

Полимеразная Цепная Реакция (ПЦР)

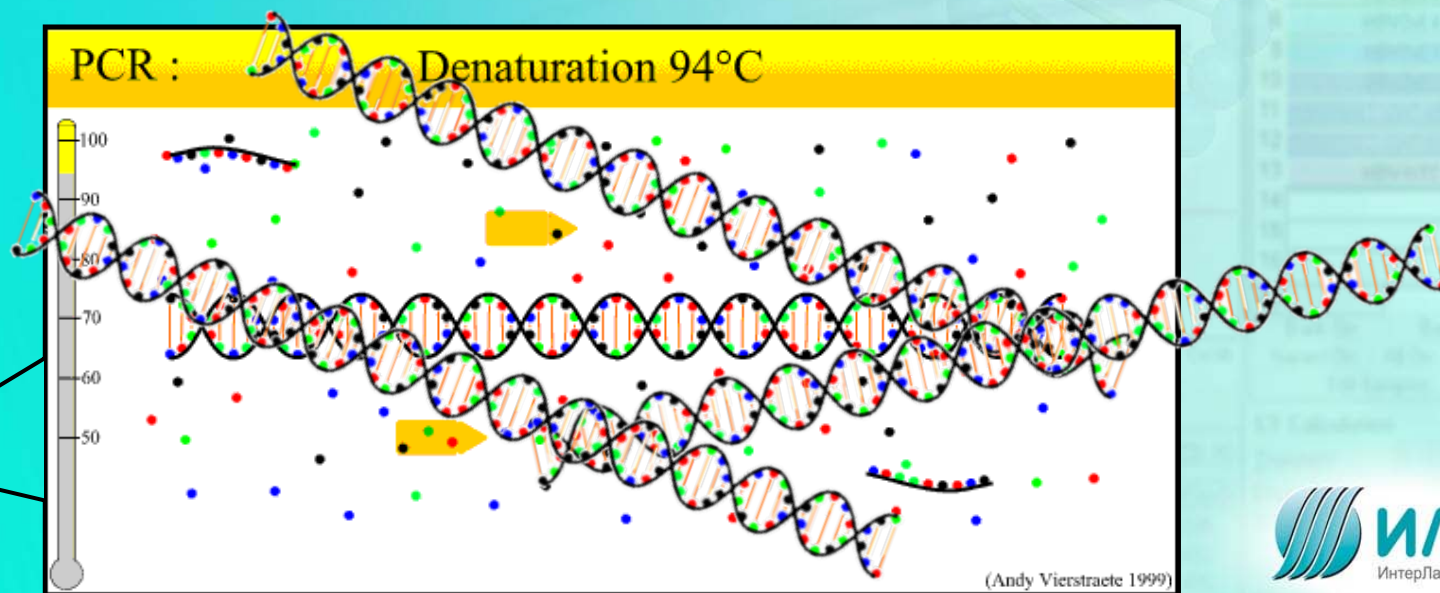
(Многократное копирование специфического фрагмента НК с последующей их детекцией.)

Высокая чувствительность при высокой специфичности анализа.

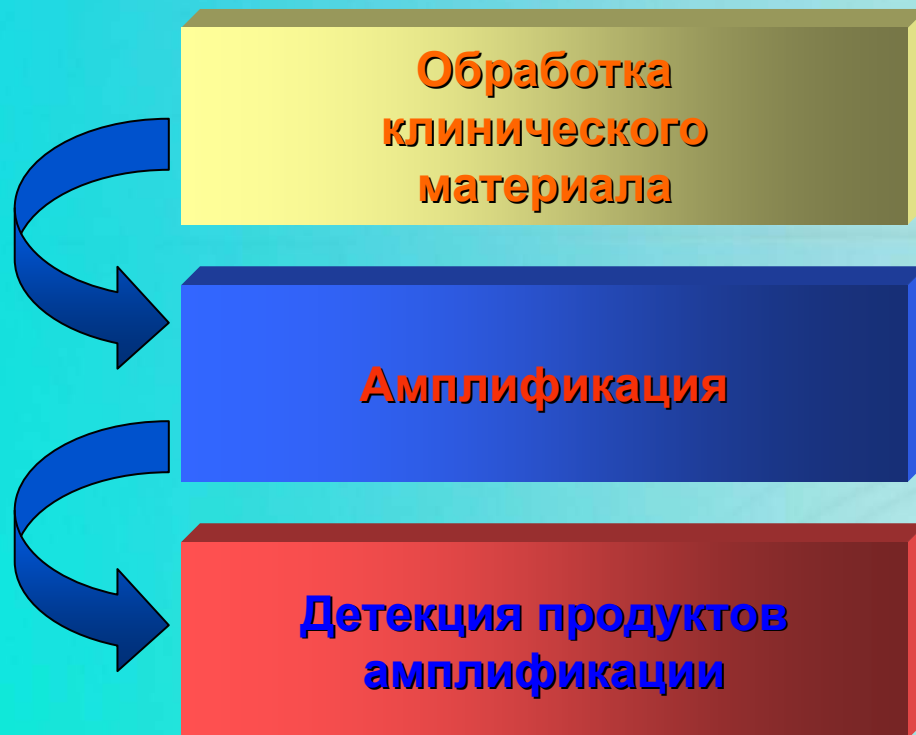
Раннее выявление возбудителя в период «серологического окна»

Возможность строгих количественных измерений.

Небольшие затраты времени



Этапы ПЦР-анализа



Принципиальная схема организации ПЦР-лаборатории

Зона приёма, разбора и первичной обработки материала



Обработка клинического материала



- Ламинарный шкаф 2-го класса защиты
- Центрифуга 12000-14000 об/мин
- Вортекс
- Термоблок
- Отсасыватель медицинский

1 зона

Аmplификация



- ПЦР-бокс
- Термоциклер
- Вортекс

2 зона

Детекция продуктов амплификации



в агарозном геле:

- Камера для горизонтального электрофореза
- Источник питания
- Трансillюминатор
- Система видеодокументирования

методом ГИФА:

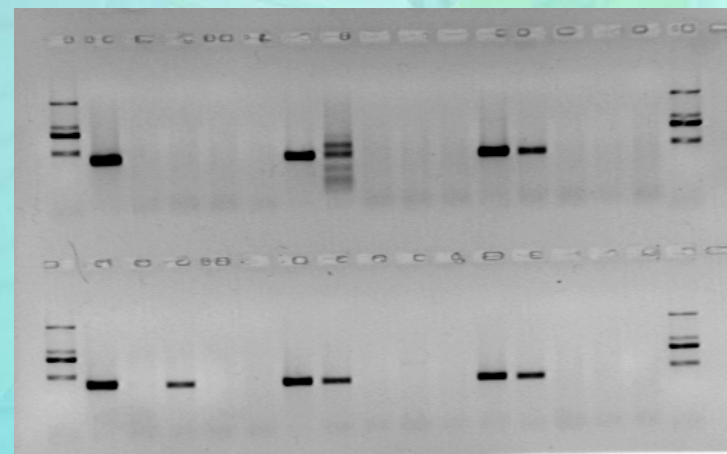
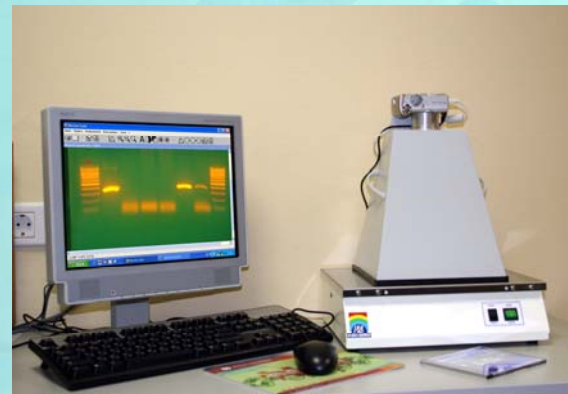
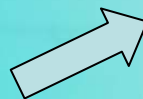
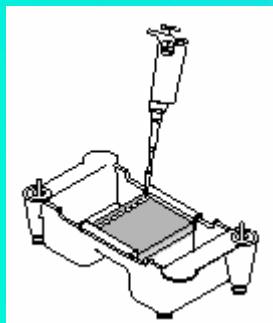
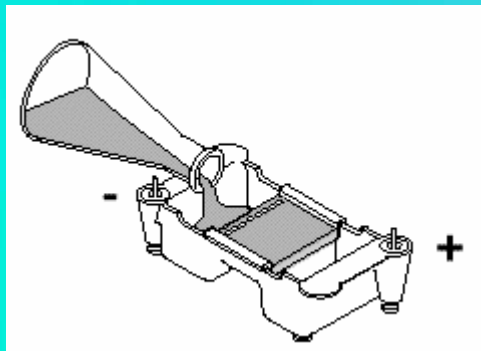
- Ридер
- Вошер
- Термостат (термошейкер)

3 зона

Методы детекции продуктов ПЦР

- Электрофоретическое разделение в агарозном геле с УФ-детекцией при окрашивании бромистым этидием
- ГИФА (гибридизационно - ферментный анализ)
- Флуоресцентная метка (детекция «по конечной точке» или «в режиме реального времени»)

Электрофорез в агарозном геле

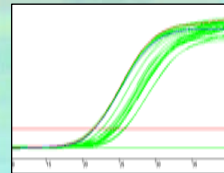


Варианты гибридизационно-флуоресцентной детекции

Детекция конечной
флуоресценции –
Fluorescence of End Point
(*FEP*)



Детекция флуоресценции
в ходе реакции –
Fluorescence in Real-Time
(*FRT*)



Детекция флуоресценции в режиме «реального времени»



Преимущества

- **Объективность исследования**
- **Возможность количественного анализа**
- **Высокая скорость исследования**
- **Минимальный риск контаминации**
- **Высокая эффективность анализа**
- **Автоматический учет результатов**
- **Менее жесткие требования к организации ПЦР лаборатории**

Области применения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»



- **Диагностика инфекционных заболеваний**
- **Количественный анализ**
- **Экспресс-диагностика**
- **Мультиплекс-диагностика**
- **Скрининг мутаций**
- **Использование альтернативных амплификационных технологий (NASBA)**

Оборудование для Real-Time-PCR

corbett
RESEARCH



Mx3000



Rotor Gene 6000



Roche

LightCycler 2.0

BIO-RAD



MiniOpticon

iQ iCycler

SmartCycler



SmartCycler

Cepheid



ABI 7x00

ABI PRISM

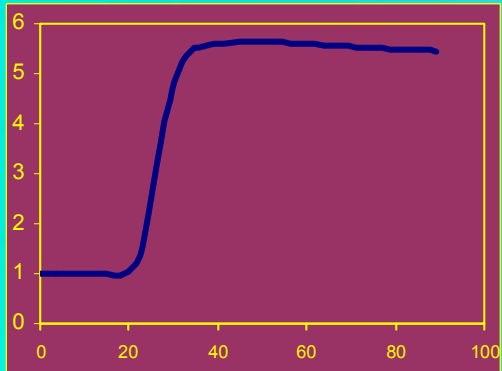
Rotor-Gene 6000

- **Высокая чувствительность**
- **До 6 каналов детекции**
- **Возможность использования широкого спектра флуорофоров**
- **Открытая платформа**
- **Высокая скорость термоциклирования**
- **Высокое температурное единообразие от пробы к пробе**
- **Возможность построения и высокоточного анализа кривых плавления ДНК**

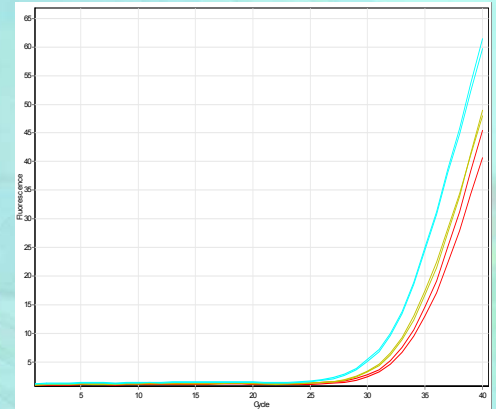


Новые возможности технологии ПЦР в режиме «реального времени» с использованием прибора «Rotor Gene 6000»

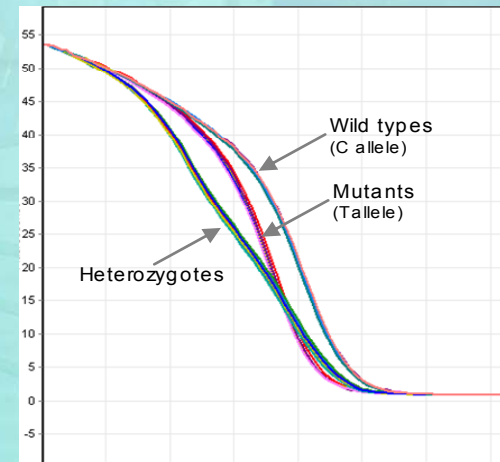
NASBA-Real-Time



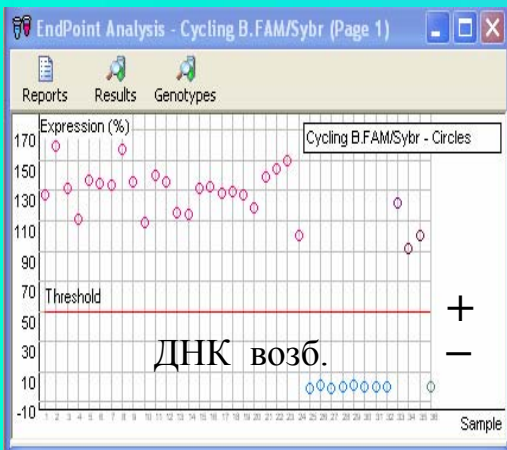
Качественная и количественная ПЦР



Выявление точечных мутаций



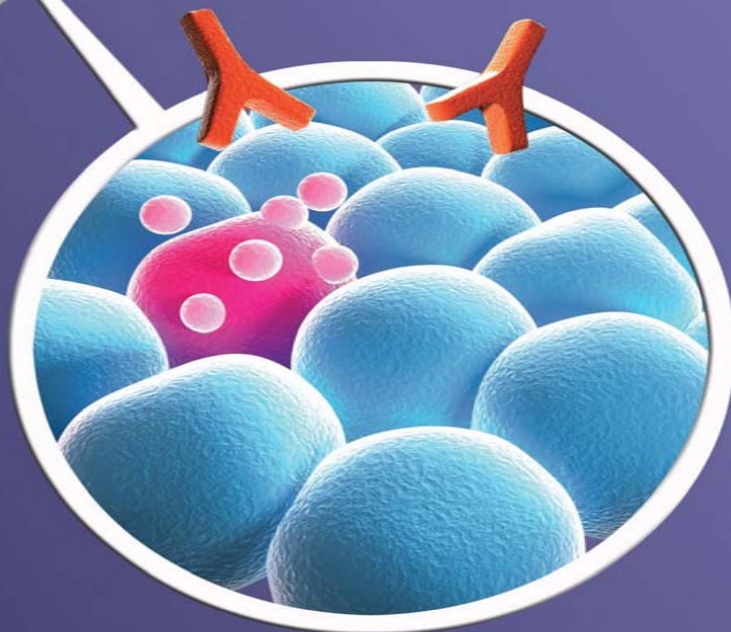
Детекция по конечной точке



Тест системы

Качественные	Количественные
<p><i>АмплиСенс Chlamydia trachomatis</i></p> <p><i>АмплиСенс Neisseria gonorrhoeae</i></p> <p><i>АмплиСенс Mycoplasma genitalium</i></p> <p><i>АмплиСенс Trichomonas vaginalis</i></p> <p><i>АмплиСенс High risk HPV</i></p> <p><i>АмплиСенс High risk HPV генотип</i></p> <p><i>АмплиСенс HIV</i></p> <p><i>АмплиСенс HCV</i></p> <p><i>АмплиСенс HCV генотип</i></p> <p><i>АмплиСенс HBV</i></p> <p><i>АмплиСенс Influenza H5N1</i></p> <p><i>АмплиСенс Bacillus anthracis</i></p> <p><i>АмплиСенс ОКИ Скрин</i></p> <p>и т.п...</p>	<p><i>АмплиСенс HCV Монитор</i></p> <p><i>АмплиСенс HBV Монитор</i></p> <p><i>АмплиСенс CMV Монитор АмплиСенс CMV Скрин-Тимр</i></p> <p><i>АмплиСенс EBV Монитор</i></p> <p><i>АмплиСенс EBV Скрин-Тимр</i></p> <p><i>АмплиСенс HPV Скрин-Тимр</i></p> <p><i>АмплиСенс Ureaplasma spp. Тимр</i></p> <p><i>АмплиСенс HIV Монитор</i></p> <p><i>АмплиСенс HHV6 Скрин-Тимр</i></p> <p><i>АмплиСенс Gardnerella vaginalis/Lactobacillus spp. Тимр</i></p>

ELISpot



MAVTECH

 **ИЛС**
ИнтерЛабСервис

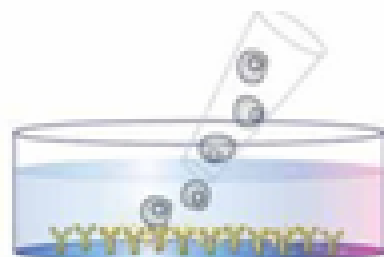
Метод EliSpot

enzyme – linked ImmunoSpot

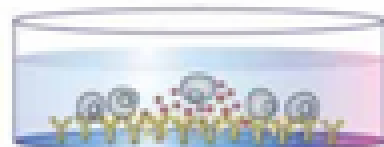
- Метод EliSpot является твердофазной модификацией метода ИФА и используется для идентификации и количественного определения клеток, вырабатывающих цитокины.
- Высокая чувствительность определяется тем, что детектируемый продукт в момент анализа находится на поверхности секретирующей клетки.
- EliSpot позволяет визуализировать секретируемый продукт.
- Современный анализ EliSpot проводят с использованием ридеров.

Схема метода **EliSpot**

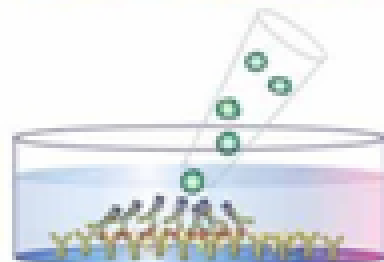
Enzyme-**l**inked Immuno**S**pot



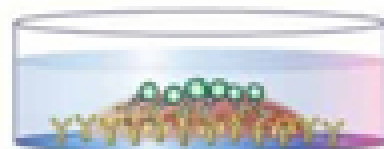
В лунки микропланшет, покрытые первичными антителами к соответствующему цитокину добавляются Т клетки



При стимуляции из клеток выделяются цитокины, которые связываются с антителами

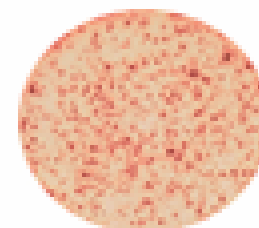
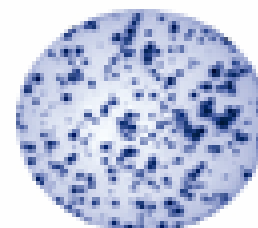
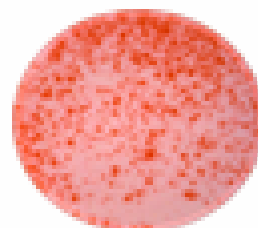
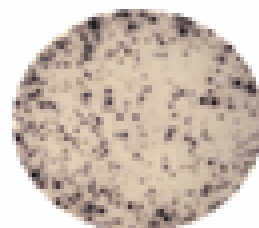


Добавляются вторичные антитела и субстрат.



Alkaline phosphatase (ALP)

Horseradish peroxidase (HRP)



BCIP/NBT

Fast red

TBM

AEC

Преимущество технологии EliSpot

- **Высокая чувствительность анализа** определение 1 клетки из 100 000 клеток популяции
- **Исследование на уровне отдельных живых клеток.** Ситуация близка к *in vivo*.
- **Качественный (вид цитокинов) и количественный (число клеток продуцентов) результат в течении 24 часов**
- **Позволяет мониторить баланс Th1/Th2**
- **Воспроизводимый результат**
- **В 100 раз более точный чем ELISA**

Используется как «золотой стандарт» при разработки вакцин (например HIV)

Разработан первый коммерческий диагностический набор T-spot TB для диагностики туберкулёза (Oxford Immunotech, Великобритания)

Основные направления:

- Аллергология
- Иммунология
- Пульмонология
- Раковые исследования
- Трансплантология
- Туберкулез

Ключевые слова

**Цитокины, Интерлекины, Хроническое системное воспаление,
Th хелперы, вакцинация клещевой энцефалит,
клеточный иммунитет,**

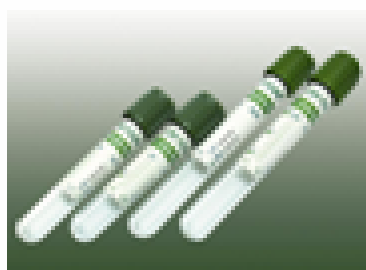
Необходимое оборудование и дополнительные реагенты

1. Среда для роста клеток RPMI-1640, фетальная сыворотка и глютамин (или GIBCO AIM-V)
2. Буфер стерильная PBS без азида
3. Отдельный ламинарный шкаф 2В класса защиты
4. Пробирки для крови с гепарином для транспортировки
5. Фикол или пробирки для фракционирования крови
6. Центрифуга (макс. 1800 x g, без торможения)
7. Оборудование для подсчёта мононуклеаров : гемоцитометр или камера Горяева с микроскопом или геманализатор, или проточный анализатор
8. Инкубатор с влажной камерой, 37 °C, 5% CO₂
9. Вошер для микропланшет (не обязательно)
10. milliQ (деионизированная вода)

Пробирки для сбора крови



**BD Sodium citrate
Vacutainer CPT**



**BD Vacutainer Lithium
Heparin**

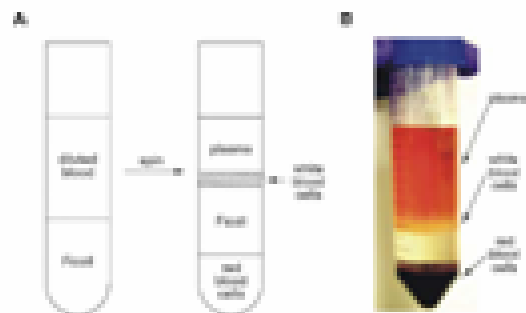


**BD Vacutainer Lithium
Heparin PST**



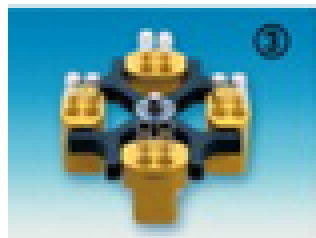
**Greiner Bio One
Lithium heparin**

**Возможные форматы
пробирок:
100 x 13мм
100 x 16мм
75 x 13мм**



**Разделение фракций крови с
помощью метода фиколевого
градиента**

Центрифуга Rotofix 32 A



Технические характеристики:

max RCF 4 186

Без охлаждения

Возможность остановки без тормозов

На данный момент пользуется центрифуга Allegra X -22R

Формат используемых пробирок:

100 x 13

100 x 16

75 x 13

- **Дорого**
- **Много не нужных функций**



Инкубатор с влажной камерой, 37°C, 5% CO2



CO2 инкубатор Galaxy 14S
14л



Oxoid CampyGen Compact



Анаэроостат AnaeroPack,
Mitsubishi Gas Chemical
America



Необходимый расходный
материал: ГазПэки

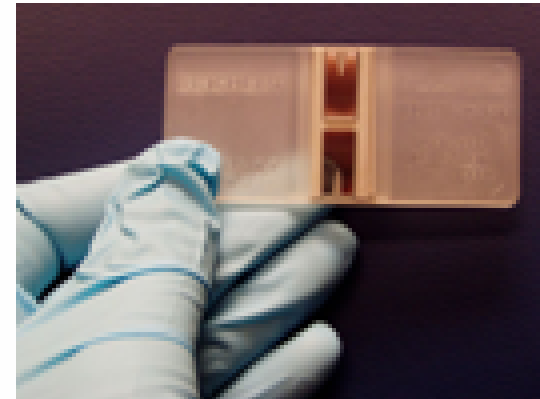
Система BD GasPack



**Оборудование для подсчёта мононуклеаров :
гемоцитометр с микроскопом или геманализатор или
проточный анализатор**



Геманализатор

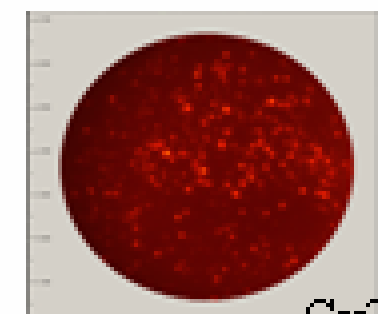


Пример гемоцитометра

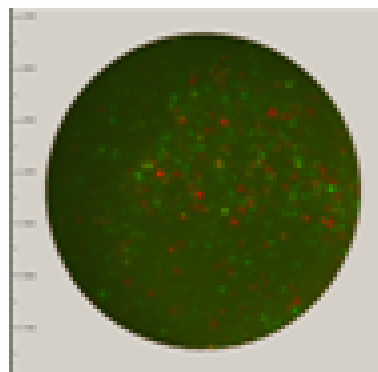
**Клеточный
анализатор**



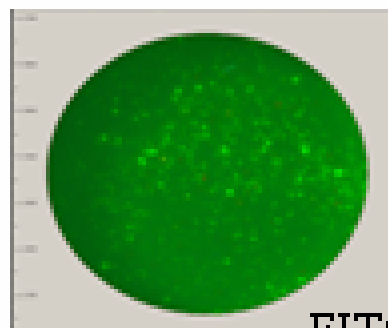
Технология FluoroSpot – новый способ детекции лимфоцитов, выделяющих несколько цитокинов (IF- γ /LN-2)



Cy3

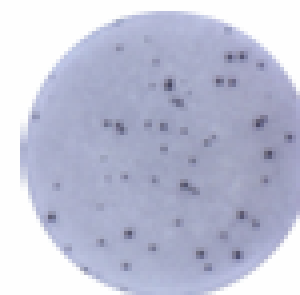


Флуоресцентный метод

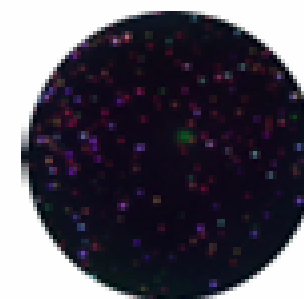


FITC

2-х цветный FluoroSpot



Ферментативный метод



3-х цветный FluoroSpot

Ридеры и реагенты для оперативной диагностики воспалительных процессов методом EliSpot

Уникальное программное обеспечение

AD BiSpot Software 5.0

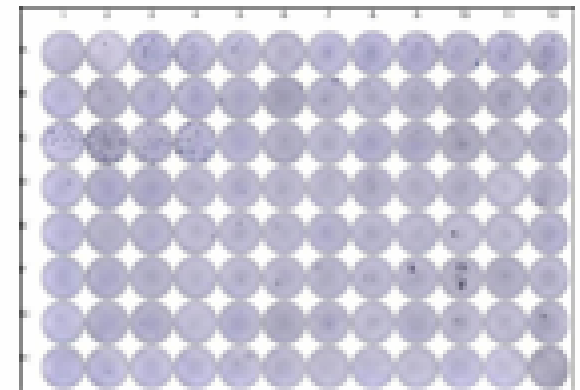
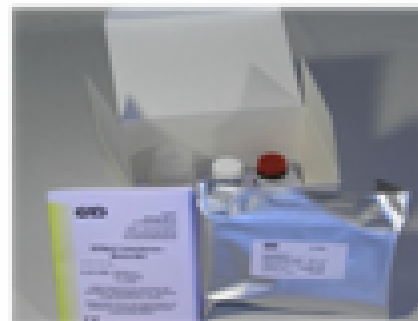


- Полный анализ одного микропланшета за 2-3 мин
- Фокусировка камеры и обработка изображений осуществляется уникальным ПО
- Подходит любой тип микропланшет
- Использует микропланшеты после ферментативного и/или флуоресцентного EliSpot метода анализа

Ридеры и реагенты для оперативной диагностики **воспалительных** процессов методом **EliSpot**



iSpot AID EliSpot Reader System



**Благодарю за
внимание.**