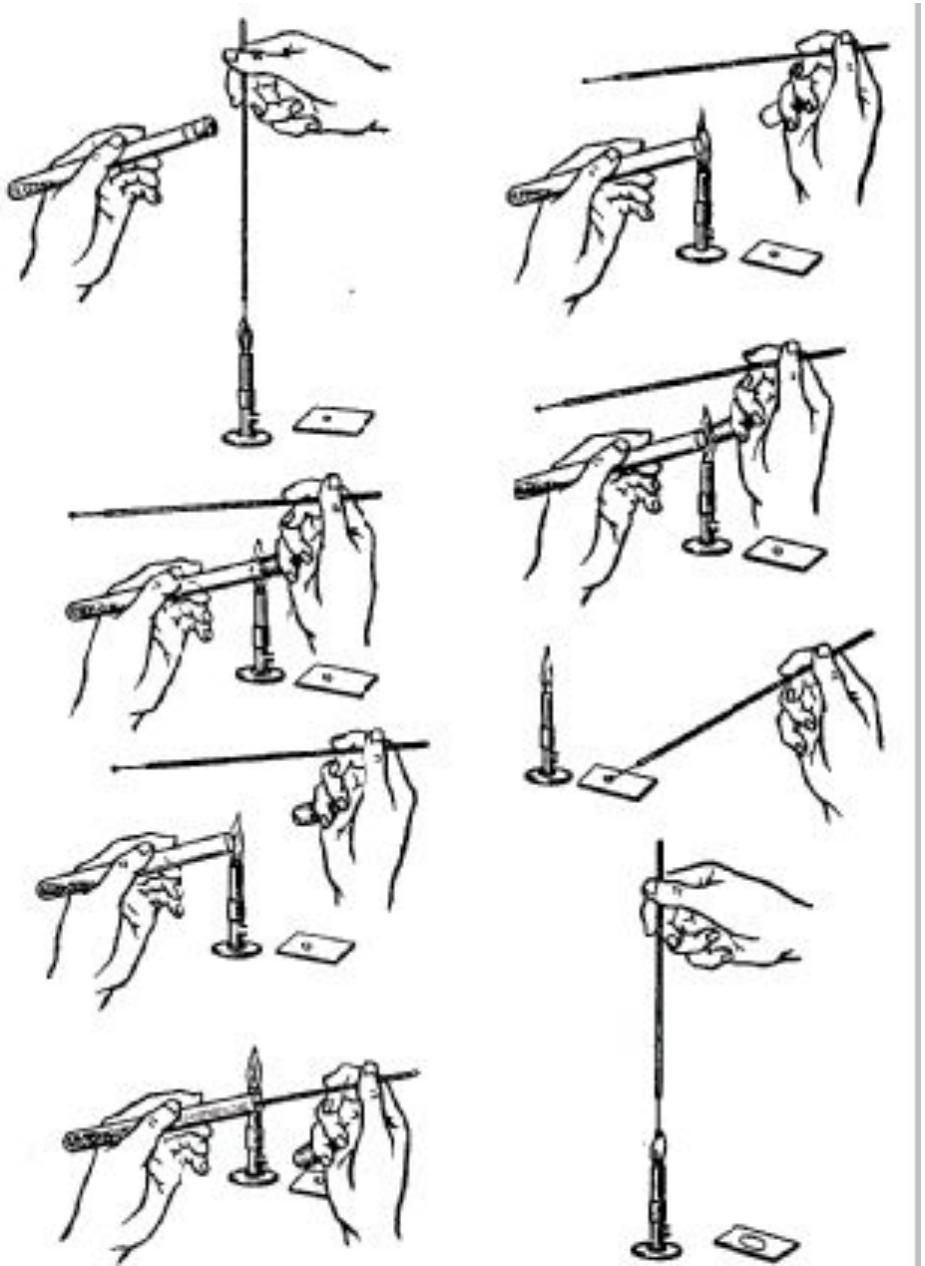
В бактериологической практике микроскопически исследуют неокрашенные образцы (нативный материал) и окрашенные препараты (мазки или мазки-отпечатки), приготовленные из клинического материала или колоний выросших микроорганизмов.

Методика приготовления препарата из бактерий (мазка)

- Обезжирить предметное стекло: натереть сухим мылом, затем снять его марлевой салфеткой. В центр стекла (на обезжиренную поверхность) стеклянной палочкой нанести каплю физиологического раствора.
- Прокаленной в пламени спиртовки и остуженной бактериологической петлей забрать бактериальную массу (очень немного, менее булавочной головки).
- Приготовить равномерную взвесь бактериальной массы в капле физ. раствора и растереть её тонким слоем 15-20 мм в диаметре, высушить на воздухе.
- Зафиксировать – провести предметное стекло (мазком кверху) через пламя спиртовки 3-4 раза так, чтобы слегка обжигало тыл руки. При фиксации бактерии погибают, поэтому **в окрашенных препаратах (мазках) бактерии изучают в неживом состоянии!!!**

MyShared

Приготовление препарата



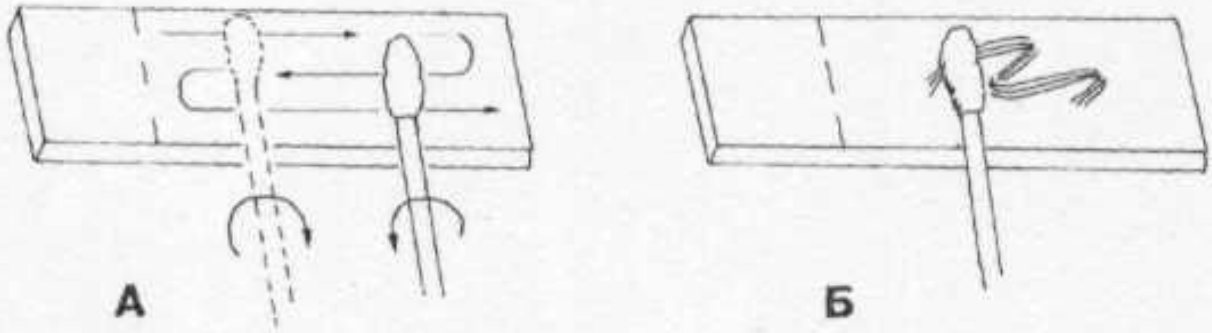
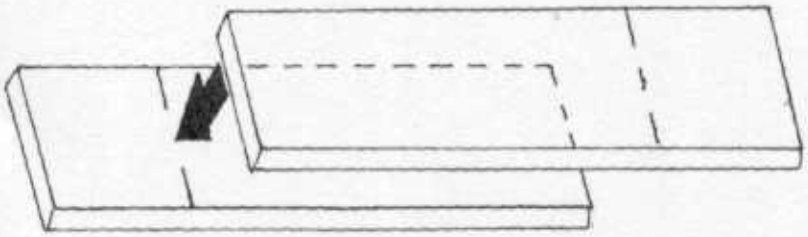
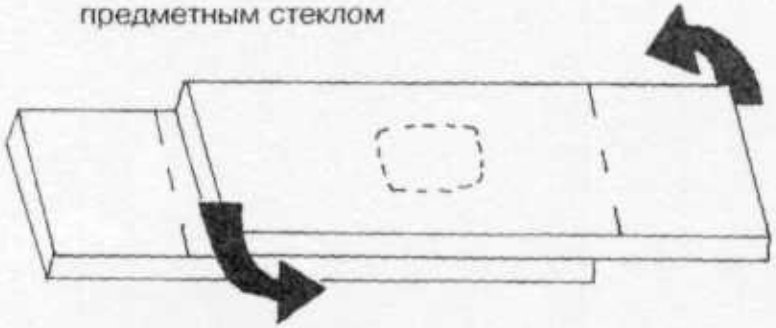


Рис. 11–8. Приготовление мазков из материала с тампонов (А) и непрозрачных жидкостей (Б). Пояснения в тексте.

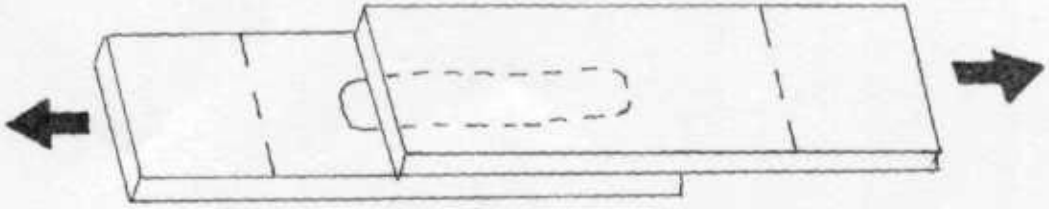
Исследуемый материал
помещают на предметное стекло



Сверху накрывают вторым
предметным стеклом



Стёкла прижимают и
вращают друг против друга

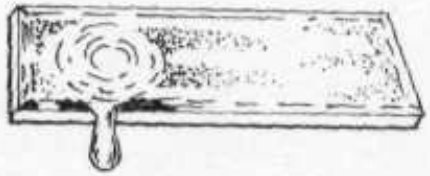


Готовят мазок, разводя стёкла в разные стороны

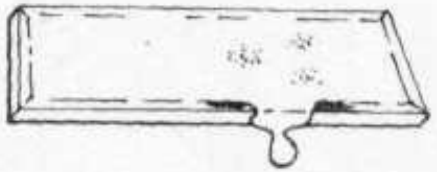
Рис. 11–9. Приготовление мазков из материала со слизистой оболочки или грубой консистенцией. Пояснения в тексте.

Окраска по Граму

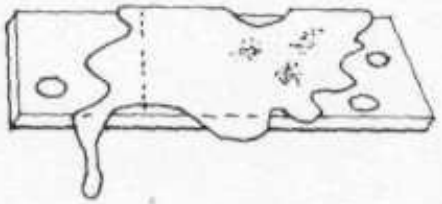
1. Фиксировать мазок на пламени
2. Окрашивать раствором кристаллического фиолетового в течение 1 мин
3. Промыть водой. Не промокать



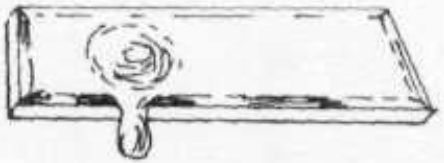
4. Окрашивать раствором Люголя в течение 1 мин
5. Промыть водой. Не промокать



6. Обесцветить в течение 10–30 с в смеси ацетона (30 мл) с этанолом (70 мл) при лёгком покачивании
7. Промыть водой. Не промокать



8. Окрашивать основным фуксином в течение 10–30 с



9. Промыть водой и высушить на воздухе

Окраска по Цилю–Нильсену

1. Фиксировать мазок на пламени
2. Окрашивать карболфуксином, нагревая на пламени спиртовки в течение 5 мин (или 20 мин на водяной бане)
3. Промыть водой
4. Обесцветить в смеси спирт–кислота до сохранения слабо-розовой окраски
5. Промыть водой
6. Дополнительно окрашивать метиленовым синим (или метиленовым синим Лёффлера) в течение 10–30 с
7. Промыть водой и высушить на воздухе

Рис. 11–11. Схема окраски бактерий по Граму и Цилю–Нильсену.

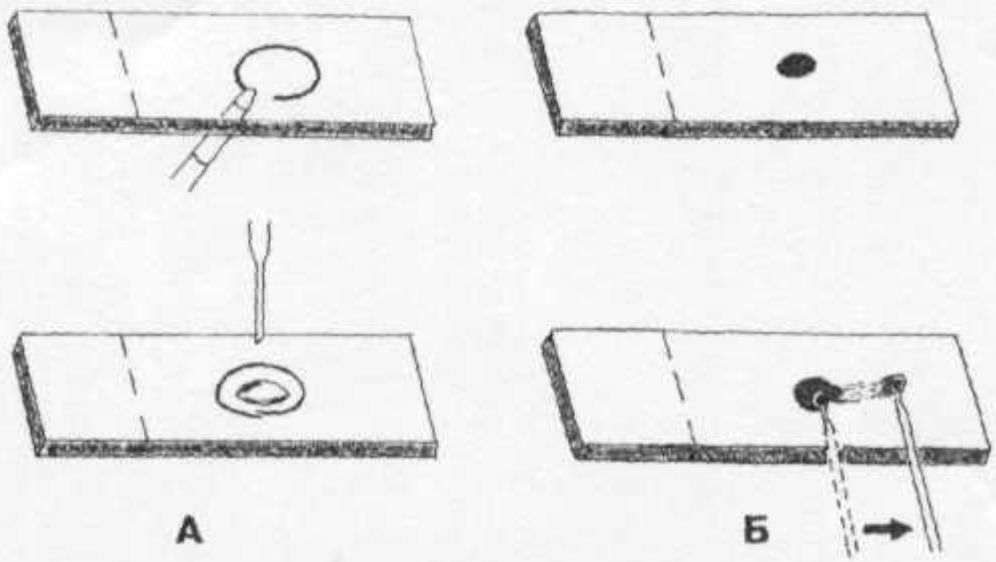


Рис. 11–10. Приготовление мазков из прозрачных жидкостей (А) и из осадка после центрифугирования (Б). Пояснения в тексте.

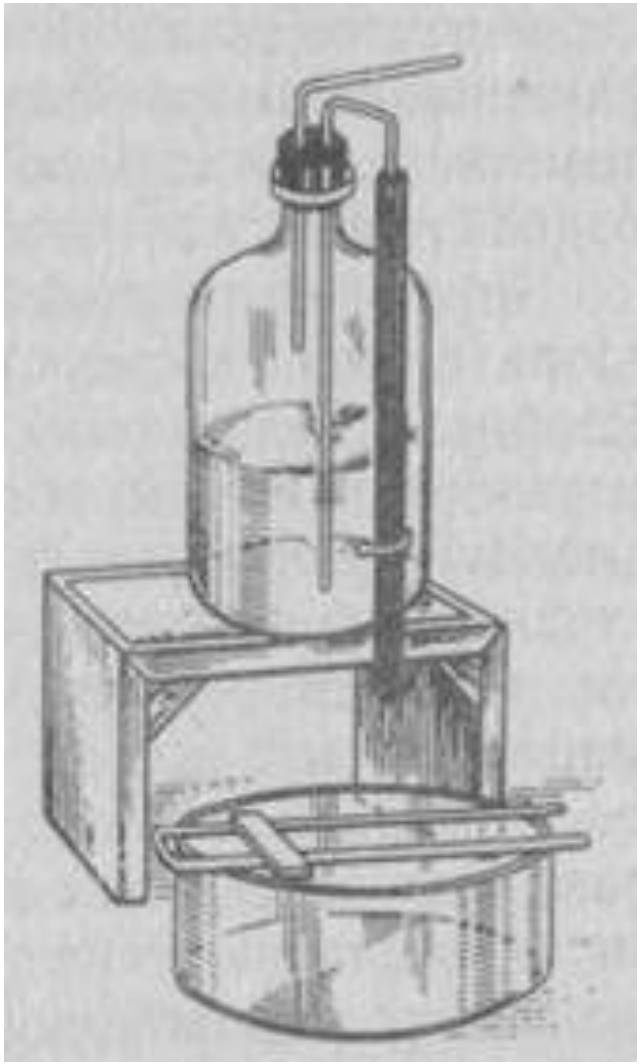
Нативные препараты

- Нативные препараты готовят для исследования живых неокрашенных бактерий. Наибольшее распространение получили метод висячей капли, микрокамеры с плотными средами и негативные методы исследования живых бактерий. Для прижизненного исследования также часто применяются исследование в тёмном поле и фазово-контрастная микроскопия. Подобные приёмы часто используют для диагностики сифилиса и предварительной диагностики диарей, вызванных кампилобактерами, а также для определения подвижности микроорганизмов.

Окрашенные препараты

- Для приготовления окрашенных препаратов из исследуемого объекта готовят мазки и фиксируют их.
- Тампоны, содержащие микроорганизмы, прокатывают по предметному стеклу (рис. 1-8, А); с их помощью также готовят мазки из непрозрачных жидкостей, например взвеси испражнений (рис. 1-8, Б). Мазки из материалов со слизистой или грубой консистенцией готовят растиранием их между двумя предметными стёклами (рис. 1-9). Прозрачные жидкости (например, мочу или СМЖ) можно нанести в виде капли на предметное стекло (рис. 1-10, А), при этом границы капли желательно обвести маркёром. Лучшие результаты даёт предварительное центрифугирование; затем осадок наносят на стекло; если он густой, его можно распределить с помощью стеклянной палочки (рис. 1-10, Б).
- Фиксация. В практической бактериологии наиболее распространена термическая фиксация (над пламенем горелки) — метод грубый, но сохраняющий морфологию и отношение к красителям у бактерий. Для более детального изучения структуры клеток применяют фиксирующие растворы, предотвращающие ферментативный аутолиз бактерий и стабилизирующие макромолекулы путём химического их сшивания. Для светооптической микроскопии используют формалин, спирты, глутаральдегид, жидкость Карнуа, ацетон, пары осмиевой кислоты и др. Мазки фиксируют, помещая их в раствор фиксатора или нанося фиксаж на мазок. Для электронной микроскопии применяют глутаральдегид и тетраоксид осмия.

Установка для окрашивания препаратов



Окрашивание

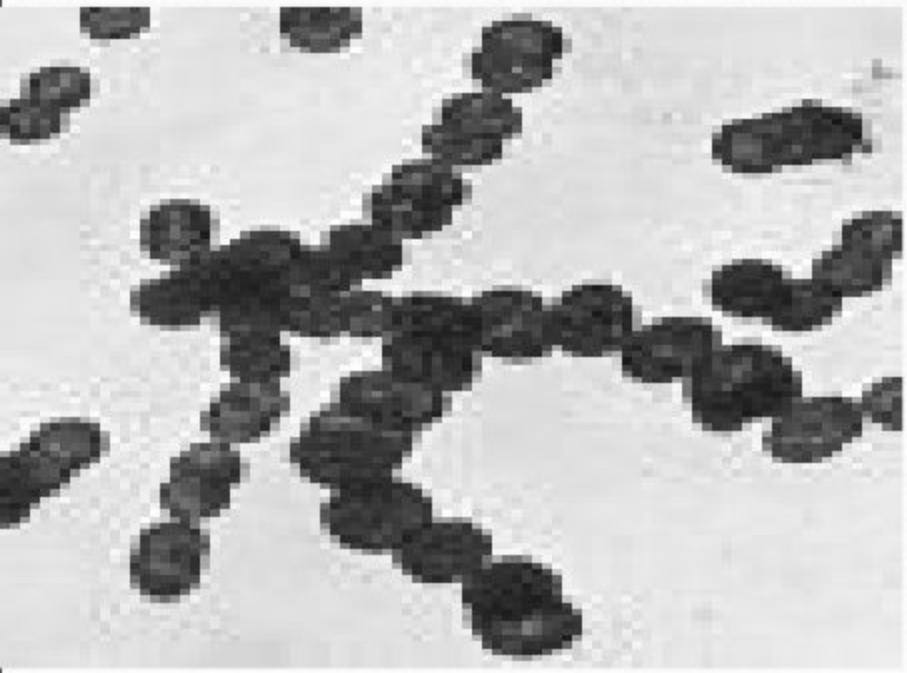
Простая окраска.

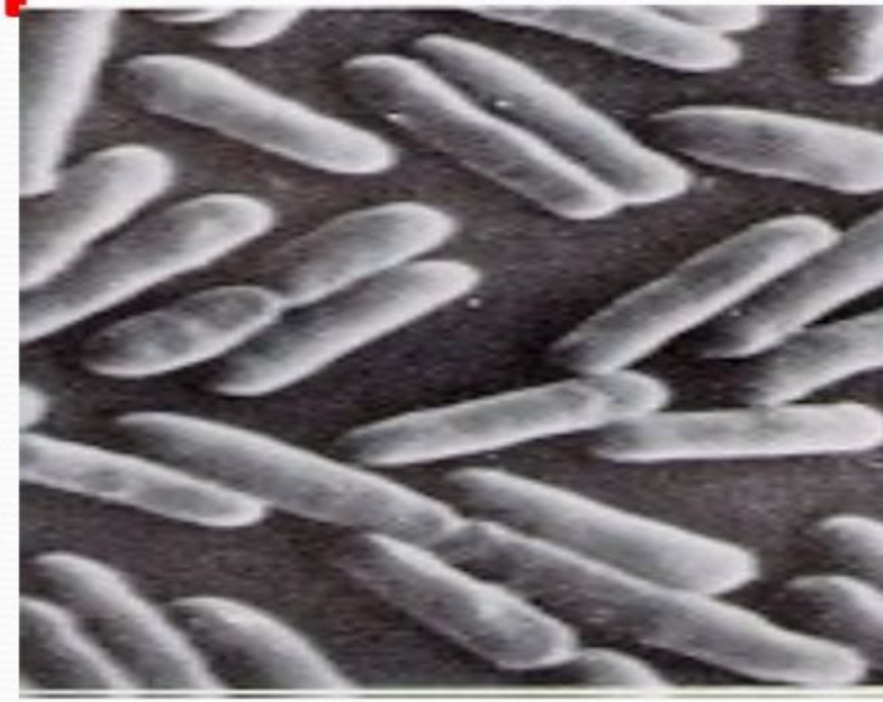
Стандартные красители, используемые для окраски бактерий, — карболовый фуксин Циля, фуксин Пфайфера и метиленовый синий по Лёффлеру. Для получения более информативных результатов в светооптической микроскопии используют специальные и дифференцирующие методы окраски.

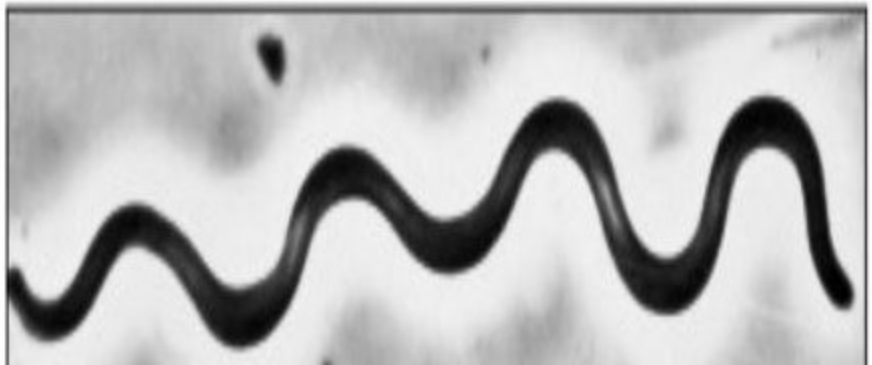
Сложные методы окраски

- **Дифференцирующие методы окраски бактерий.** Наибольшее распространение нашли методы Грама и Циля-Нильсена .
- **Специальные методы** обычно применяют для окрашивания различных морфологических структур.
- Капсулы. Для окраски капсул бактерий применяют методы Хисса, Лейфсона и Антони; последний метод наиболее прост и включает окраску кристаллическим фиолетовым с последующей обработкой 20% водным раствором $CuSO4$.
- Жгутики. Для окраски жгутиков предложены методы Лёффлера, Бейли, Грея и др. Для этих методов характерны первоначальное протравливание препарата [обычно растворами таннина, $KAl(SO4)2$, $HgCl2$] и последующая окраска (чаще карболовый фуксин Циля).
- Споры. Окраску спор бактерий проводят после предварительной обработки их стенок. Наиболее прост метод Пешкова, включающий кипячение мазка с синькой Лёффлера на предметном стекле с последующей докраской нейтральным красным. Споры окрашиваются в синий цвет, вегетативные клетки — в розовый.
- Зерна волютина. Окрашивают по методам Нейссера и Альберта.

Bacterial Shape



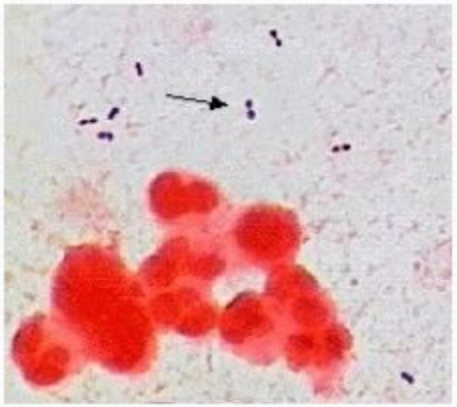




Bacterial arrangement

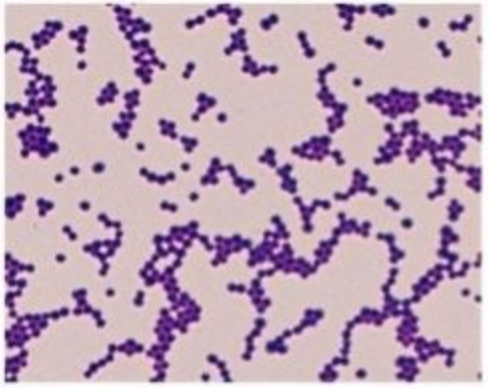
Cocci

- **Pairs**

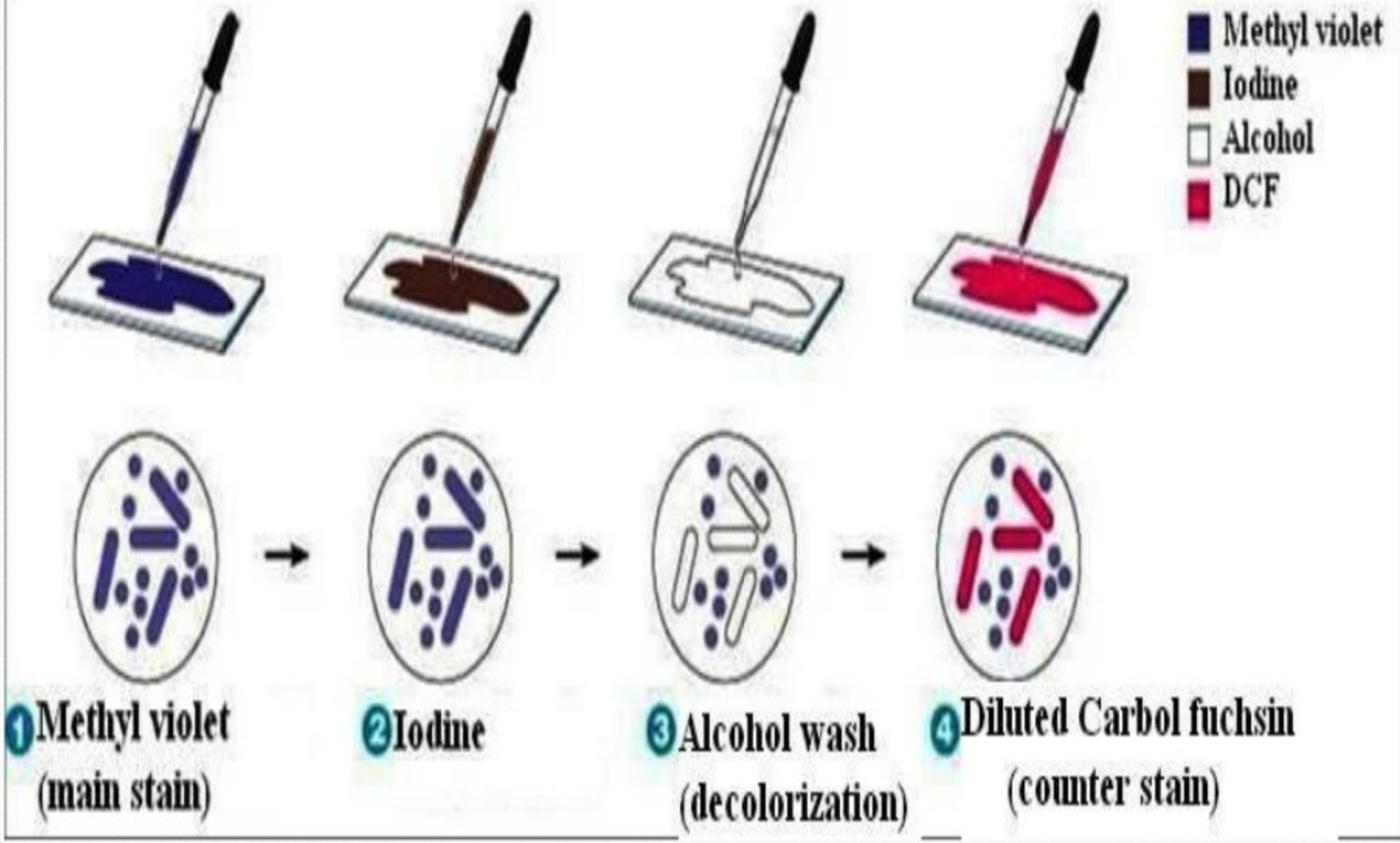


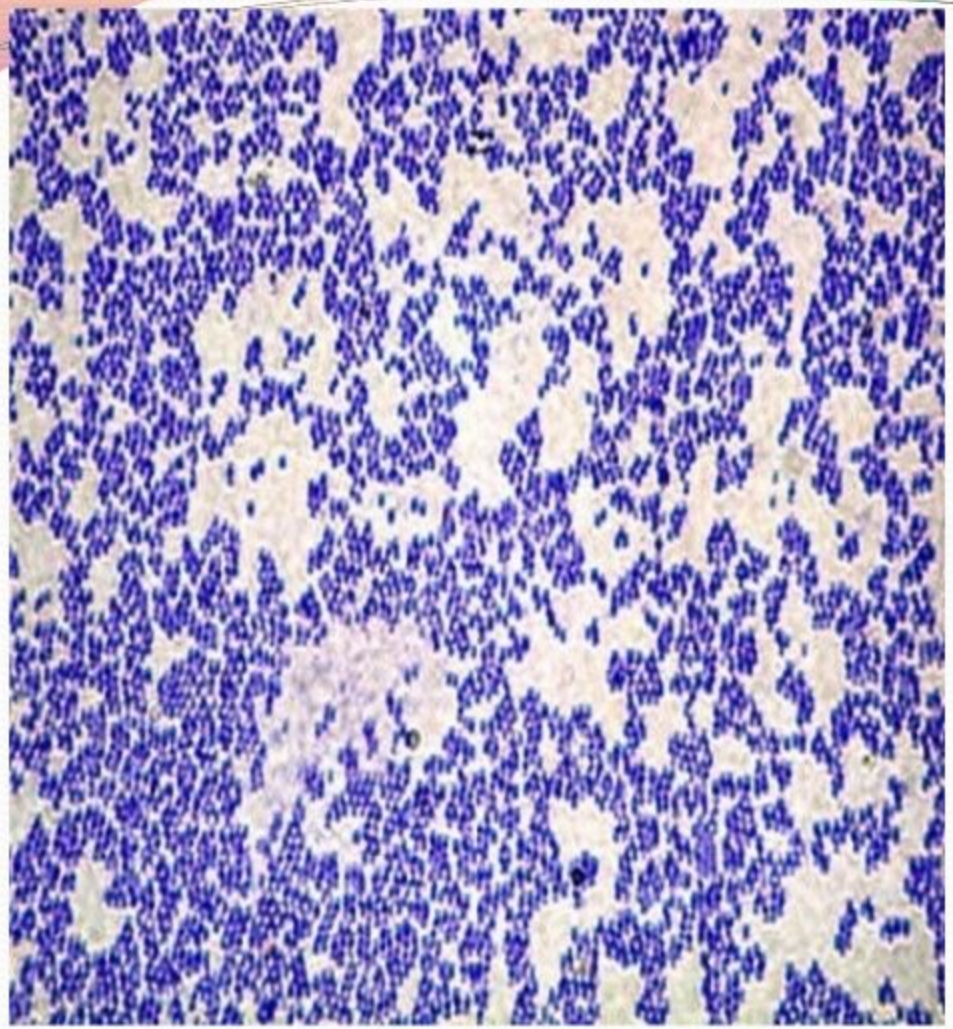
- **Chains**

- **Irregular Clusters**



Gram Staining Technique





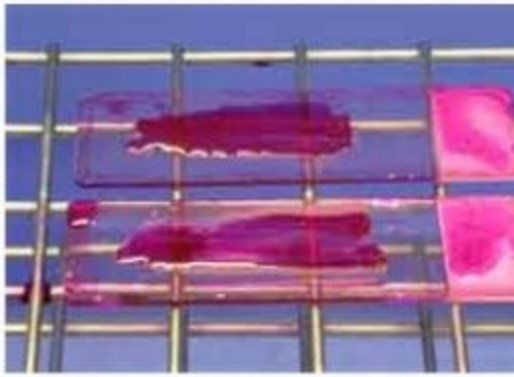
Gm+ve cocci & G-ve bacilli

Ziehl-Neelsen Stain Technique

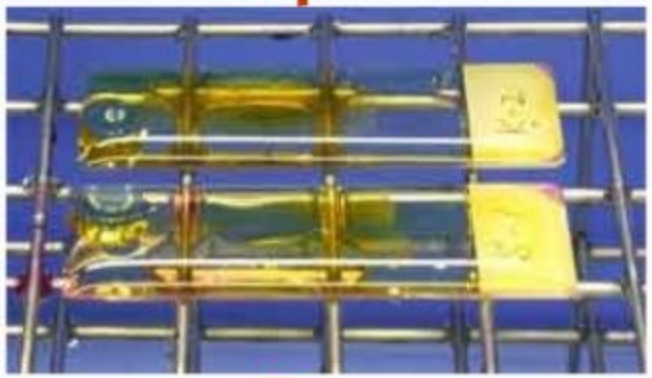
1

2

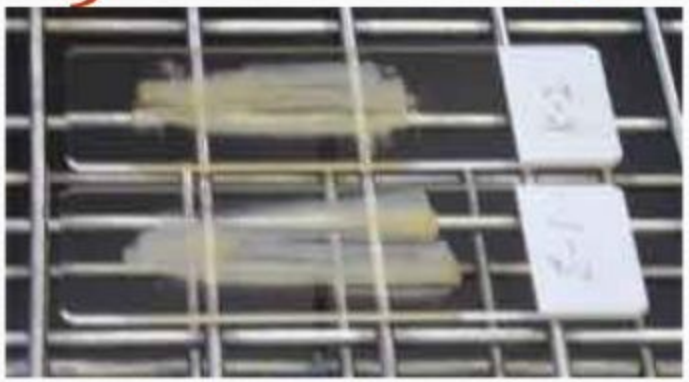
3



4



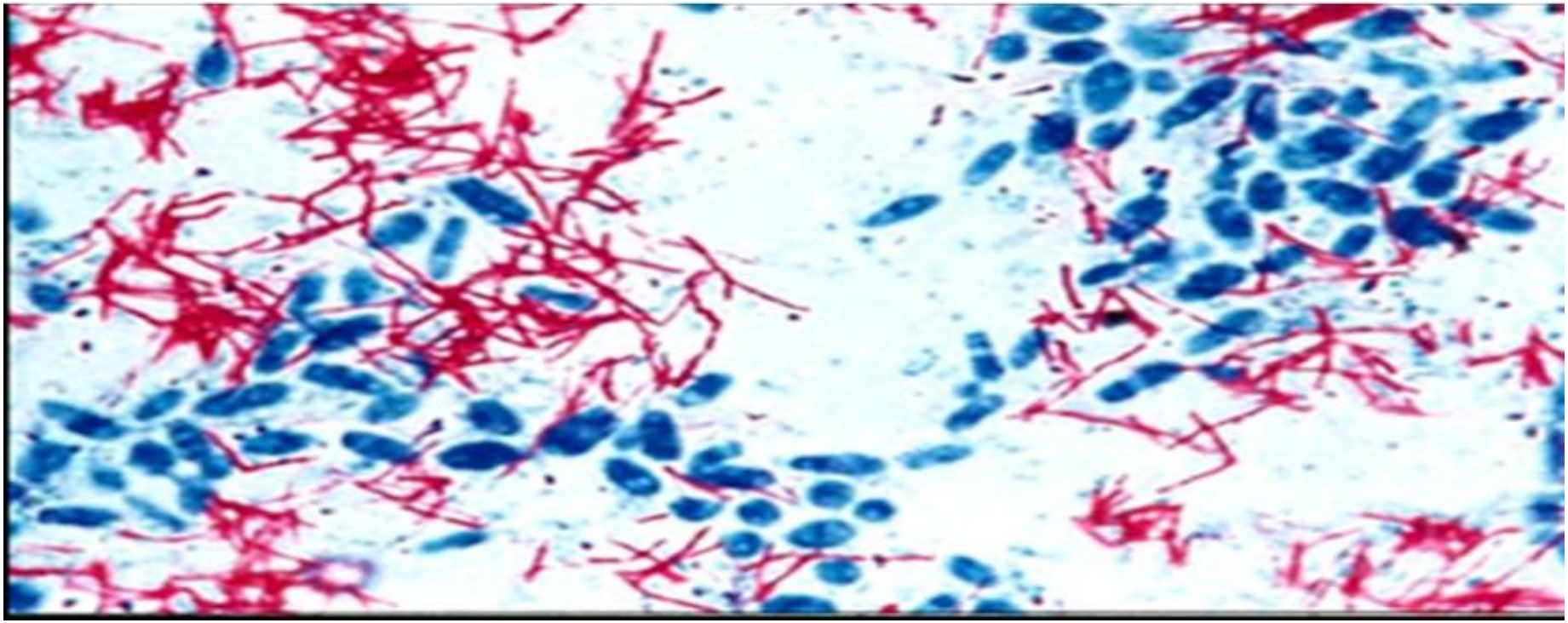
5



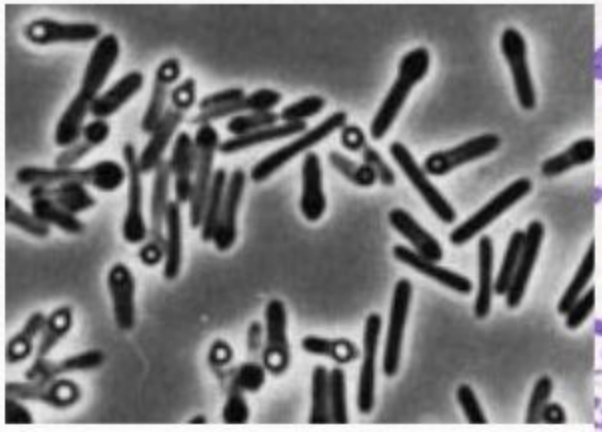
6

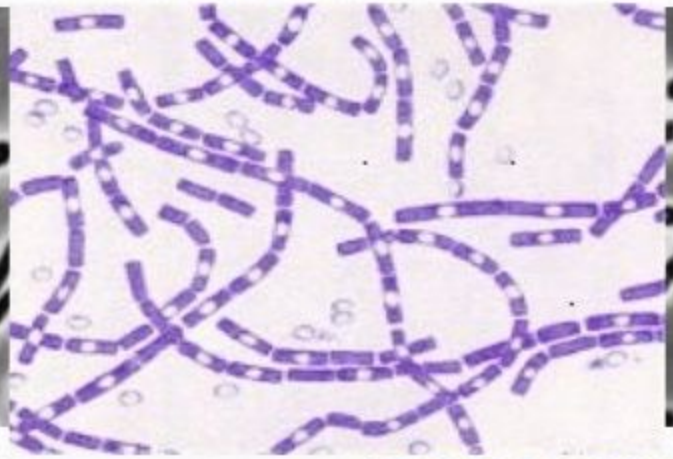
7

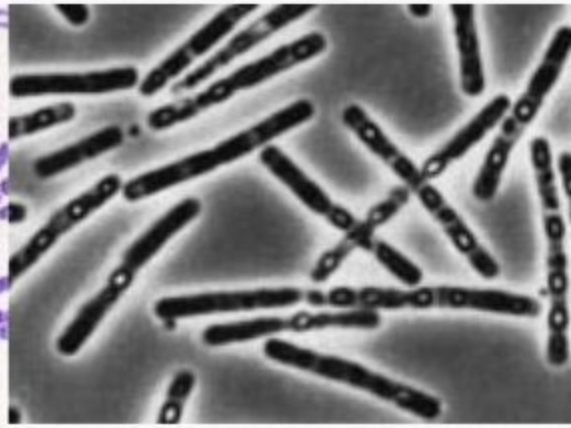
Микобактерии ТБ в мокроте
Окраска по Цилю-Нильсену

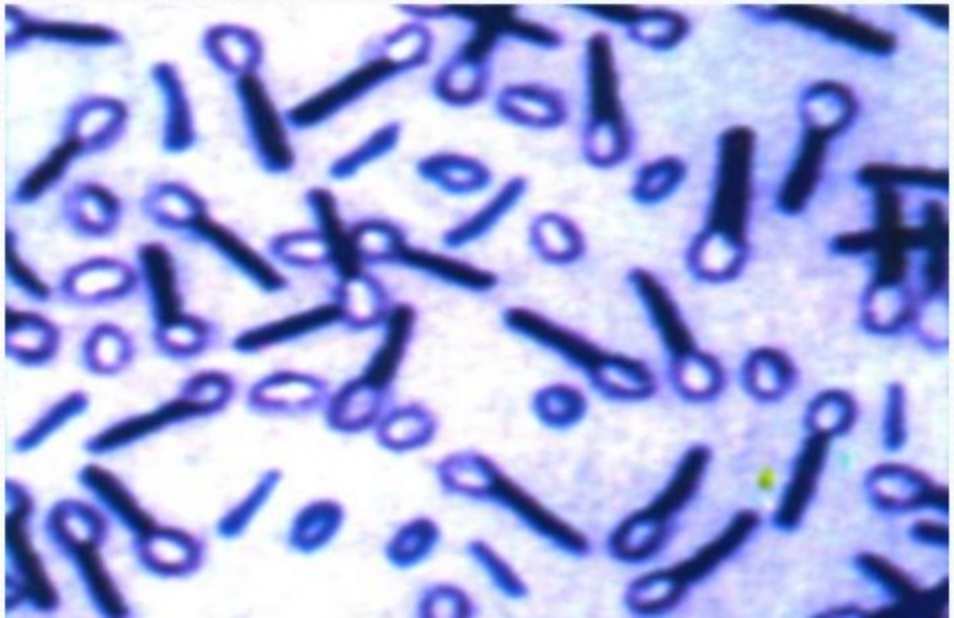


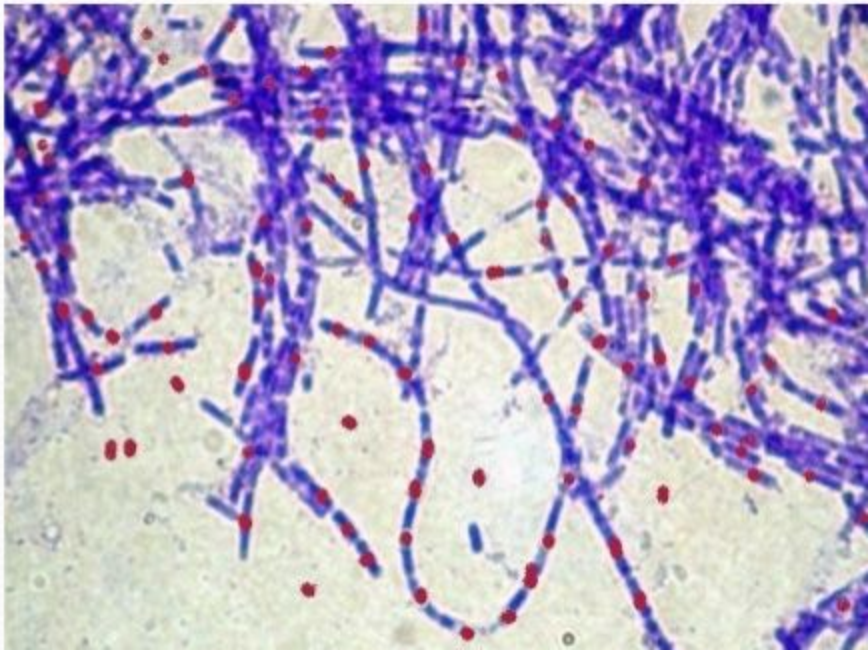
Bacterial spores



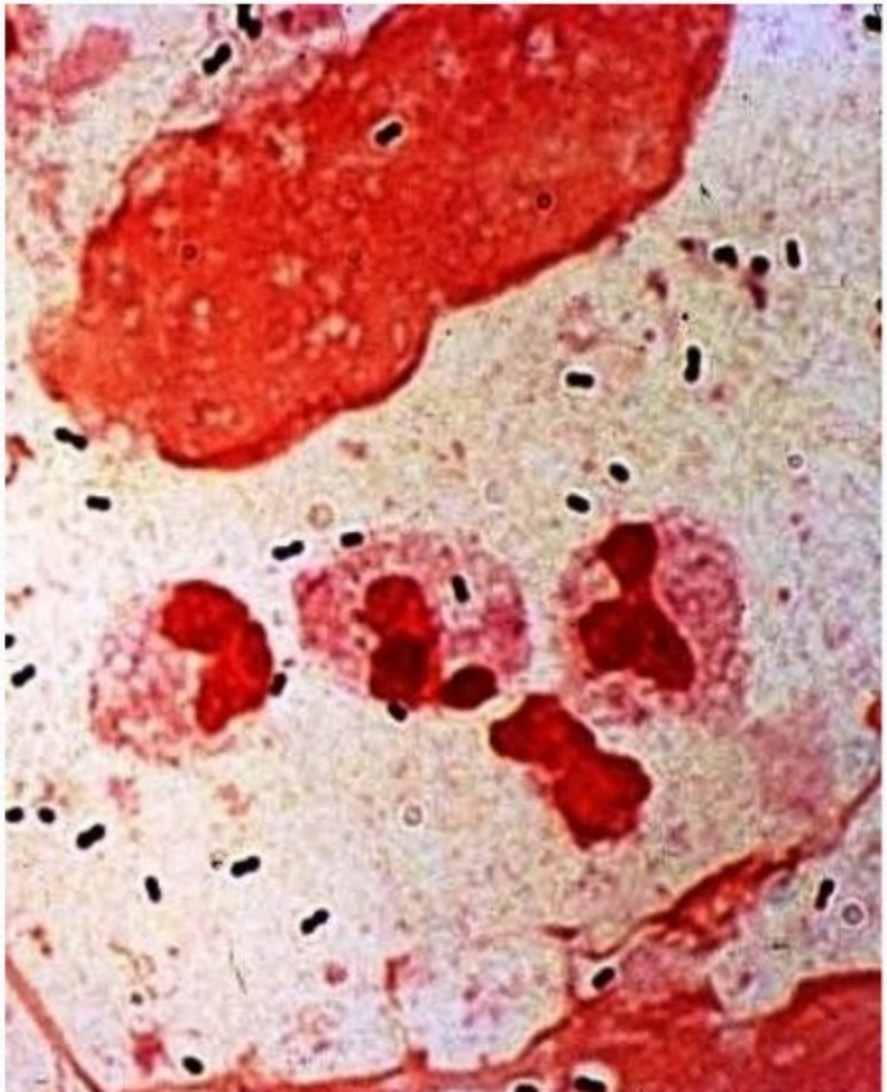


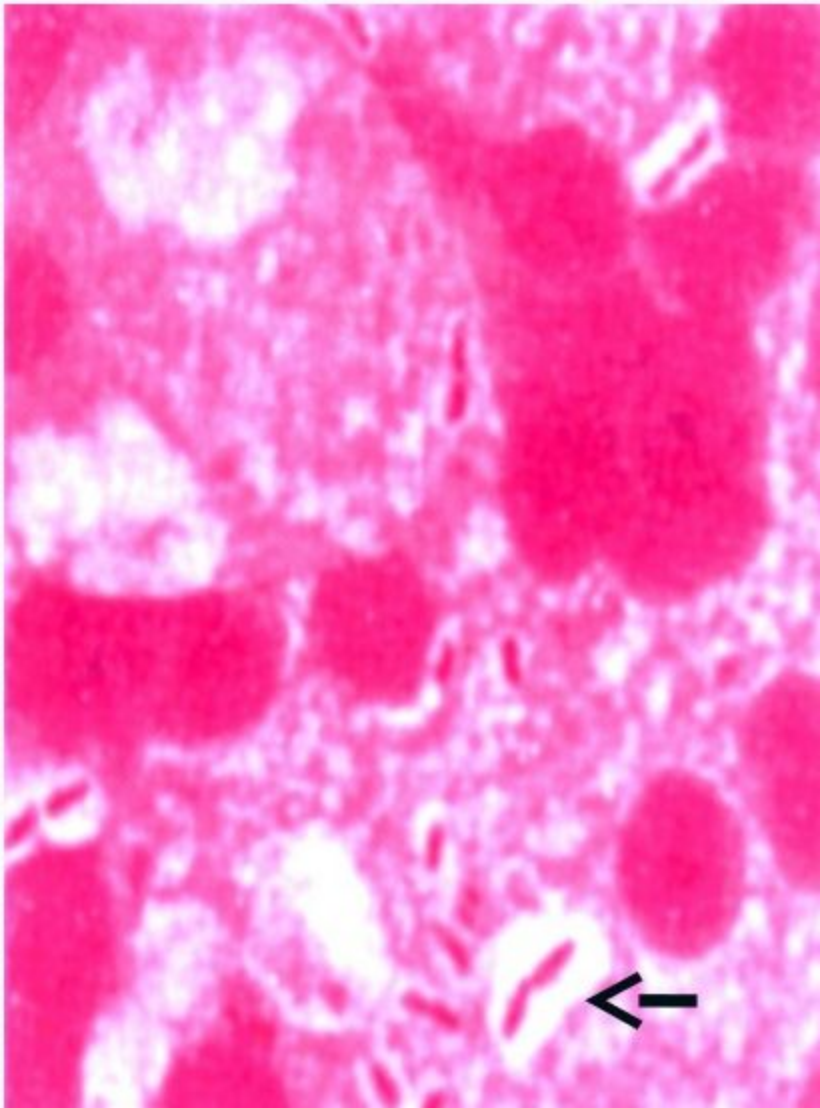






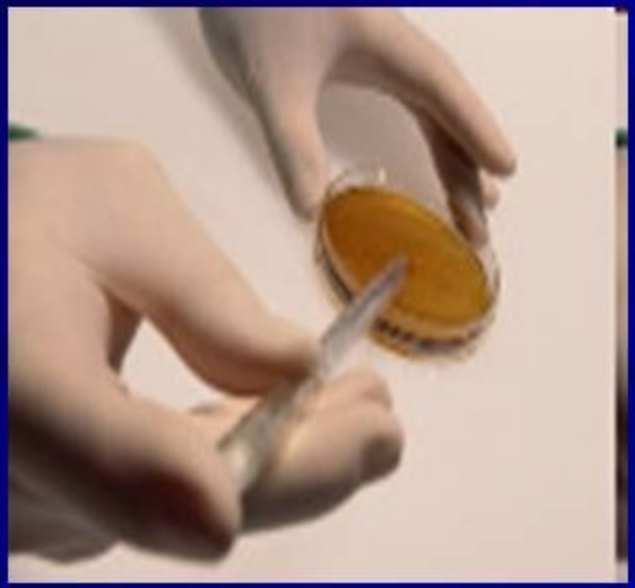
Bacterial capsule



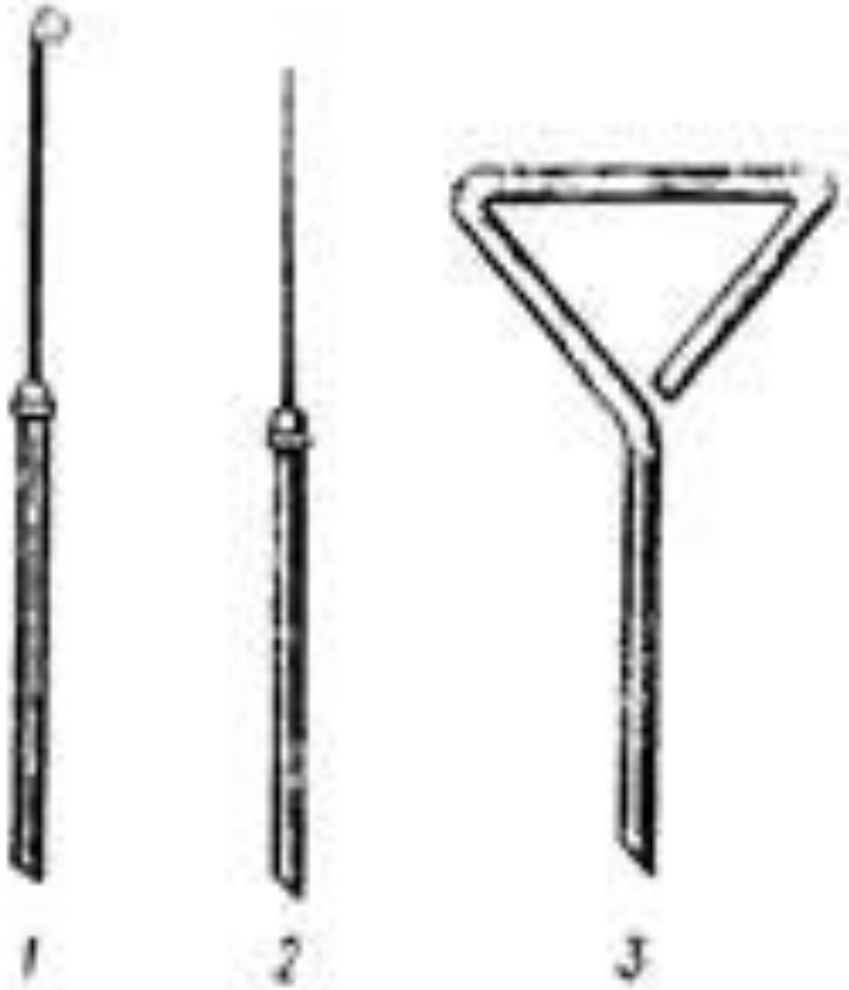


МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ (БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ) МЕТОД

- «золотой стандарт» микробиологической диагностики, результаты микробиологических исследований позволяют точно установить факт наличия возбудителя в исследуемом материале.



Идентификацию чистых культур проводят до вида микроорганизма.


1
2
3

Питательные среды для культивирования бактерий

Для выделения чистых культур патогенных бактерий применяют оптимальные для их роста питательные среды с фиксированным pH. Большинство бактерий способно расти на различных питательных средах; исключение составляют хламидии и риккетсии, не растущие in vitro вне клеточных культур. Используемая среда должна содержать:

- Универсальные источники азота и углерода — пептоны(белковые гидролизаты содержат полный набор аминокислот,пептиды),
- Универсальные источники витаминов и микроэлементов — экстракты белков животного или растительного происхождения и белковые гидролизаты.
- pH среды.
- В некоторых случаях жизнедеятельность

бактерий сопровождается сдвигом pH в кислую или щелочную сторону, что требует внесения в среды различных буферных систем (обычно применяют фосфатный буфер). Сбалансированные среды отличают высокая буферность и стабильный оптимум pH.

- Важно также создание оптимальной концентрации O_2 и CO_2. ;

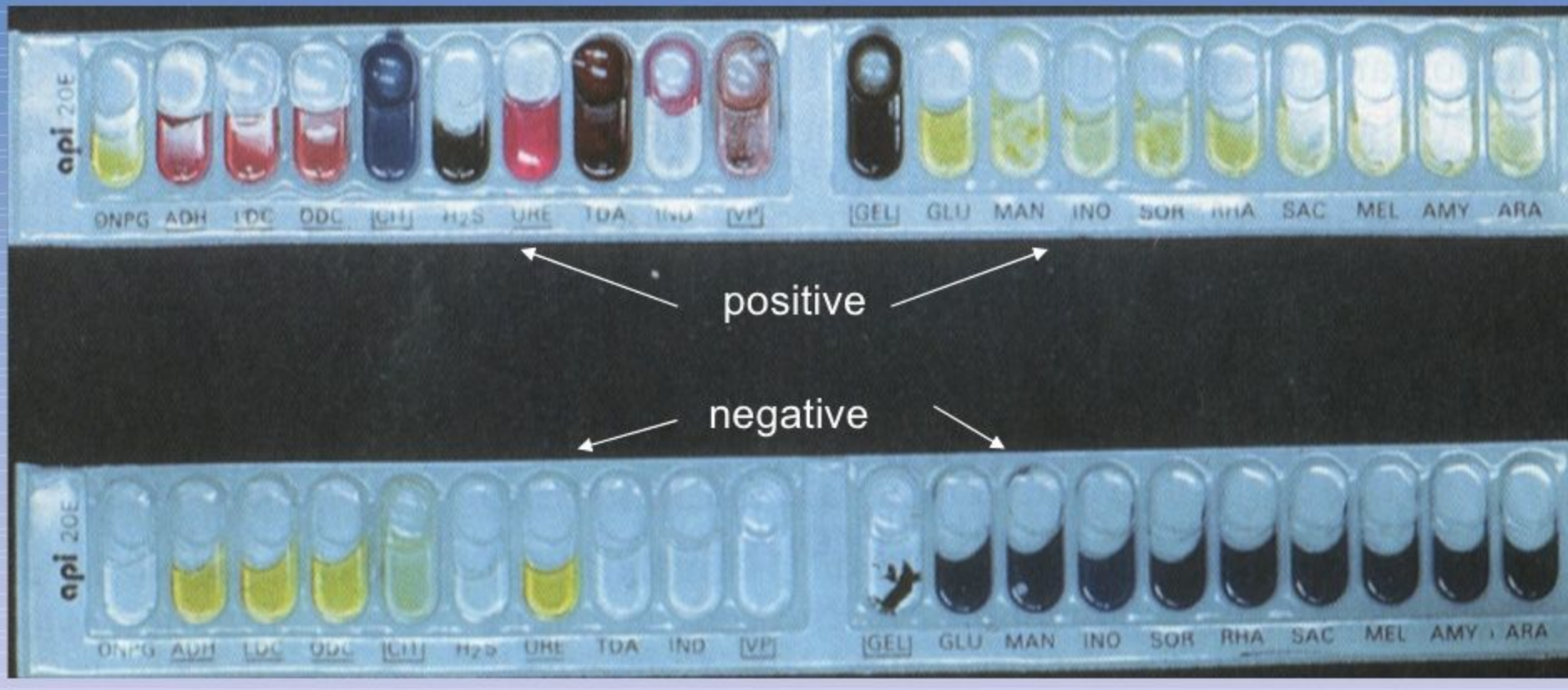
Посев по Gold

Хромогенная среда

Наборы мультимикротестов

— пластиковые планшеты, в лунки которых помещены различные субстраты и индикаторы. В лунки вносят различные разведения бактерий и инкубируют при 37 °С. На практике используют тесты RapID NH для идентификации нейссерий и гемофилов, RapID E для энтеробактерий и др., позволяющие получить результаты не позднее 4-8 ч.

Rapid Tests



ONPG (β galactosidase); ADH (arginine dihydrolase); LDC (lysine decarboxylase) ODC (ornithine decarboxylase); CIT (citrate utilization); H_2S (hydrogen disulphide production); URE (urease); TDA (tryptophan deaminase); IND (indole production) VP (Voges Proskauer test for acetoin); GEL (gelatin liquefaction); the fermentatio of glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA sucrose (SAC); Melibiose (MEL), amygdalin (AMY), and arabinose (ARA); and OX

Автоматические системы идентификации бактерий

- Автоматические системы идентификации бактерий позволяют быстро (на 24-48 ч быстрее обычных методов) получить информацию о виде возбудителя заболевания и его чувствительности к антимикробным препаратам. В настоящее время наибольшее распространение получили системы типа Microscan и Vitek.

Automated Methods

Automated systems commonly used in North America.

- ✓ Vitek/Vitek2 (BioMérieux)
- ✓ Phoenix (Becton Dickinson) &
- ✓ Baxter Microscan (Dade Behring)

- ✓ All systems include methods based on the principle of micro broth dilution tests for methicillin/oxacillin susceptibility and are generally reported to be reliable for *S. aureus* although a small number of incorrect results, mostly false resistance, have been reported.

Системы Vitek

- . В этой системе применяют один тип планшетов с тридцатью лунками.В каждую лунку автоматически вносится суспензия бактерий с известной концентрацией микробных тел. Идентификация микроорганизмов (гемофилы, нейссерии, дрожжи и анаэробы) основана на турбидометрии реакционной среды в лунке. В зависимости от свойств микроорганизма время, необходимое для его идентификации, варьирует от 4-8 до 18 ч. Система полностью компьютеризирована и работает автоматически.

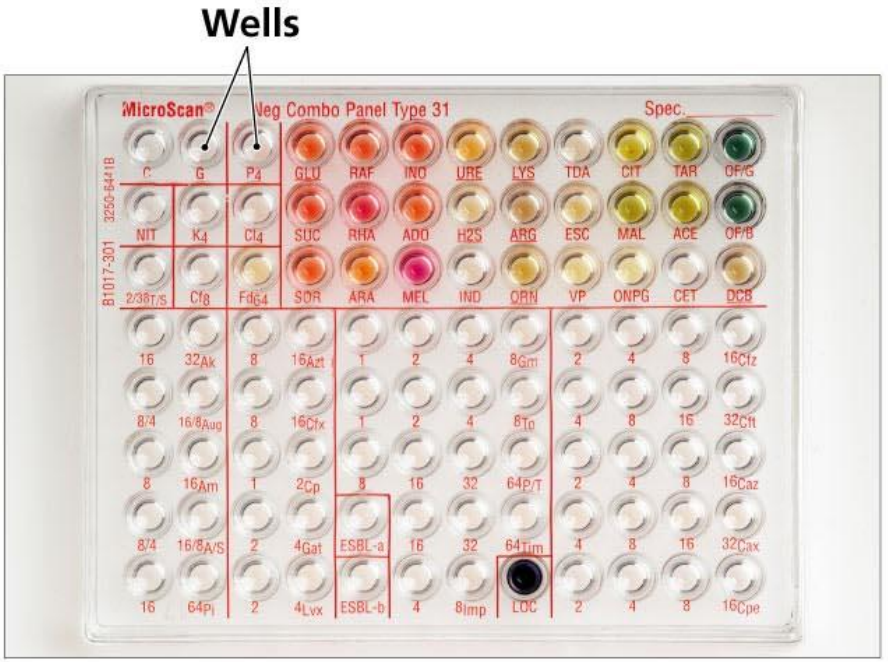
VITEK

Системы Microscan

- Используют турбидиметрические, колориметрические и флюоресцентные методы идентификации бактерий.
- Системы состоят из комплектов пластиковых планшетов, содержащих различные субстраты.
- Грамположительные и грамотрицательные бактерии дифференцируют с помощью флюоресцирующих субстратов (время анализа — 2 ч).
- Для идентификации гемофилов, анаэробов и дрожжей используют хромогенные субстраты, изменяющие свою окраску (время анализа — 4-6 ч).
- Минимальные ингибирующие концентрации различных антибиотиков определяют по изменению оптической плотности.
- Система компьютеризирована и автоматически проводит все необходимые расчёты.

Системы Microscan

(a) MicroScan instrument



(b) MicroScan® panel

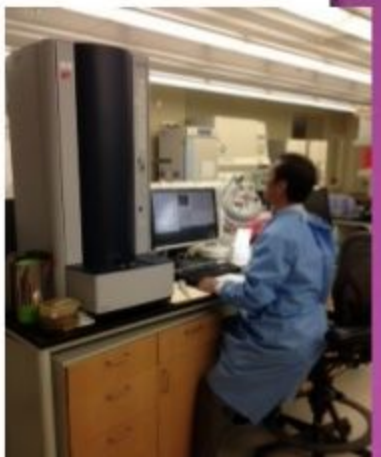
Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

BD Phoenix™
НОВОЕ *направление* в автоматизированной микробиологии

BD
Helping all people live healthy lives
MyShared

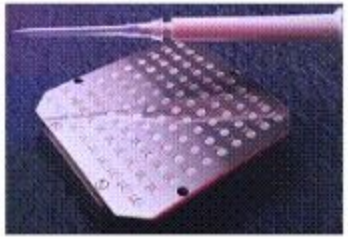
WHAT NEW METHODS ARE AVAILABLE? TWO COME TO MIND

- **16S rRNA Gene Sequencing**
  - Accurate and precise but it is not ready for prime time
  - Currently labor intensive and far too expensive for routine use in the clinical microbiology laboratory ($$/isolate)
- **MALDI-TOF Mass Spectrometry**
  - Provides accurate and extensive identification information
  - Not labor saving but very inexpensive to do daily testing ($0.50/isolate)
  - Instruments in the $250,000 – $350,000 range!



MALDI-TOF INSTRUMENTS

Plate insertion

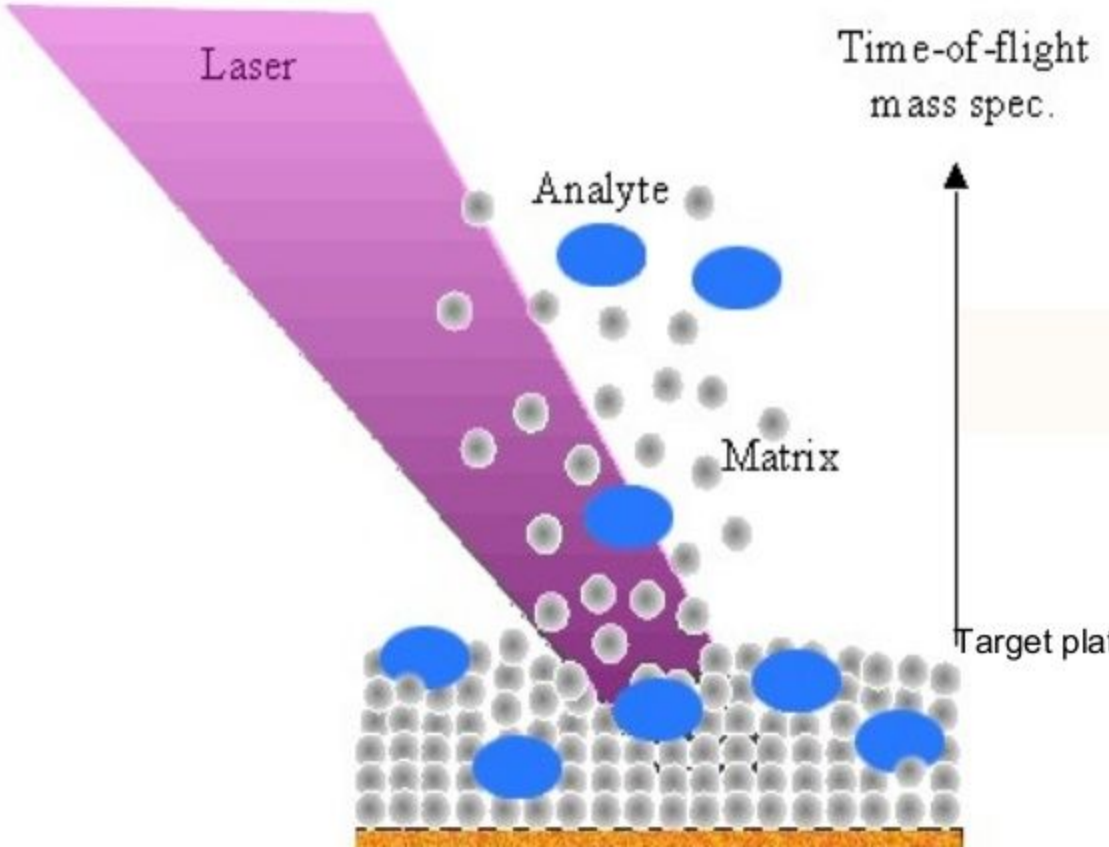


Two instruments currently:
Bruker MALDI Biotyper
Vitek MS

Target plate is positioned in instrument

HOW DOES THIS THING WORK?

- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
- MALDI

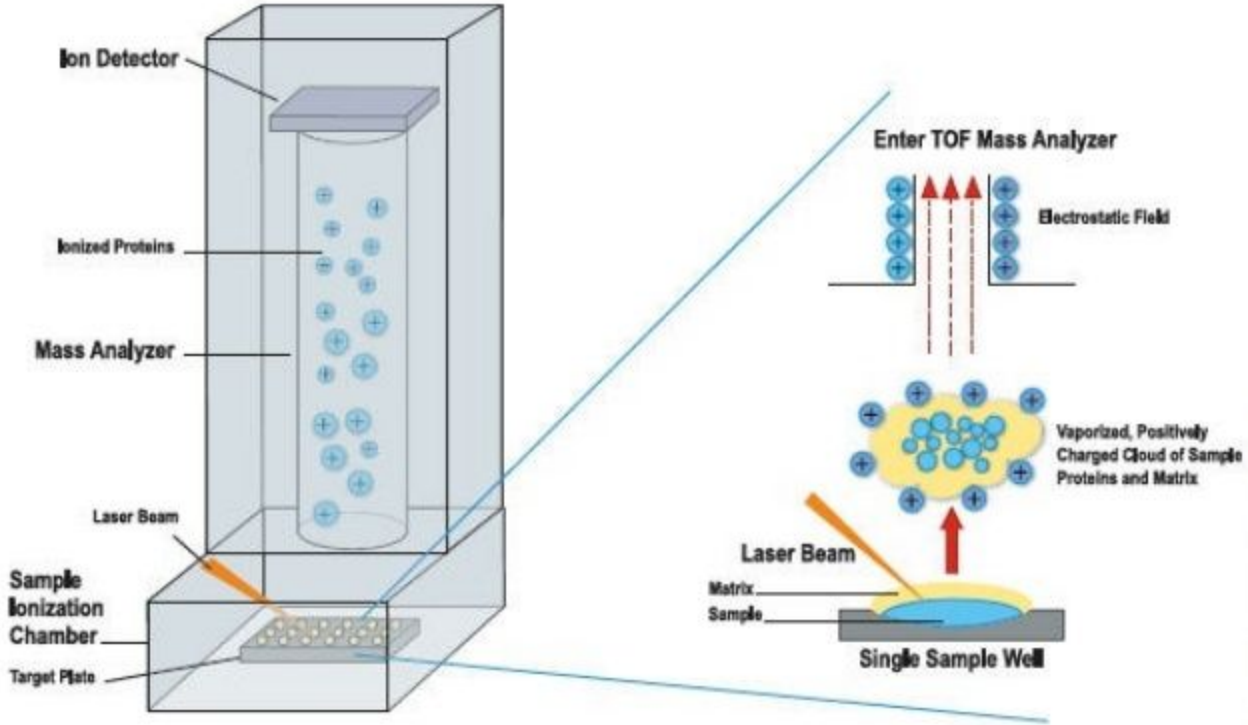


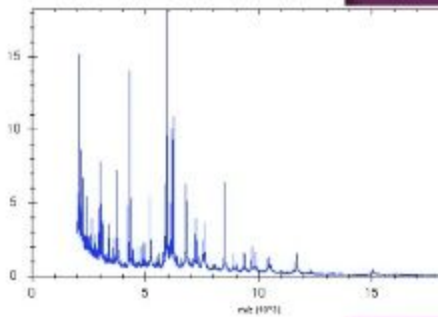
Desorption: Matrix solution absorbs the UV laser light with ablation of the top layer of the matrix, this leads to a hot plume containing many molecules

Ionization: or Protonation occurs in the hot plume creating single and multiply charged ions

Time of Flight (TOF)

Based on Mass and Charge of Proteins





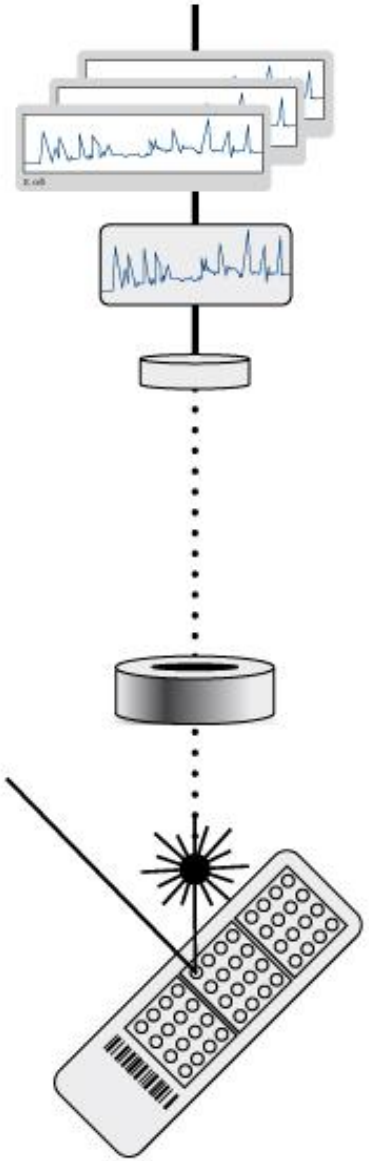
Organism	Genus-Level Cutoff Value	Spe Cut
Bacteria* GPC and GNB	≥1.700	≥2.0
Non-*diphtheriae Corynebacterium* species	≥1.500	≥1.7
Yeast	≥1.500	≥1.7

Table 1. *Bruker Biotyper Score Cutoff Values For Genus- Species-Level Identification*

* For genus- or species-level identification to be considered correct, at le a 10% difference in scores is required between the top score and the sc next different organism.
Abbreviations: GPC, gram-positive cocci; GNB, gram-negative bacilli

Plots the Time of flight (TOF) based on measuring the size and charge of the proteins hitting the detector plate, creating peaks
The plot peaks detected on the detector plate are matched to the computer data base and develops and identification score

MALDI-TOF: прибор и принцип



ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

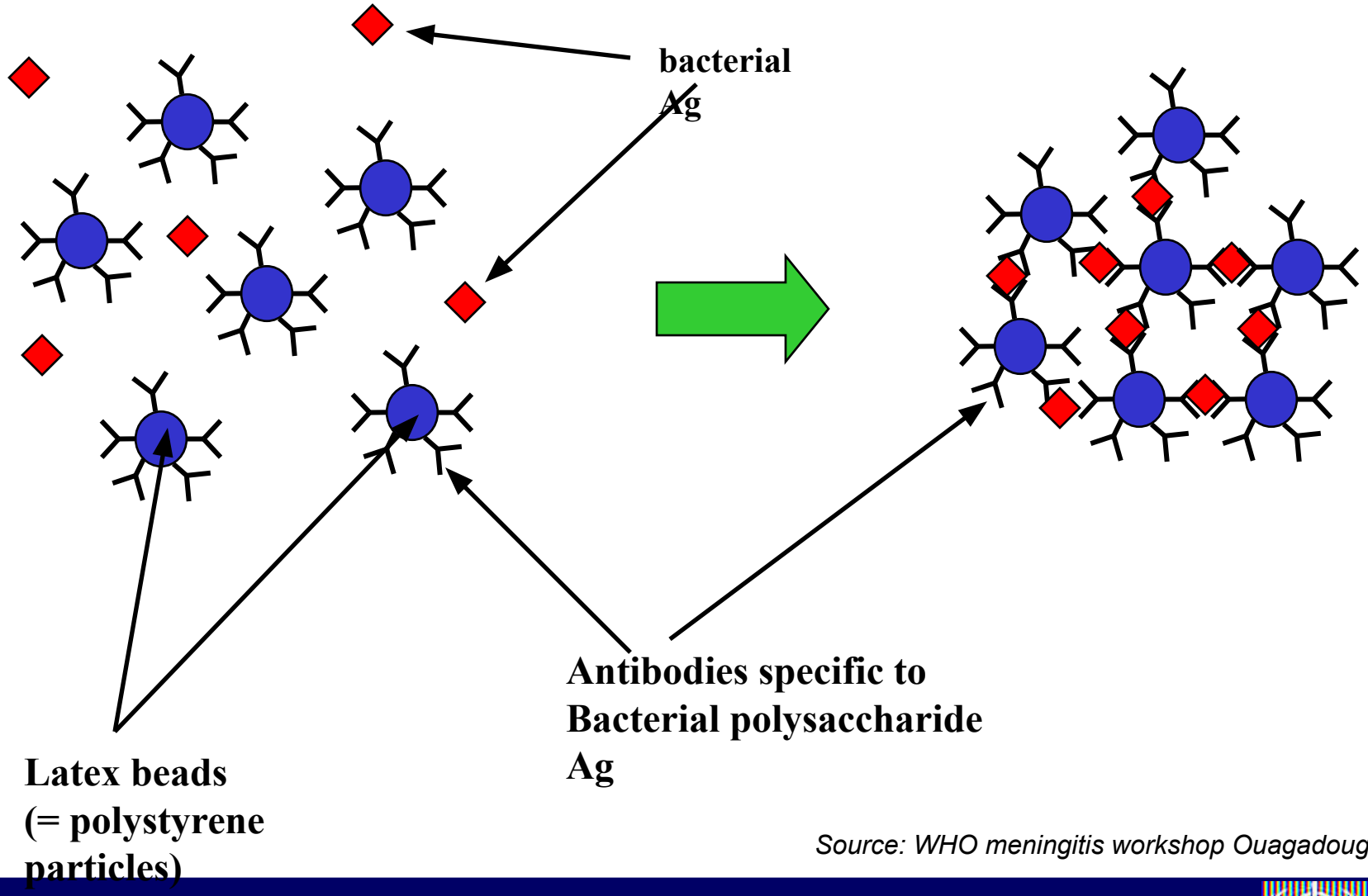
серологический

- **Выявления специфических АТ и АГ — важный инструмент в диагностике инфекционных заболеваний. Особую ценность они имеют в тех случаях, когда выделить возбудитель не представляется возможным.**

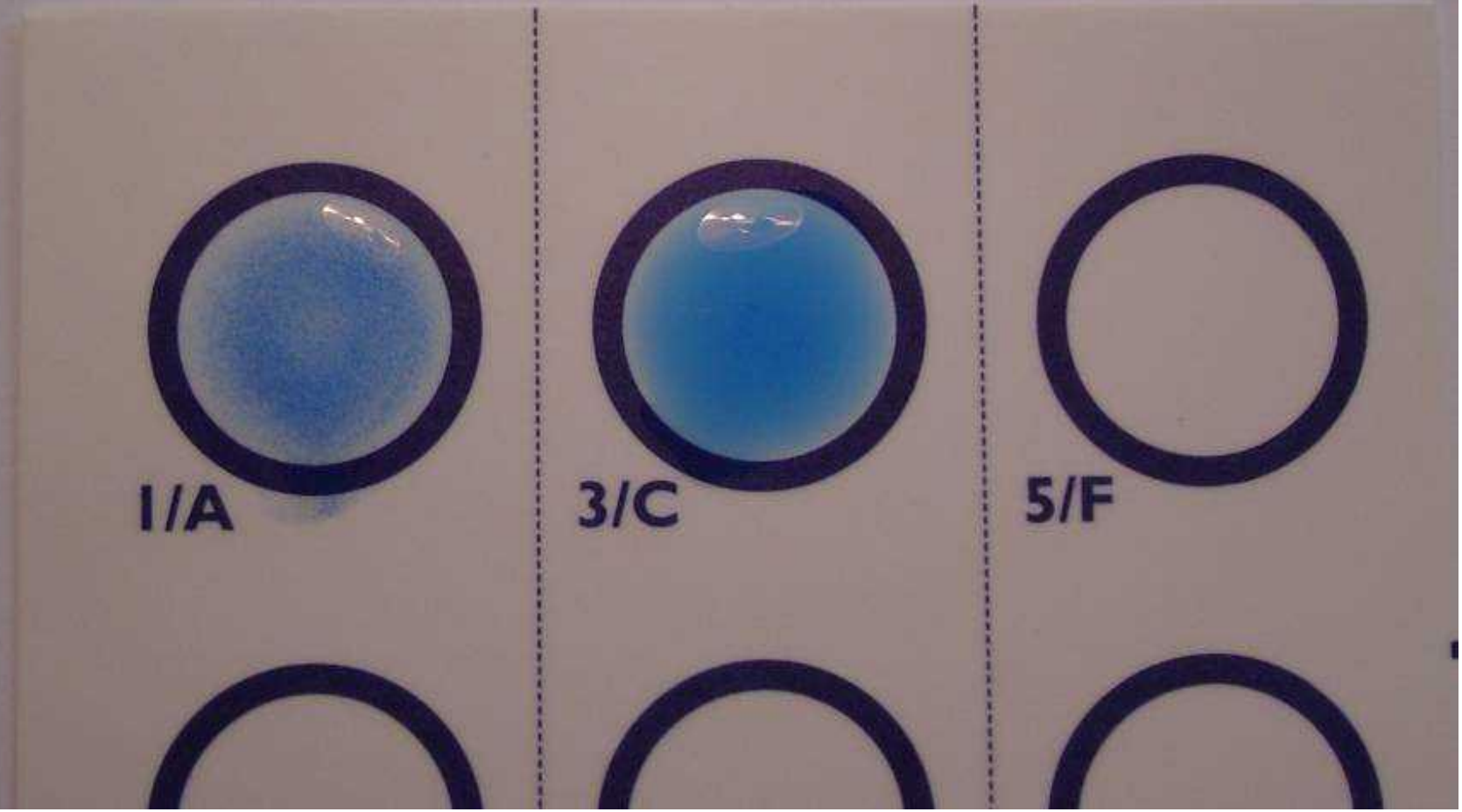
Серологические методы

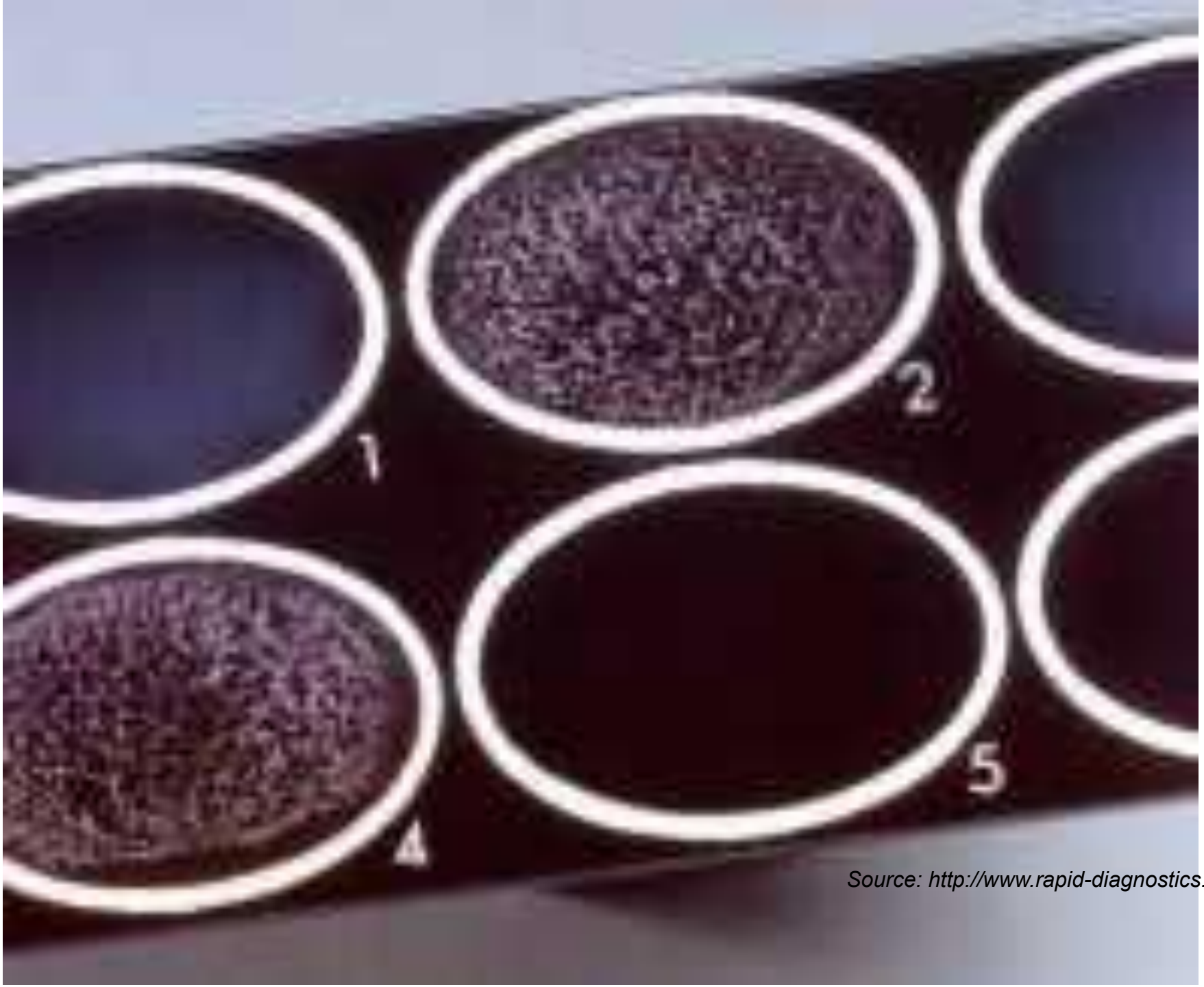
- Классические серологические реакции применяют для выявления антибактериальных АТ, а также для выявления и для идентификации бактериальных Аг.
- Среди современных методов наибольшее распространение нашли методы твердофазного ИФА и латекс-агглютинации.

Latex agglutination test



Source: WHO meningitis workshop Ouagadougou Sept 2004


1/A
3/C
5/F



Source: http://www.rapid-diagnostics.org

TABLE 6-3 Sensitivity of various immunoassays

Assay	Sensitivity* (μg antibody/ml)
Precipitation reaction in fluids	20–200
Precipitation reactions in gels	
Mancini radial immunodiffusion	10–50
Ouchterlony double immunodiffusion	20–200
Immunoelectrophoresis	20–200
Rocket electrophoresis	2
Agglutination reactions	
Direct	0.3
Passive agglutination	0.006–0.06
Agglutination inhibition	0.006–0.06
Radioimmunoassay (RIA)	0.0006–0.006
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	~0.0001–0.01
ELISA using chemiluminescence	~0.00001–0.01†
Immunofluorescence	1.0
Flow cytometry	0.006–0.06

*The sensitivity depends on the affinity of the antibody used for the assay as well as the epitope density and distribution on the antigen.
†Note that the sensitivity of chemiluminescence-based ELISA assays can be made to match that of RIA.

SOURCE: Updated and adapted from N. R. Rose et al., eds., 1997, *Manual of Clinical Laboratory Immunology,* 5th ed., American Society for Microbiology, Washington, DC.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

аллергологический

- Антигены многих возбудителей обладают сенсибилизирующим действием, что используют для диагностики инфекционных заболеваний, а также при проведении эпидемиологических исследований.

Наиболее известна **проба Манту**, используемая как для диагностики туберкулёза, так и для оценки невосприимчивости организма к возбудителю.

Аллергологические методы

- Сенсибилизирующей активностью обладает ограниченное количество бактериальных Аг. Поэтому метод кожных проб применяют лишь *при диагностике туберкулёза, сапа, мелиоидоза, бруцеллёза и туляремии*.

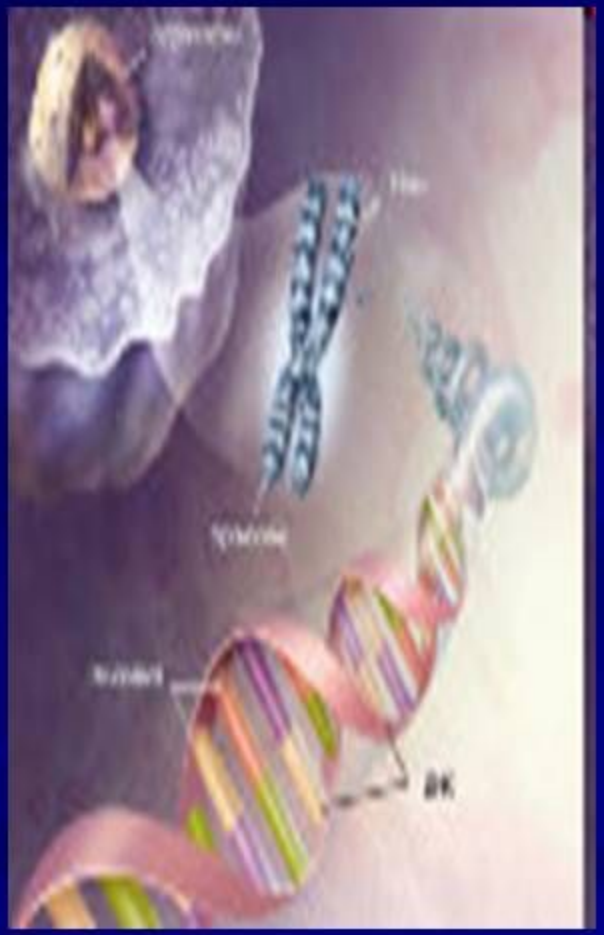
БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

- Моделирование экспериментальных инфекций у лабораторных животных — важный инструмент изучения патогенеза заболевания и характера взаимодействий микроорганизма и макроорганизма.

Биологические методы

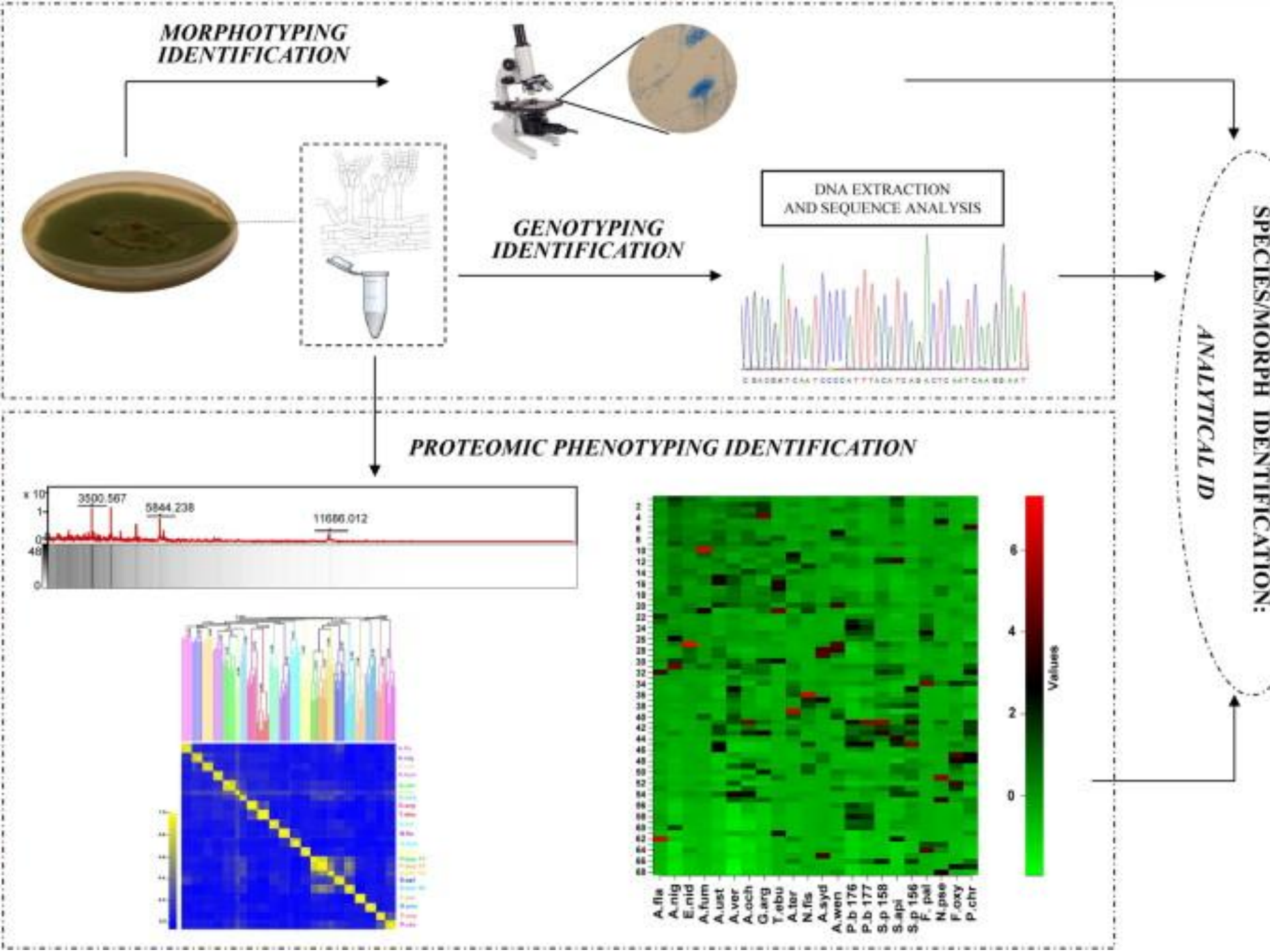
- Выделение патогенных бактерий от заражённых животных имеет большую диагностическую ценность, особенно при контрольном применении иммунных сывороток. Цель подобных манипуляций — уменьшение времени проведения бактериологических исследований.
- При диагностике инфекций, вызванных эффектами токсина (например, ботулизма или сибирской язвы), материал, предположительно содержащий возбудитель и токсин, помещают в физиологический раствор, а затем фильтруют через бумажные фильтры, натёртые тальком (последний хорошо адсорбирует токсин). Смывами с фильтров заражают чувствительных животных.
- При диагностике инфекций, обусловленных различными патогенными свойствами самого возбудителя, лабораторных животных заражают микробной взвесью.
- Для диагностики бактериальных инфекций используют различных животных, так как проявляют видовую восприимчивость к различным этиологическим агентам.
- Мыши чувствительны к пневмококкам, нейссериям, пастереллам, клостридиям, листериям, возудителям сибирской язвы, туляремии, чумы, ботулизма, столбняка, коклюша и мелиоидоза
- Крысы чувствительны к возбудителям туберкулёза (бычьего типа), мелиоидоза и др.
- Морские свинки чувствительны к возбудителям туберкулёза (человеческого типа), дифтерии, сапа, чумы, бруцеллёза, туляремии, холеры, газовой гангрены, ботулизма, псевдотуберкулёза и др.
- Кролики чувствительны к стафилококкам, стрептококкам, нейссериям, Mycobacterium bovis, возбудителям газовой гангрены, сибирской язвы, ботулизма, столбняка и др.
- Кошки. Животных заражают стафилококками, возбудителями сапа, коклюша и др.
- Обезьяны. Их заражают шигеллами, листериями, сальмонеллами, возбудителями мелиоидоза, коклюша и др.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД



- Одним из самых современных методов молекулярной биологии является метод ПЦР – полимеразная цепная реакция. Исследование методом ПЦР имеет ряд преимуществ, так как данный метод позволяет увеличивать (амплифицировать) в сотни раз участок ДНК возбудителя заболевания в исследуемом образце.

Метод ПЦР имеет высокую чувствительность и абсолютную специфичность.


MORPHOTYPING IDENTIFICATION
GENOTYPING IDENTIFICATION
DNA EXTRACTION AND SEQUENCE ANALYSIS
PROTEOMIC PHENOTYPING IDENTIFICATION
3500.567
5844.238
11686.012
Values
A.fla
A.nig
E.nid
A.fum
A.ust
A.ver
A.och
G.arg
T.ebu
A.ter
N.fis
A.syd
A.wen
P.b 176
P.b 177
S.p 158
S.api
S.p 156
F. pal
N.pse
F.oxy
P.chr
ANALYTICAL ID
SPECIES/MORPH IDENTIFICATION:

Основные вехи в развитии методов работы с ДНК

1869	Мишер выделяет ДНК из белых клеток крови
1944	Эвери доказывает, что ДНК является носителем генетической информации
1953	Уотсон и Крик открывают структуру ДНК (двойная спираль)
1955	Корнберг открывает ДНК-полимеразу
1961	Мармур и Доти открывают ренатурацию ДНК
1962	Арбер получает первые доказательства существования рестриктаз
1966	Ниренберг, Холли и Корана расшифровывают генетический код
1967	Геллерт открывает ДНК-лигазу
1972	Прочтён первый ген – ген белка оболочки бактериофага MS2
1972-1973	Ряд лабораторий развивают технологию клонирования ДНК
1975	Саузерн разрабатывает технологию переноса ДНК на фильтр с гибридизацией
1975-1977	Сэнгер и Баррел, а также Максам и Гилберт разрабатываю технолигии секвенирования ДНК
1981-1982	Пальмитер и Бринстер получают трансгенную мышь, Спрэдлинг и Рубин получают трансгенную дрозофилу
1982	Основана база последовательностей ДНК - GenBank

Основные вехи в развитии методов работы с ДНК

1985	Мюллис изобретает полимеразную цепную реакцию (ПЦР)
1987	Капеччи и Смитис разрабатываю технологию генных модификаций у мышей с использованием эмбриональных стволовых клеток
1989	Филдс и Сонг разрабатывают двугибридную систему дрожжей
1990	Липман создаёт алгоритм поиска гомологичных последовательностей - BLAST
1991	Худ и Хаикепиллер разрабатывают первый автоматический секвенатор
1995	Секвенирован первый геном (бактерия Haemophilus influenzae)
1996	Секвенирован геном дрожжей Saccharomyces cerevisiae
1996-1997	Разработаны первые ДНК-микрочипы
1997	Клонирована овечка Долли
1998	Секвенирован геном червя Caenorhabditis elegans
2001	Готов черновой вариант генома человека
2003	Секвенирован геном человека
2010	В лаборатории Вентера создана первая живая синтетическая клетка

Применение молекулярно-генетических методов в диагностике инфекционных болезней

Генетические методы применяются :

- для обнаружения микроба в исследуемом материале без выделения чистой культуры,
- для определения таксономического положения микроба,
- для проведения внутривидового типирования.

Гибридизация нуклеиновых кислот

- Наиболее распространены методы гибридизации нуклеиновых кислот. Принцип методов обусловлен способностью ДНК (и РНК) специфически соединяться (гибридизироваться) с комплементарными фрагментами искусственно созданных нитей ДНК (и РНК), меченных изотопами или ферментами (пероксидазой или щелочной фосфатазой). В дальнейшем образцы исследуют различными методами (например, ИФА).
- Метод гибридизации в растворах даёт наиболее быстрые результаты. Широкому внедрению метода препятствует проблема удаления не связавшихся нитей нуклеиновых кислот.
- Метод гибридизации на твёрдой основе и его сэндвич-модификация распространён больше. В качестве твёрдой основы служат мембраны из нитроцеллюлозы или нейлона. Не связавшиеся реагенты удаляют многократным отмыванием.

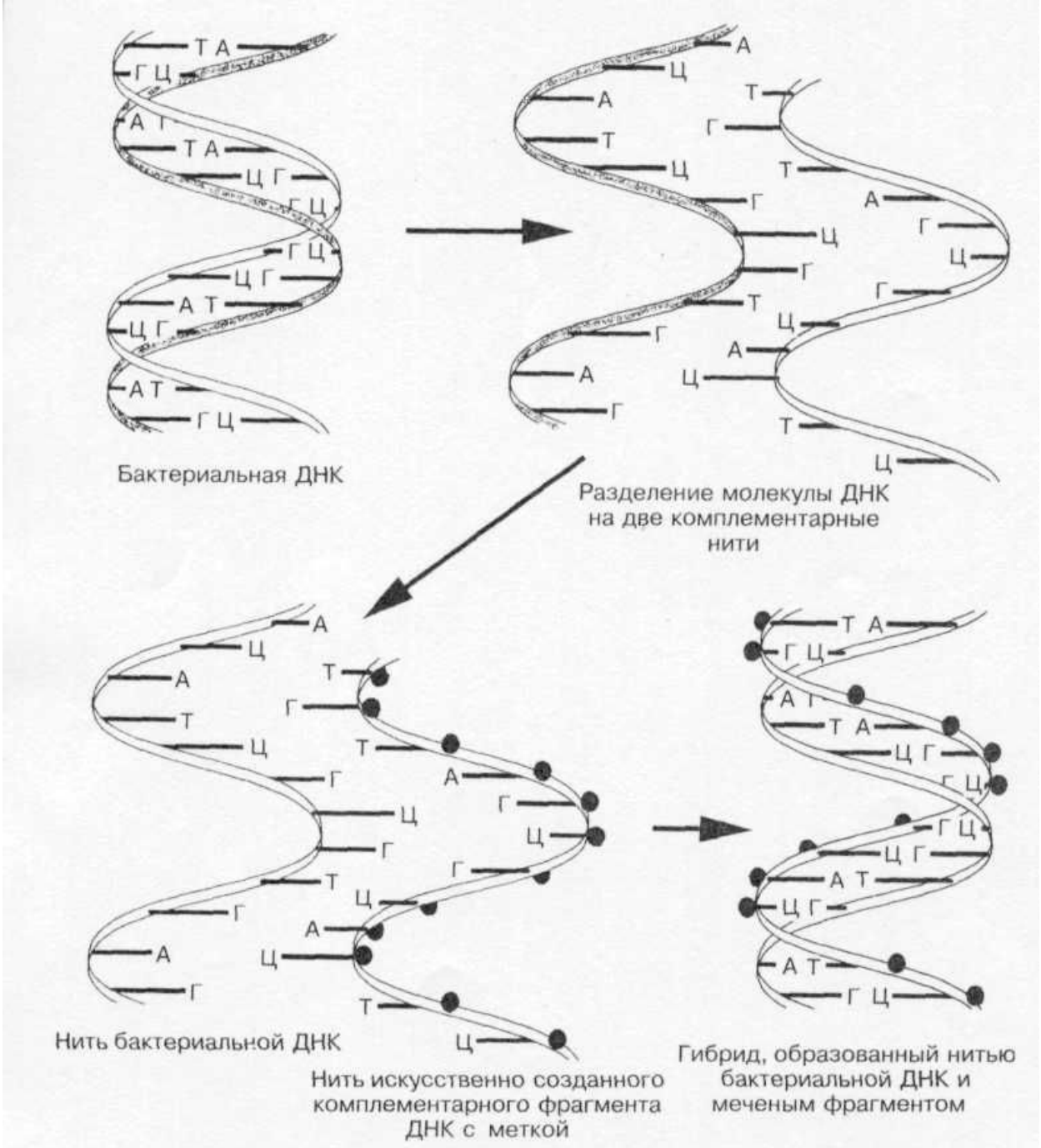


Рис. 11–17. Схема гибридизации нуклеиновых кислот.

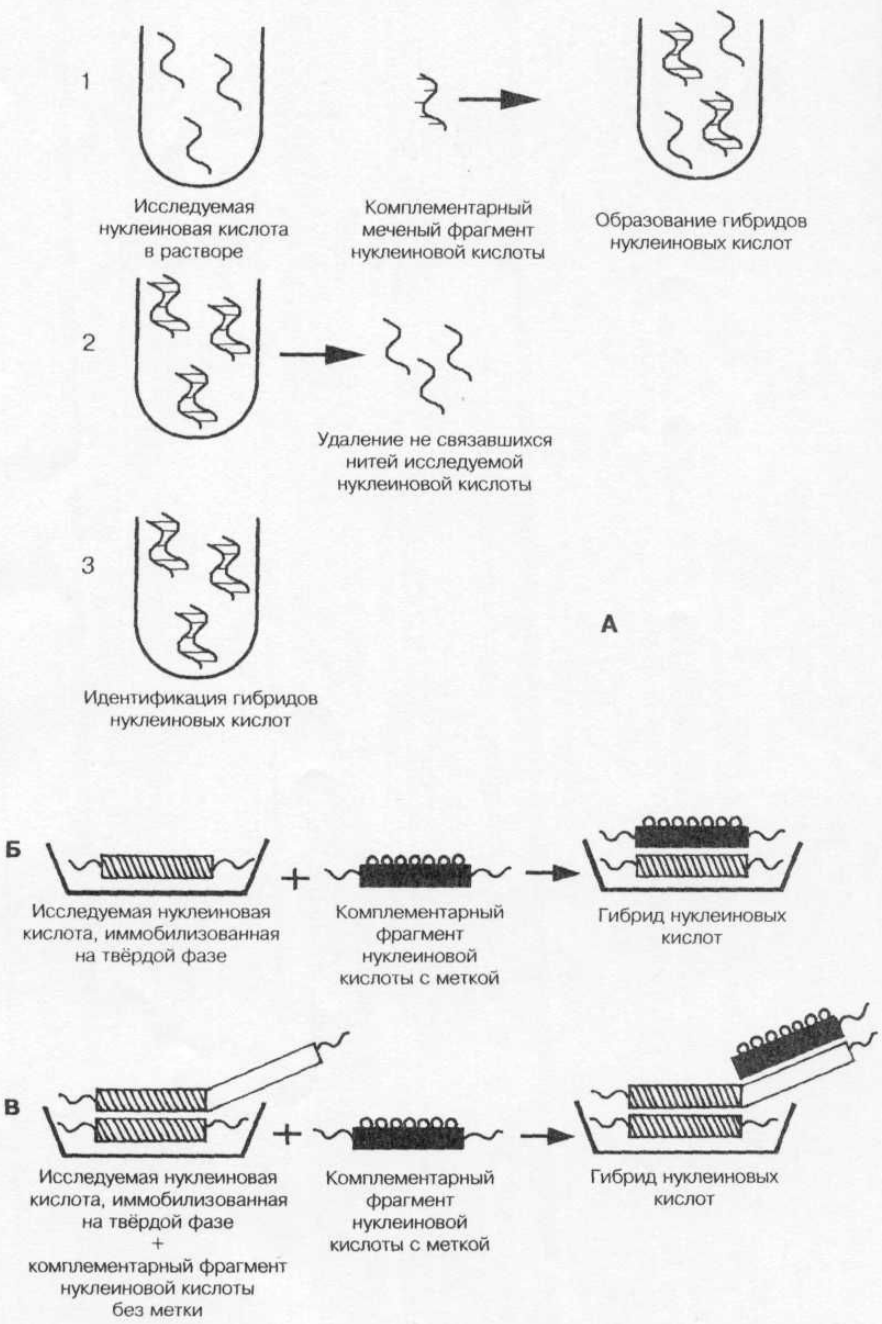


Рис. 11–18. Гибридизация нуклеиновых кислот: в растворах (А), на твёрдой основе (Б), сэндвич-гибридизация (В).

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

- Основу метода ПЦР составляет катализируемое ДНК-полимеразой многократное образование копий определённого участка ДНК.
- Первоначально проводят отжиг — термическое разделение двухнитевой молекулы ДНК на отдельные цепочки.
- Затем среду охлаждают и вносят праймеры (затравки), комплементарные нуклеотидным последовательностям обеих цепочек. Для запуска реакции применяют синтетические праймеры — олигонуклеотиды, состоящие из 10-20 нуклеоти-дов (например, дезоксинуклеотидтрифосфат), взаимодействующие с окончаниями последовательностей и образующие последовательности в 50-1000 оснований.
- Затем в среду вносят термостабильную taq-полимеразу (по названию бактерии Thermus aquaticus), что запускает образование вторичных копий цепей ДНК, после чего образующиеся двухнитевые молекулы ДНК снова подогревают. Образующиеся отдельные цепочки остужают, вносят праймеры и снова повторяют процедуру подогрева и охлаждения; поскольку tag-полимераза термостабильна, то необходимость в её повторном внесении отсутствует (рис. 1-19).
- ПЦР позволяет получить большие количества изучаемого фрагмента ДНК даже в том случае, если в распоряжении исследователя имеется всего лишь одна исходная молекула геномной ДНК.
- Идентификацию копий ДНК проводят методом электрофореза. Метод ПЦР лежит также в основе ДНК-идентификации личности, установления родства людей, выявления генов наследственных болезней и пр.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

– метод, позволяющий избирательно синтезировать большие количества определённых фрагментов ДНК

• «Полимеразная» - используется фермент ДНК-полимераза
• «Цепная» - состоит из повторяющихся циклов, количество ДНК с каждым циклом увеличивается в геометрической прогрессии

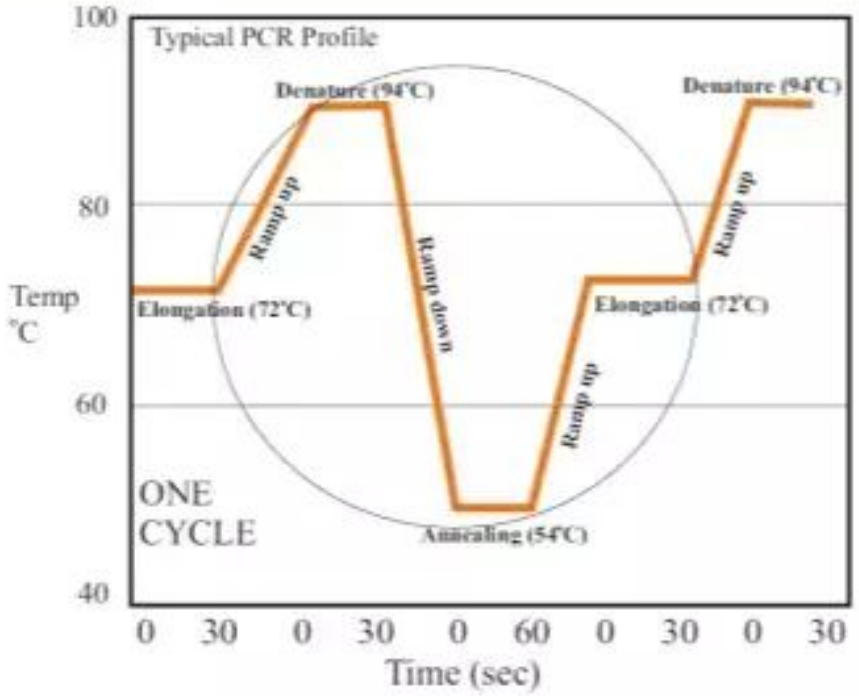
1983 г, Кэри Муллис

Компоненты ПЦР

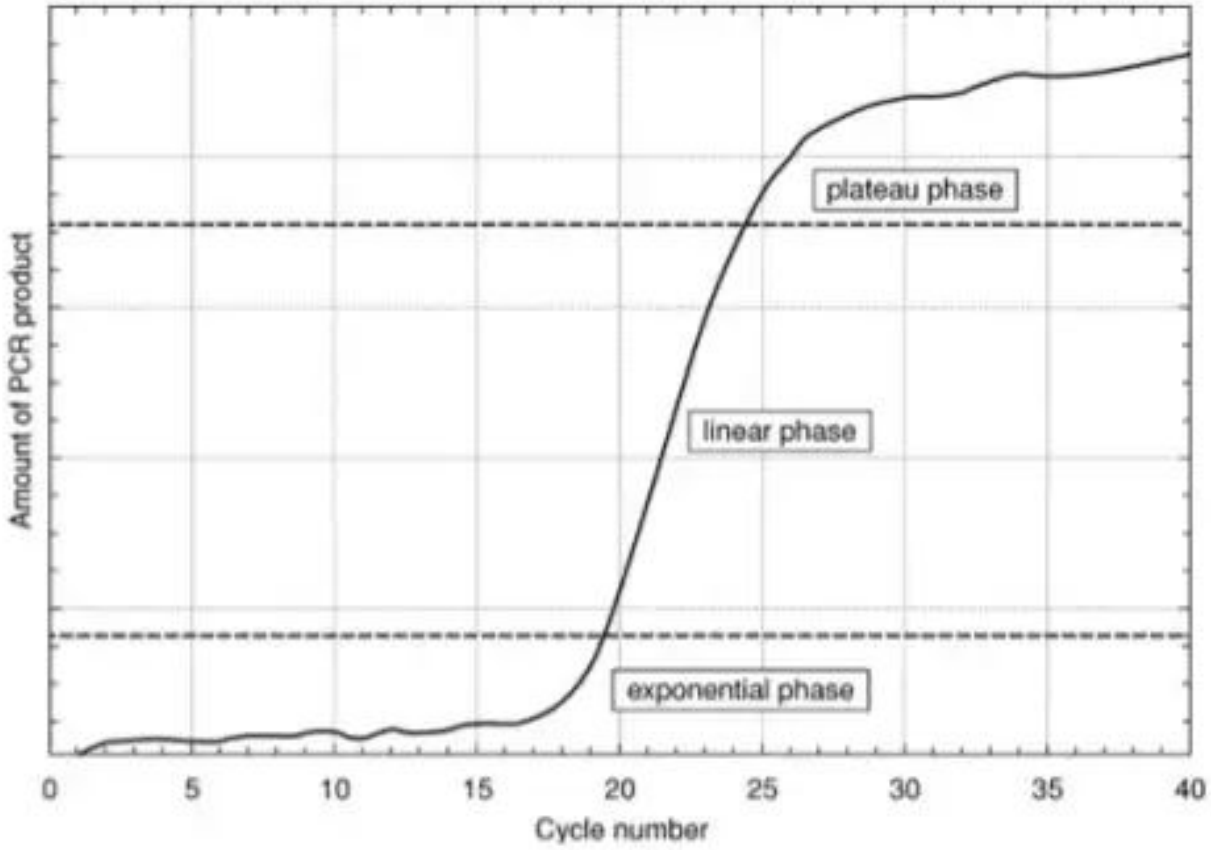
	Праймеры	Определяют амплифицируемый участок
	dNTP	«Строительный материал»
Буфер	KCl	Моновалентные катион необходим для оптимальной гибридизации праймеров
Буфер	Tris	Поддержание оптимального для ферментативной реакции pH
Буфер	$MgCl_2$	Бивалентный катион необходим для работы фермента
	Полимераза	Осуществляет синтез ДНК
	Матрица	Анализируемый образец ДНК

Этапы ПЦР

	Предварительная денатурация	~95^{0}C	1-10 мин
25-50 циклов	Денатурация	~95^{0}C	10-60 сек
	Отжиг	50-70^{0}C	10-60 сек
	Элонгация	68-72^{0}C	10-180 сек
	Финальная элонгация	68-72^{0}C	7-10 мин



Стадии ПЦР


plateau phase
linear phase
exponential phase
Amount of PCR product
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Cycle number

Амплификаторы

Термостатирование:

- твёрдый термоблок (элемент Пельтье)
- жидкость
- поток воздуха

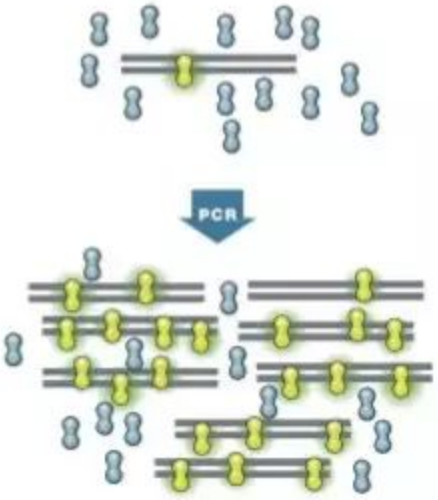
ПЦР в реальном времени

- одновременная амплификация и измерение количества продукта
- наличие флюоресцентного красителя в смеси
- наличие оптического блока в амплификаторе

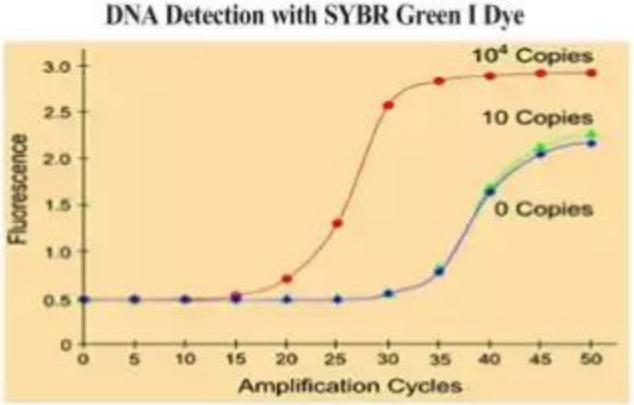
Системы детекции

1. Неспецифичные
   - интеркалирующие красители (SYBR Green и др.)
2. Специфичные
   - линейные разрушаемые пробы (TaqMan)
   - «молекулярные маячки» (beacons)
   - примыкающие пробы

SYBR Green

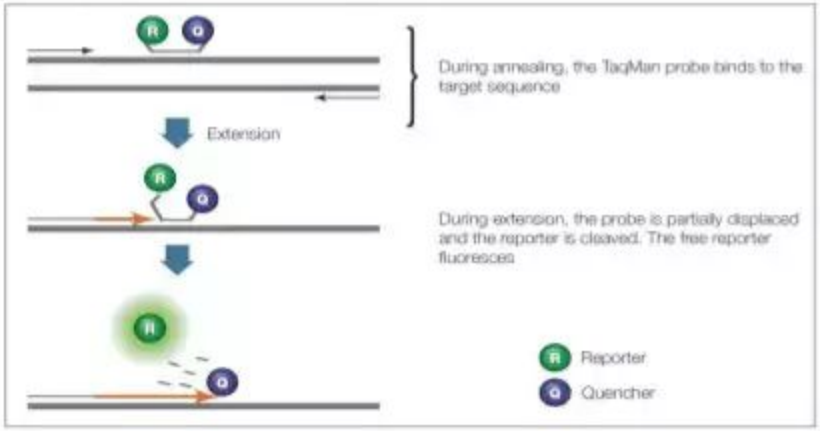

PCR

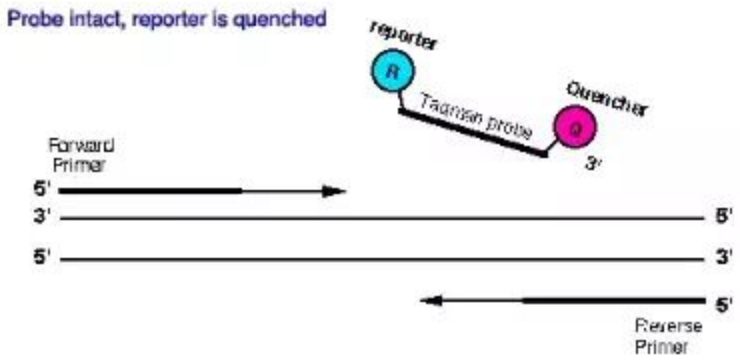
Unbound SYBR Green I
Bound SYBR Green I


DNA Detection with SYBR Green I Dye
10⁴ Copies
10 Copies
0 Copies
Fluorescence
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
Amplification Cycles

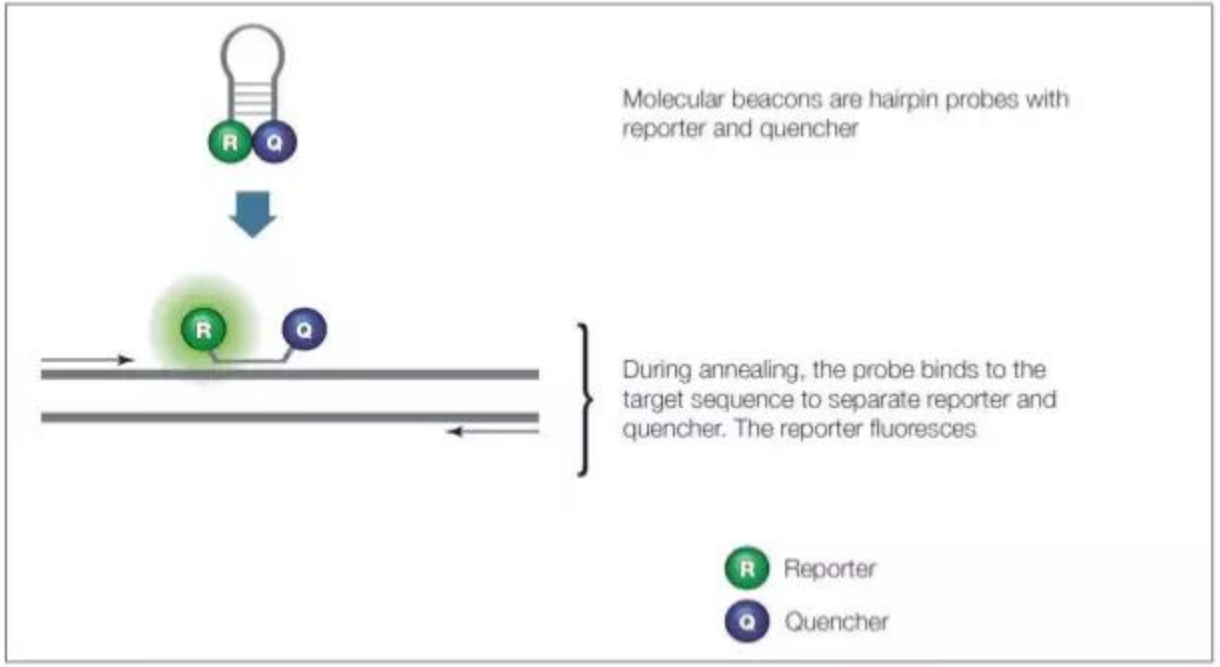
Линейные разрушаемые пробы

(TaqMan = Taq-polymerase + Pac-Man)

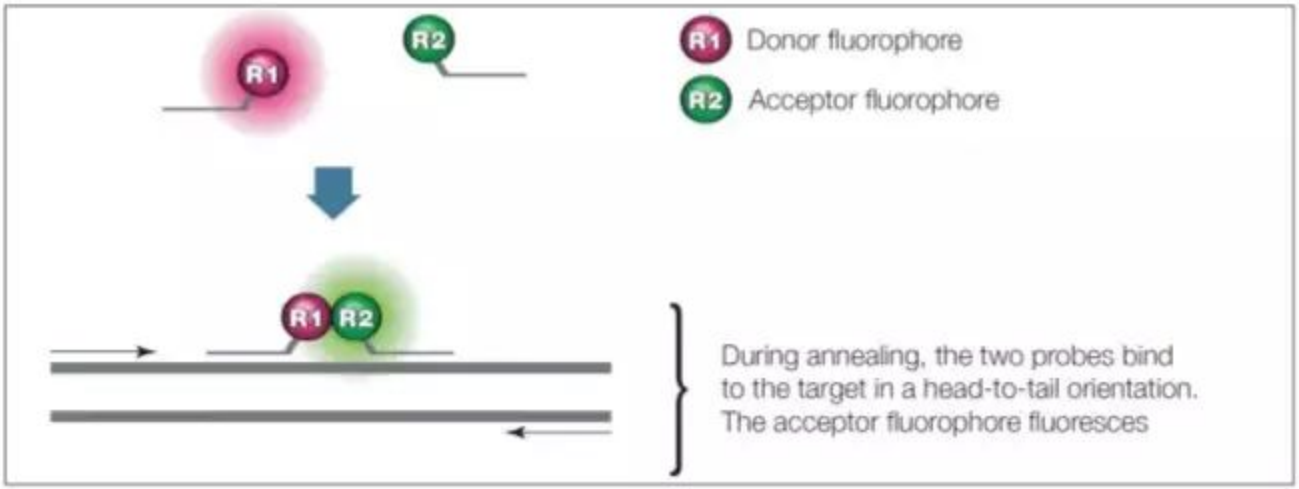




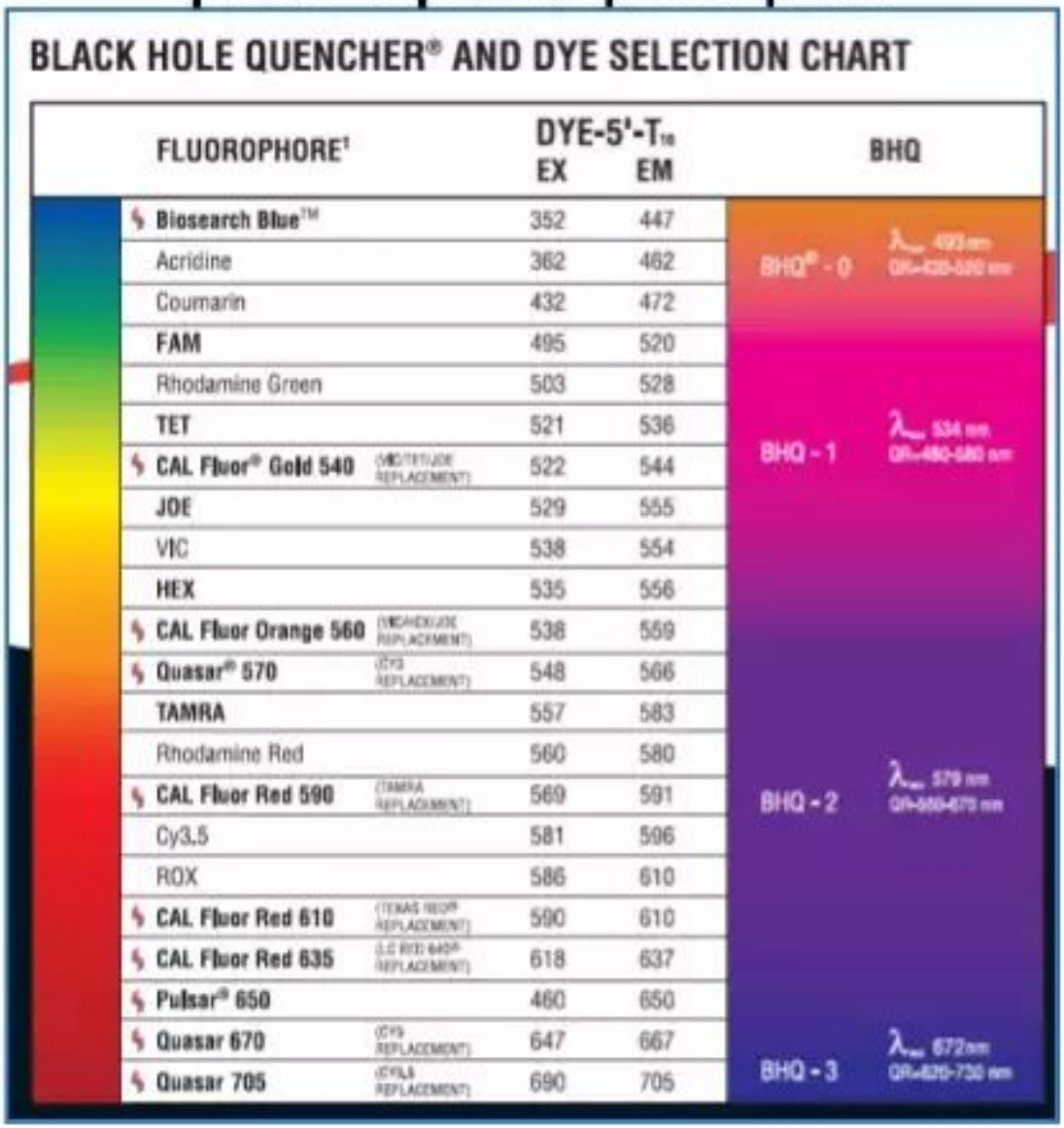
«Молекулярные маячки» (molecular beacons)



Примыкающие пробы



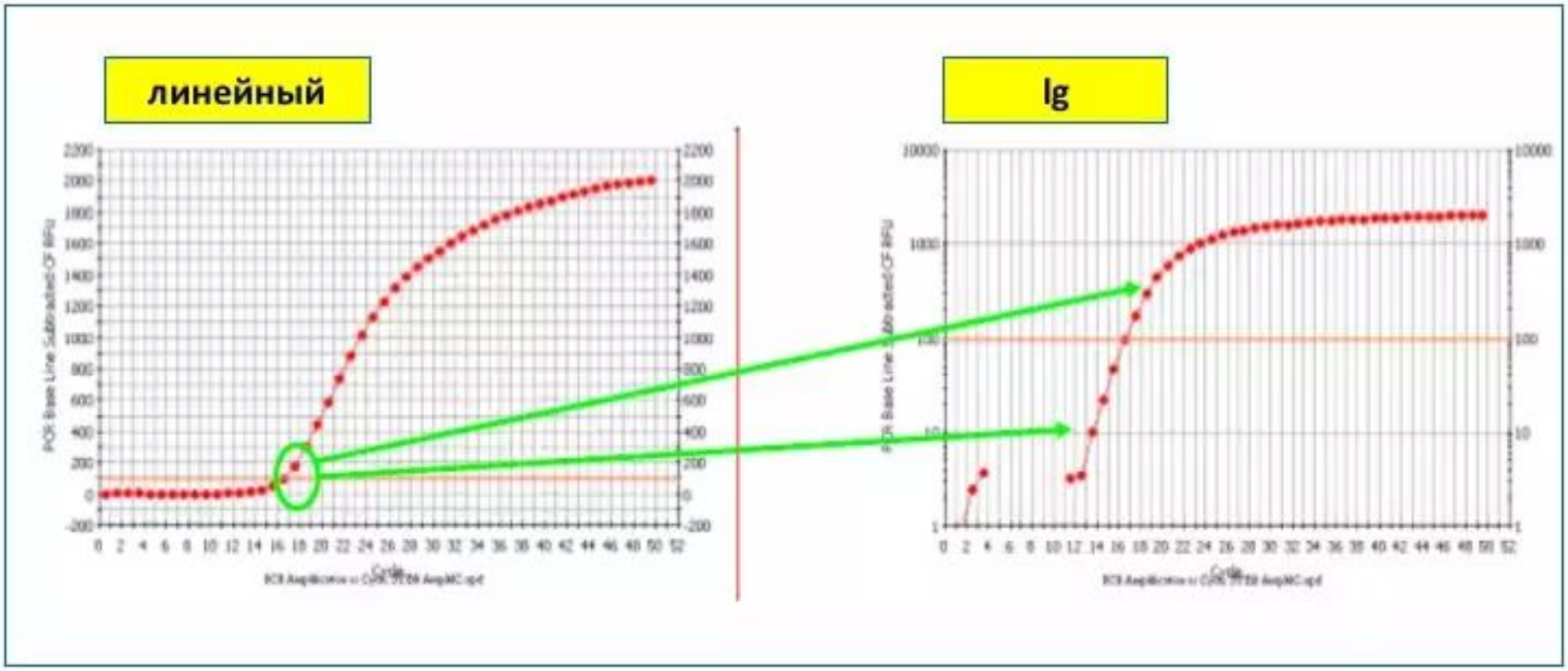
Флюорофоры и гасители флюоресценции



BLACK HOLE QUENCHER® AND DYE SELECTION CHART

FLUOROPHORE[1]		DYE-5'-T_{16} EX	DYE-5'-T_{16} EM	BHQ
Biosearch Blue™		352	447	BHQ® - 0 (λ_{max} 493 nm, QR=430-520 nm)
Acridine		362	462	
Coumarin		432	472	
FAM		495	520	
Rhodamine Green		503	528	
TET		521	536	BHQ - 1 (λ_{max} 534 nm, QR=480-580 nm)
CAL Fluor® Gold 540	(VIC/TET/JOE REPLACEMENT)	522	544	
JOE		529	555	
VIC		538	554	
HEX		535	556	
CAL Fluor Orange 560	(VIC/HEX/JOE REPLACEMENT)	538	559	
Quasar® 570	(CY3 REPLACEMENT)	548	566	
TAMRA		557	583	
Rhodamine Red		560	580	
CAL Fluor Red 590	(TAMRA REPLACEMENT)	569	591	BHQ - 2 (λ_{max} 579 nm, QR=560-670 nm)
Cy3.5		581	596	
ROX		586	610	
CAL Fluor Red 610	(TEXAS RED® REPLACEMENT)	590	610	
CAL Fluor Red 635	(LC RED 640® REPLACEMENT)	618	637	
Pulsar® 650		460	650	
Quasar 670	(CY5 REPLACEMENT)	647	667	BHQ - 3 (λ_{max} 672 nm, QR=620-730 nm)
Quasar 705	(CY5.5 REPLACEMENT)	690	705	

Представление результатов ПЦР в реальном времени

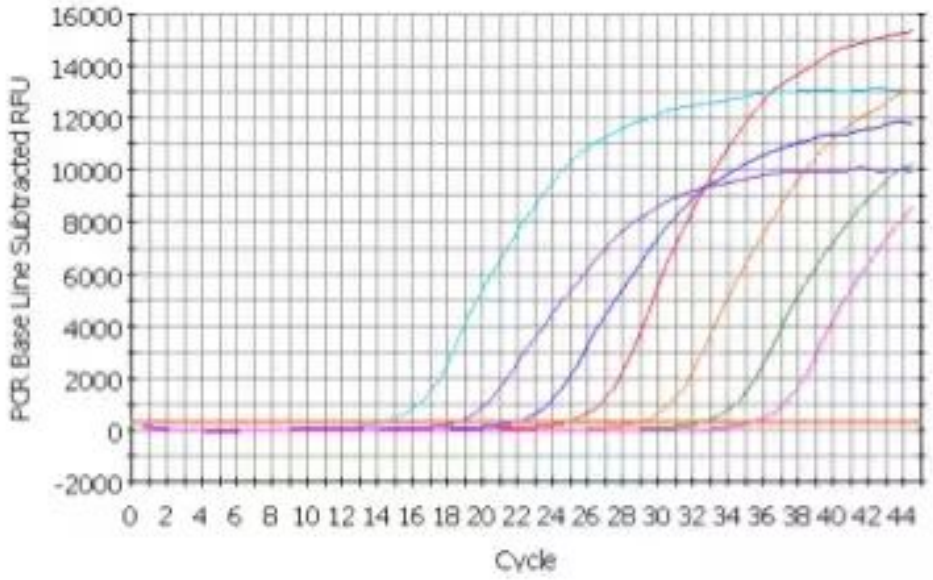


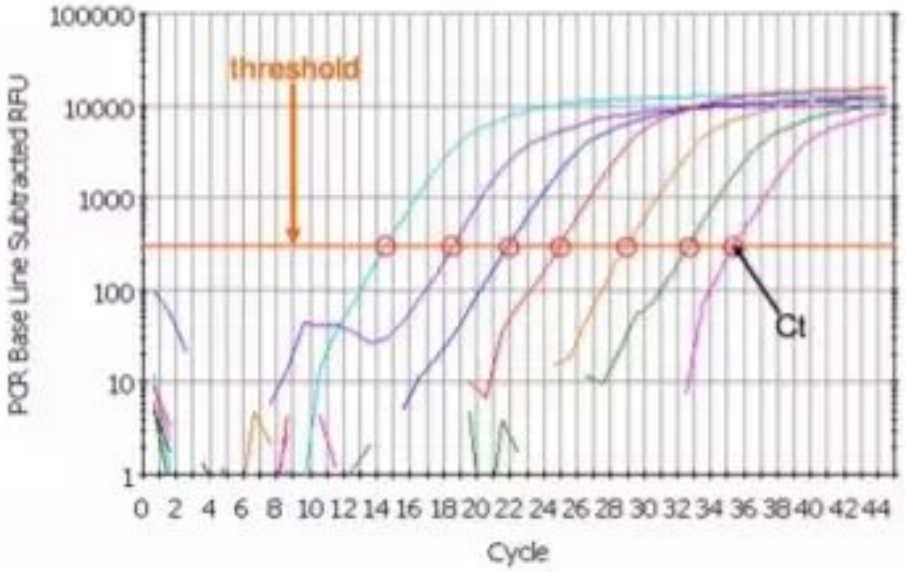
Количественная ПЦР

- Подсчёт числа копий генов
- Анализ представленности транскриптов
- Оценка инфекционной нагрузки

Количественная ПЦР

серия 10-кратных разведений





threshold – пороговая флюоресценция

C_t – пороговый цикл

Применение ПЦР

1. Научные исследования
   - амплификация ДНК для гибридизации (блоттинг, микрочипы)
   - амплификация ДНК для секвенирования
   - клонирование геномной ДНК, кДНК
   - филогенетическое сравнение геномов
   - генетическое картирование
   - анализ уровня транскрипции

Применение ПЦР

2. Медицина
   - генетическое тестирование
   - типирование тканей (для трансплантации)
   - тестирование мутаций в онкогенах
   - диагностика инфекций
3. Судебная медицина
   - ДНК-дактилоскопия
   - установление родства
4. Анализ пищевых продуктов, детекция ГМО

Применение ПЦР

Получение информации	Получение материи
• анализ уровня транскрипции • ДНК-диагностика • генотипирование	• клонирование ДНК • мутагенез • секвенирование

Залог успеха ПЦР

- высокая процессивность
- высокая чувствительность
- высокая специфичность
- низкая стоимость, быстрота

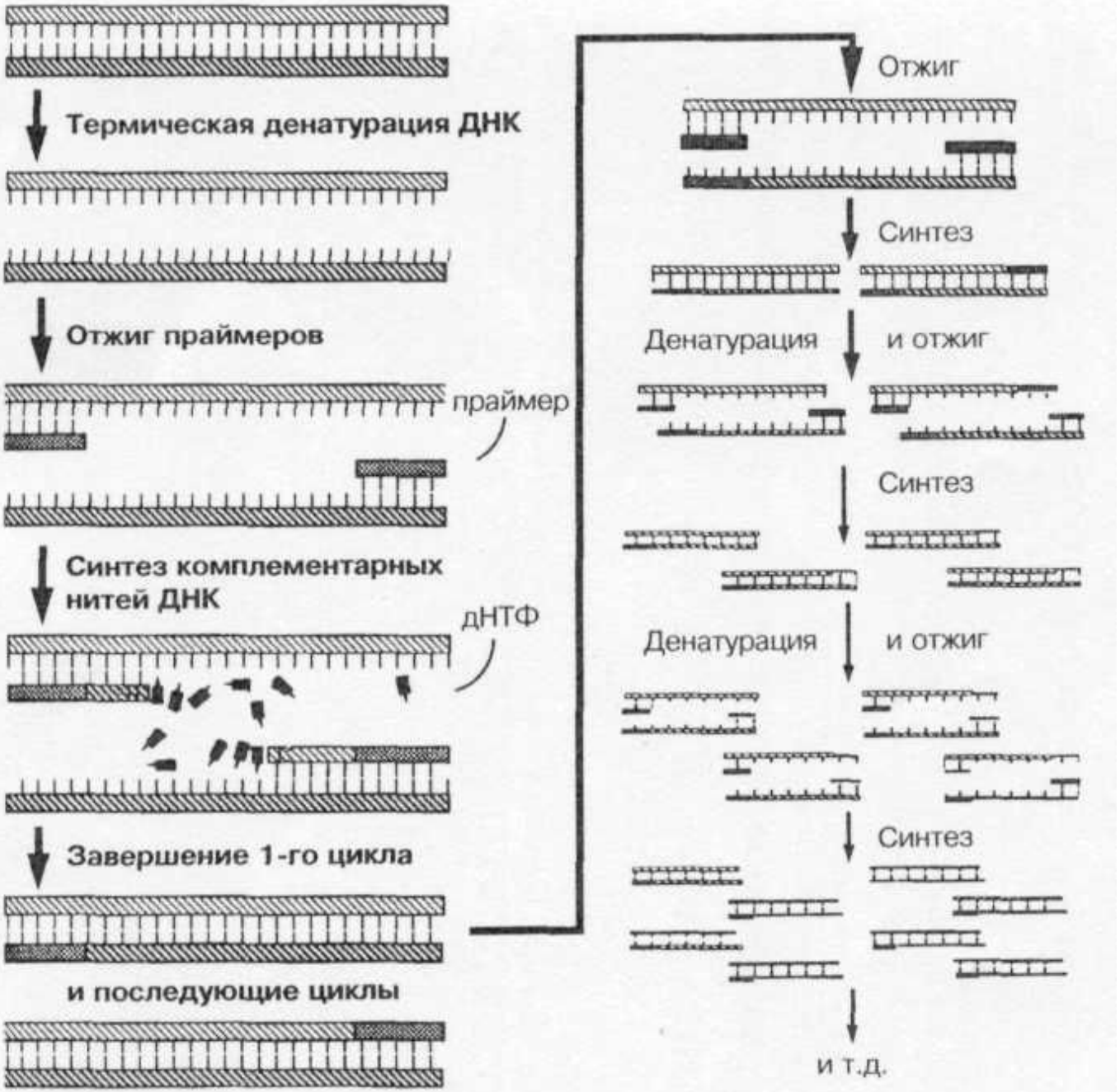
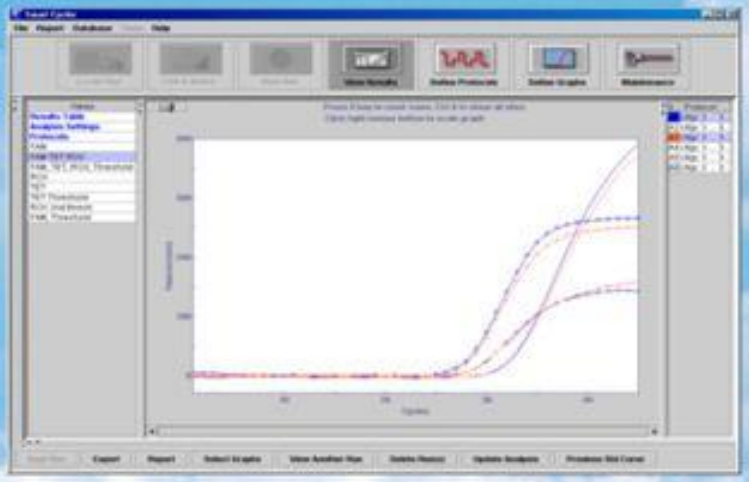


Рис. 11–19. Схема ПЦР. **дНТФ — дезоксинуклеотидтрифосфат**. Пояснения в тексте.

ПЦР в реальном времени

- В основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени лежит накопление ампликонов, содержащих ДНК/РНК мишени и их одновре-менная флюоресцентная детекция в режиме реального времени
- Определение концентрации ГМИ, микроорганизмов, пищевых аллергенов
- Мультиплексный анализ – одновременная детекция различных ДНК/РНК мишеней в одном реакционном объеме
- Чувствительность – единичные геномы, специфичность - 99,8%
- Сроки анализа - 1,5 часа вместе с пробоподготовкой
- Свободный доступ – непрерывная обработка до 100 анализов по разным программам в течение 8 часов



MyShared

Real-time ПЦР

ПЦР в реальном времени

- **Принцип метода** ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR) основан на детекции продуктов амплификации уже в процессе реакции и проведении мониторинга кинетики накопления ампликонов. Это означает, что учет результата ПЦР (числа ампликонов) происходит после каждого цикла амплификации, а не в конце, как при обычной ПЦР. Чем больше в исходной пробе было специфической ДНК, тем раньше и больше увеличится число специфических фрагментов.
- "ПЦР в реальном времени" (Real-Time PCR) позволяет позволяет осуществлять количественную оценку содержания ДНК в исследуемом материале.

MyShared

Преимущества ПЦР в реальном времени

1. Повышение специфичности метода

   за счет наличия зонда;
2. Возможность количественного определения;
3. Автоматизация;
4. Снижение риска контаминации

   за счет отсутствия электрофореза;
5. Снижение времени проведения реакции;
6. Уменьшение площади, занимаемой ПЦР-лабораторией

MyShared

- Преимуществами ПЦР анализа в реальном времени являются: высокая точность анализа; определение количества фрагментов ДНК в исходном материале; минимальный риск получения ложных результатов при анализе; высокая специфичность; быстрота (результаты готовы в течение часа); возможность идентификации нескольких инфекционных агентов одновременно (множественный ПЦР анализ); регистрация процесса и результатов в электронном варианте.

- Источник: http://www.tiensmed.ru/news/answers/pcr-real.html

- Материалом для исследования могут служить различные биологические жидкости и ткани организма: кровь, сыворотка, плазма; моча; кал; мокрота; соскобы эпителия (из матки, уретры); жидкости организма (спинномозговая жидкость, слюна, суставная и плевральная жидкость, сперма)

- Источник: http://www.tiensmed.ru/news/answers/pcr-real.html

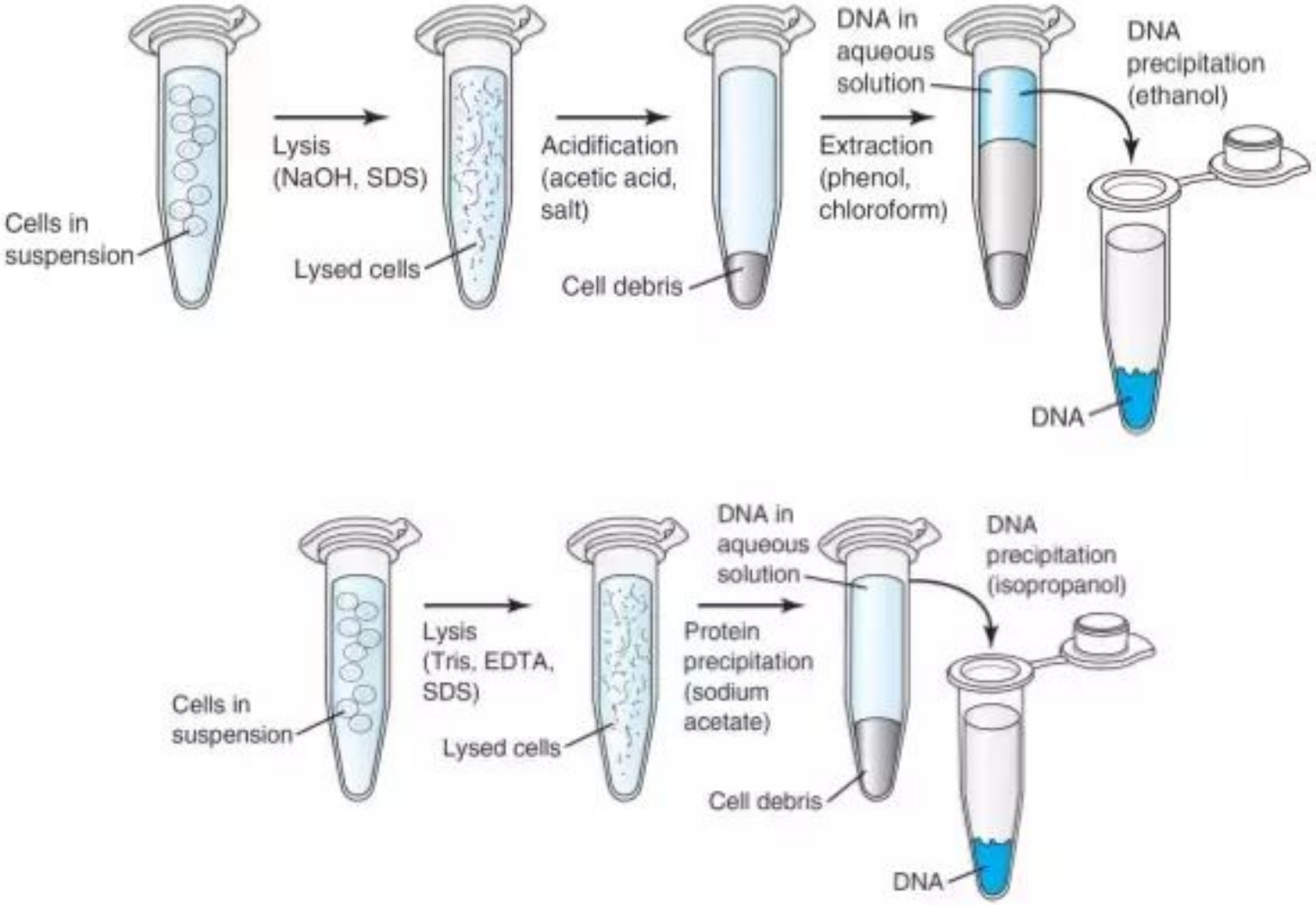
- ПЦР в реальном времени чаще применяется в медицине при диагностике различных инфекционных болезней для определения вирусной нагрузки (количества вирусных агентов); для выявления уровня бактериального заражения – бактериальная нагрузка; для определения количества внутриклеточных возбудителей инфекций; для оценки эффективности лечения; для анализа прогноза эффективности лечения; для определения устойчивости к лекарственным средствам.

- Источник: http://www.tiensmed.ru/news/answers/pcr-real.html

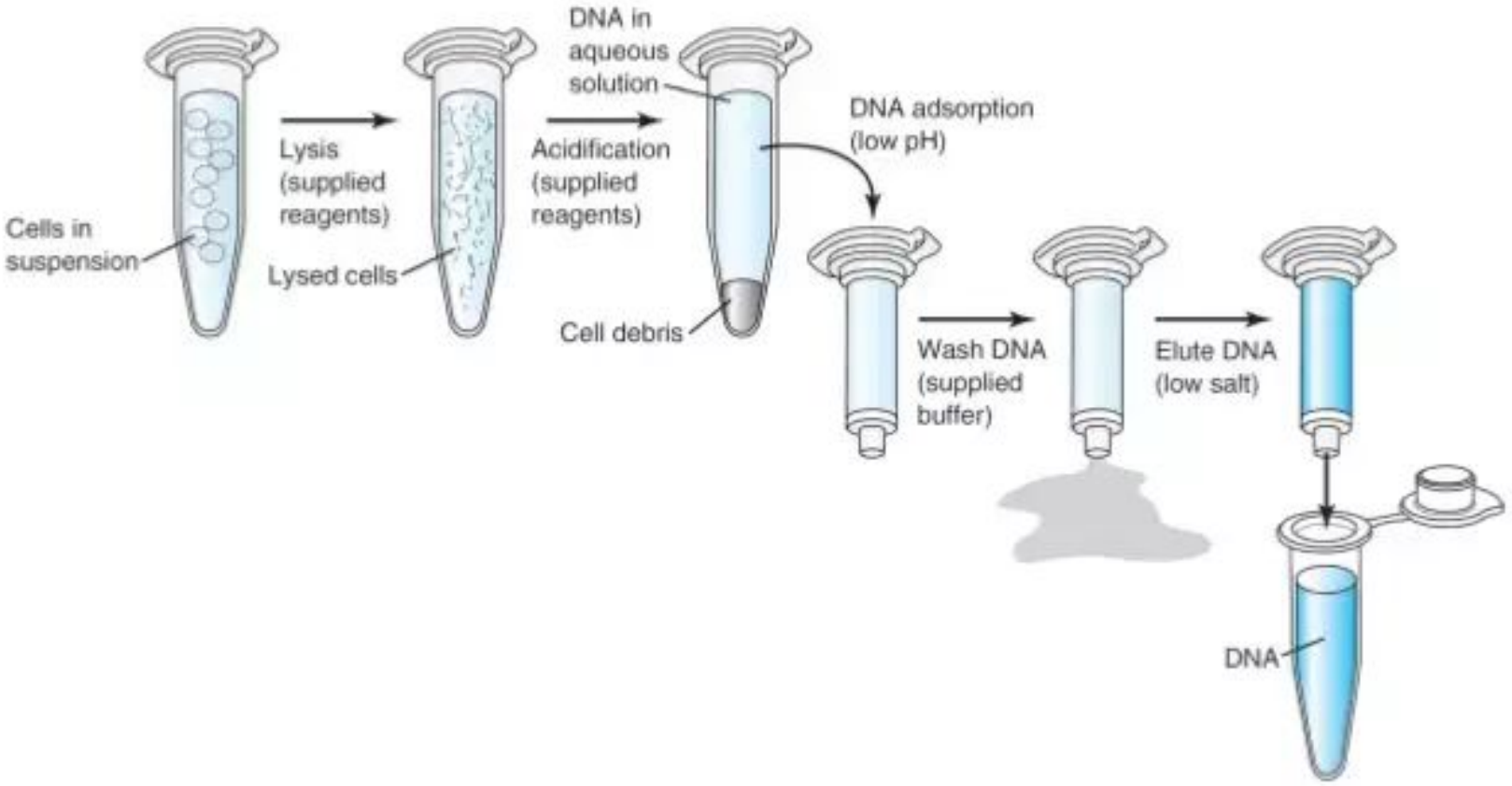
Этапы выделения ДНК/РНК

1. Лизис клеток
   - SDS, гуанидин, лизоцим и т.д.
2. Избавление от лишних примесей (белки, липиды и т.д.)
   - фенол, хлороформ, концентрированные соли
3. Преципитация ДНК
   - осаждение (этанол, изопропанол)
   - преципитация на сорбент (glass milk, колонки)
4. Растворение ДНК

Выделение ДНК



Выделение ДНК



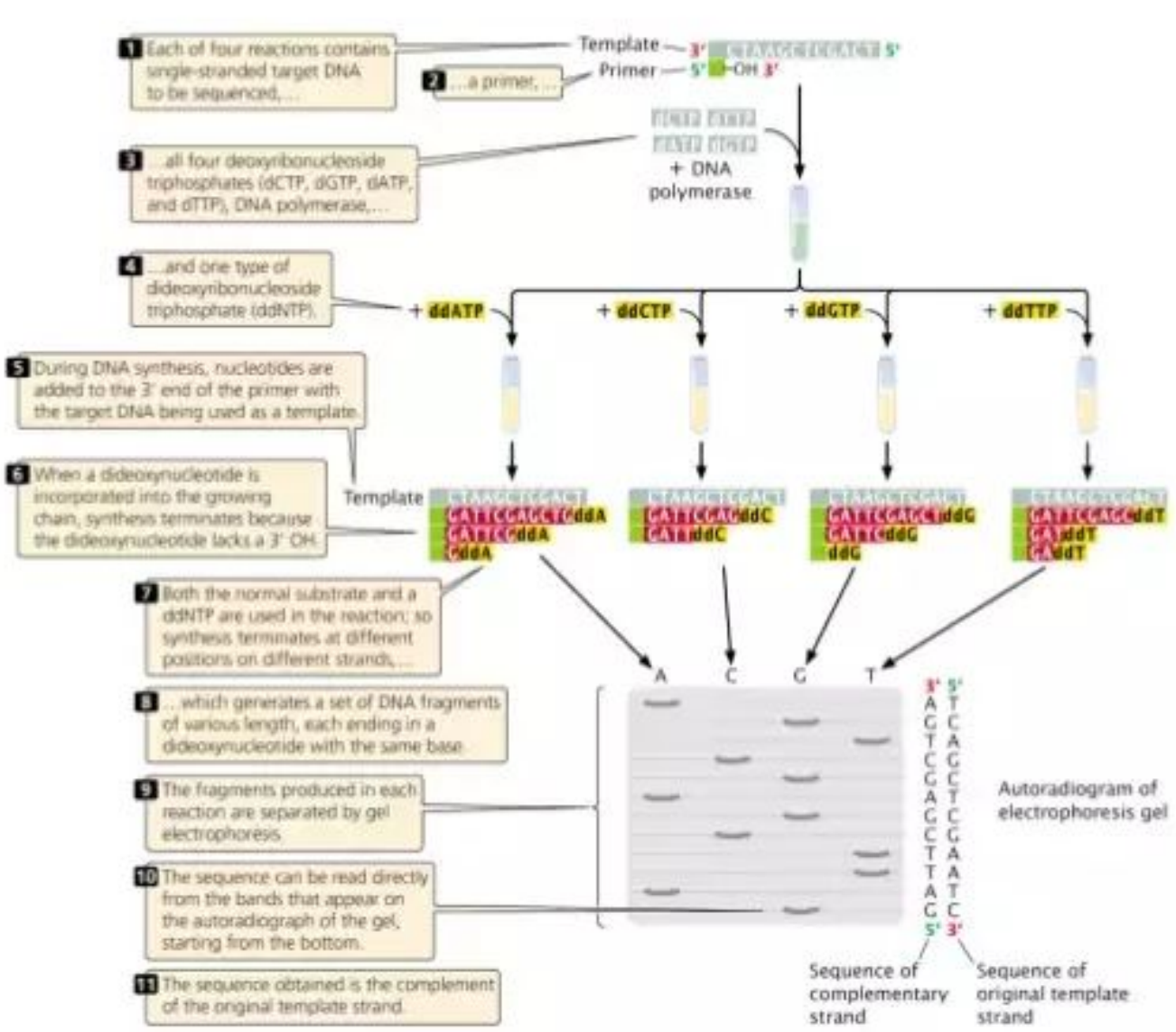
Севенирование ДНК

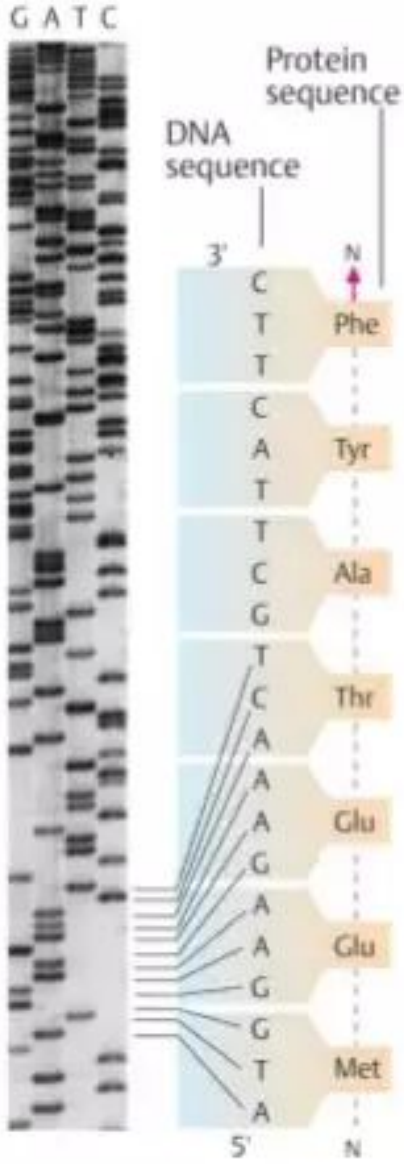
- прочтение последовательности

Классические методы:

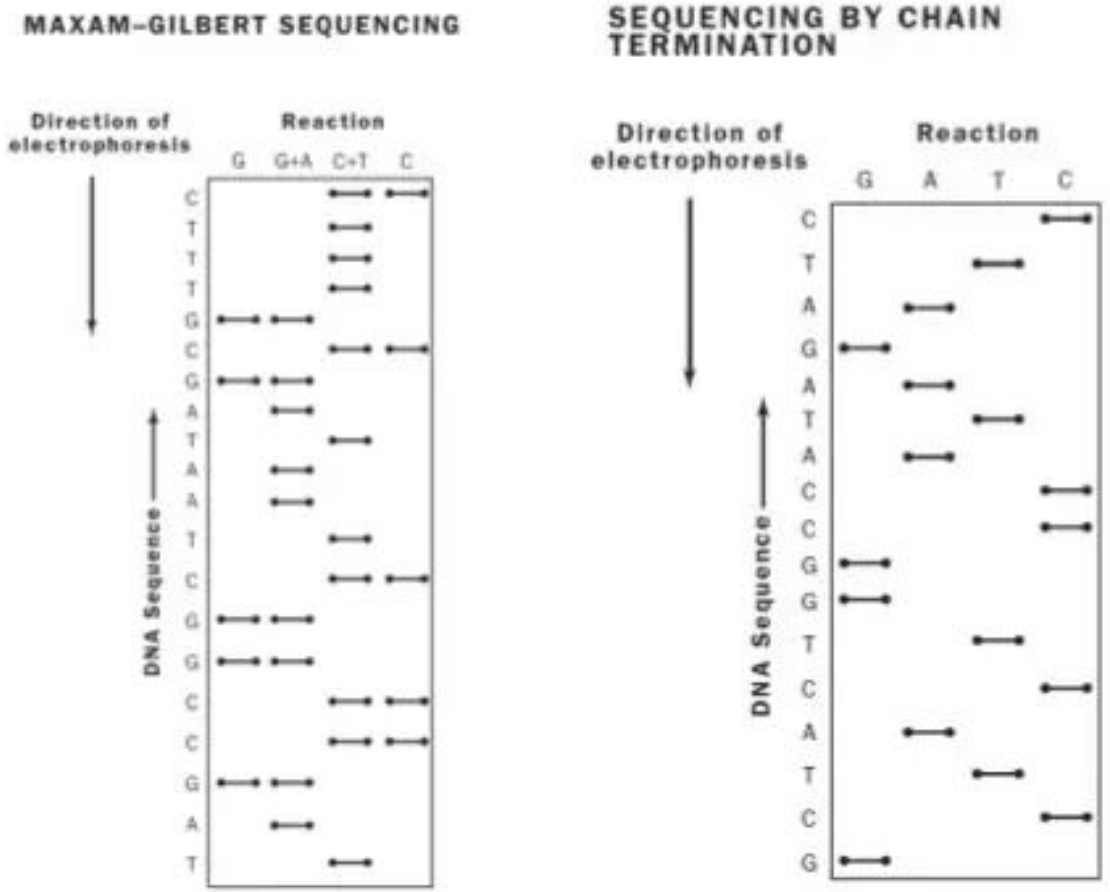
- Максам-Гилберт (химическое)
- Сэнгер (энзиматическое)

Секвенирование (Сэнгер)





Сравнение секвенирования по Максаму-Гилберту и по Сэнгеру



Полногеномное секвенирование

1. Геном разбивается на небольшие перекрывающиеся фрагменты
2. Фрагменты секвенируются
3. Сиквенсы собираются в итоговую последовательность
   - картирование
   - перекрывание

Проект «Геном человека»
1990-2003

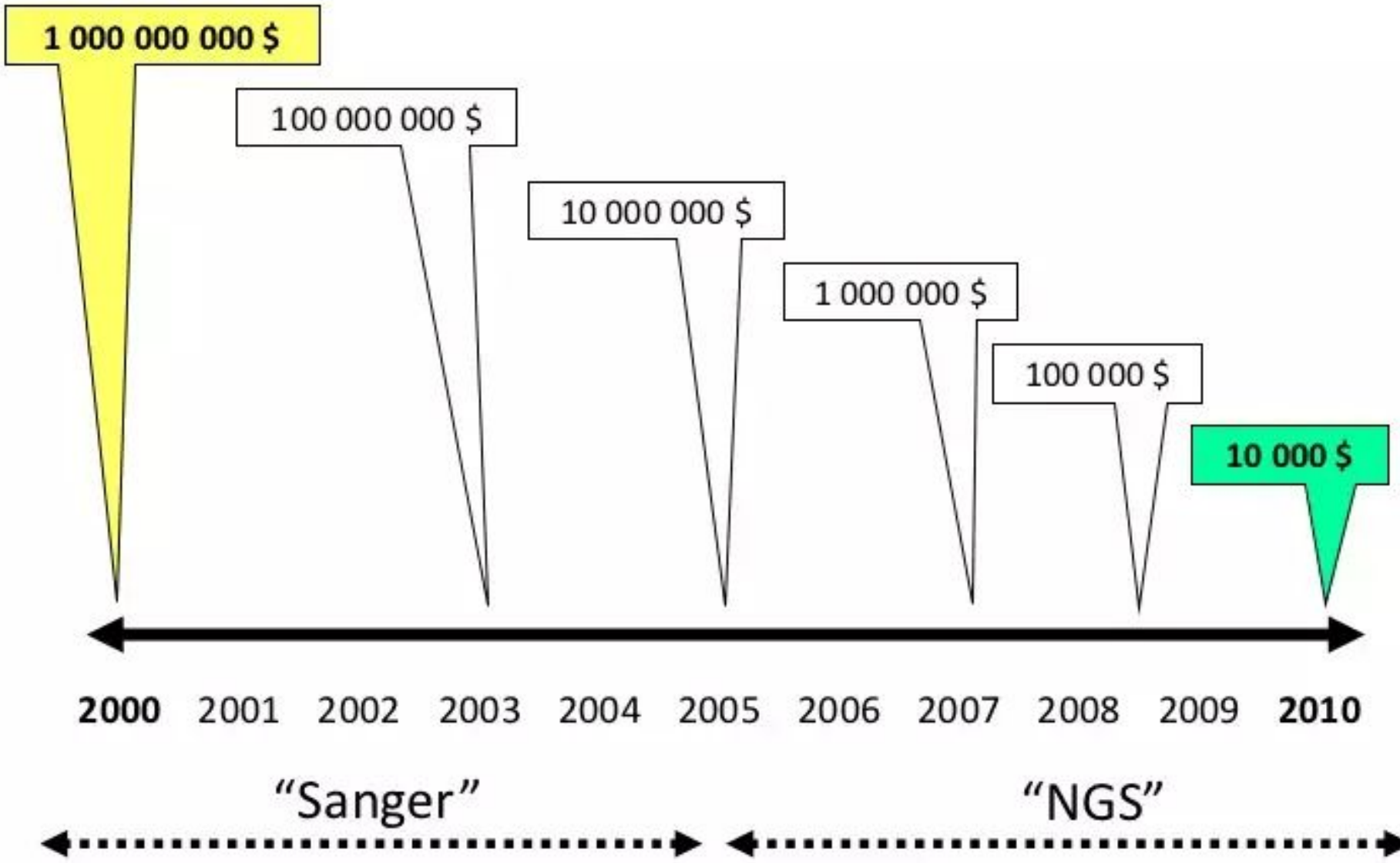
Джеймс Уотсон и Крейг Вентер – первые люди с индивидуальными прочитанными геномами

«Геном человека»

Государственный проект vs. частная компания

	Международный консорциум	**Celera Genomics**
Метод	Hierarchical shotgun	Whole-genome shotgun
Планируемые сроки	1990 – 2005	1998 – раньше гос. проекта
Планируемый бюджет	3 млрд. $	300 млн. $
Доступность результатов	Полностью доступны	Полностью запатентованы

Стоимость секвенирования одного генома

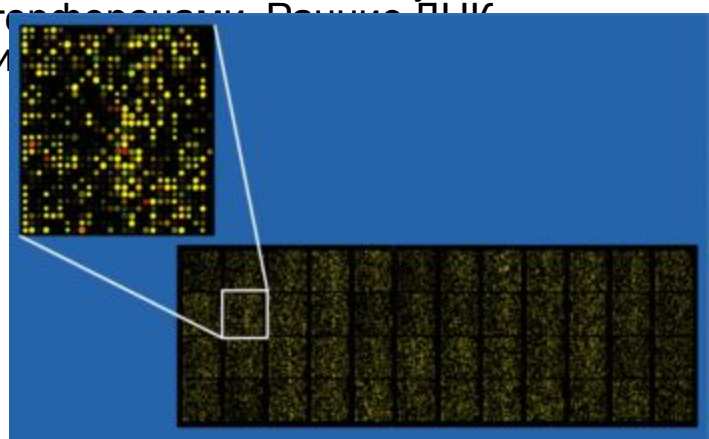


ДНК-микрочип (англ. DNA microarray) — технология, используемая в молекулярной биологии и медицине.

- Современный ДНК-микрочип состоит из тысяч дезоксиолигонуклеотидов (зондов, или проб), сгруппированных в виде микроскопических точек и закреплённых на твёрдой подложке. Каждая точка содержит несколько пикомолей ДНК с определённой нуклеотидной последовательностью. Олигонуклеотиды ДНК-микрочипа могут быть короткими участками генов или других функциональных элементов ДНК и используются для гибридизации с кДНК или мРНК (кРНК).
- Гибридизация зонда и мишени регистрируется и количественно характеризуется при помощи **флюоресценции** или **хемилюминесценции**, что позволяет определять относительное количество нуклеиновой кислоты с заданной последовательностью в образце.

- В обычном ДНК-микрочипе зонды ковалентно прикрепляются к твёрдой поверхности — стеклянному или кремниевому чипу. Другие платформы, например, выпускаемые Illumina, используют микроскопические шарики вместо больших твёрдых поверхностей.

- ДНК-микрочипы используют для анализа изменения экспрессии генов, выявления однонуклеотидных полиморфизмов, генотипирования или повторного секвенирования мутантных геномов. Микрочипы отличаются по конструкции, особенностям работы, точности, эффективности и стоимости.
- Впервые набор различных ДНК, объединённых в чип, был использован в 1987 году для определения особенностей регуляции экспрессии генов интерферонами. Ранние ДНК-микрочипы были сделаны путём «раскапывания» микроколи бумагу.



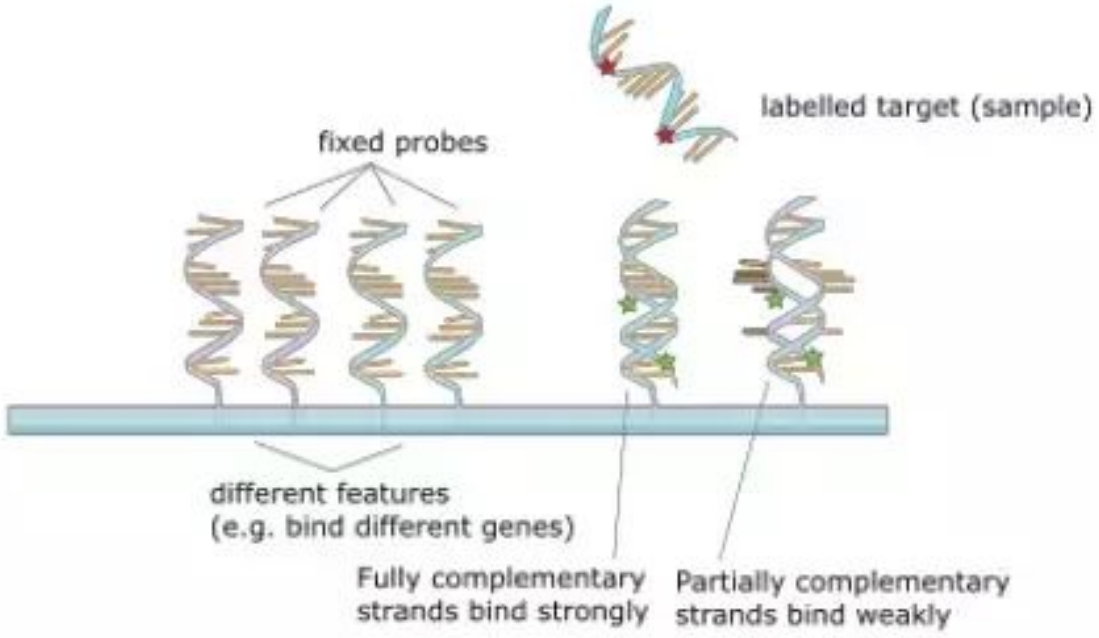
Гибридизация нуклеиновых кислот

- Анализируемая ДНК
- Зонд
- Система детекции

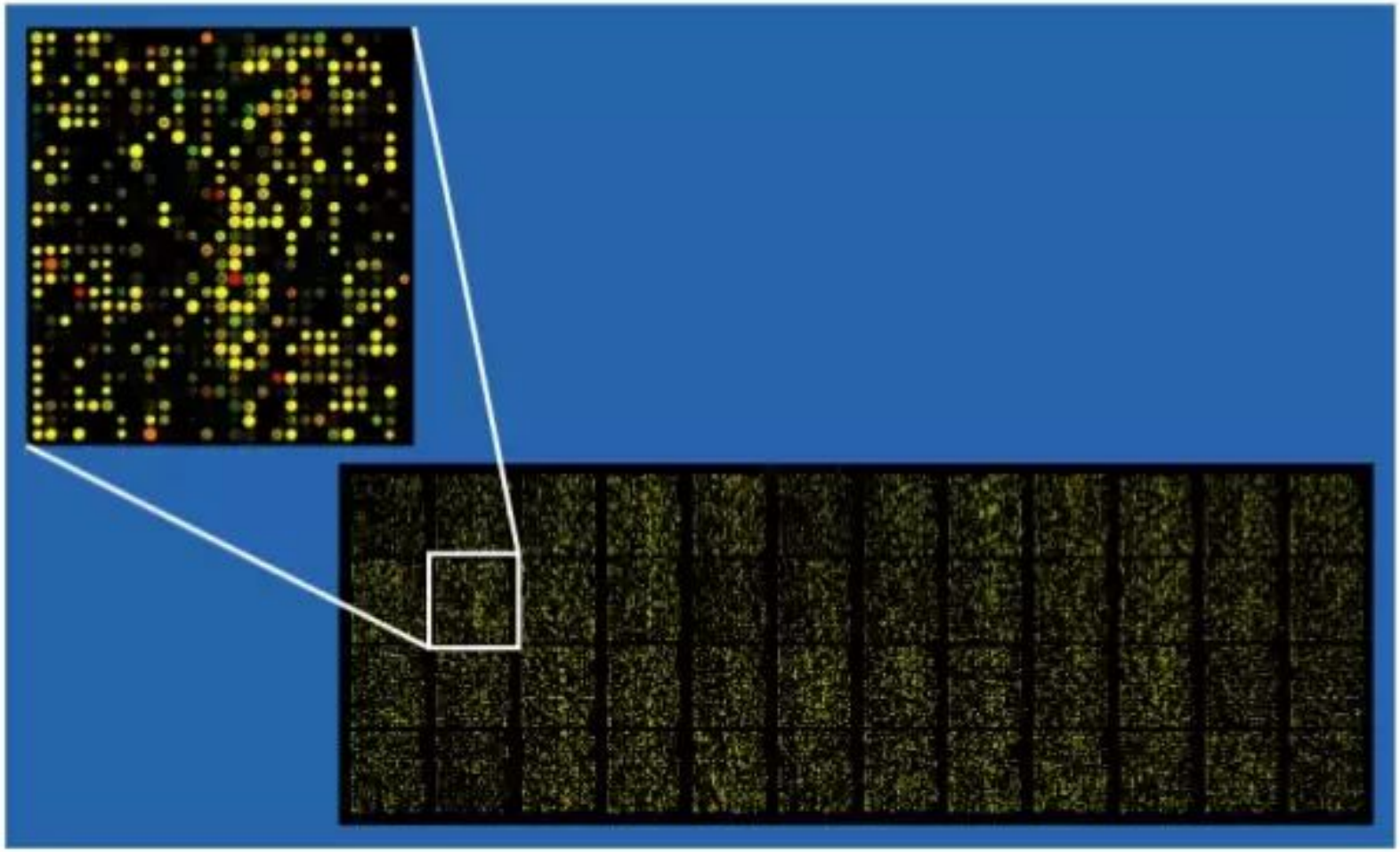
Southern blot → DNA-microarray

Гибридизация на микрочипе

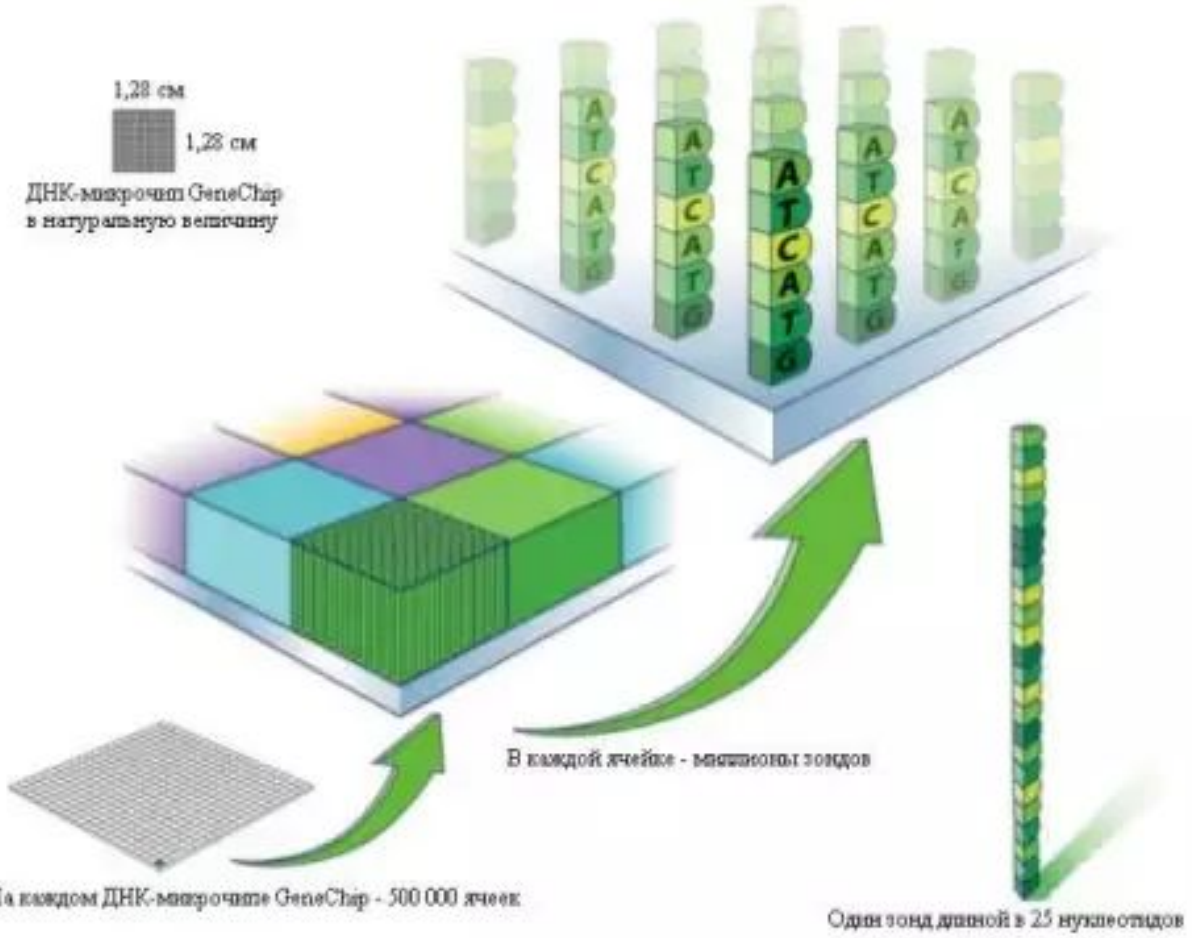
1. Получение одноцепочечных меченных молекул ДНК исследуемого образца (ПЦР, ОТ-ПЦР)
2. Гибридизация
3. Отмывка несвязавшейся ДНК
4. Считывание флюоресценции



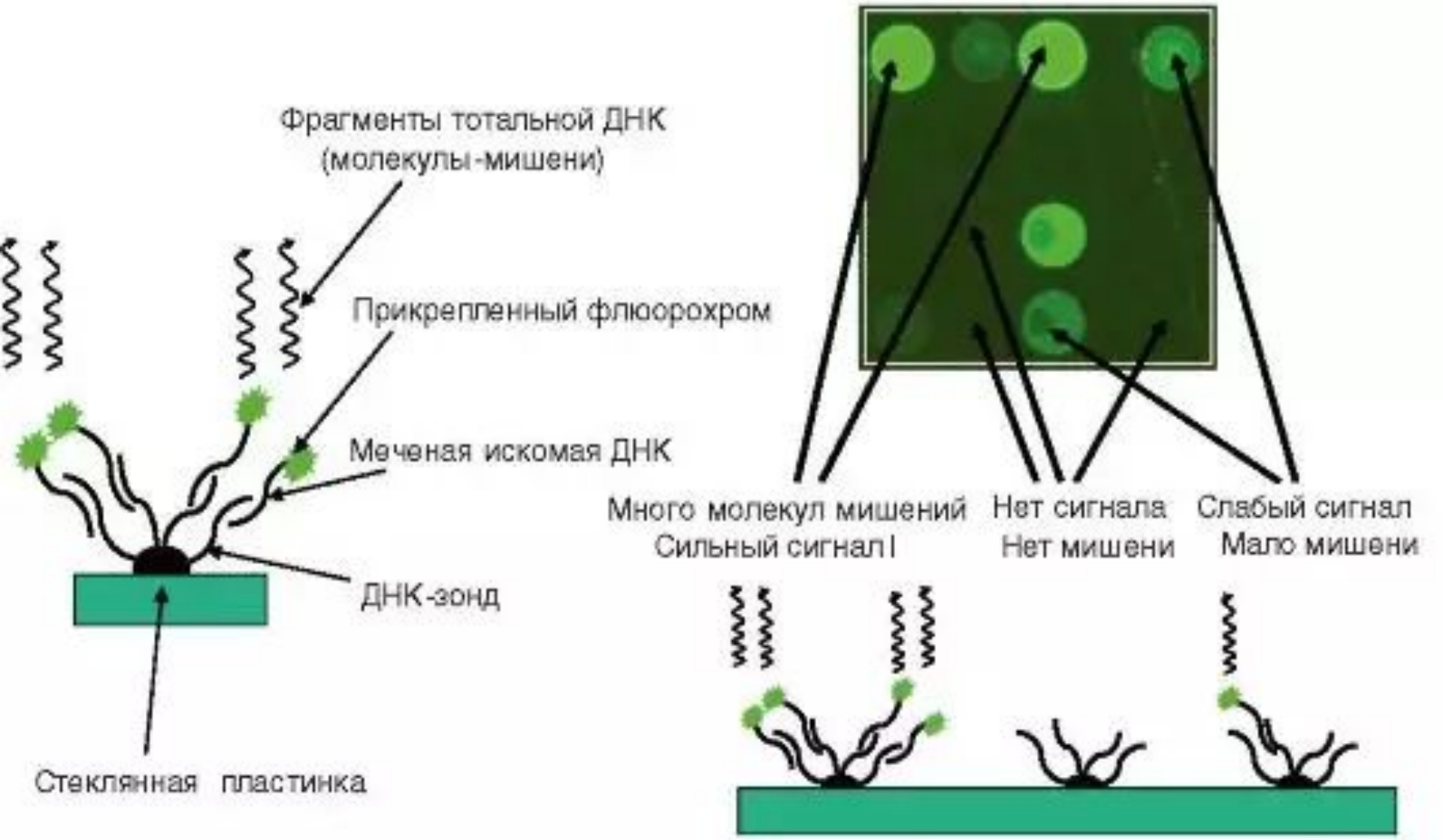
Микрочип на 40000 проб



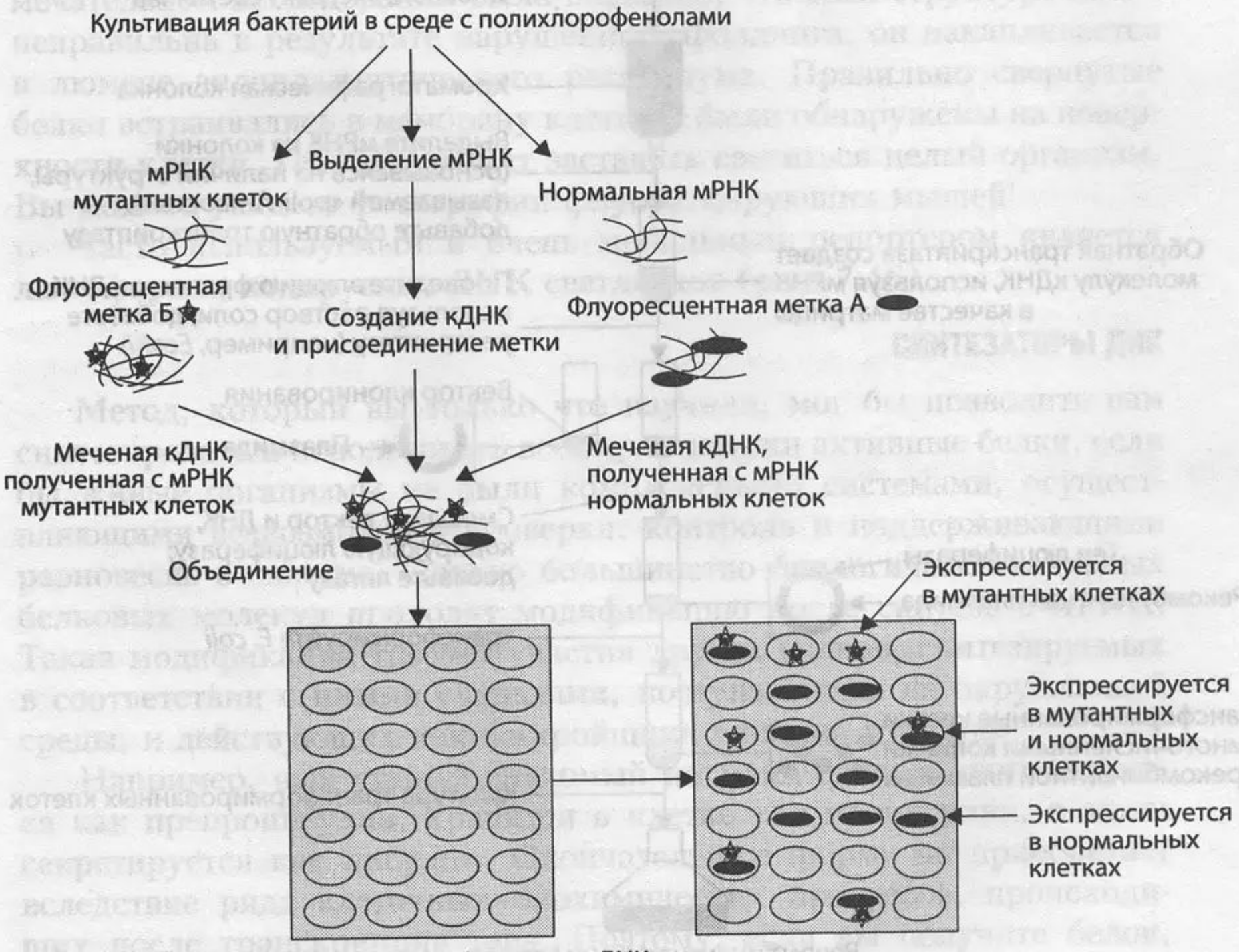
Микрочипы (microarrays)



Микрочипы



Принцип обнаружения специфической последовательности ДНК при помощи микрочипа

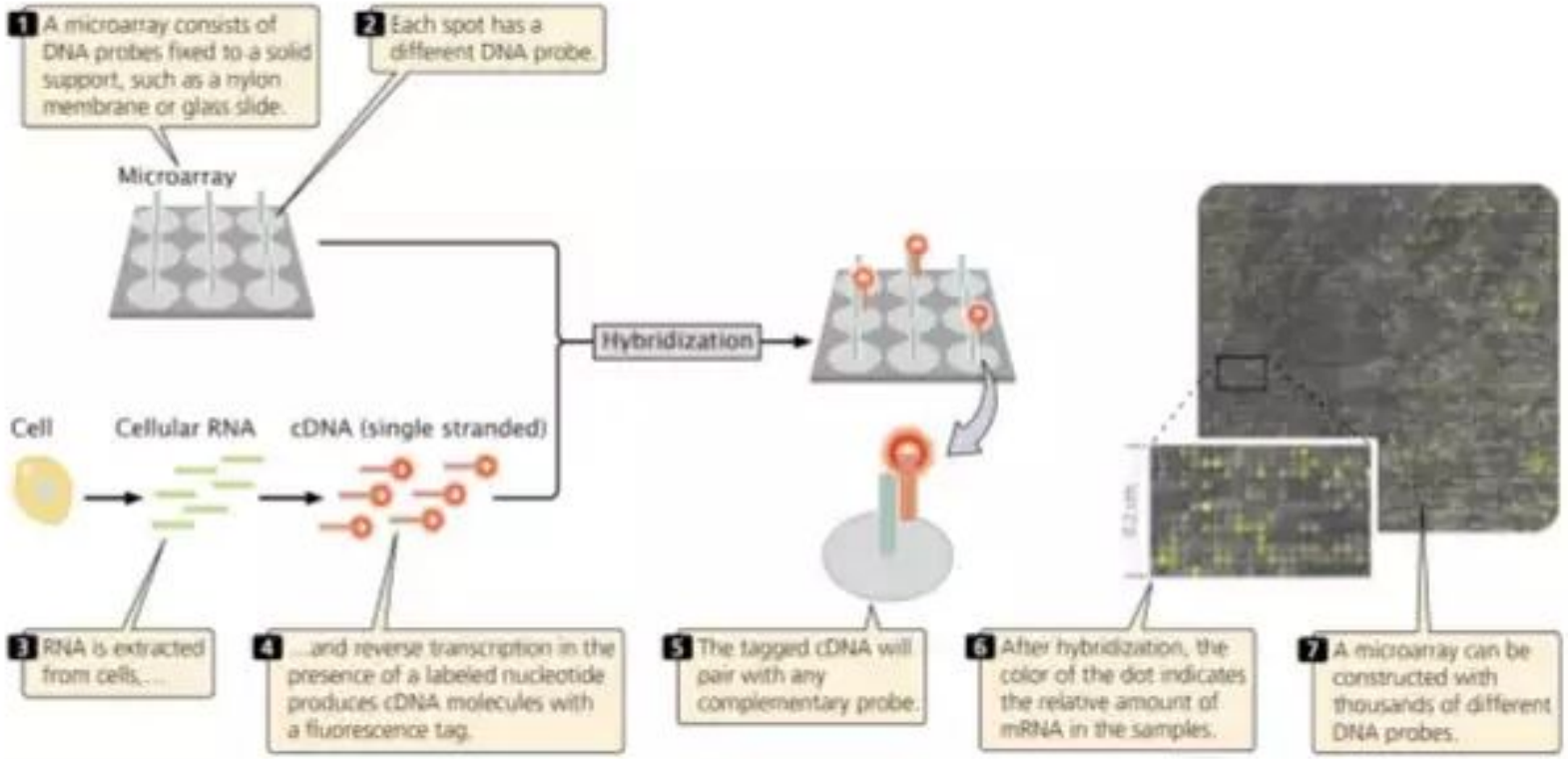

Культивация бактерий в среде с полихлорофенолами
Выделение мРНК
мРНК мутантных клеток
Нормальная мРНК
Флуоресцентная метка Б
Создание кДНК и присоединение метки
Флуоресцентная метка А
Меченая кДНК, полученная с мРНК мутантных клеток
Меченая кДНК, полученная с мРНК нормальных клеток
Объединение
Экспрессируется в мутантных клетках
Экспрессируется в мутантных и нормальных клетках
Экспрессируется в нормальных клетках

Affymetrix GeneChip

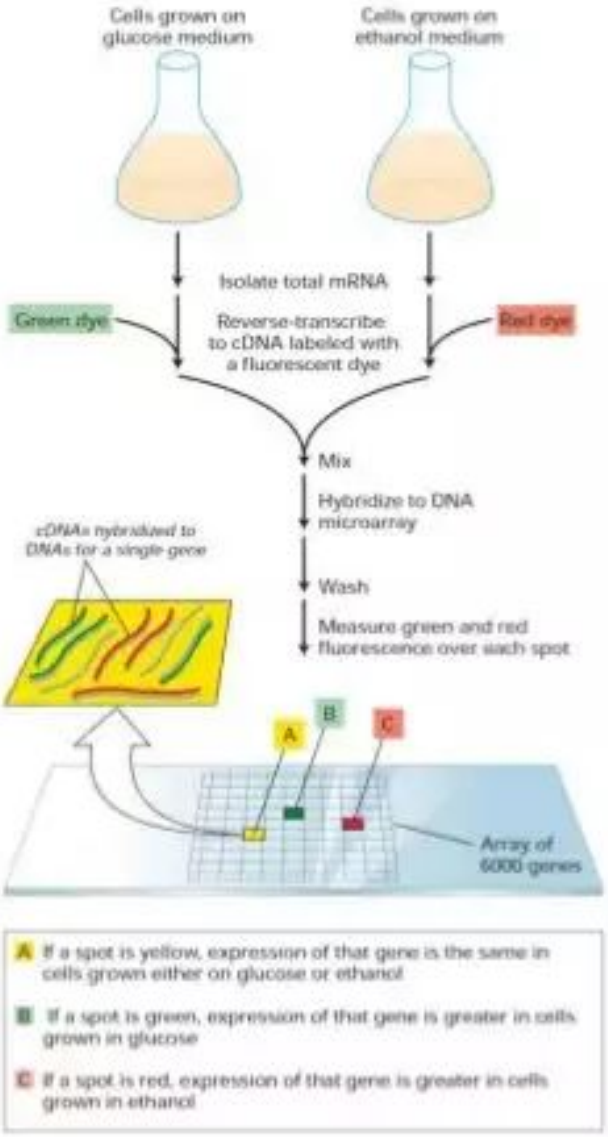
Применение микрочипов

- Анализ экспрессии
- Сравнительная гибридизация геномов
- Идентификация организма
- Анализ полиморфизмов
- Иммунопреципитация хроматина на чипе
- Анализ альтернативного сплайсинга
- Анализ перестроек

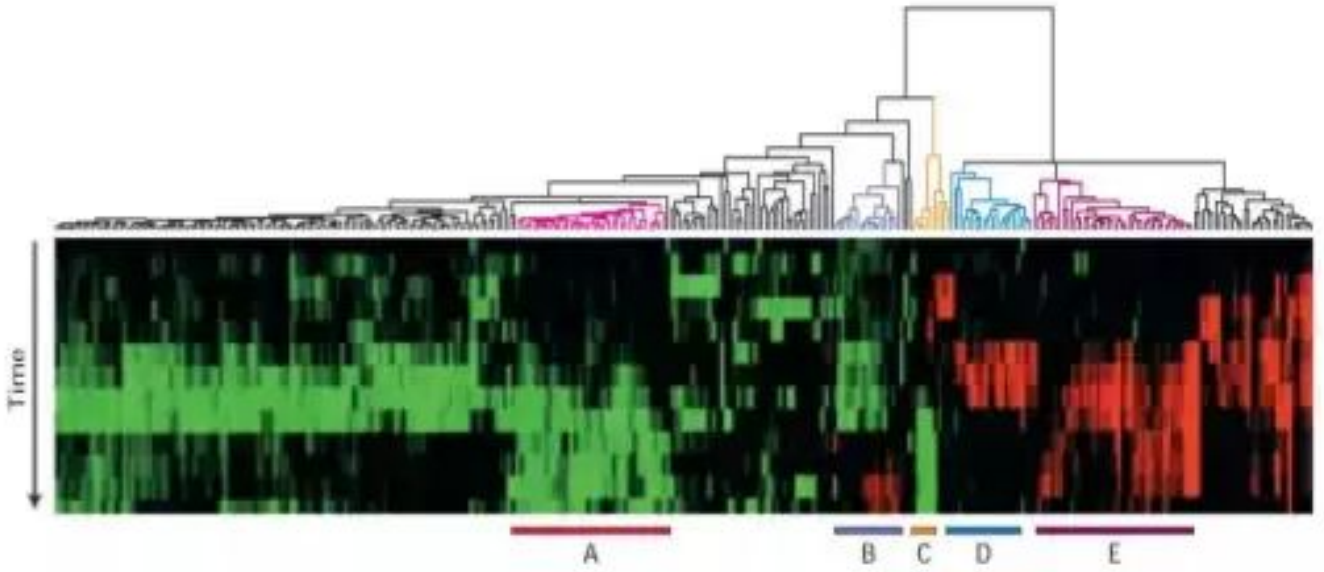
Экспрессионный профиль



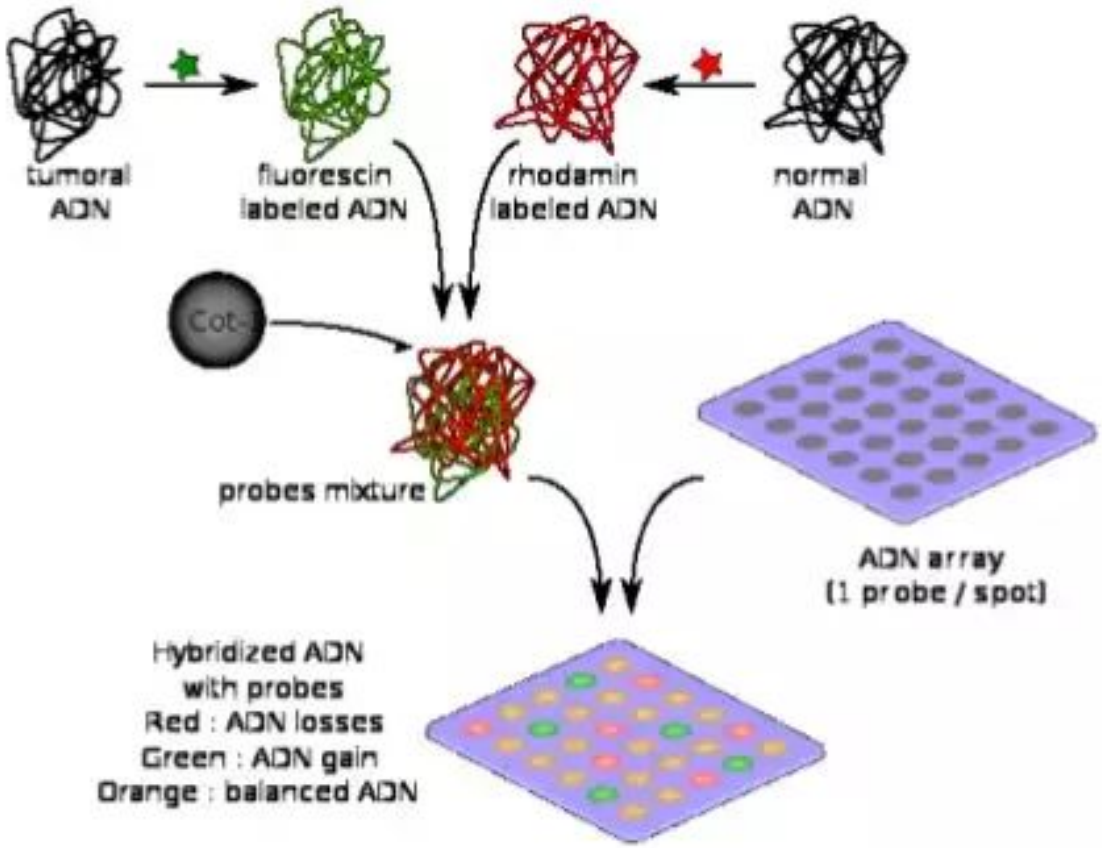
Сравнение экспрессии

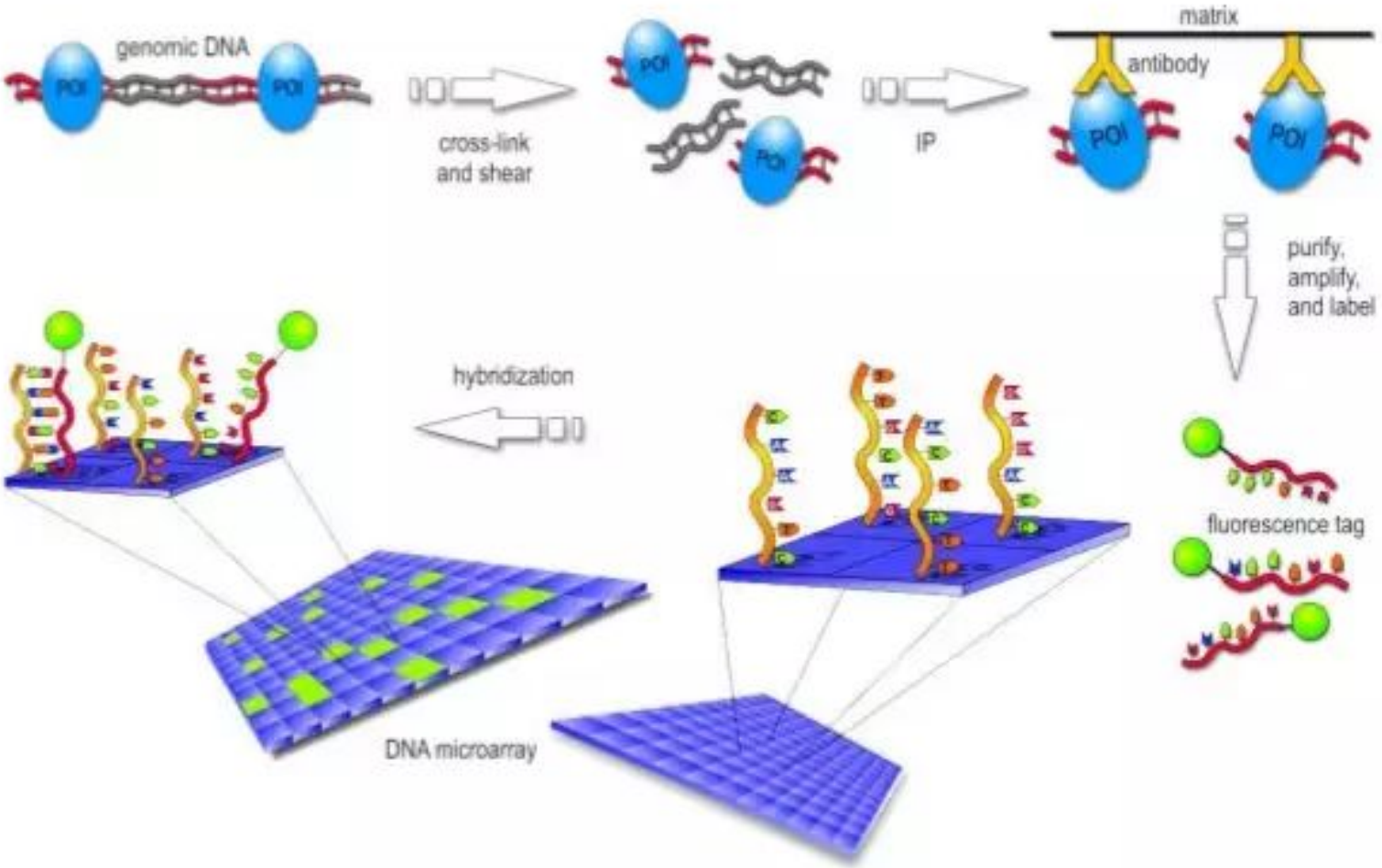


Сравнение экспрессии



Сравнительная гибридизация геномов



Иммунопреципитация хроматина на чипе

- для поиска участков связывания белков с ДНК