

РЕЦЕНЗИЯ

На дипломную работу Стрекаловской Кристины Михайловны
на тему «Вирусологические исследования при коронавирусе»
по специальности 31.02.03 «Лабораторная диагностика»

Структура дипломной работы Стрекаловской К.М. представлена введением, двумя главами, выводами. Объем работы 23 страниц печатного текста, имеются таблицы и диаграммы.

Дипломная работа является достаточно актуальной, так как пациентов болеющих коронавирусом не уменьшается. Отмечается, что коронавирусы – обширное семейство вирусов, которые поражают людей и животных.

В главе 1 рассмотрены литературные данные коронавируса и основные факторы риска, способствующие развитию заболевания.

В главе 2 представлены результаты исследования на примере Клиники СВФУ им. М.К.Аммосова. В дипломной работе проведен анализ, сделаны соответствующие выводы и рекомендации.

Примененные методы исследований и статистической обработки материалов являются достоверными, а выводы вполне обоснованными. Список использованной литературы является достаточным, содержит 2 наименований.

Замечание по выполнению дипломной работы нет.

Содержание работы соответствует специальности
31.02.03 «Лабораторная диагностика»

Заключение: дипломная работа Стрекаловской К.М. на тему «Вирусологические исследования при коронавирусе» по специальности 31.02.03 «Лабораторная диагностика» представленная к защите, представляет собой законченную научно - исследовательскую работу и может быть представлена к защите.

Рецензент:

Зев УИ КДА



Сторожева ВВ

Государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение
Республики Саха (Якутия)
«Якутский медицинский колледж»

О Т З Ы В
РУКОВОДИТЕЛЯ

Иларова Вера Иннокентьевна

на выпускную квалификационную работу студента группы ФЛ-19

Стрекаловской Кристины Михайловны

по теме: Вирусологические исследования коронавируса

Критерии:

Выпускная квалификационная работа Стрекаловской К.М., имеет достаточную степень соответствия. Структура работы логична, материал излагается последовательно, а его содержание свидетельствует о творческом подходе автора к рассматриваемым проблемам. Тема работы, заявленная на рассмотрение, раскрыта, надлежащим образом.

Отмеченные достоинства личностных характеристик выпускника

Организованность, целеустремленность.

Особых замечаний нет.

Заключение: Задание на выпускную квалификационную работу выполнено полностью

Подготовка студента соответствует требованиям ФГОС СПО по специальности 31.02.03. Лабораторная диагностика и он может быть допущен к процедуре защиты.

Подпись



Дата 14.06.22

Министерство образования и науки Республики Саха (Якутия)

ГБПОУ РС(Я) «Якутский медицинский колледж»



Допущена к защите:
Учебная
Зам. Директора по УР
часть Степанова А.Д.

СТРЕКАЛОВСКАЯ КРИСТИНА МИХАЙЛОВНА

«ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОРОНОВИРУСА»

Выпускная квалификационная работа по специальности

31.02.03. – Лабораторная диагностика

Студент отделения «Лабораторная диагностика»

Группы: ФЛ 19-1

Руководитель: Иларова Вера Иннокентьевна

г. Якутск – 2022г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	2
ГЛАВА I. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	4
1.1. Этиология и патогенез короновиральной инфекции	5
1.2. Эпидемиология и клиническая картина короновиральной инфекции.....	7
ГЛАВА II. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	11
2.1. Методы исследования и проведение забора биоматериала короновиральной инфекции COVID-19.....	11
2.2. Исследования анализа ПЦР короновиральной инфекции.....	15
2.4. Статистические данные короновиральной инфекции COVID-19, РС (Я)	20
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	22
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	23

ВВЕДЕНИЕ

Человечество находится в вечном противостоянии с миром микроорганизмов. Решив серьезно воевать против нас, микробы победили бы с легкостью, но этого не происходит и не произойдет. Заселив нашу планету, возможно, они «создали» человеческий род для себя и для эволюции самих себя. В новом тысячелетии человечество столкнулось с инфекционными болезнями, о которых никто не знал. На смену чуме и тифу пришли опасные вирусы. Изменение окружающей среды, потепление климата, увеличение плотности населения и другие факторы провоцируют их появление, а высокая миграционная активность населения способствует распространению по всему миру. Поистине, инфекции не знают границ

Лаборатория выполняет широкий спектр исследований в соответствии с профилем лечебного учреждения. Проводятся анализы квалифицированными специалистами, в короткие сроки, с высокой аналитической точностью и диагностической надёжностью, на современном высокотехнологичном оборудовании производства США, Япония, Франция.

Эпидемия COVID-19 («coronavirus disease 2019») уже вошла в историю как чрезвычайная ситуация международного значения. Нам еще предстоит изучение особенностей этой эпидемии, извлечь уроки, проанализировать недостатки обеспечения биологической безопасности населения. Ясно одно: новые вирусы будут появляться, это неотъемлемая часть нашего мира. Человечество должно научиться противостоять этим угрозам.

Актуальность темы обусловлена тем, что на данный момент времени заболевание коронавирусом COVID19 является, я думаю, проблемой №1 человечества. Таким образом, я бы хотел изучить отношение людей к коронавирусу COVID19, сделать некоторые выводы и обобщить полученную информацию.

Объект исследования: Пути передачи, источник инфекции, и расшифровка данных.

Предмет исследования: биологический материал больных с различными диагнозами COVID-19

Цель: Изучить лабораторную диагностику COVID-19.

Задачи исследования:

1. Изучить инфекционные заболевания COVID-19.
2. Изучить лабораторную диагностику биоматериала.
3. Собрать данные за 2 года и проанализировать.

ГЛАВА I. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

1.1. Этиология и патогенез короновиральной инфекции

Коронавирусная инфекция – острое вирусное заболевание с преимущественным поражением верхних дыхательных путей, вызываемое РНК-геномным вирусом рода Betacoronavirus семейства Coronaviridae.

Международный комитет по таксономии вирусов 11 февраля 2020 г. присвоил официальное название возбудителю инфекции – SARS-CoV-2. Коронавирусы (лат. Coronaviridae) – семейство, включающее на январь 2020 года 40 видов РНК-содержащих сложно организованных вирусов, имеющих суперкапсид. Объединены в два подсемейства, которые поражают человека и животных. Название связано со строением вируса: из суперкапсиды выдаются большие шиповидные отростки в виде булавы, которые напоминают корону. Вирион размером 80-220 нм. Нуклеокапсид представляет собой гибкую спираль, состоящую из геномной плюс-нити РНК и большого количества молекул нуклеопротеина N. Имеет самый большой геном среди РНК-геномных вирусов. Имеет суперкапсид, в который встроены гликопротеиновые тримерные шипы (гликопротеин S), мембранный протеин M, малый оболочечный протеин E, гемагглютининэстераза (HE), рис. 1.

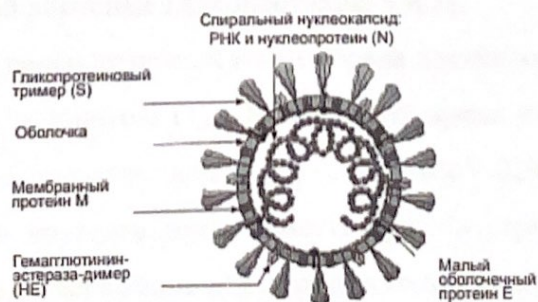
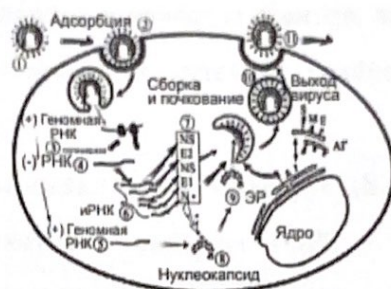


Рис. 1.

Назначение «короны» у коронавирусов связано со специфическим механизмом проникновения через мембрану клетки путём имитации молекул, на которые реагируют трансмембранные рецепторы клеток (рис. 2).



Вирус адсорбируется на клетке-мишени (1) при помощи гликопротеина S и проникает в клетку при слиянии оболочки вируса и цитоплазматической мембраны клетки или посредством рецепторного эндоцитоза (2). Геномная РНК связывается с рибосомами и служит и РНК при синтезе РНК-зависимой РНК-полимеразы (3), которая затем считывает геномную РНК, синтезируя минус-нить полной длины (4). При транскрипции минус-нити синтезируется новая геномная плюс-нить РНК (5) и набор из 5-7 субгеномных иРНК (6). При трансляции каждой субгеномной иРНК синтезируется один белок (7). N-белок связывается в цитоплазме клетки с геномной РНК, в результате чего синтезируется спиральный нуклеокапсид (8). Гликопротеины S и M, или E1, E2, переносятся (9, 10) в эндоплазматическую сеть и аппарат Гольджи.

Нуклеокапсид почкуется через мембраны внутрь эндоплазматической сети, содержащей вирусные гликопротеины S и M.

Вирионы транспортируются к мембране клетки-хозяина (10) и выходят из клетки путём эндоцитоза (11). В настоящее время известно о циркуляции среди населения четырёх коронавирусов (HCoV-229E, -OC43, -NL63, -HKU1), которые круглогодично присутствуют в структуре ОРВИ, и, как правило, вызывают поражение верхних дыхательных путей лёгкой и средней степени тяжести.

По результатам серологического и филогенетического анализа коронавирусы разделяются на три рода: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, и Gammacoronavirus. Естественными хозяевами большинства из известных в настоящее время коронавирусов являются млекопитающие. До 2002 года коронавирусы рассматривались в качестве агентов, вызывающих нетяжёлые заболевания верхних дыхательных путей (с крайне редкими летальными исходами).

В конце 2002 года появился коронавирус (SARS-CoV), возбудитель атипичной пневмонии, который вызывал ТОРС у людей. Данный вирус относится к роду Betacoronavirus. Природным резервуаром SARS-CoV служат летучие мыши, промежуточные хозяева – верблюды и гималайские циветты. Всего за период эпидемии в 37 странах мира зарегистрировано более 8 тыс. случаев, из них 774 со смертельным исходом. С 2004 года новых случаев атипичной пневмонии, вызванной SARS-CoV, не зарегистрировано. В 2012 году мир столкнулся с новым коронавирусом (MERS-CoV), возбудителем ближневосточного респираторного синдрома, принадлежащим к роду Betacoronavirus.

Основным природным резервуаром коронавирусов MERS-CoV являются летучие мыши и одногорбые верблюды (дромадеры). С 2012 года зарегистрировано 2519 случаев коронавирусной инфекции, вызванной вирусом MERS-CoV, из которых 866 закончились летальным исходом. Все случаи заболевания географически ассоциированы с Аравийским полуостровом (82% случаев зарегистрированы в Саудовской Аравии). MERS-CoV продолжает циркулировать и вызывать новые случаи заболевания.

Новый коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочечный РНК-содержащий вирус, относится к семейству Coronaviridae, относится к линии Beta-CoV B. Вирус отнесен ко II группе патогенности, как и некоторые другие представители этого семейства (вирус SARS-CoV, MERS-CoV). Коронавирус SARS-CoV-2 предположительно является рекомбинантным вирусом между коронавирусом летучих мышей и неизвестным по

происхождению коронавируса. Генетическая последовательность SARS-CoV-2 сходна с последовательностью SARS-CoV по меньшей мере на 79%. Основными клетками-мишенями для коронавирусов являются клетки альвеолярного эпителия, в цитоплазме которых происходит репликация вируса. После сборки вирионов они переходят в цитоплазматические вакуоли, которые мигрируют к мембране клетки и путем экзоцитоза выходят во внеклеточное пространство. Экспрессии антигенов вируса на поверхность клетки до выхода вирионов из клетки не происходит, поэтому антителообразование и синтез интерферонов стимулируются относительно поздно.

Образование синцития под воздействием вируса обуславливает возможность последнего быстро распространяться в ткани. Действие вируса вызывает повышение проницаемости клеточных мембран и усиленный транспорт жидкости, богатой альбумином, в интерстициальную ткань лёгкого и просвет альвеол.

При этом разрушается сурфактант, что ведёт к коллапсу альвеол, в результате резкого нарушения газообмена развивается острый респираторный дистресс-синдром. Иммуносупрессивное состояние больного способствует развитию оппортунистических бактериальных и микотических инфекций респираторного тракта. Патогенез новой коронавирусной инфекции изучен недостаточно. Данные о длительности и напряженности иммунитета в отношении SARS-CoV-2 в настоящее время отсутствуют. Иммунитет при инфекциях, вызванных другими представителями семейства коронавирусов, не стойкий и возможно повторное заражение.

1.2. Эпидемиология и клиническая картина коронавирусной инфекции.

Природным резервуаром вируса SARS-CoV-2 являются летучие мыши. Дополнительным резервуаром могут служить млекопитающие, поедающие летучих мышей, с дальнейшим распространением среди людей. Филогенетические исследования выделенных штаммов показали, что геномные последовательности вирусов, найденных в летучих мышах, на 99

процентов идентичны тем, что выделены у пациентов с COVID-19. В настоящее время основным источником инфекции является инфицированный человек, в том числе находящийся в конце инкубационного, продромальном периоде (начало выделения вируса из клеток-мишеней) и во время клинических проявлений. Механизм передачи – аспирационный. Пути передачи: воздушнокапельный (выделение вируса при кашле, чихании, разговоре) при контакте на близком расстоянии. Контактно-бытовой путь реализуется через факторы передачи: воду, пищевые продукты и предметы (дверные ручки, экраны смартфонов), контаминированные возбудителем. Риск переноса вируса с рук на слизистые оболочки глаз, носовой и ротовой полости и заболевания доказан. Возможна реализация фекально-орального механизма (в образцах фекалий от пациентов, заражённых SARS-CoV-2, был обнаружен возбудитель). Установлен факт реализации искусственного механизма передачи SARS-CoV-2. В КНР зарегистрировано более 1700 подтвержденных случаев заболевания медицинских работников, оказывавших помощь больным COVID-19. Восприимчивость и иммунитет: восприимчивость к возбудителю высокая у всех групп населения. К группам риска тяжёлого течения заболевания и риска летального исхода относятся люди старше 60 лет, пациенты с хроническими болезнями (болезнями органов дыхания, сердечно-сосудистой системы, онкологическими заболеваниями). Летальность варьирует от 2 до 4%. Вирус SARS-CoV-2 характеризуется низкой устойчивостью в окружающей среде. Погибает под воздействием УФО, дезинфекционных средств, при нагревании до 40 оС в течение 1 часа, до 56оС за 30 мин. На поверхности предметов при 18-25оС сохраняет жизнеспособность от 2 до 48 час.

Инкубационный период при COVID-19: от 2 до 14 сут., в среднем 5 суток. Для сравнения, инкубационный период для сезонного гриппа составляет около 2 дней.

Среди первых симптомов COVID-19 зарегистрировано:

- повышение температуры тела в 90% случаев;

- кашель (сухой или с небольшим количеством мокроты) в 80% случаев;
- ощущение сдавленности в грудной клетке в 20 % случаев;
- одышка в 55 % случаях; миалгии и утомляемость (44%);
- продукция мокроты (28%);
- головные боли (8%);
- кровохарканье (5%);
- диарея (3%);
- тошнота.

Данные симптомы в дебюте инфекции могут наблюдаться и при отсутствии повышения температуры тела [3].

Клинические варианты и проявления COVID-19:

1. Острая респираторная вирусная инфекция легкого течения.
2. Пневмония без дыхательной недостаточности.
3. Пневмония с ОДН.
4. ОРДС.
5. Сепсис.
6. Септический (инфекционно-токсический) шок.

Гипоксемия (снижение SpO₂ менее 88%) развивается более чем у 30% пациентов. Различают легкие, средние и тяжелые формы COVID-19. У большинства пациентов с тяжелым течением COVID-19 на первой неделе заболевания развивается пневмония. В легких с обеих сторон выслушиваются влажные крепитирующие, мелкопузырчатые хрипы. При перкуссии определяется притупление легочного звука. На высоте вдоха хрипы становятся более интенсивными, после кашля они не исчезают, не меняются в зависимости от положения тела больного (сидя, стоя, лежа). При рентгенографии отмечается инфильтрация в периферических отделах легочных полей. При прогрессировании процесса инфильтрация нарастает, зоны поражения увеличиваются, присоединяется ОРДС. Сепсис и

инфекционно-токсический шок наблюдаются при прогрессировании инфекции.

Таким образом коронавирусная инфекция – это острое вирусное заболевание с преимущественным поражением верхних дыхательных путей, вызываемое РНК-геномным вирусом рода Betacoronavirus семейства Coronaviridae.

Среди первых симптомов COVID-19 зарегистрировано:

- повышение температуры тела в 90% случаев;
- кашель (сухой или с небольшим количеством мокроты) в 80% случаев;
- ощущение сдавленности в грудной клетке в 20 % случаев;
- одышка в 55 % случаях; миалгии и утомляемость (44%);
- продукция мокроты (28%);
- головные боли (8%);
- кровохарканье (5%);
- диарея (3%);
- тошнота.

Клинические варианты и проявления COVID-19:

1. Острая респираторная вирусная инфекция легкого течения.
2. Пневмония без дыхательной недостаточности.
3. Пневмония с ОДН.
4. ОРДС.
5. Сепсис.
6. Септический (инфекционно-токсический) шок.

ГЛАВА II. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.

2.1. Методы исследования и проведение забора биоматериала коронавирусной инфекции COVID-19

Сегодня наиболее актуальной задачей общественного здравоохранения является обеспечение безопасности населения Российской Федерации. С этой целью проводится массовое тестирование населения на коронавирусную инфекцию. Оно позволяет выявить как заболевших (на любой стадии заболевания), так и бессимптомных носителей.

В настоящее время существует несколько видов исследований, у каждого из которых свои цели и назначения. Все исследования можно разделить на две большие группы: прямые – обнаружение возбудителя и непрямые – обнаружение иммунного ответа человека на контакт с возбудителем.

Прямые методы

1. Молекулярная диагностика – обнаружение РНК (генетического материала) коронавируса.

Этот тест предназначен для диагностики коронавирусной инфекции как у пациентов, у которых есть симптомы респираторной инфекции, так и у лиц без симптомов заболевания.

Для исследования проводится взятие мазка из носоглотки и ротоглотки, после чего проба направляется в лабораторию, где методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) определяется наличие либо отсутствие генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 (РНК). Если в пробе РНК коронавируса не обнаруживается, то это означает, что на момент взятия мазка пациент не инфицирован. Формат ответа при проведении ПЦР-тестирования может быть качественный: обнаружено / не обнаружено. И количественный – с указанием уровня вирусной нагрузки.

Метод ПЦР отличается высокой чувствительностью, и исследование информативно для выявления всех известных на данный момент штаммов коронавируса SARS-CoV-2, в том числе и для штамма «Омикрон».

Возможны ли отрицательные результаты исследования в том случае, если пациент болен или является носителем? Да, в редких случаях это возможно. Причин для этого несколько: низкая вирусная нагрузка (слишком малое количество вируса в верхних дыхательных путях), поздние стадии заболевания, когда у пациента есть поражение легких (вирус «спустился» из носоглотки в легкие). И, к сожалению, человеческий фактор – при неправильном взятии биологического материала: взятие мазка из носовых ходов и ротовой полости, а не носоглотки / ротоглотки.

2. Обнаружение антигенов коронавируса (экспресс-тесты).

Антигены – белковые частицы коронавируса SARS-CoV-2.

Вирусные антигены – это белки, входящие в состав вируса, которые распознаются иммунной системой нашего организма. Тест на выявление антигенов коронавируса SARS-CoV-2 так же используется для диагностики COVID-19 как у пациентов с симптомами респираторной инфекции, так и у бессимптомных лиц. Экспресс-тесты на выявление антигенов коронавируса достаточно просты в использовании, а их проведение не требует специальной лаборатории, больших временных затрат (как правило результат готов уже через 15–30 минут). Специальных навыков для проведения экспресс-тестирования также не требуется. Именно по этой причине экспресс-тесты на антигены коронавируса часто используются в учебных заведениях, на рабочих местах, в пунктах экспресс-тестирования в общественных местах, а также непосредственно на приеме врача. Если в результате исследования антигены коронавируса не обнаруживаются, это означает, что на момент проведения теста пациент не инфицирован. Впрочем, аналитическая чувствительность экспресс-теста несколько ниже, чем у метода ПЦР, поэтому если результат исследования отрицательный, а

у пациента есть симптомы заболевания COVID-19, то врач обязательно назначит дополнительный тест методом ПЦР. В случае, если результат исследования положительный – это свидетельствует об инфицировании коронавирусом SARS-CoV-2. Как и ПЦР-тест, отрицательный результат теста на антигены коронавирусы свидетельствует об отсутствии инфекции лишь на момент проведения исследования.

Возможны ли отрицательные результаты исследования, в том случае, если пациент болен или является носителем? Да, это возможно, и причины здесь схожи с ПЦР-тестированием: низкая вирусная нагрузка, поздние стадии заболевания, неправильное взятие биологического материала. Современные экспресс-тесты информативны для диагностики COVID-19 вне зависимости от того, каким штаммом коронавируса произошло инфицирование.

Непрямые методы исследования – обнаружение антител (иммуноглобулинов) против коронавируса SARS-CoV-2 в крови пациента.

Антитела, или иммуноглобулины – это белки, которые вырабатывает наша иммунная система в результате в результате инфицирования коронавирусом SARS-CoV-2. Причем антитела вырабатываются вне зависимости от того, были симптомы COVID-19 или пациент перенес заболевание бессимптомно.

1. IgM – «ранние» антитела, вырабатываются в самом начале заболевания и начинают обнаруживаются при исследовании крови уже на 5–7-е сутки. Длительность циркуляции IgM после COVID-19, как правило, составляет около 2 месяцев, но у некоторых пациентов они выявляются в течение нескольких месяцев после заболевания. Поэтому при их обнаружении без проведения ПЦР тестирования нельзя судить о наличии острой инфекции в настоящий момент. Диагноз COVID-19 может быть

подтвержден только прямыми методами диагностики – выявление РНК коронавируса либо его антигенов.

2. IgG – «поздние» антитела, начинают вырабатываться на 2–3 неделе заболевания, но у некоторых пациентов они могут обнаруживаться одновременно с IgM в более ранние сроки.

Однако для получения полной картины формирования иммунного ответа против коронавирусной инфекции важно понимать не только то, какой класс иммуноглобулинов IgM/ IgG выработались у пациента, но и к каким конкретно белкам коронавируса эти антитела сформировались.

Антитела к нуклеокапсидному белку коронавируса (белку, расположенному внутри вируса) формируются после перенесенного заболевания, но, к сожалению, не обладают свойствами препятствовать инфицированию. И их обнаружение нам говорит лишь о том, что пациент перенес COVID-19 ранее – это важно понимать в рамках оценки эпидемиологической ситуации: сколько пациентов нашей страны переболели, в том числе бессимптомно.

Антитела к spike-белку (белку оболочки вируса, благодаря которому вирус способен прикрепиться к клеткам нашего организма, тем самым осуществляя инфицирование). Обнаружение антител к spike-белку (либо его субъединицам) возможно как после перенесенного заболевания, так и после вакцинации. И самое главное: антитела к spike-белку являются нейтрализующими, то есть могут препятствовать инфицированию коронавирусом. К сожалению, на данный момент нет окончательных данных о том, как долго циркулируют нейтрализующие антитела и какой их уровень препятствует заражению. И самым надежным методом защиты от COVID-19 остается вакцинация!

Результат исследования на антитела может быть качественный: обнаружено / не обнаружено. И количественный – с указанием уровня антител в единицах ВАУ.

BAU («binding antibody units» – единицы связывающих антител) – единицы, принятые первым международным стандартом ВОЗ.

3. Для определения антител также могут использоваться экспресс-тесты – они выявляют наличие или отсутствие антител в венозной или капиллярной крови пациента. Экспресс-тест на антитела прост в исполнении, может использоваться на приеме у врача, результат может быть получен через несколько минут, но обладает меньшей чувствительностью, чем тесты, выполненные методом ИФА в условиях лаборатории.

2.2. Исследования анализа ПЦР короновирусной инфекции.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота - биологический полимер, один из двух типов нуклеиновых кислот, обеспечивающих хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов. Основная роль ДНК в клетках — долговременное хранение информации о структуре РНК и белков.

РНК– рибонуклеиновая кислота - биологический полимер, близкий по своему химическому строению к ДНК. Молекула РНК построена из тех же мономерных звеньев - нуклеотидов, что и ДНК. В природе РНК, как правило, существует в виде одиночной цепочки. У некоторых вирусов РНК является носителем генетической информации. В клетке играет важную роль при передаче информации от ДНК к белку. РНК синтезируется на ДНК-матрице. Процесс этот называется транскрипцией. В ДНК имеются участки, где содержится информация, ответственная за синтез трех видов РНК, различающихся по выполняемым функциям: информационной или матричной РНК (мРНК), рибосомальной (рРНК) и транспортной (тРНК). Все три вида РНК тем или иным способом участвуют в синтезе белка. Однако информация по синтезу белка содержится только в мРНК.

Нуклеотиды - основная повторяющаяся единица в молекулах нуклеиновых кислот, продукт химического соединения азотистого основания, пятиуглеродного сахара (пентозы) и одной или нескольких фосфатных групп. Нуклеотиды, представленные в нуклеиновых кислотах, содержат одну фосфатную группу. Они называются по содержащемуся в них азотистому основанию - адениновый (А), содержащий аденин, гуаниновый (G) - гуанин, цитозин (С) - цитозин, тимин (Т) - тимин, урациловый (U) - урацил. В состав ДНК входят 4 типа нуклеотидов - А, Т, G, С, в состав РНК также 4 типа - А, U, G, С. Сахаром в составе всех нуклеотидов ДНК является дезоксирибоза, РНК - рибоза. При образовании нуклеиновых кислот нуклеотиды, связываясь, образуют сахаро-фосфатный остов молекулы, по одну сторону которого находятся основания.

Праймер – короткая ДНК, используемая для репликации матричной цепи. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы, обрамляя начало и конец амплифицируемого участка.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР, PCR) изобрёл в 1983 году Кэри Мюллис (американский учёный). Впоследствии он получил за это изобретение Нобелевскую премию. В настоящее время ПЦР-диагностика является, одним из самых точных и чувствительных методов диагностики инфекционных заболеваний.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, способ значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

В основе метода ПЦР лежит многократное удвоение определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). В результате нарабатываются количества ДНК, достаточные для визуальной детекции. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. Кроме простого увеличения числа

копий ДНК (этот процесс называется амплификацией), ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК), и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, введения мутаций, выделения новых генов.

Специфичность и применение

ПЦР - метод молекулярной диагностики, ставший для ряда инфекций «золотым стандартом», проверен временем и тщательно апробирован клинически. Метод ПЦР позволяет определить наличие возбудителя заболевания, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул ДНК возбудителя.

ПЦР позволяет диагностировать наличие долго растущих возбудителей, не прибегая к трудоёмким микробиологическим методам, что особенно актуально в гинекологии и урологии при диагностике урогенитальных инфекций, передающихся половым путем (ИППП).

- Исследование урогенитального тракта методом ПЦР на ИППП;

Специфичность ПЦР при использовании технологии PCR даже для всех вирусных, хламидийных, микоплазменных, уреоплазменных и большинства других бактериальных инфекций достигает 100%. Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-диагностика обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать невозможно. 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.

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.). В урологической и гинекологической практике - для выявления хламидиоза, уреаплазмоза, гонореи, герпеса, гарднереллёза, микоплазменной инфекции, ВПЧ - вирусов папилломы человека; в пульмонологии - для дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных пневмоний, туберкулёза; в гастроэнтерологии - для выявления хеликобактериоза; в клинике инфекционных заболеваний - в качестве экспресс-метода диагностики сальмонеллёза, дифтерии, вирусных гепатитов В, С и G; в гематологии - для выявления цитомегаловирусной инфекции, онковирусов.

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами - короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18 - 30 букв. Каждый из праймеров сопоставим (комплементарен) с одной из цепей двуцепочечной матрицы, обрамляя начало и конец амплифицируемого участка. После соединения (гибридизации) матрицы с праймером (отжиг), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы.

Проведение ПЦР

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать;
- два праймера, комплементарные концам требуемого фрагмента;
- термостабильная ДНК-полимераза;
- дезоксинуклеотидтрифосфаты (A, G, C, T);
- ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы;
- буферный раствор.

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее $0,1^{\circ}\text{C}$. Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Добавление специфических ферментов может увеличить выход ПЦР-реакции.

Ход реакции

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20 - 35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до $94 - 96^{\circ}\text{C}$ (или до 98°C , если используется особенно термостабильная полимеразы) на 0,5 - 2 минуты, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией — разрушаются водородные связи между двумя цепями. Иногда перед первым циклом проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2 - 5 минут для полной денатурации матрицы и праймеров.

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется отжигом. Температура отжига зависит от праймеров и обычно выбирается на $4 - 5^{\circ}\text{C}$ ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5 - 2 минут. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия элонгации. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы наиболее активны при 72°C . Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 10 - 15 мин.

Подготовка материала к исследованию и транспорт его в лабораторию

Для успешного проведения анализа важно правильно собрать материал у пациента и правильно провести его подготовку. Известно, что в

лабораторной диагностике большинство ошибок (до 70%) совершается именно на этапе пробоподготовки. Для взятия крови в лаборатории в настоящее время применяются вакуумные системы, которые с одной стороны минимально травмируют пациента, а с другой - позволяют произвести взятие материала таким образом, что он не контактирует ни с персоналом, ни с окружающей средой. Это позволяет избежать контаминации (загрязнения) материала и обеспечивает объективность анализа ПЦР.

2.3. Статистические данные коронавирусной инфекции COVID-19, РС (Я), ФБУЗ " Центр гигиены и эпидемиологии в РС(Я)"

В 2020 году на территории республики согласно формы №2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» зарегистрировано 24441 случай новой коронавирусной инфекции в г. Якутске и 34 районах республики, показатель заболеваемости на 100 тысяч населения составляет 2531,0.(Табл 1)

Заболеваемость новой коронавирусной инфекции в Республике Саха (Якутии) в 2020 году (по месяцам на 100тыс населения)

Табл. 1



По состоянию на 9 ноября 2021г. за текущий год (в период с января по 9 ноября 2021г.) зарегистрировано 64718 случаев новой коронавирусной инфекции в Республике Саха (Якутия), показатель заболеваемости на 100 тысяч населения составляет 6675,4 – недельный темп прироста составляет 0,3%.(Табл 2)

Коэффициент распространенности инфекции (рис 1) в ноябре равен – 1.00, уровень летальности – 2,35%, уровень смертности 156,6 на 100 тысяч населения.

Табл 2



В ежемесячной динамике отмечается рост заболеваемости новой коронавирусной инфекции в августе на 35%, в сентябре на 15,2%, в октябре на 56,8%.

Таким образом., исходя из этих диаграмм за период с 2020 (с марта по декабрь) года по 2021 год (с января по 9 ноября) показал, что в 2020 году заболеваемость меньше чем в 2021 году на 40 277 случаев

Заключение

Коронавирусная инфекция — это группа острых инфекционных заболеваний, вызываемых различными серотипами коронавирусов. Характеризуется синдромом общей инфекционной интоксикации и синдромом поражения респираторного тракта, в основном верхних и средних его отделов — носа, глотки, гортани, трахеи и бронхов.

Обнаружение и распространение нового респираторного возбудителя сопровождаются неопределенностью в отношении его ключевых эпидемиологических, клинических и вирусологических характеристик и, в частности, его способности распространяться среди населения и вирулентности (соотношение числа случаев и тяжести заболевания). Это относится и к новой коронавирусной инфекции (COVID-19), впервые обнаруженной в городе Ухань, Китай, в декабре 2019 г.

В Республике Саха (Якутия) за 2 года способствовало повышению регистрации коронавирусной инфекции COVID-19 (2020г. - 24441 случая, 2021г. - 64718 случая).

Приоритетными задачами по снижению показателей заболеваемости COVID-19 в РС(Я) являются: соблюдение населения санитарных правил.

Список литературы

1. Государственный доклад " О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия в Республике Саха Якутия в 2020 , 2021 годах"
2. Учебно-методическое пособие «Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика»