

УДК 612.017.1:616.523 -861.1 + 616.9.-022-036.2.

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЙ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Г. Н. Кызыметова

РГКП «ВКО ЦСЭЭ» КГСЭН МЗ РК, г. Усть-Каменогорск

Резюме

В работе дана характеристика одного из самых современных методов молекулярной биологии – ПЦР диагностики (полимеразная цепная реакция). Исследование методом ПЦР имеет ряд преимуществ перед привычными способами, так как данный метод ПЦР диагностики позволяет специфично увеличивать в сотни раз участок ДНК возбудителя заболевания в исследуемом образце. Проведен анализ объема выполненных исследований генетическим методом ПЦР диагностики в период с 2007 года по 2010 год в условиях лаборатории особо опасных инфекций.

Тұжырым

Инфекция ауруларын диагностикадағы зерттеулердің тектік әдісінің қолдануы

Молекулалық биологияның өзі қазіргі әдістерінің бірін мінездеменің (полимераз ұласпалы реакция) диагностиканы ПЦР осы жұмысында берілген. ПЦР әдістерді зерттеу үйреншікті әдістердің алдында артықшылықтарының қатарын алады, диагностиканы ПЦР осы әдіс өйткені зерттелетін үлгідегі ауруды қоздырушы днк бөлімшенің реттің жүздігінде үлкейтуге ерекше мүмкіндік береді. Ерекше қауіпті инфекциялардың лабораториясы шарттарындағы мерзімге диагностикасын ПЦР-дың тектік әдістің істелінген зерттеулері 2007 жылдан 2010 жылға дейін көлемнің талдау жүргізген.

Summary

Application of the genetic method of researches in diagnostics of infectious diseases

In work the characteristic of one of the advanced methods of molecular biology – PCR diagnostics (polymerases chain reaction) is given. Research by method PCR has a number of advantages before habitual ways as given method PCR of diagnostics allows is specific to increase in hundreds times a site of DNA of the activator of disease in the investigated sample. The analysis of volume of the executed researches by genetic method PCR of diagnostics during the period since 2007 for 2010 in the conditions of laboratory of especially dangerous infections is carried out.

Лабораторная диагностика - неотъемлемая часть современной медицины, без которой немислима полноценная врачебная помощь. В настоящее время идёт непрерывное совершенствование "старых" диагностических методов, разрабатываются новые, всё более эффективные и надёжные методики.

Методы лабораторной диагностики сегодня довольно многочисленны, и продолжают расширяться, их многообразие впечатляет, и становится понятной востребованность методик - сколько важной дополнительной информации позволяет лабораторная диагностика получить врачу, чтобы точно поставить диагноз и назначить лечение [2].

Наряду с традиционными морфологическими, иммунологическими и биохимическими методиками специалисты лабораторной службы сегодня применяют новые технологии в диагностике для получения более точных результатов.

Одним из самых современных методов молекулярной биологии является метод ПЦР диагностики (возможная ошибка составляет не более 5%) – исследование в полимеразной цепной реакции. Исследование методом ПЦР диагностики имеет ряд преимуществ перед привычными способами, так как данный метод позволяет специфично увеличивать – амплифицировать - в сотни раз участок ДНК возбудителя заболевания в исследуемом образце. Чувствительность метода значительно превосходит таковую у иммунохимических и микробиологических методов, а принцип метода позволяет диагностировать наличие инфекций со значительной антигенной изменчивостью [3, 4].

Теоретически метод ПЦР диагностики позволяет обнаружить даже единственную копию чужеродной ДНК в образце, что позволяет говорить об отсутствии у него предела чувствительности. Методом ПЦР возможно определение наличия возбудителя заболевания, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул ДНК данного возбудителя [3].

Кроме высокой чувствительности, исследование методом ПЦР имеет абсолютную специфичность, то есть если метод ПЦР диагностики выполнен правильно, то он не даёт ложноположительных результатов. Иначе говоря, чтобы выявить возбудителя и определить его природу более точно, необходимо вместе с обычными анализами сдать анализ ПЦР.

ПЦР позволяет диагностировать наличие долго растущих возбудителей, не прибегая к трудоемким микробиологическим методам. Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и скрыто существующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, поскольку этот метод позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях [3].

Кроме того, применение ПЦР-диагностики также очень эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов. Методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от больного, но и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва и т.д.) [5, 6, 7].

Материалом для проведения исследований методом ПЦР служат, как правило, биологические жидкости и выделения организма: кровь, моча, слюна, мокрота. Прежде чем сдать анализ ПЦР, необходимо проконсультироваться со специалистом и тщательно подготовиться к процедуре.

Исследование методом ПЦР очень эффективно для обнаружения возбудителей особо опасных инфекций – сибирская язва, лептоспироз, листериоз и другие. Метод ПЦР диагностики позволяет изучить генетический материал данных микроорганизмов, присутствующий в образце в минимальных количествах.

Исходя из всего вышесказанного, *целью исследования* явился анализ объема выполненных исследова-

ний генетическим методом ПЦР диагностики в период с 2007 года по 2010 год в условиях лаборатории особо опасных инфекций.

Объем и методы исследования. Проведен анализ использования генодиагностики на основе полимеразной цепной реакции в условиях лаборатории особо опасных инфекций Восточно-Казахстанского областного центра санитарно-эпидемиологической экспертизы в период с 2007 года по 2010 год.

Полимеразная цепная реакция, ПЦР (Polymerase chain reaction, PCR) - диагностический прием, позволяющий определять специфические нуклеиновые кислоты или их фрагменты с высокой степенью разрешения.

В основе метода лежит многоциклового процесс, напоминающий естественную репликацию нуклеиновой кислоты, причем, каждый цикл состоит из трех последовательных этапов.

Первый этап состоит в денатурации искомой нуклеиновой кислоты, достигаемой повышением температуры до 70 - 80°C, после чего нуклеиновая кислота присутствует в растворе в виде отдельных цепей; если искомой нуклеиновой кислотой является РНК, то она предварительно переводится в форму ДНК методом обратной транскрипции.

На втором этапе к определенному участку каждой из противоположных цепей присоединяются праймеры — короткие олигонуклеотиды, комплементарные известным нуклеотидным последовательностям; для осуществления этого присоединения температура среды понижается до 37 - 40°C.

На завершающем - третьем этапе - происходит синтез новых цепей (амплификация нуклеиновой кислоты) при участии фермента - термостабильной ДНК полимеразы, поскольку этот этап, как и первый, протекает при высокой температуре.

Через три цикла устанавливается стабильная амплификация фрагмента, соответствующего нуклеотидной последовательности между двумя праймерами определенного возбудителя.

Результаты и их обсуждение. Огромную помощь в совершенствовании лабораторной диагностики особо опасных инфекции в РГКП «ВКО ЦСЭЭ» КГСЭН МЗ РК оказала модернизация лабораторий, которая выполнялась в рамках Государственной программы реформирования здравоохранения Республики Казахстан. В 2006 году в лабораторию особо опасных инфекций Восточно-Казахстанского областного центра санитарно-эпидемиологической экспертизы – ВКО ЦСЭЭ - было приобретено 7 единиц оборудования, ведущим из которых явилось оборудование для проведения исследования в полимеразной цепной реакции – ПЦР в реальном времени. В январе 2007 года оборудование было установлено и освоено специалистами лабораторной службы. В том же году методы генетической диагностики были внедрены в практическую работу в условиях лаборатории особо опасных инфекций ВКО ЦСЭЭ.

В 2007 году метод амплификационных технологий нами был использован в идентификации ДНК при диагностике двух инфекционных патологий - сибирской язвы и бруцеллеза.

Оценка объема выполненных исследований генетическим методом ПЦР диагностики в лаборатории ООИ РГКП «ВКО ЦСЭЭ» КГСЭН МЗ РК в четырехлетней динамике показала расширение возможностей лабораторной диагностики ООИ и использование в настоящее время данной методики в диагностике следующих 5-ти нозологических форм заболеваний (таблица 1): бруцеллез; сибирская язва; лептоспироз; листериоз; птичий грипп

Таблица 1 - Объемы выполненных исследований генетическим методом лабораторией ООИ с 2007-2010гг.

Нозологическая форма заболевания	Исследуемый период, годы							
	2007		2008		2009		2010	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Бруцеллез	929	271	2074	302	1572	150	2327	276
Сибирская язва	216	0	457	12	240	0	198	0
Лептоспироз	-	-	-	-	-	-	175	54
Листериоз	-	-	-	-	-	-	27	1
Птичий грипп	-	-	48	0	22	0	-	-
ИТОГО	1145	271	2579	314	1834	150	2727	331

Примечание:

1 – Исследуемые пробы, количество

2 – Пробы с положительным результатом, количество

При этом количество исследуемых проб в течение 4-х лет увеличилось в 2,4 раза - с 1145 проб в 2007 году до 2727 проб в 2010 году.

При лабораторной диагностике бруцеллеза в качестве исследуемого объекта использовался материал, получаемый из объектов внешней среды и клинический материал, полученный от больных. В 2007 году было проведено 929 проб на бруцеллез, при этом в 29,2 % случаев (271 проба) был идентифицирован возбудитель бруцеллеза; в 2008 году – из 2074-х исследованных проб в 14,6 % случаев (302 проба) верифицирован бруцеллез; в 2009 году – 1572 пробы и 2,2 % случая (150 проб) соответственно; в 2010 году – 2327 пробы и 11,9 % случая (276 проб) соответственно (таблица 2).

Анализ результатов лабораторной диагностики генетическим методом сибирской язвы в период с 2007 г.

по 2010 г. определил наличие возбудителя *Bacillus anthracis* только в 2008 году – из 457-ми исследуемых проб в 2,6 % случаях (12 проб).

Генетическая диагностика лептоспироза и листериоза в условиях лаборатории ООИ началась с 2010 года, благодаря которой в 54-х пробах из 175-ти – был обнаружен возбудитель лептоспироза; в 1-ой пробе из 27-ми исследованных - возбудитель листериоза *Listeria monocytogenes*.

В условиях лаборатории ООИ в 2008 г. и 2009 г. генодиагностика была применена и в отношении вируса H5N1 - возбудителя птичьего гриппа, вирус в клиническом материале, полученном от больных обнаружен не был. В 2011 году планируется внедрение в работу лаборатории идентификации возбудителя клещевого боррелиоза в полимеразной цепной реакции.

Таблица 2 – Идентификация возбудителя бруцеллеза генетическим методом лабораторией ООИ с 2007-2010гг.

Исследуемый материал на бруцеллез	Исследуемый период, годы							
	2007		2008		2009		2010	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Материал от людей	511	251	707	169	477	87	799	139
Объекты внешней среды	418	20	1367	133	1095	63	1528	137
ИТОГО	929	271	2074	302	1572	150	2327	276

Примечание:

1 – Исследуемые пробы, количество

2 – Пробы с положительным результатом, количество

Заключение. Таким образом, для своевременного проведения противозидемиологических мероприятий, при возникновении случаев заболеваний ООИ необходима постановка лабораторного диагноза с достаточной быстротой и достоверностью.

Метод ПЦР улавливает единичные клетки в короткий промежуток времени (5-7 часов) и по сравнению с классическими методами диагностики ООИ генодиагностика с использованием амплификационных технологий отличается высокой чувствительностью и позволяет выявлять ДНК вегетативных и спорных форм микроорганизмов в биологическом материале и объектах внешней среды.

Литература:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. — М.: Мир, 2002. — 589 с.

2. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы. — М.: Наука, 2005. — В 2 т. — С. 96-104.

3. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия. — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. — 496 с.

4. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. in: Science, 1998. P. 487—491.

УДК 641.562+ 613.292

ОРГАНИЗАЦИЯ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ В ДОШКОЛЬНЫХ УЧРЕЖДЕНИЯХ

С. К. Касымбекова

РГКП «ВКО ЦСЭЭ» КГСЭН МЗ РК, г. Усть-Каменогорск

Резюме

В статье дана характеристика правильной организации питания детей в детских дошкольных учреждениях, где в настоящее время воспитывается более половина всех детей дошкольного возраста, а во многих крупных городах и промышленных центрах - практически все дети старше 1,5-2-х лет. Большинство детей находятся в дошкольном учреждении на продленном дне, в течение 12-14-ти часов, некоторые из них - на круглосуточном пребывании, и питание их, почти полностью в течение нескольких лет обеспечивается дошкольными учреждениями. Правильная организация питания позволяет поддерживать и укреплять здоровье, а нарушение, как это, к сожалению, чаще всего и бывает в современном мире, ведет к возникновению многих патологических состояний и заболеваний.

Тұжырым

Мектептік мекемелердегі бала қоректенуінің ұйымы

Үлкен 1,5-2-ші жылдар түгелдей дерлік балалар мектепке дейінгі жастың барлық балаларын жарты дәл қазір көп тәрбие алған бала мектептік мекемелеріндегі балалардың қоректенудің дұрыс ұйымының мінездемесінің Дағаның бабында көпшілігінде ірі қалалар және өнеркәсіптік орталықтар. Балалардың көпшілігі ұзартылған түпте, ағымында 12-14-ші сағат, кейбіреулер мектептік мекемеде болады - тәулік бойы болуда, және қоректену оларды, мектептік мекемелермен толық бірнеше жылдар ағымында қамтамасыз етілейін деп қалдиды. Қоректенудің дұрыс ұйымы денсаулық қостап марқалануға мүмкіндік береді, бұл бұзушылық өкінішке орай жиірек және қазіргі әлемде болады, көп патологиялық күйлер және ауруларды пайда болуға бағытталды.

Summary

The baby food organization in preschool centres

In article the characteristic of correct catering services of children in preschool institutions where more than half of all children of preschool age now is brought up is given, and in many big cities and industrial centers - almost all children are more senior 1,5-2th years. The majority of children there are in preschool center at the prolonged bottom, within 12-14 hours, some of them - on round-the-clock stay, and their food, almost completely within several years is provided with preschool centers. Correct catering services allow to support and strengthen health, and infringement as it, unfortunately, and happens more often in the modern world, conduct to occurrence of many pathological conditions and diseases.

Среди многих факторов внешней среды, постоянно воздействующих на детский организм и оказывающих влияние на рост, развитие и формирование его устойчивости, питанию принадлежит ведущая роль.

Соблюдение основного закона рационального питания - пища по своему количеству и качеству должна соответствовать потребностям растущего организма - обеспечивает усвоение пищевых веществ, положитель-