

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства
здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)**

На правах рукописи

Морозов Евгений Николаевич

**ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ПАРАЗИТОЛОГИИ В МОНИТОРИНГЕ ЗА
СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫМИ ПАРАЗИТОЗАМИ**

03.02.11– Паразитология

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант
академик РАН, д.м.н., профессор
Сергиев Владимир Петрович

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Социальная значимость паразитарных заболеваний.....	15
1.2. Молекулярная паразитология как системный элемент обеспечения биологической безопасности России	19
1.3. Место молекулярной паразитологии в системе эпиднадзора	31
1.3.1. Виды мониторинга в системе эпидемиологического надзора	35
1.4. Современные методы диагностики паразитозов	37
1.5. Методологические принципы ПЦР	40
1.5.1. Классическая ПЦР	42
1.5.2. ПЦР в реальном времени	43
1.6. Перспективы применения методов молекулярной паразитологии.....	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ОБЪЕМ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	49
2.1. Материалы и объем исследований	49
2.1.1. Источник ДНК.....	49
2.1.1.1. Малярия.....	49
2.1.1.2. Лейшманиоз	50
2.1.1.3. Дирофиляриоз.....	50
2.1.1.4. Криптоспоридиоз	51
2.1.1.5. Лямблиоз	51
2.1.1.6. Блостоцистоз	51
2.1.2. Аппаратура и инструменты	52
2.1.3. Лабораторная посуда и материалы	53
2.1.4. Реактивы	53
2.2. Методы исследований	55
2.2.1. Выделение ДНК	55
2.2.2. Постановка ПЦР.....	55

2.2.3. Реактивы и оборудование для постановки ПЦР.....	55
2.2.4. Определение порога чувствительности ПЦР.....	57
2.2.5. Статистическая обработка результатов.....	58
ГЛАВА 3. ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПАРАЗИТОЛОГИИ В МОНИТОРИНГЕ ЗА ТРАНСМИССИВНЫМИ ПАРАЗИТОЗАМИ.....	
3.1. Малярия.....	59
3.1.1. Диагностические исследования.....	61
3.1.2. Поиск межштаммовых различий.....	66
3.2. Лейшманиозы	67
3.3. Трипаносомозы.....	69
3.4. Дирофиляриоз.....	69
3.5. Обнаружение возбудителей паразитозов в переносчике.....	71
ГЛАВА 4. ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПАРАЗИТОЛОГИИ В МОНИТОРИНГЕ ЗА НЕТРАНСМИССИВНЫМИ ПАРАЗИТОЗАМИ.....	
4.1. Криптоспоридиоз	75
4.2. Лямблиоз	76
4.3. Амебиаз	78
4.4. Токсоплазмоз	80
4.5. Трихомониаз	81
4.6. Блостоцистоз	81
4.7. Биогельминтозы	82
4.8. Геогельминтозы.....	83
ГЛАВА 5. ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ПАРАЗИТОЗАМИ (ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ).....	
5.1. Энтомологический мониторинг за переносчиками возбудителей дирофиляриозов.....	86

5.2. Создание инструментов эпидемиологического надзора за тропическими болезнями (на примере лихорадки Зика).....	88
5.3. Эпидемиологическая диагностика в потенциальных и активных очагах малярии.....	94
5.4. Проверка достоверности отсутствия больных малярией в оздоровленных очагах комплексом лабораторных методов диагностики	100
5.5. Скрининг населения с применением ДНК-диагностики в очагах висцерального лейшманиоза в Папском районе Наманганской области Республики Узбекистан	104
5.6. Результаты скрининга носителей бластоцист	112
ГЛАВА 6. ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ПАРАЗИТОЗАМИ ...	119
6.1. Мобильная паразитологическая лаборатория	121
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	133
ВЫВОДЫ	142
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	144
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	145
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	146
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	172
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	175
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	176
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	178

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В 90-х гг. XX века в России возникли «новые и возвращающиеся» социально опасные паразитозы, заражение возбудителями которых происходит из-за контаминации среды обитания человека [80]. Возбудители некоторых паразитозов являются потенциальными факторами биологической угрозы, ряд паразитарных болезней ассоциированы с ВИЧ-инфекцией. Наиболее частым патологическим проявлением паразитозов служит иммуносупрессия. В результате паразитозы способствуют частому возникновению других инфекционных болезней и неинфекционных патологических состояний [82, 89].

Как и при других видах инфекционной патологии, эффективность и стоимость лечения паразитарных болезней напрямую зависит от сроков выявления заболевания и стадии развития патологического процесса.

В связи с этим существует необходимость в современных высокочувствительных методах мониторинга за паразитарными болезнями (лабораторная диагностика паразитозов, мониторинг за лекарственной устойчивостью, контроль эффективности лечения, поиск внутривидовых различий возбудителей паразитарной природы, определение таргетных участков в геноме паразитов, как объект создания перспективных лекарственных средств нового поколения и др.). Одним из возможных путей решения этой проблемы может стать применение молекулярно-биологических методов, например, полимеразной цепной реакции (ПЦР), в настоящее время ограниченно применяющейся в отечественной паразитологии [56, 58].

Полимеразная цепная реакция в настоящее время является одним из наиболее эффективных диагностических инструментов индикации и идентификации фрагментов геномов возбудителей инфекционных и паразитарных болезней, а также изучения целых геномов различных патогенов

паразитарной природы. ПЦР в сравнении с традиционными методами диагностики обладает более высокой чувствительностью, специфичностью и позволяет проводить прямое определение присутствия генетических фрагментов микроорганизма непосредственно в клиническом материале без получения чистой культуры возбудителя, что сокращает сроки исследования и снижает трудозатраты. Такой подход является более информативным при диагностике внутриклеточных паразитов (малярия, лейшманиозы, токсоплазмоз и др.), плохо культивируемых на питательных средах [70, 71].

Различные варианты оборудования для ПЦР позволяют работать как в условиях полной автоматизации процесса, так и при чередовании ручных и автоматизированных этапов, что делает ПЦР доступной не только научным учреждениям и крупным медицинским центрам, но и клиническим и паразитологическим лабораториям системы Роспотребнадзора и первичного звена здравоохранения.

Широкое внедрение ПЦР в клиническую лабораторную диагностику требует повышения уровня информированности медицинских работников о теоретических основах и возможностях современных методических подходов и интерпретации результатов анализа.

Внедрению молекулярной диагностики, индикации и идентификации фрагментов геномов паразитов в практику может способствовать существование ПЦР-лабораторий в крупных медицинских центрах, осуществляющих ПЦР-диагностику возбудителей других инфекционных болезней: вирусов гепатита, иммунодефицита человека, микоплазмы и др. Диагностика паразитозов не требует специальной дополнительной подготовки персонала, а имеющиеся стандартные наборы реактивов могут быть дополнены лишь специально синтезированными праймерами.

Цель диссертационной работы: Разработка методологии мониторинга за социально значимыми паразитозами с применением методов молекулярной паразитологии.

Задачи исследований:

1. Проанализировать существующие в настоящее время молекулярно-биологические методики и оценить возможности их применения в медицинской паразитологии.

2. Адаптировать и оптимизировать молекулярно-биологические методы с учетом уникальной стадийности развития, свойственной исключительно возбудителям паразитарных болезней с различным патогенезом, определяющим локализацию возбудителя в организме больного и в среде обитания человека, где наиболее вероятно обнаружение патогена или фрагментов его генома.

3. Оптимизировать молекулярно-биологические методы диагностики паразитозов с учетом разнообразия механизмов передачи их возбудителей.

4. Сравнить эффективность молекулярно-биологических методов с традиционными методами диагностики паразитарных заболеваний.

5. Разработать методические подходы к дифференциальной диагностике кишечных протозоозов.

6. Оценить возможность использования оптимизированных молекулярно-биологических методик для лабораторной, клинической и эпидемиологической диагностики, а также для санитарной паразитологии.

Научная новизна результатов исследований:

1. Оценена возможность применения методов молекулярной биологии в мониторинге за паразитами, вызываемыми различными возбудителями протозойных инфекций (малярия, лейшманиозы, криптоспоририоз), гельминтными инвазиями и за комарами-переносчиками (дирофиляриозы), которая показала их значительную эффективность как в клинических, так и в популяционных исследованиях.

2. Выявлены внутривидовые фено- и генотипические различия малярийных паразитов *P. vivax*, определяющие географическое происхождение случаев малярии и продолжительность инкубационного периода в организме человека.

3. Комплексом лабораторных методов (микроскопия, экспресс-тесты и ПЦР) подтверждена достоверность отсутствия источников инфекции в оздоровленных очагах малярии в Республике Таджикистан и Кыргызской Республике, что подтвердило факт элиминации малярии в указанных государствах согласно регламенту ВОЗ.

4. Оптимизирована методика ПЦР-диагностики криптоспоридий в водных объектах окружающей среды, что существенно увеличило эффективность и чувствительность санитарно-паразитологических исследований, необходимых для определения гигиенических стандартов и биологической безопасности.

5. Показана возможность применения ДНК-диагностики в деятельности Референс-лабораторий при проведении контрольных исследований с целью определения качества работы клинично-диагностических и паразитологических лабораторий.

6. Разработаны методики ПЦР-диагностики единственного на территории Российской Федерации трансмиссивного гельминтоза человека – дирофиляриоза, а также висцерального лейшманиоза в очагах Республики Узбекистан.

Практическая ценность работы:

Внедрение в практику отечественного здравоохранения методов молекулярной паразитологии позволяет оптимизировать и повысить достоверность диагностики социально значимых паразитозов и усовершенствовать мониторинг паразитологической ситуации в стране.

Применение этих методов в Референс-лабораториях помогло сократить трудозатраты при контроле диагностики паразитозов, что наглядно доказала работа Референс-лаборатории НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им.Е.И.Марциновского по диагностике малярии, лейшманиозов и филяриозов.

Материалы исследований используются в виде лекций, семинарских и практических занятий:

- Кафедрой тропической медицины и паразитарных болезней медико-профилактического факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по специальностям 03.02.11 - «паразитология» и 03.02.05 – «энтомология»;
- НИИ МПиТМ им. Е.И.Марциновского ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава РФ в проведении учебных курсов ВОЗ и Минздрава РФ по эпидемиологическому надзору за паразитарными болезнями.

Проведенные исследования являются результатом многолетнего научного сотрудничества медицинских учреждений стран СНГ: Российской Федерации, Кыргызской Республики, Республики Узбекистан и Республики Таджикистан.

Внедрение материалов исследований в практику:

Разработанный метод ПЦР-диагностики малярии внедрен в практику Референс-центра по мониторингу за малярией, лейшманиозам и филяриозам (приказ Министерства здравоохранения РФ от 17.03.2008 №88) по паразитарным заболеваниям, функционирующего на базе НИИ МПиТМ им. Е.И.Марциновского ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава РФ.

Материалы диссертации включены в методические указания: «Профилактика дирофиляриоза» МУ 3.2.1880-04, 2004 г., «Санитарно-паразитологический анализ воды» МУК 4.2.2314-08, 2008 г., Санитарно-паразитологические исследования плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции МУК 4.2.3016-12, 2012 г., «Лабораторная диагностика гельминтозов и протозоозов» МУК 4.2.3145-13, 2014 г., «Профилактика энтеробиоза» Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.2.3110-13, 2014 г. и «Лабораторная диагностика малярии и бабезиоза» МУК 4.2.3222-14, 2014 г.

Результаты диссертационного исследования опубликованы в разделе справочника «Методики клинических лабораторных исследований» том 3 под ред. В.В.Меньшикова, Москва, 2009 г. и в разделе практического руководства «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» под ред. Г.Г.Онищенко и В.В.Кутырева, Москва, 2013 г.

Основные положения диссертации вошли в специализированный раздел Практического руководства «Стандарты и алгоритмы мероприятий при инфекционных и паразитарных болезнях» Алма-Ата, Казахстан, 2008 г.

Положения, выносимые на защиту:

1. Формирование нового для Российской Федерации научного направления «молекулярная паразитология» открывает новые возможности для медицинской науки и практики здравоохранения и государственного санитарно-эпидемиологического надзора. Применение характерных для молекулярной медицины, пока недостаточно используемых в медицинской паразитологии, молекулярно-биологических технологий позволяет получить новые научные данные и существенно расширить научные знания в этиологии и патогенезе паразитарных болезней, в открытии истинных причин возникновения ряда массовых социально значимых заболеваний человека, пока относимых к неинфекционным болезням.

2. Использование методов молекулярной паразитологии позволило получить объективные данные о распространении патогенов паразитарной природы, оценить и рассчитать уровень риска заражения возбудителями паразитарных болезней за счет индикации, идентификации и количественного определения степени контаминации абиотических объектов среды обитания человека (рекреационные водоемы, источники и системы хозяйственно-питьевого водоснабжения, продукты питания, бытовые отходы, хозяйственно-фекальные сточные воды), и зараженности возбудителями паразитарных болезней биологических объектов, играющих роль промежуточных хозяев и переносчиков.

3. Методы молекулярной паразитологии, применённые для изучения ареалов комаров-переносчиков позволили доказать завоз и укоренение на территории Российской Федерации экзотических видов комаров *Aedes aegypti* и *Ae. albopictus*, способных передавать возбудителей вирусных лихорадок Денге, Чикунгунья и Зика. Указанными методами удалось доказать наличие и отсутствие передачи малярии (Республика Таджикистан и Киргизская Республика), что

послужило основой для признания элиминации малярии на этих территориях, и дирофиляриоза (Кировская область РФ).

Апробация результатов исследования

Основные положения диссертации были доложены на:

- I международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность», Москва, 26-28 октября 2004 года
- IX съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва, 26-28 апреля 2007 года
- VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2010», Москва, 24-26 ноября 2010 года
- Всероссийской конференции «Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период», Ростов-на-Дону, 28-29 сентября 2011 года
- VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014», Москва, 18-20 марта 2014 года
- Научно-практической конференции с международным участием «Современные вопросы медицинской паразитологии и инфекционных заболеваний», Самарканд, Республика Узбекистан, 28-29 октября 2014 года
- II Всероссийской конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания», Сочи, 02-05 ноября 2015 года
- XIX форуме «Национальные дни лабораторной медицины – 2015», Москва, 23-25 сентября 2015 года
- XXIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 11-14 апреля 2016 года
- XVI семинаре-конференции проекта 5-100, Москва, 06-08 июня 2016 года

➤ II Российском конгрессе лабораторной медицины, Москва, 12-14 октября 2016 года

➤ III Всероссийской конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания», Сочи, 01-04 ноября 2016 года

➤ IX Ежегодном всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 27-29 марта 2017 года

➤ IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2017», Москва, 18-20 апреля 2017 года

➤ III Российском конгрессе лабораторной медицины, Москва, 11-13 октября 2017 года

Диссертация апробирована на совместном заседании института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им.Е.И.Марциновского и кафедры тропической медицины и паразитарных болезней МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им.И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 7 от 19 октября 2017 года).

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации

Автор лично сформулировал новое научное направление – молекулярную паразитологию, широко пропагандировал его на различных, в том числе и международных, научных форумах, уточнил и апробировал подходы к экспериментальному конструированию ПЦР-диагностикумов, спланировал и осуществил экспериментальную часть работы.

Е.Н.Морозовым предложена и обоснована возможность применения молекулярно-паразитологических методов не только в стационарных лабораторных условиях, но и в условиях мобильной паразитологической лаборатории. Автор принимал консультативное и методическое участие на всех этапах разработки рабочей конструкторской документации на мобильную паразитологическую лабораторию на базе автобуса ПАЗ.

Им сформулированы практические рекомендации по использованию молекулярно-биологических методов в системе эпиднадзора за массовыми и социально-значимыми паразитарными болезнями.

Автор самостоятельно проанализировал литературные данные, результаты выполненных им исследований, провел статистическую обработку полученных данных.

Публикации. По материалам исследований опубликовано 44 печатных работы, из них в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК России – 35. Получен один патент Российской Федерации № 2568516, написаны разделы в 4 монографиях, а также опубликовано четыре статьи в зарубежных научных журналах.

Связь диссертационной работы с планами НИР

Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной темы НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им.Е.И.Марциновского ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова «Совершенствование методов профилактики и лечения массовых и социально значимых паразитозов», № гос. регистрации 012101255415.

Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности

Областью исследования представленной диссертационной работы Морозова Евгения Николаевича являются: формулирование концепции применения методов молекулярной биологии в паразитологии и формирование нового для Российской Федерации научного направления – молекулярной паразитологии. Задачи и научные положения диссертации, выносимые на защиту, соответствуют формуле специальности 03.02.11 «паразитология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования паспорту специальности 03.02.11 «паразитология», конкретно пунктам 7, 8, 9.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 198 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и

методов исследований, четырех глав собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 215 публикаций, из которых 102 иностранных и четырех приложений. Работа иллюстрирована 21 таблицами, 9 рисунками.

Благодарности

Выражаю искреннюю признательность научному консультанту, заведующему кафедрой тропической медицины и паразитарных болезней МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), главному научному сотруднику ИМТиТЗ им.Е.И. Марциновского, доктору медицинских наук, профессору, академику РАН Владимиру Петровичу Сергиеву за помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы.

Выражаю благодарность сотрудникам ИМТиТЗ им. Е.И. Марциновского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) за экспертную помощь д.м.н., профессору А.М.Барановой, к.м.н. А.В. Кондрашину, к.м.н. Т.В.Продеус, д.б.н., профессору Е.Н.Понировскому, д.б.н. Л.А. Ганушкиной, к.б.н. В.Г. Супряге, а также, главному специалисту-эксперту Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, д.м.н. Т.М.Гузеевой.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Социальная значимость паразитарных заболеваний

Паразитарные болезни являются одной из важных, но не всегда осознаваемых проблем мирового здравоохранения. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) включила эту патологию в состав, так называемых «незамечаемых или забытых тропических болезней» (ЗТБ), хотя паразитарные болезни имеют убиквитарное распространение и кроме тропиков поражают определенную долю населения наиболее экономически развитых стран мира. Вопросами ЗТБ в штаб-квартире ВОЗ (Женева) занимается самый большой по численности департамент этой организации.

По величине ущерба, наносимого здоровью людей, кишечные гельминтозы занимают четвертое место среди всех болезней и травм (Всемирный банк, 1993). Отрицательное влияние кишечных гельминтозов на социальное развитие общества и экономику многих стран столь велико, что борьба с паразитарными болезнями, как одна из важнейших глобальных проблем, рассматривалась отдельным вопросом на встрече лидеров Восьми наиболее экономически развитых стран мира проходившей в Бирмингеме в 1998 году. Кишечные гельминтозы являются наиболее массовой патологией. По оценке в мире насчитывается более 1,4 млрд. больных.

Паразитарные болезни сохраняют лидирующее положение в России среди массовых инфекций, 95% паразитарных заболеваний связано с заражением гельминтами (глистными инвазиями) [16, 21, 68, 93, 94].

В России при официально регистрируемых 0,5-1,0 млн. случаев истинное число ежегодно заболевающих паразитозами превышает 20 млн, 85% от этого числа составляют дети. Несколько млн. детей поражены также патогенными простейшими (бластоцистами, лямблиями и др.). Сложившееся положение с заболеваемостью паразитарными болезнями является следствием того, что врачи-

педиатры и специалисты по гигиене детей и подростков недостаточно знакомы с этой патологией и не уделяют должного внимания профилактике паразитозов (Коллегия Минздрава РФ, 2001).

Вызывая у человека преимущественно хронические заболевания, паразитарные болезни оказывают многообразное комплексное выраженное отрицательное патологическое воздействие на состояние здоровья, прежде всего, детского организма. Наиболее общим патологическим воздействием паразитозов на организм человека являются иммуносупрессия и аллергизация. Кроме того, паразитозы усугубляют течение соматических заболеваний. Помимо прямого патологического воздействия на организм заболевших, паразитарные болезни вызывают задержку психического и физического развития детей, снижение работоспособности взрослых. За счет развивающегося вторичного иммунодефицита на фоне практически любой паразитарной патологии многократно увеличивается риск появления других инфекционных и неинфекционных заболеваний. Многочисленные эпидемиологические наблюдения свидетельствуют, что на фоне кишечных паразитозов в 2-5 раз чаще возникают острые кишечные инфекции [91, 141, 176]. На таком неблагоприятном фоне у больных детей отмечено снижение успеваемости и ослабление памяти [82]. Вторичный иммунодефицит паразитарной природы снижает эффективность плановой вакцинопрофилактики [82, 91].

В проводившихся Научно-исследовательским институтом медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И.Марциновского под нашим руководством в начале XXI в по заданию Минздрава России широких исследованиях было показано, что не только аскаридоз, но и токсокароз, и в меньшей степени энтеробиоз отрицательно влияют на развитие поствакцинального иммунитета к дифтерии (вакцинация и ревакцинация), кори и даже столбняку [82, 92].

Однако, эти исследования не получили должного внимания. В результате сложилась парадоксальная ситуация: «Если Вы приходите к ветеринару и просите

вакцинировать свою собаку или кошку, то Вам в обязательном порядке предложат сначала дегельминтизировать животное», в противном случае эффект от прививки будет незначительным. Однако при плановой иммунизации детей, врачи даже не подозревают о возможности неудачи иммунизации в связи с паразитарным заболеванием у ребенка; и поэтому не проводят необходимую дегельминтизацию.

Массовое применение антигельминтных химиопрепаратов позволяет резко снизить ущерб от кишечных гельминтозов. Как показывают медико-экономические исследования, профилактика массовых кишечных гельминтозов медикаментозными средствами сопоставима по экономической эффективности с вакцинопрофилактикой и даже более рентабельна, чем вакцинация против кори. Появление нетоксичных высокоэффективных антигельминтных препаратов, позволяющих добиваться хорошего эффекта при однократном приеме препарата или в результате короткого курса лечения, позволило Международной группе по ликвидации болезней (США) рассматривать вопрос о ликвидации ряда кишечных гельминтозов (MMWR, 1992).

Различные аспекты усиления профилактики гельминтозов в России рассматривались на Парламентских слушаниях в Государственной Думе Федерального Собрания Российской Федерации (2002 г.). На Правительственной комиссии по охране здоровья граждан (2003 г.). Коллегия Минздрава России определила в качестве приоритетной задачи – снижение заболеваемости кишечными гельминтозами в соответствии с реализацией стратегии ВОЗ (Минздрав России, 2001).

Долгое время считалось, что рак связан практически с любыми факторами, но полностью игнорировалась роль паразитарных агентов в развитии злокачественных новообразований. В последние годы связь рака и паразитарных болезней становится все более очевидной. Признание существования живого возбудителя в качестве этиологической причины, хотя бы на первом этапе у некоторых форм злокачественных новообразований, сразу открывает широкие возможности для реальной профилактики этих смертельных болезней. Советские

исследователи рассматривали вирусы, бактерии и паразиты «как скрытую причину» опухолей. Многие кишечные гельминты являются канцерогенами.

По материалам, опубликованным ВОЗ, до 84% некоторых форм рака этиологически связаны с живыми возбудителями, в том числе паразитами. В России многие исследователи констатировали повышенную заболеваемость раком желчных протоков на территории гиперэндемичных очагов эндемичного для нашей страны описторхоза, вызываемого *Opisthorchis felinus* – кошачьей или сибирской двуусткой. Карцинома печени была обнаружена в 0,14-0,9 % всех вскрытий, проведенных в Тюменской области, где регистрируется наибольшая заболеваемость описторхозом. При этом уровень заболеваемости первичным раком печени в Тюменской области в 7 раз выше, чем в других регионах России [61].

Патологоанатомические исследования, проведенные в Тюменской области, показывают наличие связи между описторхозом, развитием рака печени и холангиокарциномы [10, 11]. На юге Тюменской области, где пораженность описторхозом не превышает 0,5%, частота рака печени составляет 4,4 случаев на 100 000 населения. В центре Тюменской области (Ханты-Мансийский Автономный округ), где средняя пораженность населения описторхозом более 45%, рак печени регистрируется на уровне 49,8 на 100 000 населения или более чем в 10 раз чаще. В высокоэндемичных по описторхозу Ханты-Мансийском Автономном округе и Тобольском районах уровень первичного рака печени, рака поджелудочной железы и рака желчных протоков соответственно в 3, 2 и 13 раз выше по сравнению с гипоэндемичными районами той же Тюменской области [20, 21].

Таким образом, патология паразитарной природы остается не только массовой, но и социально значимой проблемой для отечественного здравоохранения и медицинской науки. Среди населения Российской Федерации выявляются следующие основные паразитарные болезни, подлежащие учету:

- протозоозы - малярия (отдельно - паразитоносители), токсоплазмоз, лямблиоз, криптоспоририоз, пневмоцистоз, амебиаз и др.;
- гельминтозы - аскаридоз, трихоцефалез, энтеробиоз, тениаринхоз, тениоз, гименолепидоз, дифиллоботриозы, описторхоз, клонорхоз, парагонимоз, метагонимоз, нанофиетоз, псевдамфистомоз, церкариозы, эхинококкозы, токсокароз, стронгилоидоз, анизакидозы, фасциолез; а также завозные из стран зарубежья – шистосоматозы, анкилостомидозы, трихостронгилидозы, филяриидозы, дракункулез;
- акарозы – чесотка, демодекоз, клещевые дерматиты, клещевые аллергозы;
- дерматозы, вызываемые насекомыми – педикулез.

1.2. Молекулярная паразитология как системный элемент обеспечения биологической безопасности России

Современные достижения мировой биологии и медицины создали предпосылки для появления молекулярной паразитологии, формирующейся на стыке фундаментальных наук и практической паразитологии. К ним относятся расшифровка генома человека, разработка концепции программированной гибели клетки, успешное введение в практику экспериментальной биологии методов культивирования стволовых клеток и ряд других [65, 197]. В результате достигнутого прогресса развитие молекулярной паразитологии и медицины вступило в новую фазу. Появляются практически безграничные возможности вмешательства в процессы жизнедеятельности человеческого организма. Игнорирование этих революционных достижений и попытки продолжать развитие традиционных методов и средств профилактики и лечения паразитарных болезней могут привести к значительному отставанию России в области теоретической и практической медицины. Указанное обуславливает необходимость активного развития в России молекулярной паразитологии, основными задачами которой являются познание причин возникновения и

механизмов развития большинства паразитарных заболеваний, разработка новейших методов профилактики, диагностики и лечения заболеваний, осуществляемых на молекулярном и клеточном уровнях [51, 65].

В Российской Федерации продолжается рост заболеваемости населения социально значимыми болезнями: онкологическими, инфекционными, наследственными, паразитарными и рядом других. Возникновение термина "социально значимые болезни" подчеркивает, что профилактика, диагностика и лечение указанных болезней остается одной из первостепенных проблем здравоохранения. Последнее несет значительный экономический ущерб в связи со снижением трудоспособности, утратой трудоспособности и увеличением инвалидности, и смертности населения, вызванных этой патологией [63, 64].

Инфекционные и паразитарные болезни повсеместно остаются ведущей причиной смертности населения, занимая в ее структуре 3-4-е место даже в развитых странах. Согласно оценкам ВОЗ ежегодно более 2 млрд. человек страдают инфекционной и паразитарной патологией. Каждый год среди 51 млн человек, погибающих от всех причин, от инфекций и паразитозов умирают 17 млн., что существенно больше, чем от сердечно-сосудистых болезней. По оценкам российских экспертов, а также по данным ВОЗ, в ближайшие годы в России будет возрастать число социально значимых заболеваний, что обусловлено ухудшением экологии, снижением уровня жизни населения и качества медицинской и лекарственной помощи [42, 46, 57, 90, 130].

Особое внимание должно уделяться профилактике и своевременной диагностике паразитарных болезней. По расчетам экспертов ВОЗ профилактика каждого из случаев острых и хронических инфекционных заболеваний, включая паразитозы, будет стоить менее 0,35 долларов США, что эквивалентно цене утренней газеты. Пока эти деньги не выделены, ежегодно от них будут умирать десятки миллионов людей, а убытки от потери трудоспособности составлять миллиарды долларов [114, 175].

Проблемы формирования и развития молекулярной паразитологии, а также обеспечения биобезопасности населения РФ требуют комплексного подхода к ее решению, который возможен только на государственном уровне путем целенаправленных скоординированных действий федеральных органов исполнительной власти, ведомственных служб государственной системы здравоохранения, ветеринарии, органов исполнительной власти субъектов РФ, органов местного самоуправления научных и общественных организаций [5, 65, 90, 112].

Вместе с тем, реализация данного научного направления на основе применения достижений молекулярной паразитологии будет способствовать улучшению показателей качества жизни населения РФ, увеличению ее продолжительности, обеспечению биобезопасности государства путем разработки и внедрения новых способов диагностики, профилактики и лечения [65].

Основной задачей реализации направления должно стать формирование этой отрасли медицинской науки и практической медицины, базирующейся на принципиально новом подходе к болезни и больному: исследование причин возникновения заболевания на уровне гена, разработка новых способов диагностики заболеваний человека и создание спектра высокоэффективных лекарственных средств нового поколения; концентрация ресурсов на проектах, имеющих наибольшее значение для повышения качества жизни населения и биологической безопасности России [62, 65, 84, 85].

Необходимо предусматривать поэтапное выполнение комплекса мероприятий для повышения эффективности профилактики, диагностики и адекватной терапии на основе современных инновационных технологий, уделяя особое внимание разработке новых генно-инженерных и клеточных технологий для высокоэффективной профилактики и терапии паразитарных заболеваний человека.

Исследование молекулярных механизмов реализации патологической генетической информации будет первым шагом в решении задач молекулярной

паразитологии. Это необходимая база для развития инновационных технологий, направленных на совершенствование диагностических, профилактических и лечебных мероприятий большинства социально значимых заболеваний, в т.ч. паразитарных.

Развитие диагностики должно идти в направлении выявления первых досимптоматических и доклинических признаков паразитарных заболеваний, что позволит использовать эти подходы при диспансеризации населения для профилактики или проведения адекватной терапии [4, 34, 136].

Знание молекулярно-генетических причин развития паразитарных болезней будет способствовать наиболее радикальному способу лечения заболеваний генной терапии [178]. При этом прослеживается возможность как коррекции, так и уничтожения возникших аномалий в клетке. Направление генной терапии уже около 20 лет активно развивается в прогрессивных странах мира. Вместе с тем, при соответствующем финансировании исследования и разработки этой области в РФ можно существенно ускорить.

Перспективными для развития молекулярной паразитологии являются работы в области клеточных технологий. Для заместительной и иммунокорректирующей терапии ряда паразитарных заболеваний исследуется возможность использования стволовых клеток и мезенхимальных клеток предшественников из различных тканей человека. Клеточные технологии при современном уровне развития науки в России применяются только для ускорения репаративных процессов в хронических или длительно-незаживающих ранах. Разработка подходов по использованию стволовых клеток и клеток-предшественников из различных тканей человека открывает широкие перспективы для развития молекулярной паразитологии и лечения социальнозначимых заболеваний, включая паразитарные [14, 48].

При развитии фармацевтического направления необходимо способствовать проведению исследований, связанных с поиском путей и подходов направленной

доставки лекарственных средств в аномальную или чужеродную клетку. Перспективность этих работ обусловлена возможностью высокоточного поражения конкретного очага болезни или даже одной клетки без оказания побочного токсического влияния на соседние здоровые клетки и организм в целом [69, 101, 106, 165].

Молекулярно-медицинские подходы будут весьма эффективны при разработке средств защиты населения от возможного использования генных технологий для воздействия на генетический фонд нации. Между тем, отсутствие четкой государственной политики в области генно-инженерных разработок приводит к возрастающей зависимости РФ от импортных медицинских генно-инженерных технологий и внешних воздействий, угрожающих генетическому здоровью нации в условиях неблагоприятной демографической ситуации.

Необходимо предусмотреть проведение научно-исследовательских работ, направленных на разработку и внедрение методов диагностики, современных методов лечения и создание новых классов лекарственных противопаразитарных средств. Перспективность полученных результатов будет рассматриваться с учетом научно-обоснованных и разработанных критериев оценки эффективности мероприятий по предупреждению и лечению паразитарных заболеваний. Указанные работы должны осуществляться организациями и учреждениями на конкурсной основе.

Развитие молекулярной паразитологии, а именно разработка новейших медицинских технологий, диагностических протоколов, новых классов лекарственных средств потребует качественной профессиональной подготовки как научных и медицинских работников, так и преподавателей медицинских высших учебных заведений [56, 58, 85, 107].

С этой целью требуется разработать и осуществить комплекс мер, направленных на повышение квалификации, профессиональную переподготовку научных и медицинских работников, разработать специальные программы и методическое обеспечение для студентов медицинских вузов в области

молекулярной паразитологии с учетом современных представлений об этиологии, патогенезе, профилактике, диагностике и лечении паразитарных болезней.

Для реализации целей данного научного направления потребуется укрепление материально-технической базы научно-исследовательских и лечебных учреждений, работающих по указанному направлению, современным медико-биологическим оборудованием [65]. Необходимо выделение средств на разработку нормативной документации с целью государственной регистрации новых лекарственных и диагностических средств, а также на расширение объемов производства современных отечественных лекарственных средств и тест-систем для профилактики диагностики и терапии паразитарных заболеваний [50, 69, 80, 91].

Требует особого внимания формирование новой и совершенствование существующей законодательной базы в области развития молекулярной паразитологии в Российской Федерации. Кроме того, потребуется разработка нормативных документов, соответствующих международным стандартам, обеспечения контроля качества отечественных биологических продуктов и лекарственных средств, получаемых на основе биотехнологического производства.

Для успешной реализации направлений молекулярной паразитологии необходимо значительное внимание уделять разработке новых классов лекарственных препаратов. В настоящее время в нашей стране состояние фармацевтической отрасли промышленности не соответствует мировым стандартам и не обеспечивает потребности россиян в современных лекарственных препаратах. Крайне низок в общем потоке лекарств процент лекарственных средств, полученных с помощью генно-инженерных технологий. В России производят только альфа-2-интерферон, эритропоэтин, интерлейкин-1-бета, в то время как за рубежом более 50 генно-инженерных препаратов составляют 20% фармацевтического рынка и около 150 препаратов проходят испытания. Ограниченность выделяемых средств не позволяет нашей стране развивать данное

направление отечественной биотехнологии, однако имеющийся научный потенциал способен оказать достойную конкуренцию на мировом фармацевтическом рынке.

С целью удовлетворения потребностей отечественного здравоохранения в эффективных антигельминтных препаратах и обеспечения импорт независимости России по этому классу лекарств был выполнен полный цикл фундаментальных и прикладных исследований. В результате комплексных поисковых работ были отобраны соединения, обладающие выраженной целевой противогельминтной активностью. В соответствии с регламентом Фармакологического комитета страны были выполнены необходимые доклинические и клинические испытания разных классов антигельминтных препаратов. Отработаны лабораторные технологические регламенты получения субстанций и лекарственных форм четырех препаратов – «Азинокса», «Альбендазола», «Медамина», «Фенасала». Оформлена и утверждена в установленном порядке необходимая научно-техническая и разрешительная документация на производство и применение в медицинской практике указанных препаратов. В 2003 г. «Медамин (карбендацим)», «Альбендазол», «Фенасал (никлозамид)» включены в одобренную и рекомендованную Минздравом России Формулярную систему по использованию лекарственных средств (Федеральное руководство, 2003).

Необходимо подчеркнуть, что в настоящее время значителен потенциал наших биологических противников в межвидовой борьбе человека и паразитов-возбудителей, которые имеют широчайшее распространение и служат причиной каждой третьей смерти на Земле. Более того, такое утверждение подтверждает возможность преднамеренного распространения инфекций, в том числе и паразитарных болезней, через биотерроризм или применение биологического оружия [86].

В многоплановой проблеме биобезопасности существует несколько важных аспектов, пока не получивших должного внимания, и, как правило, остающихся без должного внимания.

Первый из них – это популяционная неспецифическая иммунорезистентность населения. Самым массовым фактором, вызывающим иммуносупрессию в современном мире, выступают паразитарные болезни [64].

Помимо непосредственного ущерба эта патология опосредованно способствует массовому появлению и распространению любых инфекционных и паразитарных болезней. Основным механизмом этого является стимуляция Th2 типа иммунного ответа, при котором тормозится продукция интерферонов и противовоспалительных цитокинов, а инфекционный процесс любой этиологии переходит на фоне выраженной иммуносупрессии в хроническое течение, часто приводящее к летальному исходу. Тканевые гельминты вызывают столь глубокую иммуносупрессию, что способны подавлять иммунную реакцию отторжения транспланта [86, 91, 144].

Наличие кишечных гельминтов подавляет Th1 тип иммунного ответа и стимулирует Th2 тип ответа, что приводит к снижению эффективности плановой и экстренной иммунопрофилактики [86, 88, 146].

Поэтому изучение молекулярных механизмов воздействия паразитов на иммунную систему человека, и разработка эффективных средств лекарственной профилактики паразитарной иммуносупрессии важная составляющая обеспечения биологической безопасности нашей страны [45].

Другой аспект потенциальной биопасности – это генетически модифицированные переносчики возбудителей болезней.

Появление в Бразилии в результате случайного завоза африканского малярийного комара вызвало небывалую эпидемию смертельной тропической малярии с гигантской смертностью. Это потребовало проведения специальной национальной программы ликвидации комара *An. gambiae*. На что потребовалось более трех лет и миллионы долларов [13, 17, 79, 86, 135].

Под благовидными предлогами работы по созданию генетически модифицированных переносчиков активно ведутся во многих странах мощными

исследовательскими организациями. Первым таким объектом стал генетически измененный комар – переносчик малярии. В настоящее время расшифрованы геномы многих эффективных переносчиков малярии и эти данные доступны в интернете.

Создаются подходы к получению генетически измененных переносчиков желтой лихорадки, лихорадки денге и других опасных трансмиссивных инфекций [86].

Угроза намеренного или непреднамеренного выпуска в природу таких генетически измененных переносчиков настолько велика, что Всемирная организация здравоохранения сочла необходимым издать специальный документ по этическим, юридическим и социальным аспектам получения генетически измененных переносчиков и их значимости для здравоохранения.

На фоне кишечных гельминтозов в десятки раз увеличивается риск заражения и манифестного проявления любых инфекционных агентов. Это было неоднократно подтверждено эпидемиологическими наблюдениями в очагах холеры и других острых кишечных и воздушно-капельных инфекций.

Угнетающее влияние кишечных паразитов, даже таких банальных как острицы, подтверждается наблюдениями за дошкольниками города Москвы. Среди детей, пораженных острицами, а таких в Москве около 30% дошкольников и младших школьников «истинно часто болеющих детей», то есть тех, кто болеет более 6 раз в году, в 5,7 раз больше [61, 86, 88].

Биологическая опасность определяется наличием возбудителя (в биотическом и абиотическом материале), источником которого могут быть больные люди (носители), животные (резервуары и переносчики), продукты и сырье животного происхождения, учреждения и организации, производящие работы с использованием возбудителей инфекционных болезней. К факторам биологической опасности следует также относить вещества, снижающие устойчивость организма человека к патогенам.

Завоз возбудителей может приводить не только к эпидемическим последствиям. Известны различные эпизоотии и эпифитотии, связанные с интродукцией новых патогенов. Завоз возбудителей происходит в процессе миграции людей, птиц и летучих мышей, международной торговли животными, сырьем животного и растительного происхождения и продуктами питания, непреднамеренной перевозке инфицированных переносчиков транспортными средствами.

В настоящее время особую настороженность вызывает глобальное распространение «азиатского тигрового комара» – *Aedes albopictus* – эффективного переносчика ряда опасных арбовирусов [87, 90]. Завоз этого переносчика из Азии в США был связан с импортом для переработки отработанных автомобильных покрышек, в которых находились яйца этого комара. Вероятно, уже из США этот комар также с покрышками был завезен в Европу, сначала в Италию, а затем в Албанию и Францию [79, 87, 195].

Ранее в странах Южной Европы масштабные эпидемии лихорадки Денге были связаны с наличием эффективного переносчика *Ae. aegypti*. Ликвидация *Ae. aegypti* на континенте в начале XX в. привела к длительному отсутствию лихорадки Денге и желтой лихорадки в Европе из-за невозможности ее укоренения в отсутствие эффективного переносчика. Появление *Ae. albopictus*, доказавшего свою способность самостоятельно без присутствия *Ae. aegypti* обеспечивать интенсивную передачу всех четырех типов вируса Денге, вынуждает обратить внимание на возникновение новой биологической угрозы - возврата лихорадки Денге на Европейский континент [12, 87]. Возник риск распространения и других опасных арбовирусов – Чикунгунья и Зика.

Современной биологической угрозой для нашей страны стало новое появление *Ae. aegypti* на юге России после более чем 50-летнего отсутствия. Успешная кампания по уничтожению *Ae. aegypti* была проведена в Советском Закавказье в 1930-е годы, что явилось ответом на уже упоминавшееся выше эпидемическое распространение в конце 1920-х годов лихорадки Денге на юге

Европы и в Турции, связанное именно с этим переносчиком. В 2001-2007 годы в Большом Сочи и Адлере были выявлены самки комаров *Ae. aegypti*. Новое появление *Ae. aegypti*, вероятно, связано с распространением с сопредельной территории Грузии, так как в Гудауте и Сухуми в 2007 г. также были обнаружены комары *Ae. aegypti* [135].

Специального рассмотрения заслуживает ситуация с комарами *Culex pipiens*. В Европе существует два варианта (подвида или вида) этих комаров. В США летальную эпидемию Лихорадки Западного Нила обеспечил гибридный вариант переносчика, сформировавшийся из двух указанных вариантов *Culex pipiens*. Завоз такого, пока отсутствующего в Евразии, комара может сопровождаться драматическими эпидемическими последствиями [134].

В настоящее время проблема биологической безопасности уже не рассматривается исключительно как свод противоэпидемических правил, снижающих риск инфицирования при работе с патогенным материалом. В современный период развития человеческого общества понятие биологической безопасности переместилось из области профессиональной техники безопасности в микробиологии в сферу глобальных проблем.

Этому способствовали концепции экологической безопасности, сохранения биологического разнообразия, устойчивого развития общества, безопасности жизнедеятельности, микробиологической безопасности, а также обострившаяся проблема терроризма, характеризующаяся появлением новых угроз стабильности стран [63, 89, 90].

Естественным механизмом циркуляции возбудителей считается эволюционно выработанная способность микроорганизмов адаптироваться к изменяющимся условиям среды обитания. К естественным процессам относится образование новых патогенов, как результат адаптации, или эволюции микроорганизмов [60, 89, 90]. Искусственные факторы и процессы связаны с непосредственной деятельностью человека по созданию и использованию микроорганизмов [89].

На современном этапе биобезопасность представляет собой развивающуюся область научных знаний, охватывающих теорию и практику защиты человека от опасных биотических факторов. Объектом исследования биобезопасности являются процессы, происходящие в природе и обществе, сопровождающиеся негативными последствиями воздействия биотических и биогенных факторов, независимо от способа их получения. Фундаментальным направлением деятельности в теоретической области биобезопасности является создание идеологии оценки степени опасности и формирования теоретико-экспериментальной базы прогнозирования негативного действия биотических факторов, представляющих основу для разработки систем противодействия [89].

Поэтому помимо возможности использования высокопатогенных возбудителей правомочно рассмотрение вопроса о намеренном применении в биотеррористических целях нелетальных патогенов, снижающих специфическую и неспецифическую резистентность организма человека. Наиболее вероятными патогенами с указанными свойствами являются возбудители массовых паразитарных болезней, прежде всего гельминты. Яйца гельминтов (свиных аскарид, токсокар, фасциол, *Baylisascaris procyonis* и др.) высокоустойчивы и легко сохраняются на протяжении длительного времени без создания особых условий [27, 30, 47, 50]. Массовое получение этих патогенов не вызывает трудности и не требует защитного лабораторного оборудования. Инактивация яиц гельминтов – чрезвычайно трудоемкая и технически сложная задача.

Результаты проводимых научных исследований должны иметь высокий социально-экономический эффект. Экономическая эффективность будет основываться на снижении анализа затрат на профилактику, лечение больных паразитарными заболеваниями, обеспечения биологической безопасности населения и сокращения экономических потерь от временной утраты трудоспособности, снижения показателей по первичной инвалидности и смертности населения. Социальная значимость будет определяться результатами

реализации мероприятий, направленных на качественное улучшение показателей здоровья населения России [90].

Проведение мероприятий по внедрению современной диагностики, профилактики и лечения основных паразитарных болезней с помощью методов молекулярной паразитологии позволит повысить эффективность выявления лиц, подверженных паразитарным заболеваниям на основе молекулярно-генетического и цитогенетического скрининга. Предполагается, что применение фармацевтических препаратов нового поколения приведет к сокращению сроков восстановления утраченного здоровья, инвалидизации и смертности населения.

Качество диагностики, профилактики и лечения основных паразитарных заболеваний необходимо довести до уровня современных европейских стандартов, что позволит сократить расходы по затратам на лечение, на выплату единовременных пособий по временной нетрудоспособности, компенсаций по оплате лекарственных средств за счет применения прогрессивных способов ранней диагностики и профилактики болезней и увеличить период активной трудоспособности граждан Российской Федерации. Кроме того, возможно получение экономической прибыли за счет выхода российских фармацевтических производителей на мировой рынок лекарственно-диагностических средств.

Создание высокоэффективной системы обеспечения диагностики возбудителей паразитозов, а также лекарственной профилактики, повышающей неспецифическую резистентность организма будет способствовать предотвращению негативных последствий воздействия инфекционных, химических и физических агентов на здоровье населения [65, 90, 143].

1.3. Место молекулярной паразитологии в системе эпиднадзора

Возбудителям паразитарных болезней присущи: самовоспроизведение, изменчивость, саморегуляция.

И.И.Шмальгаузен в 1961 г. указал на всеобщность явления саморегуляции в органическом мире, существующей внутри биологической системы. Основной характеристикой является генетическая гетерогенность, обеспечивающая

приспособление к меняющимся условиям среды обитания. Основой саморегуляции паразитарных систем является гено- и фенотипическая неоднородность популяций паразита и хозяина и её изменчивость. Академик В.Д. Беляков (1983 г.) сформулировал теорию саморегуляции паразитарных систем из 4-х постулатов:

- существует гено- и фенотипическая гетерогенность популяций паразита и хозяина по признакам внутрисистемных взаимоотношений;
- изменчивость биологических свойств обусловлена взаимодействием популяций паразита и хозяина;
- фазовая самоперестройка популяций паразита обуславливает неравномерность динамики эпидемического процесса;
- регулирующая роль в развитии эпидемического процесса принадлежит социальным и природным условиям.

Выживание и сохранение популяций возбудителей происходит под иммунным и лекарственным прессами. В результате отбора образуются субпопуляции, которые отличаются пониженной вирулентностью и повышенной жизнеспособностью за счет изменений метаболизма и ферментных процессов.

Возбудитель трёхдневной малярии (*Plasmodium vivax*) менее изучен, чем возбудитель тропической малярии [183], видимо из-за меньшей опасности для жизни человека и отсутствия необходимости создания видовой антималярийной вакцины. У него выявлена иная, чем у *Plasmodium falciparum*, структура генома: методом прямого секвенирования в полимеразной цепной реакции установлено специфическое разнообразие ДНК не только в числе повторностей, но и в их вариациях [29, 52, 132, 151, 158].

Генетическая полиморфность *Plasmodium vivax* проявляется в разнотипности спорозоитов [29, 200]. Наличие фенотипов спорозоитов с разным по длительности периодом тканевой шизогонии обуславливает существование гетерогенных популяций, адаптированных к условиям внешней среды. Этот возбудитель отличается высоким полиморфизмом [44, 168]. Исследования

показали замечательную пластичность генома, генерирующего внутривидовые различия между гомологичными хромосомами.

P. vivax имеет больше биологических отличий, чем *P. falciparum*:

- внедрение (инвагинация) только в незрелые эритроциты (ретикулоциты) с привлечением Даффи-фактора крови;
- наличие кавеоллярных структур мембраны эритроцита, связанных с цитоплазматическими везикулами (зернистость Шюффнера);
- наличие гипнозоитов (тканевых форм возбудителя), чувствительных только к 8-аминохинолинам - примахину и тафенохину;
- ограниченная (в отдельных местностях Мьянмы, Индонезии и Папуа-Новой Гвинеи) устойчивость к лекарственным препаратам - хлорохину и примахину;
- развитие в малярийных комарах в условиях не только тропического, субтропического, но и умеренного климата [202].
- самый широкий мировой ареал, отражающий закономерности географического распространения возбудителей трёхдневной малярии и переносчиков;
- многообразие гено- и фенотипов возбудителей из разных регионов мира;
- наличие поздних первичных проявлений в течение 30 мес. после заражения и возможность длительного существования возбудителя в местностях с ограниченным сезоном передачи малярии через малярийных комаров (2-5 мес.);
- высокая инфективность для самок комаров рода *Anopheles*;
- высокая заболеваемость населения, но без смертельных исходов.

Особенности *P. vivax* выражены в следующих клинических проявлениях:

- сохранение в организме человека посредством фенотипов, имеющих длительный латент и рецидивы;
- более лёгкое течение по сравнению с тропической малярией;
- удлинение сроков первичных поздних проявлений до 3-х лет.

- слабо манифестные клинические проявления и более низкая паразитемия в препаратах крови больных после длительной инкубации возбудителя в организме человека [6, 38, 40, 41, 124, 201].

В связи с неоднозначностью понятия «эпидемиологический надзор» и различными толкованиями этого базового термина эпидемиологии, используемыми разными авторами, необходимо подчеркнуть, что наиболее адекватную трактовку этого термина дали корифеи отечественной эпидемиологии П.Н.Бургасов и О.В.Бароян (1975). Современный эффективный эпиднадзор должен включать не только систему изучения динамики инфекционной и паразитарной заболеваемости, возрастного, полового и профессионального состава заболевших, особенностей биологии и экологии возбудителя инфекции и путей и условий его передачи, что полностью определяется термином «Мониторинг». Неотъемлемой составной частью эпиднадзора является планирование и осуществление конкретных мер, направленных на снижение заболеваемости или ликвидацию эпидемического характера распространения болезни. Важными элементами эпиднадзора, обеспечивающими его постоянное совершенствование, должны являться изучение эффективности действующих профилактических и противоэпидемических мероприятий или их систем, исследования, направленные на усовершенствование этих мероприятий, и периодическая корректировка их на основе полученных результатов, а также новейших данных смежных разделов науки и опыта, накапливаемого службами эпиднадзора в различных странах и обобщаемого на международном уровне [90].

Для ряда паразитарных болезней, например, болезнь Шагаса, характерно присутствие возбудителя в крови в начале развития заболевания. Только в первые один-два месяца теоретически возможно обнаружить трипаносомы при исследовании крови, особенно если такое исследование проводится на фоне развившегося лихорадочного пароксизма. В дальнейшем возбудитель на многие годы исчезает из кровотока. При классическом развитии американского

трипаносомоза антитела появляются только через несколько месяцев после стихания острых проявлений болезни Шагаса [114, 131, 165,195].

Теоретически существенным облегчением ранней диагностики болезни Шагаса, ответственной за тяжелый экономический ущерб и появление миллионов инвалидов, из-за развивающейся кардиопатии и мега-органов, может стать ПЦР-диагностика. Это только один из возможных примеров, имеющейся ниши в сфере использования ПЦР-диагностики в области паразитарной патологии человека.

1.3.1. Виды мониторинга в системе эпидемиологического надзора

Составной частью системы эпиднадзора в России является мониторинг, включающий 5 видов: метеорологический, экологический, энтомологический, социально-демографический и эпидемиологический [34, 73].

Метеорологический мониторинг проводится для определения:

- сроков начала и окончания сезона эффективной заражаемости переносчиков – комаров *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* (при дирофиляриозах) или *Anopheles* (при малярии);
- определения времени возможности появления первого случая заражения человека в данном году и последнего, т.е. длительности сезона передачи возбудителей по данным метеостанций о среднесуточных температурах воздуха;
- числа оборотов инвазии в течение сезона передачи.

Экологический мониторинг отражает влияние окружающей среды на распространение трансмиссивных инфекций и динамику их ареалов. При этом учитывают:

- ландшафты, способствующие «восприимчивости» территории для данной инфекции;
- хозяйственную деятельность местного населения;
- степень контакта комаров с человеком (при малярии) или с животными (при дирофиляриозах);

- природные катаклизмы (потепление климата, засуха, паводки, наводнения).

Энтомологический мониторинг необходим для постоянных наблюдений за переносчиками в природных условиях. Он включает:

- мониторинг численности преимагинальных фаз развития переносчика (яйцо, личинка, куколка);
- мониторинг численности взрослых комаров *Anopheles*;
- учёт численности переносчиков, нападающих на человека;
- определение степени контакта комаров с человеком;
- заражённость переносчиков возбудителями - ксеномониторинг;
- учёт динамики мест выплода переносчиков;
- изучение суточной динамики нападения комаров на человека;
- определение раздражимости и резистентности переносчиков к применяемым инсектицидам.

Эпидемиологический мониторинг проводят для:

- эпидемиологического надзора за населением;
- оценки эпидемиологической ситуации в реальном времени;
- эпидемиологической диагностики (эпидемиологического обследования случаев и очагов, наблюдения за ними);
- районирования территории по степени опасности для населения [59].

Социально-демографический мониторинг включает:

- определение групп повышенного риска заражения;
- установление типов миграций населения (бытовые, профессиональные, беженцы, переселенцы);
- сбор информации о численности, возрастном и половом составе населения;

- выяснение отношения населения к проводимым профилактическим мероприятиям (анкетирование).

Молекулярно-генетические исследования находят применение во всех указанных направлениях мониторинга за паразитами, кроме первого. Наиболее важную роль ДНК-диагностика играет в экологическом, энтомологическом и эпидемиологическом видах мониторинга, где проводится изучение функционирования паразитарных систем трансмиссивных и нетрансмиссивных инфекций в различных условиях внешней среды, что будет показано в 3, 4 и 5 главах диссертации.

1.4. Современные методы диагностики паразитозов

Диагностика паразитарных болезней основывается на выявлении простейших, яиц и личинок гельминтов часто микроскопическими методами. В зависимости от локализации возбудителя материалом для исследования могут быть кровь, мокрота, фекалии, образцы тканей (биоптаты), спинномозговая жидкость, костный мозг и др. [170]. Иногда прибегают к культивированию на специальных средах или путем пассажей на лабораторных животных (биологическая проба). В последние годы расширился спектр иммунологических методов диагностики паразитозов [192]. При некоторых паразитарных болезнях используют метод ПЦР для идентификации ДНК паразита в биологических материалах [53, 54, 72, 78, 169].

В настоящее время ПЦР применяется при следующих паразитозах:

- Малярия (научные исследования)
- Лейшманиозы (рутинная диагностика и научные исследования)
- Токсоплазмоз (в основном рутинная диагностика)
- Дирофиляриозы (эпидемиологические и энтомологические исследования)
- Простейшие кишечника (анализ водопроводной и питьевой воды, рутинная диагностика)

Ограничения применения ПЦР при рутинной диагностике паразитозов связаны со сложным жизненным циклом паразитов, когда паразит на разных стадиях жизненного цикла изменяет свою локализацию в организме хозяина и невозможно определить, какой материал оптимально брать для исследования [56].

Внедрение метода ПЦР в широкую практику стало одним из наиболее важных событий в биологии и медицине в последнее десятилетие. Метод ПЦР ставит диагностику на принципиально иной уровень – определения специфических нуклеиновых кислот – ДНК или РНК, что позволяет провести прямое обнаружение инфекционного агента или генетической мутации [56].

С помощью ПЦР одна молекула искомой ДНК может быть обнаружена в присутствии миллионов других молекул ДНК в исследуемом материале [28, 31, 58, 102, 118].

Идея открытия метода ПЦР принадлежит К.Б.Мюллису, сотруднику корпорации «Цетус». В 1983 году он разработал метод, благодаря которому *in vitro* можно было получать копии изучаемых генов в неограниченном количестве. Этот метод, основанный на амплификации искомого участка ДНК, он назвал полимеразной цепной реакцией (ПЦР). В скором будущем, новый метод стал одним из наиболее совершенных среди других методов молекулярно-биологических исследований [56].

До изобретения ПЦР и других методов амплификации нуклеиновых кислот (например, лигазная цепная реакция) для генетических исследований использовали ДНК-зондовую детекцию, основанную на гибридизации меченых радиоактивным изотопом или флуоресцентным веществом специфических олигонуклеотидных зондов с выделенной ДНК. Однако ДНК-зондовая диагностика имеет существенные ограничения как по своей чувствительности, так и по трудоемкости и длительности исследования: для ее осуществления необходимо выделить интактную ДНК из не менее чем 10000 клеток, а сам процесс гибридизации не может быть полностью автоматизирован [111, 122, 126].

ПЦР представляет собой процесс, протекающий в одной пробирке и

состоящий из повторных циклов амплификации (размножения, копирования) специфической последовательности молекулы ДНК, с целью получения достаточно большого числа копий, которые могут быть выявлены обычными методами детекции, например, электрофорезом.

Со временем появились модификации ПЦР, позволившие оптимизировать реакцию и снизить число случаев гипо- и гипердиагностики. К таким модификациям относятся: ПЦР с вложенными праймерами (nested-PCR), ПЦР в реальном времени, мультиплексная ПЦР. В последнее время большое внимание уделяется разработке биочипов, в основе которых также лежит метод ПЦР.

Основные области применения метода ПЦР в медицине - это диагностика, мониторинг лечения и профилактика инфекционных заболеваний разной этиологии, наследственных и онкологических болезней и ряда других патологических состояний [18, 91, 150, 167, 187].

Благодаря использованию ПЦР и прямому секвенированию (установлению нуклеотидной последовательности) продуктов ПЦР, значительно упростился поиск мутаций и маркеров генетического полиморфизма. Молекулярный анализ нуклеиновых кислот позволяет обнаружить специфические нарушения в генах, оценивать их влияние на экспрессию генов и физиологию клетки.

Большой интерес для изучения межштаммовых различий представляют методы, не требующие знания ДНК-последовательности: RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA) – «случайно амплифицируемая полиморфная ДНК» и УП-ПЦР – ПЦР с универсальными праймерами. В этих методах используются праймеры не направленные на какой-либо ген: RAPD-PCR (длина праймеров 10 нуклеотидов) и УП-ПЦР (длина праймеров в среднем 16 нуклеотидов). Существуют также менее распространенная техника AP-PCR (arbitrary primed polymerase chain reaction) – ПЦР с произвольными праймерами (длина праймеров более 15 нуклеотидов). Такие праймеры синтезированы на определенные последовательности различных объектов, но используются на другом объекте. При DAF-PCR (DNA amplification fingerprinting) используются также

произвольные праймеры, но более короткие, в сравнении с АП-ПЦР (5 нуклеотидов и более).

Однако все вышеперечисленные методы являются лишь косвенным доказательством межштаммовых различий и только применение прямого секвенирования, позволяющего установить точную нуклеотидную последовательность переменных участков генома, может точно показать локализацию этих различий [28, 48].

1.5. Методологические принципы ПЦР

Независимо от модификации метод ПЦР состоит из трех основных этапов: выделение ДНК, ПЦР собственно (амплификация) и детекция продукта ПЦР (амплифицированной ДНК) [14, 18, 19, 28, 31, 119].

ПЦР представляет собой циклический процесс, проводимый в одной пробирке в специальном программируемом термостате, называемом амплификатор или термоциклер, который автоматически меняет температуру и время в соответствии с заложенной программой [14, 19, 28, 31, 113].

Процесс амплификации состоит из трех последовательных стадий: **денатурации, отжига праймеров и элонгации** (достройки праймеров), повторяющихся 25-35 раз.

- **Денатурация** - плавление двухцепочной молекулы ДНК на две олигонуклеотидные нити, необходимое для присоединения праймеров к определяемому участку ДНК; температура - 95°C; время - 1 мин.

Праймеры – короткие одноцепочные ДНК, состоящие из 20 - 30 дезоксиолигонуклеотидов, комплементарных 3' концам цепей копируемой ДНК матрицы. Праймеры ограничивают фрагмент ДНК, который будет миллион раз скопирован на стадии элонгации.

- **Отжиг праймеров** - комплементарное присоединение к соответствующим последовательностям специфического фрагмента ДНК на противоположных концах каждой из нитей; температура отжига зависит от

структуры праймеров (соотношения нуклеотидов в цепи ДНК) [104, 105] и рассчитывается по формуле:

$$T_m = 22 + 1.46 ([2 \times (G+C)] + (A+T))$$

где:

T_m - оптимальная температура для присоединения праймеров.

$G+C$ - количество G (гуанина) и C (цитозина) в структуре праймеров.

$A+T$ - количество A (аденина) и T (тимина) в структуре праймеров.

Существует также ряд компьютерных программ, рассчитывающих оптимальную температуру для присоединения праймера к комплементарному участку ДНК. Значение температуры обычно располагается в интервале 45-65°C; при уменьшении температуры увеличивается выход неспецифического продукта, при увеличении – уменьшается выход продукта ПЦР. Время отжига праймеров подбирают экспериментально или рассчитывают с помощью компьютерных программ. Точно подобранные температура и время отжига праймеров являются гарантией специфичности реакции.

- **Элонгация праймеров** - комплементарное достраивание цепей ДНК (синтез фрагмента или полимеризация). Присоединившиеся праймеры формируют стартовые блоки, с которых начинается синтез ДНК. Комплементарное достраивание нитей ДНК всегда протекает только в направлении от 5'-конца к 3'-концу нити ДНК и происходит в противоположных друг другу направлениях. При построении молекулы ДНК *in vitro* для наращивания нуклеотидной цепи используют дезоксинуклеозидфосфат (дНТФ). Каждому нуклеотиду соответствует свой дНТФ: аденину - дАТФ, гуанину - дГТФ, тимину - дТТФ и цитозину - дЦТФ.

Элонгация протекает при температуре 72°C. При данной температуре оптимально работает фермент Таq-полимераза, катализирующий построение новой нуклеотидной нити. Время элонгации может варьировать в зависимости от длины ожидаемого фрагмента ДНК. В современных методиках используют Таq-полимеразу, выделенную из термостабильной бактерии *Thermus aquaticus*,

живущей в горячих источниках. Этот фермент высоко стабилен и сохраняет активность до конца процесса амплификации. Ранее в ПЦР использовали нетермостабильные ДНК-полимеразы. Это требовало добавления новых порций фермента после каждого цикла денатурации ДНК. Таq-полимераза вводится в реакционную смесь однократно.

По окончании каждого цикла ПЦР количество определяемых участков ДНК в реакционной смеси увеличивается в 2 раза. Так, например, по окончании 30 циклов ПЦР из одной молекулы ДНК-мишени образуется 2^{30} копий (1073741824 копий) этой молекулы, т.е. если повторяется n циклов - количество фрагментов ДНК будет составлять 2^n . Возможность получить большое количество копий определяемых участков ДНК обуславливает высокую чувствительность ПЦР.

1.5.1. Классическая ПЦР

Для видоспецифической диагностики используются праймеры, комплементарные консервативному участку ДНК паразита с известной последовательностью нуклеотидов. Наиболее надежным является метод ПЦР с так называемыми «вложенными» праймерами (nested-PCR) (рисунок 1.5.1.1.).

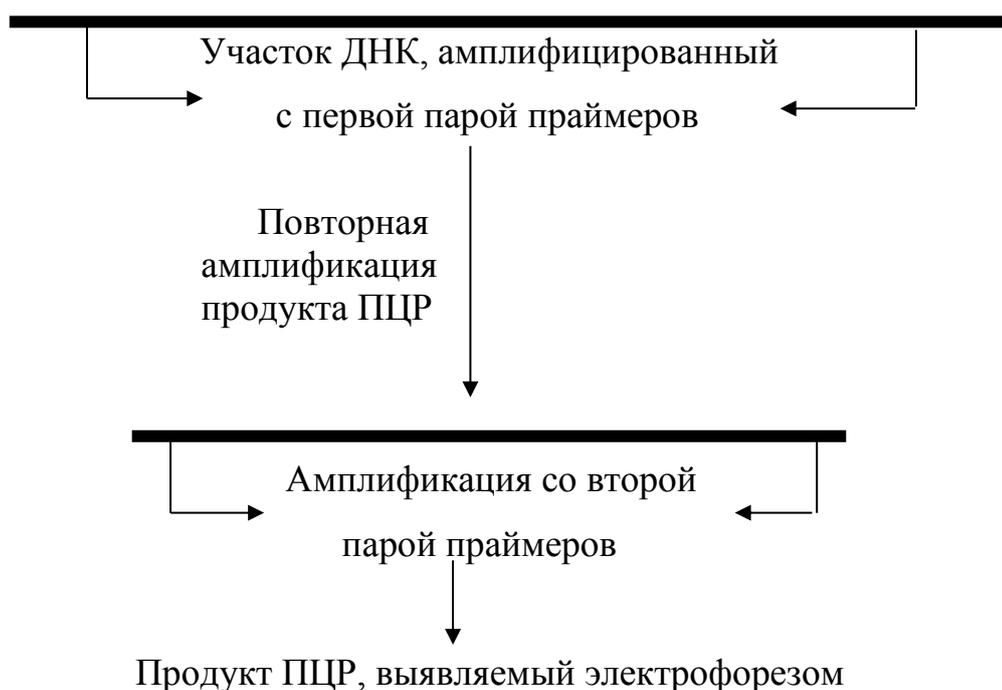


Рисунок 1.5.1.1. ПЦР с «вложенными» праймерами

Такой метод предполагает использование двух пар праймеров. Первая пара амплифицирует достаточно большой участок ДНК, который затем амплифицируется со второй парой праймеров. Это позволяет значительно повысить специфичность реакции и избежать гипердиагностики. Метод nested-PCR необходим при использовании в качестве источника ДНК каплей крови, собранных на фильтры, так как в этом случае невозможна полная очистка ДНК паразита от ДНК хозяина и внешних контаминантов. Основным недостатком этого метода в том, что амплификацию необходимо повторять дважды, что требует в два раза больше времени и реактивов.

Избежать этих недостатков можно путем подбора высокоспецифичных праймеров, амплифицирующих только искомым ДНК.

1.5.2. ПЦР в реальном времени

В начале 90-х годов XX века было предложено регистрировать накопление продукта ПЦР в ходе реакции. Изобретение метода флуоресцентной детекции результатов ПЦР дало начало новому направлению в ПЦР-диагностике – ПЦР «в реальном времени». Появление новой методики позволило проводить количественный анализ, а также снизить число ложноположительных результатов за счет отсутствия фазы электрофореза – самой «грязной» фазы ПЦР [117, 171, 180, 181, 186]. Кроме того, флуоресцентные методы позволяют избирательно регистрировать амплификацию определенных фрагментов ДНК, повышая тем самым достоверность исследования. Флуоресцентная детекция результата ПЦР возможна как по конечной точке с помощью специального оборудования, так и в процессе реакции – «в реальном времени». При регистрации результатов амплификации в течение всего процесса исследователь получает намного больше информации об особенностях течения реакции. В настоящее время техника постановки ПЦР «в реальном времени» значительно проще, чем при классической ПЦР [77, 160, 162, 182, 194].

1.6. Перспективы применения методов молекулярной паразитологии

Одним из перспективных направлений применения молекулярно-биологических методов в паразитологии является иммуногенетика, основной задачей которой является изучение генетических основ иммунного ответа человека. Применение иммуногенетических методов позволит уточнить механизм лекарственной устойчивости возбудителей паразитарных заболеваний, в первую очередь малярии, к применяемым химиотерапевтическим препаратам.

Взрывное развитие молекулярной биологии и иммунологии, появление молекулярной медицины оказало заметное воздействие на понимание паразито-хозяйных отношений и способов выживания паразитов-прокариот в неблагоприятных условиях среды организма хозяина, а также на механизмы патогенеза многих инфекционных и отдельных паразитарных болезней человека [89].

Изучение паразито-хозяйных отношений представляет не только узко профессиональный медицинский интерес. Паразитизм – это вид межвидовой конкуренции, приносящий пользу популяции паразита. По своей сути паразитизм относится к таким сложнейшим биологическим понятиям, как ген, популяция, окружающая среда. Явление паразитизма зарождается в результате поведенческих контактов между разными формами живых существ. Оно не возникает внезапно, а развивается на протяжении многих поколений по мере адаптации одних организмов к условиям существования на поверхности или внутри других живых форм. Становление паразитизма означает преодоление сопротивления, которым обладает любая особь и даже клетка, обеспечивающего предотвращение проникновения внутрь посторонних живых существ. В процессе такого преодоления происходит взаимная адаптация и формируется уникальная биологическая система – «паразит-хозяин». Неизвестно ни одной группы или формы, которую можно было бы квалифицировать, как отошедшую от паразитизма и вернувшуюся к свободному образу жизни, в силу «невыгодности» такого отхода с точки зрения «экономики организма». Поэтому в свете

эволюционного учения паразитизм является наиболее прогрессивной формой существования. При этом паразит оказывает выраженное воздействие на организм хозяина [89, 90].

Практически универсальным следствием воздействия паразита на организм хозяина является развитие иммуносупрессии. Известно, что в системе клеточного иммунитета регистрируются два взаимоисключающих ответа со стороны иммунокомпетентных лимфоцитов - Т-хелперов: Тх1 (Th1) и Тх2 (Th2) типы ответа. Каждый из указанных вариантов ответа характеризуется своим набором продуцируемых цитокинов – интерлейкинов (IL) и интерферонов (INF). В реальной жизни невозможно наблюдать изолированные проявления Th1 и Th2 типов иммунного ответа. Всегда в организме больного присутствуют элементы обоих типов иммунного ответа. Однако в этой смеси наблюдается преобладание того или иного варианта. Как правило, преобладание Th1 типа иммунного ответа ассоциируется с острым течением инфекции и последующим выздоровлением, а Th2 тип – с хронизацией инфекционного процесса и аллергическими проявлениями.

Гельминтозы являются хорошо воспроизводимым индуктором Th2 типа иммунного ответа. Пусковыми механизмами стимулирования активации Th2 ответа при гельминтозах являются растворимые метаболиты и компоненты мембраны (кутикулы или тегумента) инвазионных или мигрирующих личинок и взрослых стадий паразита. Полагают, что антигены гельминтов при взаимодействии с CD4+ клетками человека преимущественно стимулируют продукцию цитокинов, регулирующих Th2 тип иммунного ответа - IL4, IL5 и IL10. последний выступает как прямой антагонист INF γ [9, 19, 117].

Присутствие тканевых паразитов вызывает столь выраженную иммуносупрессию, что не происходит отторжения кожных аллотрансплантатов у лабораторных грызунов, инвазированных трихинеллами. Впервые эти эксперименты были выполнены сотрудниками НИИМП и ТМ им. Е.И.Марциновского. Было показано, что трихинеллезная инфекция не приводит к

общему подавлению иммунореактивности. Костный мозг лабораторных грызунов, пораженных трихинеллезом, более эффективно защищает облученных животных, а реакция «трансплантат против хозяина» у них выражена слабее. Впоследствии за рубежом при повторении этих экспериментов были получены идентичные результаты. В дополнение было показано, что подобным иммуносупрессирующим действием помимо трихинелл обладают другие гельминты и, в частности – *Nippostrongylus braziliensis*. Кроме задержки отторжения кожного аллотрансплантата было зафиксировано более продолжительное функционирование трансплантированной почки – 32 дня против 10 в контроле [78, 206].

Наиболее частым патогенным проявлением паразитирования в организме человека гельминтов и патогенных простейших является, помимо иммуносупрессии, аллергизация. Было показано, что экспансия популяции цитокинов Th2 в ответ на аллергены возникает только у индивидуумов с HLA-D гаплотипом и способностью к независимой от HLA гиперпродукции IgE. Аллергический фенотип формирует ряд генов на хромосоме 11q, 5q и кластер генов на хромосоме 11q13. С другой стороны, чрезмерная иммуносупрессия паразитарной природы может, в конечном счете, приводить к торможению аллергических проявлений на другие аллергены. При этом происходит полное выключение ответа со стороны Т-системы иммунитета на любые антигены, включая антигены самого возбудителя паразитарного заболевания.

В настоящее время методы молекулярно-биологической диагностики нашли широкое применение в области инфекционной патологии. Стали рутинными методы диагностики ВИЧ/СПИД, гепатитов, кори, дифтерии и других социально-значимых инфекционных заболеваний с помощью ПЦР. Большое число наборов для ПЦР диагностики имеется на рынке. При этом изготовлением и реализацией таких ПЦР наборов занимается большое количество как отечественных, так и зарубежных фирм-производителей. Совершенно другая ситуация сложилась в области диагностики паразитарных болезней человека. Число имеющихся

готовых наборов для ПЦР-диагностики паразитарных болезней невелико. Предлагаемые наборы согласно прилагаемым инструкциям применимы только при единичных нозологических формах. Отсутствует какая-либо системность в создании ПЦР-диагностик паразитарных болезней. Представляется явно случайный выбор того или иного паразита-эукариота как объекта для молекулярно-биологической индикации и идентификации.

Часто предлагаемые на рынке тест-системы для ПЦР-диагностики паразитарных болезней путем исследования крови не учитывают ни особенности жизненного цикла паразитов-эукариотов, который гораздо более сложен, чем аналогичный цикл развития паразитов-прокариот. Более того такие тест-системы для ПЦР-диагностики отдельных паразитозов не учитывают патогенез конкретной паразитарной болезни. При многих паразитозах паразиты отсутствуют в периферической крови, а локализуются в органах и тканях, откуда они не способны проникать в кровоток. Поэтому попытки использования ПЦР для выявления таких возбудителей теоретически обречены на неудачу и практически будут постоянно давать ложноотрицательные результаты на фоне положительных серологических реакций [54, 56, 58].

В настоящее время отсутствует система ПЦР-диагностики всего многообразия паразитарной патологии. Эти возбудители болезней человека достаточно многочисленны. По своему числу они уступают только микроорганизмам – возбудителям болезней человека бактериальной природы и существенно превосходят известное число возбудителей болезней человека вирусной природы.

Наиболее актуальным представляется создание ПЦР-диагностик для выявления трансмиссивных паразитарных болезней человека.

Большая потребность существует в разработке ПЦР продуктов для диагностики кишечных паразитозов человека, рутинная классическая микроскопическая диагностика которых либо чрезвычайно трудоемка, либо недостаточно информативна.

Чрезвычайная эпидемическая опасность водного пути передачи возбудителей паразитарной природы стала следствием возникновения самых массовых водных эпидемий криптоспоридиоза и лямблиоза, связанных с системами коммунальных водопроводов. Такие эпидемии нередко охватывали сотни тысяч больных. При этом полностью отсутствуют ПЦР-диагностикумы для осуществления эпидемиологического надзора за системами водоснабжения больших городов.

Таким образом, при достаточно длительной истории использования молекулярно-биологических методов и средств индикации и идентификации возбудителей болезней человека микробной природы сохраняется ряд научных проблем в системе применения ПЦР-диагностикумов для диагностики и профилактики паразитарных болезней человека.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ОБЪЕМ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материалы и объем исследований

2.1.1. Источник ДНК

В качестве источника ДНК паразитов использовались пробы из банка ДНК НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского, биологический материал из специализированной КДЛ по паразитарным болезням Клинического центра Первого МГМУ им.И.М.Сеченова, препараты из специализированных центров по борьбе с паразитарными болезнями Республик Таджикистан, Кыргызстан, Узбекистан и Грузия.

Для отработки режимов ПЦР и испытаний праймеров было использовано:

- 20 проб криптоспоридий
- 15 проб лямблий
- 25 проб дирофилярий
- 1050 проб 4-х видов малярии
- 120 проб 2-х видов лейшманиозов
- 10 проб бластоцист

Кроме того, для постановки ПЦР использовалась кровь от больных с подозрением на токсоплазмоз.

2.1.1.1. Малярия

Работа проводилась с использованием ДНК, выделенной по нашей оригинальной методике из препаратов «толстая капля» крови, окрашенных по Романовскому-Гимза от больных трехдневной и тропической малярией, а также с ДНК, выделенной из бумажных обеззоленных фильтров или нативной крови с подтвержденным наличием малярийных паразитов от тех же больных [52]. Препараты крови «толстая капля» и фильтры с кровью были получены из

госпиталя погранвойск г. Душанбе (Республика Таджикистан), Центра по борьбе с паразитарными заболеваниями Республики Грузия, Центра по борьбе с тропическими заболеваниями Республики Таджикистан, Референс-центра по малярии НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им.Е.И.Марциновского, Клинико-диагностического центра Первого МГМУ им.И.М.Сеченова.

Для микроскопического контроля проводилось изучение препаратов крови от тех же больных. С тем, чтобы исключить возможность перекрестных реакций, специальную группу составляли препараты крови от лихорадящих лиц с установленным диагнозом гепатита, пиелонефрита, пневмонии, онкологических заболеваний.

2.1.1.2. Лейшманиоз

В качестве источника ДНК использовалась культура промастигот лейшманий, постоянно поддерживаемая в отделе медицинской протозоологии НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им.Е.И.Марциновского [76]. Также были использованы фиксированные препараты амастигот лейшманий на стеклах, ранее использовавшиеся для диагностической микроскопии. Таким образом, в разработке участвовали все стадии жизненного цикла лейшманий: промастиготы, содержащие органеллы движения – жгутики из культуры лейшманий, выращенные на среде 199 и амастиготы (безжгутиковые стадии), полученные из лейшманиальных поражений теплокровных животных и человека [24, 25, 26, 76].

2.1.1.3. Дирофиляриоз

Для работы использовали ДНК дирофилярий, выделенную из крови собак, у которых заболевание дирофиляриозом было подтверждено ветеринарными специалистами. Взятие проб крови больных собак для отработки методики постановки ПЦР производили в ветеринарных клиниках г. Москвы. Комаров-переносчиков дирофилярий собирали в разных районах Московского региона, а

также в прилегающих областях. В этом случае были исследованы микрофилярии паразитов [76, 98].

2.1.1.4. Криптоспоридиоз

Работа проводилась с использованием ДНК, выделенной из проб экскрементов молодых телят, содержащих ооцисты паразитов. Первые экскрементные пробы были взяты в совхозе «Орловский» Щелковского района Московской области [56]. Также сбор биоматериала осуществлялся в хозяйстве «Золотая нива» Пушкинского района Московской области. Были отобраны 26 телят, возраст которых находился в диапазоне 1-3 недели. Пробы фекалий получали только от телят, у которых предварительно ветеринарными специалистами хозяйств «Орловский» и «Золотая нива» был поставлен и подтвержден диагноз – криптоспоридиоз. Методом стимулирования прямой кишки были взяты 26 экскрементных проб.

2.1.1.5. Лямблиоз

Для оптимизации ДНК диагностики лямблиоза и отработки условий реакции были использованы образцы кала пациентов, собранные в специализированной клиничко-диагностической лаборатории по паразитарным болезням Клинического центра ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, а также в процессе обследования декретированных контингентов [56, 104, 105].

2.1.1.6. Бластоцистоз

Для оптимизации ДНК диагностики бластоцистоза и отработки условий реакции были использованы:

- культура бластоцист, поддерживавшаяся на среде Павловой, из банка простейших отдела медицинской протозоологии НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского [103, 104, 105];
- образцы кала пациентов, собранные в специализированной клиничко-диагностической лаборатории по паразитарным болезням Клинического центра ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, а также в процессе обследования декретированных контингентов.

2.1.2. Аппаратура и инструменты

- Амплификатор типа «Герцик МС-2» со скоростью нагрева/охлаждения активного элемента не менее $1,5^{\circ} \text{C}/\text{с}$.
- Прибор для горизонтального электрофореза типа «SubCellGTSsystem» с комплектом кювет и гребенок.
- Источник напряжения типа «PowerPac 300» с диапазоном регулируемого напряжения 50-300 В.
- Видеосистема типа «GelDoc 2000TM», предназначенная для ввода в компьютер, анализа и документирования изображений люминисцирующих следов ДНК в гелях, окрашенных бромистым этидием: диапазон излучения 300-400 нм, чувствительность – не менее 10 нг ДНК (по бромистому этидию).
- Холодильник бытовой электрический ГОСТ 26678
- Камера морозильная, обеспечивающая температуру минус 20°C .
- Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф (частота вращения не менее $13\,000 \text{ мин}^{-1}$).
- Термостат типа «TERMO 24-15» по пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 мл, диапазон температур от 15°C до 120°C , количество гнезд – не менее 20 каждого типа, точность поддержания температуры – $0,2^{\circ} \text{C}$, разность температур между соседними ячейками – не более $0,5^{\circ} \text{C}$.
- Аппарат для встряхивания типа «Вортекс», скорость вращения $250\text{-}3000 \text{ мин}^{-1}$.
- Печь микроволновая (мощностью не менее 400 W).
- Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г. ГОСТ 24104
- Анализатор потенциометрический, погрешность измерений $\text{pH} = 0,01$. ГОСТ 19881-74
- Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные. ГОСТ 19569-89Е

- Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды. ГОСТ 6709-72
- Гомогенизатор перистальтического типа «Стомайкер» или других моделей.
- Облучатель бактерицидный настенный ОБН –150 или других видов. ТУ 16-535-84
- Дозаторы с переменным объемом дозирования:
 - 0,2-2,0 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью = 1,2%;
 - 0,5-10,0 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью = 0,8%;
 - 2-20 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью = 0,8%;
 - 20-200 мкл с шагом 0,1 мкл, с точностью = 0,6%;
 - 100-1000 мкл с шагом 1 мкл, с точностью = 3%;
 - 2-10 мл с шагом 0,1 мл, с точностью = 0,5%;
- Пинцет медицинский. ГОСТ 21241-89

2.1.3. Лабораторная посуда и материалы

- Бумага фильтровальная лабораторная. ГОСТ 12026-76
- Воронки стеклянные. ГОСТ 25336-82
- Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические, вместимостью 25, 50, 100, 200, 1000 мл. ГОСТ 12738-77
- Цилиндры стеклянные мерные лабораторные, вместимостью 25, 100, 1000мл. ГОСТ 1770-74
- Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф, вместимостью 0,2; 0,5; 1,5 мл.
- Наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования до: 10; 20; 200; 1000 мм³; 10 см³.

2.1.4. Реактивы

- Кислота соляная, хч. ГОСТ 3118-77

- Кислота борная, хч. ГОСТ 9656-75
- Натрия гидроксид, чда. ГОСТ 4328-77
- Натрий хлористый, хч. ГОСТ 4233-77
- Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), хч. ТУ 6-09-11-1721-83
- Гексадецилтриметиламмоний бромид (СТАВ)
- Корпорация «Сигма Алдрич» (Sigma), кат. № Н 5882
- Трис (оксиметил) аминометан, хч. ТУ 6-09-4292-76
- Альбумин бычий сывороточный сухой (БСА).
- Корпорация «Сигма Алдрич» (Sigma), кат. № В 4287
- Этидий бромистый, хч. ТУ 6-09-13-452-75
- Спирт этиловый ректифицированный ГОСТ Р 51652-00
- Спирт изопропиловый, хч. ТУ 6-09-402-85
- Масло вазелиновое медицинское. ГОСТ 3164-78
- Хлороформ, хч. ГОСТ 20015-88
- Вода дистиллированная. ГОСТ 6709-72
- Вода деионизированная. ОСТ 11.029.003-80
- 2-меркаптоэтанол, хч. ТУ 6-09-08-1024-81
- Термостабильный фермент Таq-полимераза, оптимум работы в области 70-72⁰ С. Корпорация «Сигма Алдрич» (Sigma), кат. № Д 1806.
- Буфер для ПЦР с MgCl² . Корпорация «Сигма Алдрич» (Sigma), кат. № Р 2192.
- Агароза для электрофореза (тип П). Корпорация «Сигма Алдрич» (Sigma), кат. № А.6877.
- Маркер молекулярной массы ДНК. Корпорация «Сигма Алдрич» (Sigma), кат. № Р 1473.

2.2. Методы исследований

2.2.1. Выделение ДНК

Выделение ДНК проводилось с помощью стандартных наборов производства компании Биоком (Россия) и ДНК-технология (Россия) по прилагаемым инструкциям. Использовались следующие наборы реагентов: Проба-рапид, Проба-ГС, Проба-НК.

2.2.2. Постановка ПЦР

Для постановки ПЦР использовались готовые ПЦР смеси ПЦР-ядро (Биоком, Россия), а также наборы реагентов для постановки ПЦР без праймеров (Ампли-сенс, Россия).

Для визуализации результатов ПЦР проводили электрофорез в 1,5% агарозном геле [7]. Для визуализации результатов электрофореза в гель добавляли бромистый этидий (EtBr) до концентрации 0,5 мкг/мл. Для приготовления геля и проведения электрофореза использовали 1xTAE буфер (0,04 М Трис-ацетат, 2 мм ЭДТА, pH 8,0). Перед нанесением на гель пробы смешивали с утяжеляющим раствором, содержащим 0,25% бромфенолового синего, 35% глицерина, 50 мМ ЭДТА. Электрофорез проводили при напряженности поля от 2 до 15 В/см и комнатной температуре. Полосы нуклеиновых кислот в геле идентифицировали в УФ с длиной волны 254 нм и фотографировали с помощью цифровой камеры Kodak Digital Camera на приборе Kodak EDAS 290. Фотографии анализировали с помощью программы AdobePhotoshopCS, Version 8.0.

2.2.3. Реактивы и оборудование для постановки ПЦР

Реакционная смесь «Ампли-Сенс-200-1» (ФГУ ЦНИИЭ Роспотребнадзора):

- Смесь нуклеотидтрифосфатов, 1,76 мМ *dNTP-mix*
- 5-х ПЦР-буфер (без Mg⁺⁺)
- MgSO₄
- Деионизированная вода, стерильная, автоклавированная, H₂O MilliQ

- Таq – полимераза
- Минеральное масло вазелиновое
- Смесь праймеров по 2 мкл каждого

Количество ингредиентов на 10 пробирок в зависимости от объема реакционной смеси приведено в таблице 2.2.3.1.

Таблица 2.2.3.1

Состав и объемы ингредиентов ПЦР

№ п	Реактивы	Объем реакционной смеси 300 мкл	Объем реакционной смеси 500 мкл
1	Деионизированная вода	190 мкл	322 мкл
2	Буфер для полимеразной цепной реакции с Mg (10 х)	30 мкл	50 мкл
3	Смесь нуклеотидов	30 мкл	50 мкл
4	Праймер 1 (5 пМ/мкл)	20 мкл	30 мкл
5	Праймер 2 (5 пМ/мкл)	20 мкл	30 мкл
6	Таq-полимераза (5 ед/мкл)	10 мкл	18 мкл

Примечание: реакционную смесь готовят на необходимое количество проб, но не меньше чем на 5.

Реакционная смесь компании Биоком:

ПЦР – ядро – 5 мкл;

Смесь растворителя – 10 мкл;

ДНК – 0,3-0,5 мкл;

Масло для ПЦР.

Общие требования к постановке идентификационной ПЦР. При проведении идентификации обязательно готовят следующие пробы:

- ДНК – матрица положительного контроля с праймерами к соответствующим возбудителям;
- ДНК-матрица отрицательного контроля с праймерами к соответствующим возбудителям;
- ДНК-матрица отрицательного контроля с теми же праймерами
- исследуемые образцы ДНК-мишени с праймерами.

2.2.4. Определение порога чувствительности ПЦР

Определение порога чувствительности проводилось методом серийных разведений исходной ДНК. Применялись разведения 1:5, 1:10, 1:50 и 1:100. Предварительно микроскопическим методом подсчитывалось количество паразитов в пробе.

Условия проведения полимеразной цепной реакции

Для предупреждения ложноположительных и ложноотрицательных результатов ПЦР соблюдали разработанные специальные требования к планировке, режиму работы ПЦР-диагностической лаборатории [105].

1. На стадии обработки клинического материала и приготовления реакционной смеси использовали только одноразовые наконечники и пробирки.

2. Не допускали использования одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинического материала.

3. Не использовали одни и те же наконечники при внесении различных проб в амплификационную смесь.

4. Операции «обработка клинического материала», «сборка реакционной смеси» и «электрофорез» проводили в отдельных помещениях или в тщательно изолированных зонах.

5. Каждая рабочая зона была снабжена собственными комплектами автоматических пипеток, пластиковой и стеклянной посудой, штативами, халатами и прочими принадлежностями.

6. Инструменты, приборы, материалы из зоны обработки клинического материала не переносили в зону сборки реакционной смеси, а также из помещения для электрофореза в любую другую зону, во избежание контаминации помещений продуктами амплификации или ДНК искомого микроорганизма.

7. В нерабочее время проводили облучение помещений УФ-светом.

2.2.5. Статистическая обработка результатов.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием программных пакетов BioStat Professional 5.8.4 и Microsoft Excel 2010.

Статистическую погрешность вычисляли с учетом среднего квадратичного отклонения качественных признаков (m).

Оценку зараженности производили как в процентах, так и при помощи индекса MFIR (Minimum field infection rate), который вычислялся по формуле: (количество зараженных проб/количество комаров) $\times 1000$.

Глава 3. ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПАРАЗИТОЛОГИИ В МОНИТОРИНГЕ ЗА ТРАНСМИССИВНЫМИ ПАРАЗИТОЗАМИ

3.1. Малярия

До настоящего времени выявление малярийных паразитов при микроскопическом изучении препаратов крови, окрашенных по Романовскому-Гимза, в первую очередь – препарата толстая капля крови продолжает оставаться основным методом паразитологической диагностики малярии и «золотым стандартом» [52, 139, 145]. Однако эффективность этого метода имеет свои ограничения. В первую очередь, они могут быть связаны с исходно низкой паразитемией, либо обусловлены относительно ограниченным количеством исследуемой крови при дефектах приготовления толстой капли, что может препятствовать выявлению паразитов при их субмикроскопическом уровне [52, 54]. Эти ограничения могут быть также связаны с недостаточной квалификацией персонала. Последнее имеет особое значение в случаях гипо- и гипердиагностики малярии. Значимость квалификации персонала неизмеримо возрастает в условиях отсутствия эндемии и появления только спорадических завозных случаев малярии, что характерно для современных условий Российской Федерации. Все перечисленные ограничения микроскопии обусловили необходимость поиска методов диагностики малярии, не зависящих от квалификации микроскописта [20, 21, 23, 36, 40, 52].

В настоящее время при малярийной инфекции ПЦР ограничено применяется в диагностических целях, преимущественно в специальных исследованиях. Материалом в этих исследованиях обычно служит периферическая кровь, собранная на бумажные фильтры или цельная кровь, что требует дополнительного взятия крови. При этом ДНК возбудителей малярии выделяют стандартным методом щелочного лизиса из 100 мкл крови.

Нами в НИИМПиТМ им. Е.И.Марциновского была разработана оригинальная методика ПЦР-диагностики малярийной инфекции, основанная на выделении ДНК из препарата крови толстая капля уже использованного при микроскопическом исследовании, т.е. ранее окрашенного по Романовскому-Гимза [52, 132, 207]. Для уточнения порога чувствительности была проведена специальная серия исследований, при которых ДНК, выделенная из заведомо положительных толстых капель с паразитемией, подсчитанной на 1 мкл крови, последовательно разводилась. Данные ПЦР с разведенной ДНК позволили вычислить порог чувствительности, значения которого находились в пределах от 2 до 4 паразитов в одном мкл крови [54].

Возможность использования препаратов крови толстая капля, приготовленного для рутинных микроскопических исследований, для целей ПЦР-диагностики повышает и расширяет роль и значение препаратов толстая капля в эпиднадзоре за малярией и позволяет использовать эти препараты для ретроспективного контрольного исследования в целях исключения гиподиагностики малярии в очагах с низкой пораженностью населения [38, 41, 52, 125, 214].

Большая опасность восстановления на территории РФ *vivax*-малярии связана с возможностью ее завоза лицами, прибывшими с территорий, эндемичных по этой видовой форме малярии, среди которых могут быть потенциальные паразитоносители, в том числе с субмикроскопическим уровнем паразитемии [37, 39, 147, 154, 159, 212].

Высокая специфичность, чувствительность и автоматизированность метода ПЦР позволяют успешно использовать его, как в диагностических целях, особенно как референс метод, так и при массовых обследованиях в очагах малярии, когда необходимо ежедневно микроскопировать сотни стекол. Преимущество ПЦР диагностики малярии в Референс-центрах в возможности накопления клинического материала для постановки ПЦР 1 раз в 1-2 недели, что значительно сокращает трудозатраты.

В странах распространения лекарственно устойчивой тропической малярии к хлорохину (практически все страны тропического и субтропического климата, кроме стран Центральной Америки), и в случае ее завоза на территории, свободные от этой наиболее клинически и эпидемически опасной видовой формы малярии, необходимо периодически проводить мониторинг за состоянием чувствительности *P.falciparum* к применяемым препаратам [66, 75]. Наибольшую эпидемическую опасность представляет лекарственная устойчивость *P.falciparum* степени R1, когда после окончания лечения паразитемия остается на субмикроскопическом уровне. Применение ПЦР-диагностики будет способствовать выявлению случаев R1 и, тем самым, снижать возможную летальность и оптимизировать мониторинг [74, 75, 133, 140, 149].

ПЦР-диагностика малярии имеет значительные преимущества в сравнении с микроскопической диагностикой не только по специфичности и чувствительности, но и по трудозатратам, особенно при массовых обследованиях. Так, микроскопия 100 препаратов крови требует для окончательного заключения, в среднем 16,5 часов, что соответствует работе трех микроскопистов в течение рабочего дня. Использование ПЦР позволяет при наличии одного термоциклера выполнить эту работу одному человеку за один рабочий день.

3.1.1. Диагностические исследования

В настоящее время нами разработаны и внедрены в НИИМП и ТМ им.Е.И.Марциновского методики ПЦР диагностики всех 4-х видов малярийных паразитов. ПЦР диагностика малярии может использоваться в сложных и спорных случаях, а также при плохом качестве приготовления препаратов крови (аутофиксация, дефекты окраски). Особенную ценность представляет разработанный в Институте метод выделения ДНК из препаратов крови толстая капля, ранее использовавшихся в микроскопической диагностике малярии. Этот метод внедрен и широко используется в работе федерального Референс-центра по диагностике малярии Минздрава России.

Для детекции ДНК малярийных паразитов были применены праймеры, комплементарные к ДНК рода *Plasmodium*, а также к 4-м видам малярийных паразитов человека. В настоящее время, в связи с выявлением в странах Юго-Восточной Азии «пятого вида» малярии человека, вызываемого *P. knowlesi* (возбудитель малярии обезьян), разрабатываются видоспецифичные праймеры к этому виду [129].

По препаратам толстая капля крови с микроскопически подтвержденным наличием в них малярийных паразитов установлено, что данные препараты могут служить надежным источником ДНК плазмодиев [18, 52]. Следует подчеркнуть, что качество препарата и срок его хранения практически не влияют на качество ПЦР диагностики (таблица 3.1.1.1).

Таблица 3.1.1.1

Использование в качестве источника ДНК препаратов малярии толстая капля с разными сроками хранения

Срок хранения препарата	Количество препаратов	Подтверждение диагноза малярии		Примечания
		Микроскопически	ПЦР	
Меньше 1 года	25	25	25	-
1-2 года	23	23	23	-
3-5 лет	30	30	30	-
6-10 лет	28	28	28	-
11-15 лет	21	21	20	Все толстые капли, положительные в микроскопии и отрицательные в ПЦР имели видимые повреждения, возникшие в результате частого их просмотра
16-20 лет	22	22	20	
Более 20 лет	22	22	19	

Для идентификации возбудителей малярии рода *Plasmodium* проводили ПЦР с праймерами PLU1 5'-ТCAAAGATТАAGCCATGCAAGTGA-3' и PLU5 5'-

ССТGGTGTTCCTTAAACTTC-3', специфичными к гену 18S РНК всех представителей рода. Для видовой идентификации *P. vivax* и *P. falciparum* ПЦР проводили с праймерами

VIV1 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' и

VIV2 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3', специфичными к гену 18S РНК *P. vivax*, и праймерами

rFAL1 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACSSAAATATATT-3' и

rFAL2 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3', специфичными к гену 18S РНК *P. vivax* и *P. falciparum*.

Для изучения генетической структуры популяций *P. vivax* были использованы праймеры, специфические к участку гена *msp-1* белка оболочки мерозоиота MSP1. Реакция амплификации с праймерами

A5 5'-GGGAATTCTACTACTTGATGGTCCTC-3' в качестве прямого и

A6 5'-CCTTCTGGTACAGCTCAATG-3' в качестве обратного была проведена по условиям, описанным ранее. Результаты ПЦР визуализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле. Очистка ПЦР-продукта для секвенирования проводилась с использованием набора для элюции QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенный ПЦР-продукт был секвенирован с обеих цепей. Нуклеотидные последовательности, полученные в результате секвенирования, сравнивали и выравнивали с последовательностями базы данных GeneBank с помощью пакета филогенетических программ CLUSTALWX1,83. Характеристика праймеров, отобранных для наших исследований для всех видов *Plasmodium* и режимы амплификации суммированы в таблицах 3.1.1.2. и 3.1.1.3.

**Характеристика праймеров, использованных для Nested ПЦР1
и Nested ПЦР2 при диагностике рода и видов *Plasmodium***

Тип праймера	Условное обозначение	Последовательность олигонуклеотидов	Размер продукта ПЦР
Род <i>Plasmodium</i> Nest 1	PLU 5 PLU 6	5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3' (21 bp.) 5'-TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG-3' (23 bp.)	~1200bp*.
<i>P.falciparum</i> Nest2	FAL1 FAL2	5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3' (30 bp.) 5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3' (30 bp.)	205 bp.
<i>P.vivax</i> Nest2	VIV1 VIV2	5'-CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGATAC-3' (30 bp.) 5'-ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3' (30 bp.)	120 bp.
<i>P. malariae</i> Nest2	MAL1 MAL2	5'-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC-3' (30 bp.) 5'-AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA-3' (30 bp.)	144 bp.
<i>P.ovale</i> Nest2	OVA1 OVA2	5'-ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA-3' (30 bp.) 5'-GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG-3' (30 bp.)	~800 bp.

* bp – пара основания

Таблица 3.1.1.3

Оптимизированные режимы амплификации

Стадия	Режим
Начальная денатурация	95°C – 5 мин
Денатурация	95°C – 1 мин.
Отжиг праймеров	53°C – 2 мин.
Удлинение	72°C – 2 мин
Конечное удлинение	72°C – 8 мин
Количество циклов амплификации	25

В качестве перехода к более современному методу ПЦР-диагностики – ПЦР в реальном времени был предложен метод одноэтапной ПЦР, которая при добавлении реагента SybrGreen, а также наличия соответствующей приборной базы, может проходить с флуоресцентной детекцией в реальном времени. Для идентификации возбудителей малярии проводили ПЦР родоспецифичными праймерами PLU6 5'-ТТАААТТГТТGCAGТТААААСG-3' и PLU5 5'-ССТГТТГТТGCСТТАААСТТС-3', специфичными к гену 18S РНК рода *Plasmodium*. Для постановки видоспецифичного диагноза *P.vivax* проводилась амплификация тех же образцов ДНК с праймерами VIV1 5'- CGСТТСТАGСТТААТССАСАТААСТGАТАС-3' и VIV2 5'- АСТТССАAGCCGAAGCAAAGAAAGTCСТТА-3', специфичными к гену 18S РНК *P. vivax*, праймерами VDTOF 5'-ATG GAG GAC СТТ ТСА GAT GTA ТТТ GAC АТТ-3' и VDFOR 5'-СТТGСТGТAAАССААААAGТССА-3', специфичными к фрагменту гена дегидрофолатдегидрогеназы. Эксперимент показал высокую чувствительность данной модификации ПЦР. С целью определения результата реакции был выполнен электрофорез в агарозном геле (рисунок 3.1.1.1.). Эксперимент показал воспроизводимость реакции, ее специфичность и чувствительность, а также возможность диагностики малярии методом ПЦР в реальном времени. Таким образом, в зависимости от наличия оборудования в

лаборатории можно проводить молекулярную диагностику малярии двумя различными модификациями полимеразной цепной реакции.

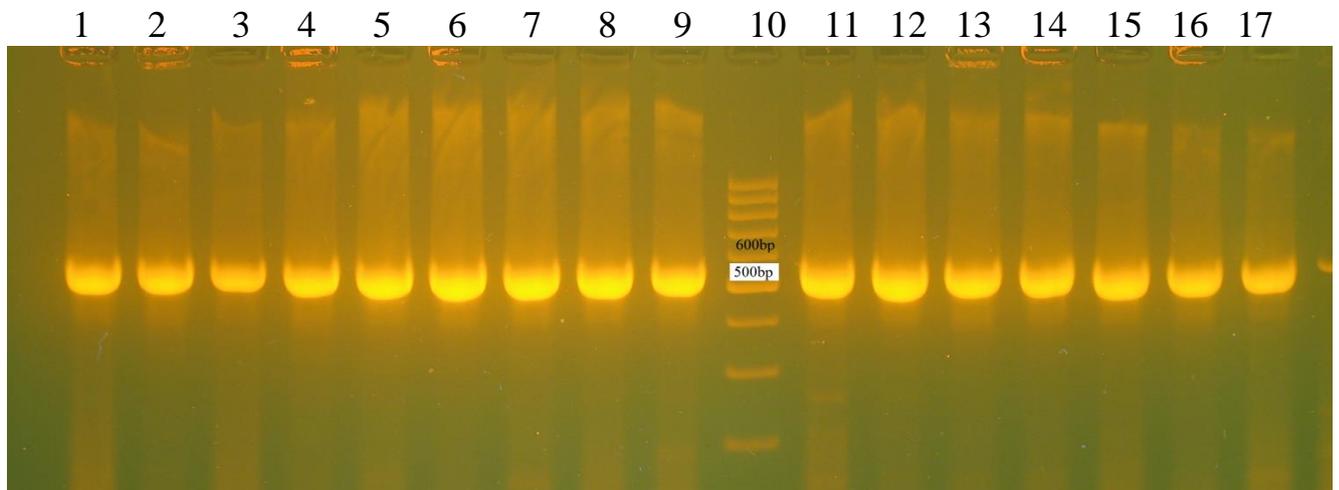


Рисунок 3.1.1.1. Фотография электрофореза ПЦР малярии (линии 1 – 9 и 11 – 17 положительные образцы от больных малярией, линия 10 – стандартный маркер)

3.1.2. Поиск межштаммовых различий

В настоящее время возбудители малярии представляют особый интерес для научного сообщества. Особенно интересным и заслуживающим внимания оказался тот факт, что повторяющиеся рибосомные гены, являющиеся у других организмов продуктом согласованной эволюции, в случае малярийного плазмодия относительно малокопийны и представлены сильно отличающимися блоками, каждый из которых транскрибируется на определенной стадии жизненного цикла [29]. Таким образом, жизненный цикл малярийных плазмодиев тесно связан с функционированием рибосом, специфичных для каждой стадии жизненного цикла. Отличия между рибосомными генами разных типов у каждого вида плазмодиев столь существенны, что превышают таковые межвидовые различия между генами одного типа у разных видов плазмодиев. Рибосомы каждой из стадий отличаются по структуре и функциональной активности. В ходе развития малярийного паразита образование рибосом регулируется на уровне транскрипции трех различных типов 18S рДНК – А, S и О, транскрибируемых на

стадиях эритроцитарной шизогонии, спорогонии и формирования оокинеты соответственно. Рибосомные гены представлены 4-8 рибосомными оперонами, которые разбросаны по различным участкам генома. Накопление мутаций в рибосомных генах разных типов у малярийных паразитов происходит независимо друг от друга и с большой скоростью, не свойственной другим организмам, что является примером исключения из гипотезы согласованной эволюции рибосомных генов [29]. Уровни дивергенции и направление эволюционных процессов между структурно детерминированными (ген 18S рРНК) и менее функционально значимыми участками (внутренними транскрибируемыми спейсерами – ITS1 и ITS 2) могут варьировать.

3.2. Лейшманиозы

В последнее время увеличилось число регистрируемых случаев лейшманиозов у людей в мире, что связано с расширением ареалов возбудителей и переносчиков, с распространением паразитов в новые географические зоны [137, 152, 166, 174, 190]. Лейшманиозы являются оппортунистической инфекцией у лиц с иммунодефицитом, что изменило привычную эпидемическую картину [82, 127, 128, 177, 184].

В связи с возрастанием числа международных путешествий, являющихся причиной завоза паразитов, лейшманиозы регулярно диагностируют в регионах, где данная инфекция неэндемична. Диагноз может быть поставлен путем обнаружения паразита при микроскопии и при помощи серологических методов.

Висцеральные лейшманиозы обычно диагностируют с применением иммуносорбентного теста (ELISA) у иммунокомпетентных пациентов [205].

Однако чувствительность серологических методов у пациентов со СПИДом колеблется, по данным различных исследований, от 6 до 82%.

Прямое обнаружение паразита лучше всего достигается путем мультипликации промастиготных форм *in vitro*. Этот метод является более чувствительным, чем микроскопическое исследование биопсийного материала. Более того, культивирование *in vitro* позволяет более подробно изучить культуру

посредством изоферментного теста и получить важные сведения о чувствительности культуры к химиотерапии.

Однако культивирование *in vitro* может быть проведено только при наличии нативного материала.

Альтернативным методом диагностики является идентификация возбудителя при помощи молекулярно-биологических методов, таких как специфические ДНК-зонды, или ПЦР.

Были выделены несколько ДНК мишеней, и их ценность для использования в ПЦР-диагностике постепенно возрастает.

В данный момент применение метода ПЦР оптимизировано для использования в рутинной клинической диагностике. В результате были выбраны следующие праймеры для детекции паразитов *Leishmania infantum*.

Прямой праймер - LITSR - CTGGATCATTTTCCGATG;

Обратный праймер – L5.8S - TGATACCACTTATCGCACTT.

Экспериментальным путем было установлено, что оптимальной температурой отжига праймеров является 53° С. Для увеличения количества продукта ПЦР количество циклов амплификации увеличили до 40.

В результате проведенной оптимизации температуры отжига праймеров и времени элонгации был выбран следующий режим амплификации (таблица 3.2.1.).

Таблица 3.2.1

Оптимизированные режимы амплификации

Стадия	Режим
Начальная денатурация	95°С – 2 мин
Денатурация	95°С – 20 сек.
Отжиг праймеров	53°С – 30 сек.
Удлинение	72°С – 1 мин
Конечное удлинение	72°С – 6 мин
Количество циклов амплификации	40

Визуализация продукта ПЦР проводилась в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

При оценке результата ПЦР ожидаемый размер продукта (относительно маркера) для *L.infantum* - 400 - 451 в. п.

3.3. Трипаносомозы

Возбудители африканского и американского трипаносомозов, как и другие кровепаразиты, могут быть легко диагностированы методом ПЦР по цельной крови, крови, собранной на бумажные фильтры, а также по препаратам крови толстая капля, окрашенным по Романовскому-Гимза. В литературе представлено большое число праймеров как для *T. cruzi*, так и для *T. gambiensi*. Эта проблема становится актуальной в связи с появлением в Европе завозных случаев трипаносомозов после посещения эндемичных территорий в тропиках [91, 118].

3.4. Дирофиляриоз

Дирофиляриоз представляет собой уникальный для России гельминтоз, возбудитель которого на личиночной стадии развивается в организме переносчиков – комаров родов *Culex*, *Anopheles* и *Aedes* [13, 110]. До недавнего времени проблеме выявления, лечения и профилактики дирофиляриоза в нашей стране уделялось мало внимания [97]. Считалось, что это весьма редкий, не имеющий существенного медицинского значения гельминтоз, который в основном завозится к нам из других стран с более теплым климатом [3, 53].

В последние 5 лет число больных, зарегистрированных в РФ, превысило 200 чел. Это не отражает истинной ситуации, т.к. дирофиляриоз не входит в число паразитозов, подлежащих официальной регистрации [1, 2, 8, 98].

Границы распространения дирофиляриозов определяются ареалами комаров-переносчиков и количеством тепла, необходимого для развития комаров и возбудителей в них (пороговой для личинок дирофилярий является 14⁰С). В результате районирования территории России были выделены 3 зоны потенциального риска заражения дирофиляриями: низкого, умеренного и

устойчивого. Ареал дирофиляриозов в России занимает территорию от 41⁰с.ш. до 58⁰с.ш., где среднесуточные температуры июля составляют от 17,5⁰С на севере до 24⁰С и выше на юге. В таких условиях сезон передачи через комаров длится 2-2,5 мес. на севере и 3-4 мес. на юге. Кроме того, распространение этой зоонозной инвазии осуществляют подвижные домашние и дикие животные [2]. Сведения об ареалах дирофиляриозов необходимы для экологического, энтомологического и эпидемиологического видов мониторинга в системе эпиднадзора за трансмиссивными болезнями [99, 130, 156].

Для диагностики дирофиляриозов применяют полимеразную цепную реакцию [3]. *D. repens* имеет повторяющиеся участки ДНК, а *D. immitis* кутикулярный антиген, которые могут быть использованы для диагностики этих видов дирофилярий. Метод ПЦР позволяет идентифицировать особи гельминтов в очагах, где одновременно распространены разные виды дирофилярий [209].

Нами были выбраны и синтезированы праймеры для диагностики *D. repens* и *D. immitis* и подобраны режимы амплификации для этих праймеров (таблица 3.4.1.) [76]. Испытания метода ПЦР диагностики дирофиляриозов проводилось на сыворотках крови собак с установленным диагнозом. Было проверено 10 положительных и 30 отрицательных сывороток. Полученные данные показали 100% эффективность и чувствительность метода.

Таблица 3.4.1

Оптимизированные режимы амплификации

Стадия	<i>D.repens</i>	<i>D.immitis</i>
Начальная денатурация	94 ⁰ С – 5 мин	94 ⁰ С – 5 мин
Денатурация	94 ⁰ С – 30 сек	94 ⁰ С – 1 мин
Отжиг праймеров	50 ⁰ С – 30 сек	50 ⁰ С – 2 мин
Удлинение	72 ⁰ С – 1 мин	72 ⁰ С – 3 мин
Конечное удлинение	72 ⁰ С – 5 мин	72 ⁰ С – 5 мин
Количество циклов амплификации	30	30

Визуализация продукта ПЦР проводилась в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

При оценке результата ПЦР ожидаемый размер продукта (относительно маркера) для *D. repens* составил в. р., для *D. immitis* - в. р.

Для идентификации *D. repens* использовали праймеры:

DIR3: F - 5' – CCGGTAGACCATGGCATTAT - 3'

DIR-4: R - 5' – CGGTCTTGGACGTTTGGTTA - 3'

Для идентификации *D. immitis* использовали праймеры:

COI intF - 5' – TGATTGGTGGTTTTGGTAA - 3'

COI intR 5' – ATAAGTACGAGTATCAATATC -3'.

Также была отработана методика постановки ПЦР с использованием ДНК, выделенной из комаров родов *Culex*, *Anopheles* и *Aedes*.

3.5. Обнаружение возбудителей паразитозов в переносчике

Новым важным для задач эпидемиологического надзора за паразитарными болезнями направлений наших исследований стала разработка методологии определения уровня зараженности членистоногих – переносчиков возбудителей инфекционных и паразитарных болезней. Этот подход позволяет получать конкретные объективные данные инфицированности переносчиков патогенными агентами и рассчитывать реальный риск заражения людей в результате трансмиссивной передачи возбудителя на обследуемых конкретных территориях [7, 13, 22, 33, 81, 109].

Наши исследования в НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского проводились на протяжении последних 10 лет. Целью указанных научных разработок стала оптимизация методики выявления наличия патогенных агентов в теле членистоногих – переносчиков, ранее эти цели достигались за счет ненадежных методов микроскопической визуализации патогенов в препаратах, приготовленных из свежеполученных членистоногих, не подвергшихся процессу высыхания. Высохший материал для микроскопического

исследования оказался не пригоден.

В наших исследованиях мы основывались на выделении фрагментов ДНК, позволявших проводить достоверную индикацию и идентификацию возбудителей трансмиссивных паразитарных заболеваний в переносчике.

В качестве первого объекта для наших исследований были использованы переносчики возбудителей дирофиляриозов. Для этой цели нами были подвергнуты исследованию комары родов *Culex*, *Anopheles* и *Aedes*, отловленных «методом на себя» или эксгаустером в местах дневок в Московской, Тверской и Нижегородской областях (с 2008 по 2011 гг.) [76].

В качестве праймера для постановки ПЦР с материалом, полученным из комаров – переносчиков дирофилярий, мы использовали тот же праймер (ту же генетическую последовательность, что и для разработанной нами диагностики дирофиляриозов у людей).

В результате исследования было выявлено 116 самок комаров, зараженных личиночными стадиями дирофилярий, в том числе 28 самок *Culex*, 10 самок *Anopheles* и 78 самок *Aedes*. Как было показано использование генетической последовательности праймера, полученного на основании изучения генома взрослого паразита *Dirofilaria repens*, оказалось пригодным для выявления и идентификации присутствия личиночной стадии того же паразита. Эти данные еще раз подтверждают сохранение полного генома паразита на протяжении всего жизненного цикла, включающего полную трансформацию организма паразита в различные стадии на протяжении прохождения всего жизненного цикла.

Для исследования в ПЦР мы использовали материал, полученный из отловленных комаров. Насекомые гомогенизировались, после чего проводилось выделение ДНК по стандартным протоколам для наборов, предусматривающих разрушение хитиновых оболочек.

Достоверность определения зараженности комаров – переносчиков личиночными стадиями дирофилярий была дополнительно подтверждена микроскопическим исследованием. Микроскопию раздавленного

насекомого проводили до того как указанный материал впоследствии использовался в ПЦР.

Другим объектом нашего исследования стали клещи – переносчики возбудителя клещевого боррелиоза. Клещевой боррелиоз или болезнь Лайма – группа природно-антропургических, трансмиссивных, зоонозных инфекций, вызываемых различными видами боррелий. Заболевание характеризуется склонностью к хроническому и латентному течению, с преимущественным поражением кожи, опорно-двигательного аппарата, нервной системы на фоне интоксикации, лихорадки и полисистемного поражения различных органов.

В сезон активного нападения клещей, присасывание этих членистоногих вызывает большое число обращений пострадавших лиц в различные лечебно-профилактические учреждения за медицинской помощью. Пик обращений наблюдается в весенне-летний период года [43, 67, 72].

Важнейшим критерием оказания квалифицированной адекватной медицинской помощи лицам, подвергшимся нападению клещей, служит достоверное определение зараженности клеща, то есть наличие в организме членистоногого возбудителей клещевого боррелиоза – *Borrelia* spp.

Для определения наличия возбудителя в организме клещей мы отработывали возможность использования содержимого организма членистоногого для молекулярно генетического исследования. В связи с тем, что в настоящее время на рынке медико-биологических препаратов существует большое число наборов для ПЦР диагностики клещевого боррелиоза у людей, основным направлением наших исследований стал подбор оптимальной системы для выделения ДНК паразита из высушенных, либо заспиртованных особей членистоногих – переносчиков клещевого боррелиоза.

Было испытано 12 различных коммерческих наборов различных производителей. Было проведено более 500 исследований с различными коммерческими наборами. В каждом случае мы определяли количество (объем) выделенной ДНК возбудителя.

В результате предпочтение было отдано набору «Проба-ГС» (ДНК-технология, Россия). Несмотря на самую сложную из всех испытываемых наборов методику выделения, данный набор позволяет выделить максимальное количество ДНК из всех проб, взятых для анализа.

Экспериментальные работы проводили на клещах, зараженных возбудителем болезни Лайма – *Borrelia burgdorferi*. Аналогичную разработанную нами методику мы применяли и для оценки зараженности комаров возбудителями дирофиляриоза и малярии [83, 84].

В дальнейшем методику, отработанную на экспериментальных материалах с зараженными клещами, мы с успехом применяли для исследования диагностического материала, поступавшего из клинично-диагностического центра Первого МГМУ им И.М. Сеченова. Всего за 2008-2012 гг. было исследовано 148 клещей, которые приносили пострадавшие от нападения членистоногих, обратившиеся за медицинской помощью в отделение медицинской паразитологии и тропической медицины КДЦ КЦ ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России. Среди исследованных членистоногих 54 экземпляров клещей оказались зараженными *Borrelia burgdorferi*.

Предложенный нами подход к определению объективного уровня зараженности членистоногих – переносчиков патогенами – возбудителями инфекционных и паразитарных болезней является важным компонентом определения уровня и степени различных биологических угроз на территории нашей страны и расчета реальных рисков заражения людей возбудителями различных трансмиссивных инфекционных и паразитарных болезней во время пребывания на эндемичных территориях.

Проведенные исследования показали возможность использования данного набора для оценки зараженности членистоногих возбудителями трансмиссивных паразитарных и тропических болезней.

Глава 4. ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПАРАЗИТОЛОГИИ В МОНИТОРИНГЕ ЗА НЕТРАНСМИССИВНЫМИ ПАРАЗИТОЗАМИ

4.1. Криптоспоридиоз

Применение молекулярно-генетических методов для индикации *Cryptosporidium parvum* может иметь целью как рутинную диагностику криптоспоридиоза у пациентов, так и, что более важно с точки зрения осуществления санитарно-эпидемиологического надзора и обеспечения биологической безопасности страны, обнаружение этого патогена в питьевой воде и водных объектах среды обитания человека [58, 138, 188, 198, 211, 213]. Нами была отработана и предложена методика обнаружения возбудителя криптоспоридиоза, которая может успешно применяться для выполнения этих целей. Для этого по литературным данным были подобраны оптимальные праймеры и оптимизированы режимы амплификации для этих праймеров.

Выбранные праймеры проверялись на гомологичность и отсутствие перекрестных реакций в базе данных генетической информации Genbank с помощью компьютерной программы Blast.

В результате были выбраны следующие праймеры для детекции паразитов *Cryptosporidium parvum* [148, 164, 189].

Прямой праймер - CCGAGTTTGATCCAAAAAGTTAGGAA;

Обратный праймер – CGTTAACGGAATTAACCAGAC.

Экспериментальным путем было установлено, что оптимальной температурой отжига праймеров является 45° С. Для увеличения количества продукта ПЦР количество циклов амплификации увеличили до 35. В результате проведенной оптимизации температуры отжига праймеров и времени элонгации был выбран следующий режим амплификации (таблица 4.1.1.).

Таблица 4.1.1

Оптимизированные режимы амплификации

Стадия	Режим
Начальная денатурация	95°C – 5 мин
Денатурация	95°C – 1 мин
Отжиг праймеров	45°C – 2 мин
Удлинение	72°C – 3 мин
Конечное удлинение	72°C – 4 мин
Количество циклов амплификации	35

Визуализация продукта ПЦР проводилась в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

При оценке результата ПЦР ожидаемый размер продукта (относительно маркера) для *S. parvum* - 400 - 451 в. р.

4.2. Лямблиоз

Праймеры для диагностики лямблиоза подбирались на основании литературных данных о нуклеотидной последовательности *Giardia lamblia* (*Lamblia intestinalis*) [115, 116, 163, 189, 203] и собственной практики.

Выбранные праймеры проверялись на гомологичность и отсутствие перекрестных реакций в базе данных генетической информации Genbank с помощью компьютерной программы Blast.

В результате были выбраны следующие праймеры для детекции паразитов *Giardia lamblia*.

Прямой праймер – 5' –GGAGACCGACGAGCAAAGC– 3';

Обратный праймер – 5' – СТТГССААГCGCCTCAA – 3'.

Экспериментальным путем было установлено, что оптимальной температурой отжига праймеров является 58° С. Для увеличения количества продукта ПЦР количество циклов амплификации увеличили до 40.

В результате проведенной оптимизации температуры отжига праймеров и времени элонгации был выбран следующий режим амплификации (таблица 4.2.1.).

Таблица 4.2.1

Оптимизированные режимы амплификации

Стадия	Режим
Начальная денатурация	94°C – 5 мин
Денатурация	94°C – 30 сек.
Отжиг праймеров	58°C – 30 сек.
Удлинение	72°C – 30 сек.
Конечное удлинение	72°C – 7 мин
Количество циклов амплификации	40

Визуализация продукта ПЦР проводилась в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

При оценке результата ПЦР ожидаемый размер продукта (относительно маркера) для *Giardia lamblia* –148 пар оснований (рисунок 4.2.1.).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

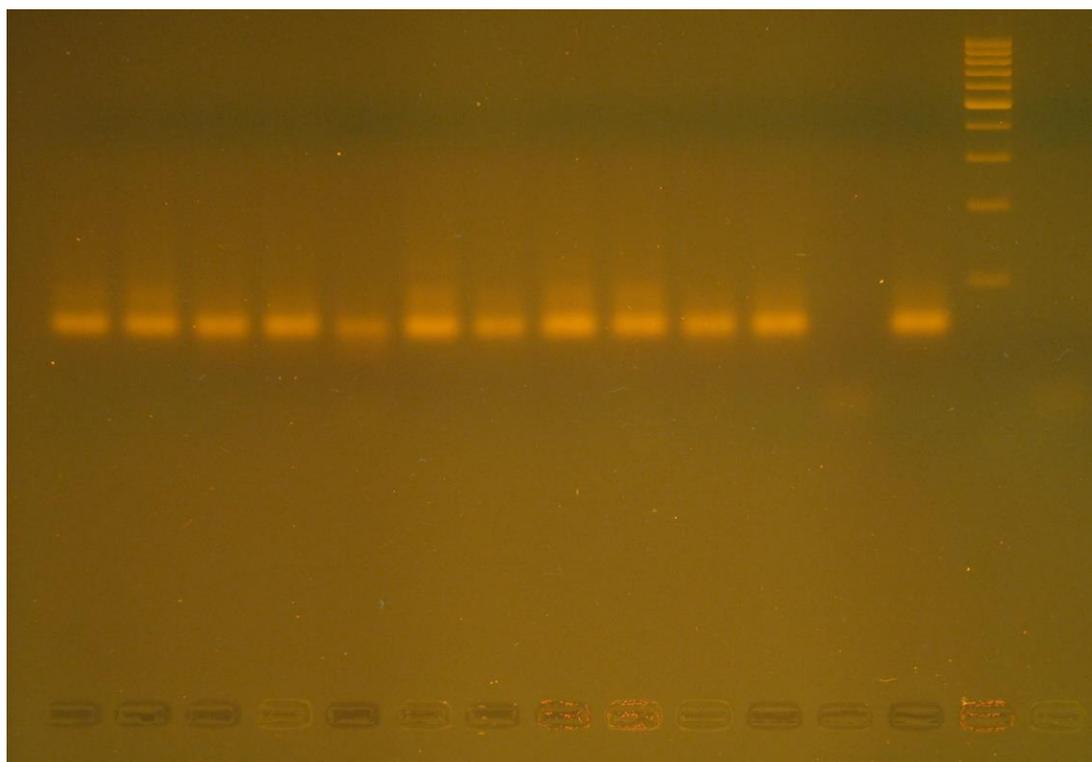


Рисунок 4.2.1. Электрофореграмма продуктов амплификации возбудителей лямблиоза, полученных с использованием отобранных праймеров (линии 1 – 11 положительные образцы от больных лямблиозом, линия 12- отрицательный контроль, линия 13 – положительный контроль, линия 14 – стандартный маркер)

4.3. Амебиаз

Дифференциация патогенной инвазивной *Entamoeba histolytica* от комменсалов *E.dispar* или *E.moshkovskii* невозможна на основе морфологических микроскопических исследований [124, 142, 215]. Для осуществления подобной дифференциальной диагностики критически важной для постановки диагноза и определения тактики лечения необходимо использовать молекулярные методы, в частности ПЦР.

Кишечный амебиаз необходимо дифференцировать с диарейными болезнями, протекающими с признаками колита и с кровью в испражнениях.

Появление крови в испражнениях обращает внимание больного, а также медицинского персонала. Этот признак может наблюдаться при болезнях, вызванных простейшими (балантидиаз), бактериями (дизентерия, кампилобактериоз, сальмонеллез, эшерихиоз), гельминтами (шистосомоз, анкилостомоз), а также неинфекционными болезнями (неспецифический язвенный колит, новообразование кишечника, болезнь Крона, дивертикулярная болезнь, пеллагра и др.).

Одним из методов диагностики амебиаза является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Её высокая чувствительность позволяет обнаружить в исследуемом материале единичные клетки и даже их фрагменты ДНК. Метод исключает перекрёстные реакции и специфичность достигает 100%. Также к основным достоинствам метода ПЦР относятся: простота и удобство проведения анализа; сравнительно небольшие затраты времени на проведение анализа; умеренная и постоянно снижающаяся себестоимость [103, 104, 105].

Праймеры для диагностики амебиаза подбирались на основании литературных данных о нуклеотидной последовательности *Entamoeba histolytica* [182, 199, 208] и собственной практики.

Выбранные праймеры проверяли на гомологичность и отсутствие перекрестных реакций в базе данных генетической информации Genbank с помощью компьютерной программы Blast.

В результате были выбраны следующие праймеры для детекции паразитов *Entamoeba histolytica*.

Прямой праймер – 5' – ATG CAC GAG AGC GAA AGC AT – 3';

Обратный праймер – 5' – GAT CTA GAA ACA ATG CTT CTC T – 3'.

Экспериментальным путем было установлено, что оптимальной температурой отжига праймеров является 63° С. Для увеличения количества продукта ПЦР количество циклов амплификации увеличили до 35. В результате проведенной оптимизации температуры отжига праймеров и времени элонгации был выбран следующий режим амплификации (Таблица 4.3.1.).

Таблица 4.3.1

Оптимизированные режимы амплификации

Стадия	Режим
Начальная денатурация	94°C – 5 мин
Денатурация	94°C – 1 мин
Отжиг праймеров	63°C – 1 мин
Удлинение	72°C – 1 мин
Конечное удлинение	72°C – 5 мин
Количество циклов амплификации	35

Визуализация продукта ПЦР проводилась в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

При оценке результата ПЦР ожидаемый размер продукта (относительно маркера) для *Entamoeba histolytica* - 166 пар оснований

4.4. Токсоплазмоз

В настоящее время в России выпускается ряд тест-систем на основе ПЦР для диагностики токсоплазмоза у больных, в том числе и для ПЦР в реальном времени. В качестве материала для исследования предлагается использовать кровь, амниотическую жидкость, слезную жидкость [15, 193, 210]. Однако с учетом сложного жизненного цикла *Toxoplasma gondii*, вероятность обнаружения паразита в крови крайне мала, поскольку в момент активных клинических проявлений паразит отсутствует в кровеносном русле [120, 153, 172, 179, 185]. Нами было поставлено более 150 реакций ПЦР (из них 48 ПЦР в реальном времени). Положительных результатов выявлено не было.

Значительно информативней постановка реакции с использованием в качестве источника ДНК слезной жидкости или околоплодных вод, поскольку в этом биологическом материале может содержаться возбудитель, а процедура выделения ДНК в этих случаях значительно упрощена.

4.5. Трихомониаз

Молекулярная диагностика трихомониаза широко применяется в настоящее время в практике клинико-диагностических лабораторий всех уровней [49]. Разработаны тест системы как для классической ПЦР, так и для ПЦР в реальном времени [121, 157, 196]. Преимущества ПЦР при диагностике трихомониаза очевидны, поскольку методика выделения ДНК из отделяемого влагалища значительно проще, чем при остальных паразитозах, что сокращает время постановки реакции, уменьшает ее стоимость и трудозатраты, а также минимизирует ложноотрицательные результаты.

4.6. Блостоцистоз

До недавнего времени *Blastocystis hominis* не рассматривались как этиологический фактор патологических состояний человека. Более того, некоторые исследователи вообще сомневались в патогенных потенциях *B.hominis* и считали блостоцитоз не заболеванием, а безвредным транзитным носительством непатогенных микроорганизмов [32]. Заболевания, вызванные *B.hominis*, обычно рассматривали как экзотические протозойные инфекции, связанные с путешествиями в тропические и субтропические страны.

В то же время, и в странах с умеренным климатом поражения кишечника, обусловленные *B.hominis*, не так уж редки. В настоящее время эти паразиты обнаружены не только в Африке и Азии, но и в Европе, Северной и Южной Америке, Австралии, то есть расселение *B. hominis* можно считать всемирным [32]. В последние годы накопилось достаточное количество эпидемиологических и клинических материалов, а также лабораторных данных, подтверждающих как потенциальную, так и реальную этиологическую роль *B.hominis* в патологии человека, развивающейся на фоне снижения резистентности макроорганизма [95, 96, 104, 191]. Основными клиническими проявлениями блостоцистоза являются диарея и абдоминальные боли. Заболевание развивается по типу энтерита, энтероколита или колита. Многочисленные сообщения убедительно свидетельствуют об этиологическом и патогенетическом значении блостоцист в

развитии диарейного синдрома. Так, например, проведенное в 1986 году в Югославии целенаправленное паразитологическое исследование подтвердило высокую частоту обнаружения бластоцист при хронических заболеваниях, когда диарейный синдром имел рецидивирующее течение и продолжался не менее одного месяца [32].

Особенно актуальной проблема бластоцистоза становится в связи с резким увеличением числа ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом, так как у иммунокомпрометированных людей *B.hominis* легко вызывают хронические поражения пищеварительной системы.

Диагноз бластоцистоза ставится на основании микроскопического исследования методом нативного мазка. Однако диагностика бластоцистоза затруднена обилием различных морфологических форм бластоцист.

В НИИ МП и ТМ им.Е.И.Марциновского впервые в России была внедрена ПЦР-диагностика бластоцистоза, которая, наряду с методиками ПЦР-диагностики криптоспориоза, лямблиоза и амебиаза, должна помочь в дифференциальной диагностике кишечных протозоозов.

4.7. Биогельминтозы

В диагностике биогельминтозов у человека молекулярно-биологические методы имеют достаточно ограниченное применение [173]. Это связано с особенностями жизненного цикла возбудителей. ПЦР-диагностика тканевых гельминтозов, таких как трихинеллез, цистицеркоз, фасциолез, парагонимоз и пр., невозможна из-за отсутствия паразитов или их частей в выделениях человека. При диагностике этих заболеваний предпочтение следует отдавать иммунологическим методам (ИФА, РИФ). Ограниченные возможности для ПЦР-диагностики остаются в отношении ленточных гельминтов, но и в этом случае молекулярные методы практически не применяются, т.к. микроскопическое исследование не требует длительной пробоподготовки и имеет значительные преимущества как по чувствительности, так и по трудозатратам.

4.8. Геогельминтозы

Основным направлением применения методов молекулярной паразитологии в отношении геогельминтозов является санитарная паразитология [46, 123, 161]. В настоящее время разрабатываются различные типы тест-систем для поиска возбудителей геогельминтозов в среде обитания человека: почве, воде поверхностных водоемов, а также питьевой воде. При этом такие тест-системы можно комбинировать с аналогичными на кишечные протозоозы, что позволит оценить уровень биологической безопасности среды обитания человека [56].

Оптимизация молекулярной диагностики кишечных проозоозов

На основе разработанных в НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им.Е.И.Марциновского методик молекулярно-биологической диагностики кишечных протозоозов (лямблиоз, амебиаз, бластоцистоз и криптоспоридиоз) нами создана система ПЦР-диагностики простейших кишечника для подтверждения дифференциального диагноза в сложных случаях.

Данная система основана на наборах праймеров к четырем основным возбудителям кишечных протозоозов и наборе реагентов для ПЦР (PCR-core), выпускаемом отечественной промышленностью. Структура праймеров для диагностики простейших кишечника:

- *G.lamblia*:

Прямой праймер – 5' –GGA GAC CGA CGA GCA AAG C– 3';

Обратный праймер – 5' – CTT GCC AAG CGC CTC AA – 3'

- *E.histolytica*

Прямой праймер – 5' –ATG CAC GAG AGC GAA AGC AT– 3';

Обратный праймер – 5' – GAT CTA GAA ACA ATG CTT CTC T– 3'

- *S.parvum*

Прямой праймер – 5' –CCG AGT TTG ATC CAA AAA GTT AGG AA– 3';

Обратный праймер – 5' – CGT TAA CGG AAT TAA CCA GAC – 3'

- *B.hominis*

Прямой праймер – 5' –GGA ATC CTC TTA GAG GGA CAC TAT ACA T–
3';

Обратный праймер – 5' – TTA СТА ААА ТСС ААА GTG TTC ATC GGA C
– 3'

В таблице 4.8.1. представлены режимы амплификации для обнаружения возбудителей кишечных протозоозов.

Таблица 4.8.1

Режимы амплификации

Стадия	<i>G.lamblia</i>	<i>S.parvum</i>	<i>B.hominis</i>	<i>E.histolytica</i>
Начальная денатурация	94°C – 5 мин	94°C – 5 мин	94°C – 5 мин	94°C – 5 мин
Денатурация	94°C – 30 сек	94°C – 1 мин	94°C – 1 мин	94°C – 1 мин
Отжиг праймеров	58°C – 30 сек	45°C – 2 мин	60°C – 1 мин	63°C – 1 мин
Удлинение	72°C – 30 сек	72°C – 3 мин	72°C – 1 мин	72°C – 1 мин
Конечное удлинение	72°C – 7 мин	72°C – 4 мин	72°C – 5 мин	72°C – 5 мин
Количество циклов амплификации	40	35	35	35

Размер амплифицируемого фрагмента ДНК составляет для:

G.lamblia – 148 пар оснований,

E.histolytica – 160 пар оснований,

S.parvum – 450 пар оснований,

B.hominis – 585 пар оснований.

Следует отметить, что данная методика легко адаптируется для постановки ПЦР в реальном времени путем добавления в реакционную смесь реагента SybrGreen.

Указанные условия постановки ПЦР были испытаны на 254 пробах клинического материала, взятого от пациентов с диареями неясной этиологии. В результате проведенных исследований было выявлено: 102 положительных результата на наличие ДНК бластоцист, 14 – криптоспоридий и 6 – дизентерийной амебы. В одном случае выявлена сочетанная инфекция, вызванная *B.hominis* и *S.parvum*. Все случаи протозойных заболеваний, выявленные с помощью ПЦР, были впоследствии верифицированы стандартными микроскопическими методами.

Глава 5. ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ПАРАЗИТОЗАМИ (ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)

Молекулярно-генетические исследования обычно применяют в клинической диагностике для выявления больных малярией в эндемичных местностях; подтверждения результатов микроскопического исследования препаратов крови; определения резистентности возбудителей к лекарственным препаратам.

В системе эпидемиологического надзора эти методы применяют гораздо шире:

- 1) при эпидемиологическом обследовании потенциального или активного очага малярии для установления происхождения случая и его классификации (завозной или местный);
- 2) при поиске источников инфекции среди групп повышенного риска заражения (сезонные рабочие, коммерсанты, иностранные студенты и др.);
- 3) для оценки эффективности проведенных противомаларийных мероприятий (сезонной или межсезонной химиопрофилактики);
- 4) для мониторинга восприимчивости переносчиков к возбудителям и чувствительности к применяемым инсектицидам;
- 5) при подтверждении достоверности отсутствия больных или паразитоносителей в оздоровленных очагах (сертификации элиминации малярии на отдельной территории).

5.1. Энтомологический мониторинг за переносчиками возбудителей дирофиляриозов

Применение популяционно-генетических исследований для изучения переносчиков, заражённых возбудителями дирофиляриозов, было вызвано необходимостью энтомологического мониторинга ситуации, определения риска заражения и оценки эффективности применявшихся мер профилактики. В

отдельных населенных пунктах и регионах Российской Федерации, потенциально опасных для распространения этих паразитозов.

Для исследования комаров на заражённость возбудителями дирофиляриозов использовали полимеразную цепную реакцию, позволяющую обнаружить до 1 микрофилярии в биопробах (50-100 взрослых особей комаров). В последние годы появились варианты ПЦР, позволяющие определить наличие в организме комара инвазионной стадии личинок некоторых филярий с помощью L-3 активного гена. За период с 2006 по 2011 год было собрано и исследовано 6891 экземпляров самок комаров, собранных в разных районах умеренно-климатической зоны России. Комары были объединены в 726 проб и проанализированы методом ПЦР на заражённость *D. repens* и *D. immitis* [76].

Изучение зараженности самок комаров в разные месяцы теплого сезона года показало, что зараженные *D. repens* комары появляются во второй декаде мая. Комары, зараженные *D. immitis*, были обнаружены, начиная с июня. Общая заражённость комаров (*Dirofilaria spp.*) одинакова в мае, июне, июле (0,86%, 1,24% и 0,98% соответственно). В августе отмечается увеличение зараженности переносчиков (5,38%), а в 1- 2 декадах сентября – снижение до 2,46%. Данные энтомологического мониторинга показали, что если в 2006-2008 гг. заражённость комаров дирофиляриями была практически одинаковой (0,44 – 0,49%), то с 2009 г. она возростала: почти в пять раз в 2009 г., более, чем в 5 раз – в 2010 г., в 7,5 раз - в 2011 г.

Заражённость *D. repens* составляла у самок комаров р. *Culex* – $2,31 \pm 0,54\%$, у р. *Aedes* – $1,86 \pm 0,25\%$, у р. *Anopheles* – $3,35 \pm 1,1\%$. Заражённость комаров *D. immitis* у р. *Culex* составляла $1,29 \pm 0,4\%$, у р. *Aedes* – $0,78 \pm 0,16\%$. У самок рода *Anopheles* *D. immitis* были обнаружены только в одной пробе с двойным заражением. Полученные результаты свидетельствуют о примерно идентичной зараженности комаров разных родов. Следовательно, в отличие от малярии, где специфическим переносчиком служат исключительно комары одного рода *Anopheles*, при дирофиляриозе передачу способны осуществлять все комары

которые встречаются на данной территории, что существенно увеличивает вероятность сохранения гельминта – возбудителя как вида.

Для оценки зараженности комаров использовали индекс MFIR (Minimum field infection rate), вычисляемый по формуле: число проб, в которых были обнаружены зараженные комары/общее число комаров \times 1000. В наших исследованиях было обнаружено достоверное увеличение числа зараженных комаров на протяжении всех лет исследования (2006 - 2011 гг.). Пик зараженности отмечали в августе, причем максимальная зараженность была зарегистрирована в 2011 году.

Из 14 обследованных районов Московского региона в пяти не зафиксировано ни одной положительной пробы, свидетельствующей о зараженности комаров дирофиляриями. В остальных девяти районах зарегистрирована зараженность комаров, показатели которой варьировали от 1,2 до 4,23%. Разработанный метод может быть использован для диагностики дирофиляриоза в крови дефинитивного хозяина (человека и плотоядных), а также для тестирования комаров на зараженность дирофиляриями. На протяжении всех лет наблюдений уровень зараженности комаров различных родов отличался незначительно – р. *Aedes* - $2,64 \pm 0,29$, р. *Anopheles* – $3,72 \pm 1,15$ и р. *Culex* - $3,59 \pm 0,7\%$. В то же время показатели зараженности за период исследования значительно возросли - с $0,44 \pm 0,18\%$ в 2006 г. до $3,25 \pm 0,37\%$ в 2011г. Зараженность в начале лета (май-июнь) составила в среднем за все годы 2,65%. Максимальная зараженность комаров в большинстве исследованных районов наблюдалась в период с середины августа до середины сентября и составила в среднем за все годы 8,77%.

5.2. Создание инструментов эпидемиологического надзора за тропическими болезнями (на примере лихорадки Зика)

Вирус Зика передается людям при укусах зараженных комаров рода *Aedes*, в основном вида *Aedes aegypti*, обитающих в тропических регионах. Эти же комары являются переносчиками лихорадки денге, чикунгуньи и желтой лихорадки.

Лабораторная диагностика лихорадки Зика основана на анализе сыворотки или плазмы крови на наличие вирусной РНК или специфического иммуноглобулина (Ig) М. При этом серологические тесты обладают низкой специфичностью по отношению к близкородственным флавивирусам (например, вируса желтой лихорадки, вируса Денге и т.д.), специфические антитела обнаруживаются в крови не ранее, чем через 4 суток после проявления симптомов болезни. Во избежание ложноотрицательных результатов в этот период наиболее предпочтительны тесты, основанные на детекции РНК вируса: в течение не более чем 5-7 суток с начала проявления симптомов болезни в сыворотке или плазме крови, и не более чем 20 суток в моче. Тесты, основанные на детекции РНК вируса, отличаются более высокой специфичностью в отношении близкородственных флавивирусов по сравнению с серологическими.

Так как ПЦР широко применяется для диагностики заболеваний, вызванных флавовирусами и является быстрым, чувствительным и специфичным методом, мы разработали набор реагентов, основанный на одностадийной ОТ-ПЦР-РВ, для детекции РНК вируса Зика в биологическом материале.

Геном вируса Зика представлен положительно направленной одноцепочечной РНК размером приблизительно 11 000 н.п. Фланкирующие участки генома не содержат участков, кодирующих белки и известны как 5' и 3'-нетранслируемые области. Транслируемый полипротеин подвергается посттрансляционной модификации вирусной и клеточными протеазами в три структурных белка (капсидный (С), премоembrанный (prM) или мембранный (М) и оболочечный (Е)) и семь неструктурных (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b и NS5).

Для выбора гена-мишени был проведен сравнительный анализ геномов как близкородственных вирусов (вирусов Денге типов 1,2,3,4; Японского энцефалита; лихорадки Западного Нила; Желтой лихорадки; Спандвени), так и известных последовательностей вируса Зика. Исходя из результатов анализа в качестве гена-мишени был выбран регион NS2B-NS3, который отвечал требованиям

специфичности по отношению к близкородственным вирусам, так и гомогенности внутри штаммов вируса Зика.

Подбор праймеров и зондов осуществлялся исходя из следующих критериев:

1) Специфичность. Минимальное количество мисматчей с неспецифической мишенью – 2 нуклеотида в пределах первых пяти нуклеотидов с 3'-конца.

2) Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций.

3) Температура отжига праймеров не должна быть ниже температуры стадии отжига в программе амплификации более, чем на 5 градусов цельсия.

4) Размер ампликона не должен превышать 300 н.п. (максимально допустимый размер ампликона для обратной транскриптазы).

5) У праймеров должны отсутствовать любые димеры со свободной энергией образования менее -4 и 3'-димеры со свободной энергией образования менее -2.

6) Олигонуклеотидный зонд типа Taqman.

7) Температура отжига зонда должна составлять от 60 до 80 градусов цельсия.

8) Длина олигонуклеотидного зонда должна быть максимально короткой.

9) Зонд не должен содержать на 5'-конце нуклеотид G (гуанин).

Выбор методики пробоподготовки осуществлялся исходя из следующих критериев:

1) Используемые вещества не должны быть высокотоксичными.

2) Препарат выделенной РНК должен обладать чистотой, приемлемой для проведения обратной транскрипции.

3) Метод не должен быть трудозатратным, общее время пробоподготовки не должно превышать 2 часа.

Для определения диагностической чувствительности и специфичности были приготовлены 100 образцов мочи, 100 образцов сыворотки крови и 100 образцов плазмы крови. В 50 образцов каждого типа была внесена РНК вируса Зика до

конечной концентрации, варьирующей в диапазоне от 10^6 до $3 \cdot 10^2$ копий/мл образца (таблица 5.2.1.). В целях предотвращения деградации нативной РНК в нативном биоматериале раствор РНК добавлялся непосредственно на стадии лизиса. Наличие или отсутствие анлита в образцах было подтверждено с помощью наборов сравнения QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Германия) и «RealStar Zika virus RT-PCR Kit 1.0» (Altona Diagnostics Gmb, Германия). Образцы были параллельно проанализированы с помощью набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV».

Диагностическая чувствительность определялась как доля, выраженная в %, истинно положительных результатов ко всем получившимся положительными, включая ложноположительные и составила 100%. Для расчета нижней границы интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью $C = 90\%$ использовалась следующая формула:

$(1-C/100)^{1/n} * 100\%$, где:

n – общее число исследуемых проб с истинно положительными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

C – доверительная вероятность, в данном исследовании принята равной 90%. Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 90% составила 95,5%.

Таблица 5.2.1

Характеристика клинического материала для определения диагностической чувствительности

Клинический материал	Число образцов с истинно положительными результатами	Результаты испытуемого набора		Диагностическая чувствительность
		Положительные	Отрицательные	
Сыворотка крови	50	50	0	95,5-100%
Плазма крови	50	50	0	95,5-100%
Моча	50	50	0	95,5-100%

Диагностическая специфичность определялась как доля, выраженная в %, истинно отрицательных ко всем получившимся отрицательными и составила 100%. Для расчета нижней границы интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической специфичности с доверительной вероятностью $C = 90\%$ использовалась следующая формула:

$(1-C/100)^{1/n} * 100\%$, где:

n – общее число исследуемых проб с истинно положительными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

C – доверительная вероятность, в данном исследовании принята равной 90%.

Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 90% составила 95,5%.

Таблица 5.2.2

Характеристика клинического материала для определения диагностической специфичности

Клинический материал	Число образцов с истинно отрицательными результатами	Результаты испытываемого набора		Диагностическая специфичность
		Положительные	Отрицательные	
Сыворотка крови	50	50	0	95,5-100%
Плазма крови	50	50	0	95,5-100%
Моча	50	50	0	95,5-100%

Для подтверждения аналитической чувствительности на этапе выходного контроля наборов реагентов из образца pIZIKV-tr был приготовлен и проанализирован КОЧ-ZIKV с концентрацией $3 \cdot 10^2$ копий/мл в десяти повторностях. Значение C_t всех десяти повторностей составило <45 , что позволяет использовать данный образец для подтверждения аналитической чувствительности на стадии выходного контроля наборов реагентов.

Клинические испытания набора проводились на основании разрешения Росздравнадзора о возможности проведения клинических испытаний медицинского изделия - Набор реагентов для обнаружения РНК вируса Зика (*Zika virus*) методом полимеразной цепной реакции «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» № 514/216 от 16.06.2016.

Местом проведения испытаний был выбран НИИ гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург).

В соответствии с Приказом Минздрава РФ от 9 января 2014г. №2н, согласованная сторонами программа клинических испытаний включала:

- анализ представленной документации;
- проведение клинико-лабораторных испытаний, необходимых для применения медицинского изделия по назначению;
- оценку и анализ полученных данных и их соответствие заявленным характеристикам;
- доработку эксплуатационной документации производителя по результатам испытаний (при необходимости);
- оформление и выдача заявителю акта оценки результатов клинико-лабораторных испытаний.

Клинико-лабораторные испытания состояли из следующих этапов:

- 1) соответствие аналитических характеристик испытуемого набора заявленным в технической и эксплуатационной документации;
- 2) оценка внешнего вида упаковки и маркировки и соответствие этих показателей качества указаны в технической и эксплуатационной нормативной документации испытуемого набора;
- 3) определение диагностических характеристик набора (чувствительности и специфичности);
- 4) экспериментальная апробация инструкции по применению испытуемого набора;
- 5) анализ клинической безопасности согласно экспериментальной апробации инструкции по применению испытуемого набора;

б) сравнение результатов с помощью набора сравнения «АмплиСенс ® *Zika virus*-FL», ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия.

7) оценка воспроизводимости испытуемого набора.

Подготовка и инактивация проб проводилась в Федеральном научном Центре исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, имеющим лицензию на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей инфекционных заболеваний 1-4 групп патогенности, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Во время клинических испытаний набора реагентов для обнаружения РНК вируса Зика (*Zika virus*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» для диагностики *in vitro* производства ООО НПФ «Литех» проведена проверка полноты и достоверности установленных технической и эксплуатационной документацией производителя заявленных характеристик безопасности и эффективности испытуемого набора в соответствии с предназначенным производителем применением медицинского изделия по назначению, в том числе, определение его аналитических и диагностических характеристик, указанных в технической и эксплуатационной документации производителя.

5.3. Эпидемиологическая диагностика в потенциальных и активных очагах малярии

В настоящее время 55% всех случаев малярии вызываются *Plasmodium vivax*, ежегодно в мире заболевают трехдневной малярией 75 млн. человек. Эти случаи возникают в азиатской части Европейского региона, в Центральной и

Юго-Восточной Азии, на Ближнем Востоке, в Центральной и Южной Америке, менее всего - в Африке. На многих территориях ареалы *P.vivax* и *P.falciparum* совпадают, хотя у этих возбудителей резко отличаются биологические и эпидемиологические характеристики. На территориях с низким уровнем передачи *P.vivax* неизменно становится доминирующим возбудителем. Этому способствует значительно более раннее по сравнению с *P. falciparum* появление гаметоцитов *P.vivax* в крови больных: на 3-4 дни болезни, тогда как при тропической малярии – на 9-10 дни. Известно также, что больные трехдневной малярией становятся заразными для переносчика еще в конце инкубационного периода до развития первых клинических проявлений, а заболевания новорожденных возникают даже с первых дней жизни; заражение *P.falciparum* регистрируются после 6 месяцев жизни.

Изучение популяционной структуры возбудителя малярии необходимо для понимания роли полиморфизма возбудителя в передаче малярии. Такая информация особенно актуальна, так как часто регистрируется микст-инфекции разными генетическими вариантами *P.vivax*. В прежде эндемичных странах СНГ (Республики Кыргызстан и Таджикистан) в 2005-2010 гг. впервые были проведены генетические исследования завозной тропической и местной вивакс-малярии. Их целью стало изучение молекулярно-генетической структуры популяций возбудителя трехдневной малярии по маркерной области генома – области гена белка оболочки I мерозоида *Plasmodium vivax*.

Материал для нашего исследования был собран в июле-октябре 2006 г. в 2-х городах и 3-х селениях Республики Кыргызстан (г. Бишкек, г. Ташкумыр Жалалабадского вилоята, с. Кора-Бок, с. Ак-Турпок и с. Бургонди Баткенскоого вилоята). Всего было собрано 128 образцов крови от 60 больных с клиническими признаками малярии, а также у 157 лиц, контактировавших с больными. Возраст больных был от 1 года до 80 лет, доля лиц до 15 лет составила 25%. Кровь была собрана в стерильные контейнеры с ЭДТА и сохранялась при $t^{\circ} = 4^{\circ}\text{C}$. Всего было собрано 285 образцов. ДНК выделяли стандартным методом щелочного лизиса из 100 мкл крови.

Всего было исследовано 149 образцов крови больных малярией. В результате реакции амплификации получен характерный продукт длиной около 1600 п.н. С эпидемиологической точки зрения важно, что специфическая амплификация в образцах крови членов семей, заболевших не наблюдалась. Это значит, что внутрисемейная и внутрисемейная передача возбудителя малярии на обследованных территориях отсутствовала.

В результате видовой идентификации возбудителей характерный продукт длиной около 310 п.н. был получен только с праймерами rVIV1 и rVIV2, специфичными к 18S ДНК *P. vivax*.

В гене *msp-1* была проанализирована структура шестого варибельного блока. В результате амплификации образцов крови, содержащих ДНК *P. vivax*, с праймерами, специфичными к участку гена белка мерозоиита, был получен специфический продукт амплификации размером от 615 п.н. до 700 п.н. Для определения последовательности нуклеотидов изучаемого участка было проведено секвенирование полученного ПЦР-продукта для образцов из городов Бишкек, Ташкомур и Ошского вилоята. Для сравнения были проанализированы образцы крови больных из очага трёхдневной малярии Хатлонского вилоята соседнего Таджикистана.

В результате секвенирования было показано, что размер исследованных последовательностей варьировал от 699 п.н. до 615 п.н. за счет продолжительных делеций-инсерций в области поли-Q повторов. Q-повторы – это микросателлитные тринуклеотидные повторы, кодирующие аминокислоту глицин. В большинстве случаев микросателлит образован нуклеотидами САА, но замена по третьему положению кодона приводит к появлению микросателлита САG. За счет вырожденности генетического кода подобная замена не приводит к замене аминокислоты. Длина Q-повторов у изученных изолятов *P. vivax* колеблется от 2 до 25 аминокислот (изолят Td21). Q-повторы из 25 аминокислот – самые длинные из обнаруженных ранее. Длина Q-повторов у изолятов, зарегистрированных в международной базе данных GeneBank, не превышает 21 аминокислотного остатка (рисунок 5.3.1.).

жителей города Ташкомур характерна исключительно высокая (99%) гомология изученных последовательностей. Выявленный нами факт с большой долей вероятности свидетельствует об относительно недавнем формировании данного городского очага малярии. Более того, указанный очаг сформировался в результате однократного заноса возбудителя трехдневной малярии и дальнейшего распространения этого клона возбудителя через популяцию местных комаров – переносчиков.

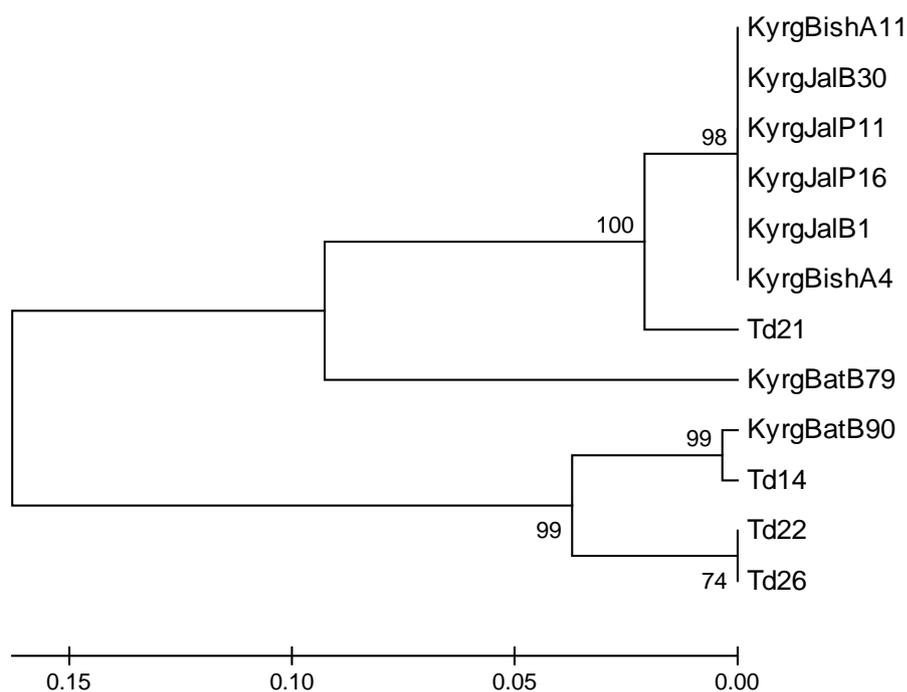


Рисунок 5.3.2. Дендрограмма сходства аминокислотных последовательностей участка белка MSP1. Образцы из Кыргызстана: KyrgJalB1, PKyrgJal11, KyrgJalP16 - образцы больных из г. Ташкомур, KyrgBisA11, KyrgBisA4 – образцы больных из города Бишкек, KyrgBatB-79, KyrgBatB-90 – образцы больных из Баткенского вилоята. Td – образцы крови больных из Хатлонского вилоята Таджикистана

Другая эпидемическая ситуация сложилась в Баткенском вилояте Республикии Кыргызстан, где был выявлен промежуточный уровень генетической гетерогенности возбудителей трехдневной малярии (рисунок 5.3.2): образцы KyrgBatB79 и KyrgBatB90. На севере указанная область граничит с

Республикой Узбекистан, на юге - с Республикой Таджикистан. Гомология последовательностей изолятов из Баткенского вилоята составляет 81%. Статистический и филогенетический анализ позволяют утверждать, что данный очаг был сформирован в результате заноса возбудителей, по крайней мере, из двух источников, поскольку возбудители из Баткенского вилоята попадают в два кластера. Изоляты *P. vivax* в первом кластере филогенетически близки к Таджикским изолятам, уровень их гомологии составляет в некоторых случаях 99%. Однако, в некоторых населенных пунктах Баткенской области выявляются возбудители, филогенетически далекие от возбудителей Таджикистана (образец KyrBat79). Более высокий уровень полиморфизма маркерной области генома возбудителей из Баткенского вилоята коррелирует с данными о более высоком, по сравнению с г. Ташкомур, уровне заболеваемости трехдневной малярией в этом регионе. Популяция *P. vivax* Хатлонского вилоята является наиболее гетерогенной, в ней обнаруживаются возбудители, филогенетически близкие к возбудителям из стран Юго-Восточной Азии.

В результате было установлено, что популяции возбудителей Кыргызстана состоят из различных изолятов *P. vivax*, что не может обеспечить селекцию возбудителей в очагах малярии. Низкий уровень генетической изменчивости даёт основание полагать, что паразитарные системы трёхдневной малярии в условиях эпизодических заносов возбудителей не являются адаптированными, что в значительной степени определяет невозможность укоренения малярии.

Таким образом, удалось подтвердить чрезвычайную важность результатов, полученных в популяционных обследованиях с помощью молекулярно-генетических методов, для эпидемиологического анализа и получения детальной характеристики истории формирования новых очагов малярии. Без использования методологии ПЦР-исследований в эпидемиологическом надзоре за малярией получение необходимых достоверных данных ретроспективного эпидемиологического анализа невозможно.

5.4. Проверка достоверности отсутствия больных малярией в оздоровленных очагах комплексом лабораторных методов диагностики

Наглядным примером эффективного использования комплекса лабораторных методов диагностики (микроскопической, иммунологической и молекулярной) в эпидемиологическом надзоре за малярией являются наши совместные исследования с Республиканским Центром тропических болезней Республики Таджикистан в последние годы [54].

Основным фактором распространения малярии в Республике Таджикистан является завоз инфекции и залёт заражённых малярийных комаров с сопредельной территории Исламского Государства Афганистан (ИГА). Тропическая малярия в Республике Таджикистан была элиминирована в 2008 г. В текущем 2016 г. предстоит изучение и подтверждение достижения элиминация трёхдневной малярии (*Plasmodium vivax*) на указанной территории. Значительное улучшение маляриологической ситуации в Республике Таджикистан также подтверждает резкое снижение числа завозных случаев трёхдневной малярии в Россию: только 2 – в 2011 г., 1 - в 2012 г., 1- в 2015 г., что было выявлено в результате эпидемиологического мониторинга, осуществляемого в Российской Федерации.

В соответствии с требованиями ВОЗ окончательным подтверждением диагноза малярии является обнаружение возбудителей при микроскопическом исследовании препаратов крови (толстая капля и тонкий мазок), которое принято называть «золотым стандартом». В качестве дополнительных методов применили иммунологические для выявления специфических антител в сыворотке крови больного (реакция иммуно-флуоресцирующих антител или экспресс-тесты) и молекулярные – для выявления ДНК паразита (полимеразная цепная реакция) [54]. Поскольку микроскопия препарата крови имеет ограничения, связанные с исходно низкой паразитемией при трёхдневной малярии после длительной инкубации, с недостаточной квалификацией персонала (дефекты приготовления

препарата крови), были применены методы паразитологической диагностики малярии, не зависящие от квалификации лаборанта-микроскописта.

Для лабораторного подтверждения случаев малярии были использованы экспресс-тесты, основанные на взаимодействии антигенов малярийного плазмодия с моноклональными антителами, нанесенными на тест. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) рекомендует применять эти тесты на любых территориях, где высокое качество микроскопии обеспечить невозможно. К достоинствам экспресс-метода относят быстрое получение ответа, относительно высокую специфичность, простое их использование, транспортировка и хранение, возможность проведения исследования без специальной подготовки и лабораторного оборудования. Это обусловлено необходимостью диагностики в определённых условиях (полевые, перебои подачи электроэнергии, отсутствие лаборатории или квалифицированных лаборантов), когда использование экспресс-тестов является методом выбора для быстрого определения возбудителей малярии в крови человека.

В периоде элиминации малярии в Республике Таджикистан, когда число случаев и очагов значительно уменьшилось, появилась необходимость популяционных исследований для проверки достоверности отсутствия источников инфекции в неактивных очагах, учитывая возможность восстановления и распространения малярии в южных районах, пограничных с ИГА [54].

Кроме того, была апробирована в полевых условиях реального эпидемиологического популяционного обследования разработанная нами в НИИМП и ТМ им. Е.И. Марциновского ПЦР-диагностика [52]. Как уже указывалось ПЦР-диагностика малярии имеет значительные преимущества в сравнении с микроскопической диагностикой не только по специфичности и чувствительности, но и по трудозатратам, особенно при массовых обследованиях. Так, микроскопия 100 препаратов крови требует для окончательного заключения, в среднем 16,5 часов, что соответствует работе трех микроскопистов в течение

рабочего дня. Использование ПЦР позволяет при наличии одного термоциклера выполнить эту работу одному человеку за один рабочий день.

При финансовой поддержке Глобального Фонда по борьбе со СПИД, туберкулёзом и малярией были приобретены экспресс-тесты CareStarttbMalaria HPR2/PLDH (*P.falciparum/P.vivax*) COMBOGO161 AccessBio. Исследования были проведены в 2012 г. в населенных пунктах Кумсангирского, Кабадиянского, Хатлонскоговилоятов и Вахдатского района Республиканского подчинения [54].

Молекулярная диагностика образцов крови из Республики Таджикистан проводилась нами в НИИМП и ТМ им. Е.И. Марциновского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Всего было исследовано 750 препаратов крови, выборочно взятых у жителей оздоровленных очагов малярии с целью проверки достоверности отсутствия местной передачи. Все исследования проводились по стандартным методикам, изложенным в главах 2 и 3 настоящей диссертации.

Для определения качества выделения ДНК проводили ПЦР с праймерами, гомологичными участку 15978-15997 и 16545-16526 мтДНК человека. Для идентификации возбудителей малярии рода *Plasmodium* проводили ПЦР двумя праймерами, описанными в главах 2 и 3 настоящей диссертации и специфичными к гену 18S РНК всех представителей этого рода. Для уточнения результатов эксперимента в ряде случаев проводилась амплификация образцов ДНК с праймерами VIV1 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' и VIV2 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3', специфичными к гену 18S РНК *P. vivax*, праймерами VDTO F 5'-ATG GAG GAC CTT TCA GAT GTA TTT GAC ATT-3' и VDFO R 5'-CTT GCT GTA AAC CAA AAA GTC CA-3', специфичными к фрагменту гена дегидрофолатдегидрогеназы.

В качестве положительного контроля применяли ДНК, которая используется в указанном качестве в работе Референс-центра по трансмиссивным паразитарным болезням на базе НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Всего было выделено и использовано 10 образцов положительного контроля ДНК. Результаты визуализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Иммунологические исследования были проведены с использованием экспресс-тестов CareStartbMalaria HPR2/PLDH (*P.falciparum/P.vivax*) COMBOGO161 AccessBio в населенных пунктах Кумсангирского, Кабадиянского, Дангаринского районов Хатлонского вилоята и Вахдатского района Республиканского подчинения.

В населенных пунктах Кумсангирского района было обследовано 2000 лиц разного возраста с помощью тестов и параллельно с микроскопией толстой капли крови [54]. В ходе проведенного нами исследования с помощью метода экспресс-тестов случаев обнаружения возбудителей малярии не было. Все препараты толстой капли крови были доставлены в паразитологическую лабораторию Центра по борьбе с тропическими болезнями Хатлонского вилоята, где проводилось микроскопическое исследование. 10% отрицательных препаратов повторно подвергали микроскопии в Референс-лаборатории Республиканского центра по борьбе с тропическими болезнями (РЦБТБ). Все результаты были отрицательными, т.е. идентичны результатам полевых исследований с применением экспресс-тестов [54].

В населённых пунктах Кабадиянского района было обследовано 2000 человек. Из общего числа обследованных лиц с помощью экспресс-метода только 1 дал положительный результат. Контрольная микроскопия препаратов крови в паразитологической лаборатории РЦБТБ не подтвердила наличие паразитов в препаратах крови.

В 2014 году было исследовано 750 образцов крови жителей оздоровленных очагов в районах Таджикистана с применением молекулярной диагностики – полимеразной цепной реакции (ПЦР) [155]. Для контроля выделения ДНК была проведена ПЦР с праймерами, специфичными к участку митохондриального генома человека. Положительный фрагмент специфического размера длиной около 500 п.н. был получен во всех изученных образцах, что доказывает хорошее качество выделенных препаратов ДНК. Продукты амплификации длиной около 1000 п.н., характерные для всех малярийных паразитов р. *Plasmodium*, в исследованных образцах получены не были. В ряде случаев в образцах

проводился дополнительный контрольный анализ с праймерами VIV1 и VIV 2, праймерами VDTOF и VDFOR. На электрофореграмме видно, что положительный контроль при амплификации с праймерами VIV1 и VIV2 имеет специфический фрагмент 120 п.н. Ни в одном из проведенных экспериментов не было обнаружено четкого положительного признака, подтверждающего наличие возбудителя малярии. 750 образцов крови жителей оздоровленных очагов в районах Таджикистана были исследованы с применением молекулярной диагностики – ПЦР и показали отсутствие малярийных паразитов. Достоверность отсутствия источников инфекции и местной передачи малярии через комаров была доказана при применении комплекса трёх методов: микроскопической, иммунологической и молекулярной диагностики.

Полученные нами результаты являются достаточными для подтверждения отсутствия местной передачи возбудителя трехдневной малярии на территории Республики Таджикистан в соответствии с требованиями ВОЗ по сертификации элиминации малярии.

5.5. Скрининг населения с применением ДНК-диагностики в очагах висцерального лейшманиоза в Папском районе Наманганской области Республики Узбекистан

Первые случаи заболевания висцеральным лейшманиозом (ВЛ) в Папском районе Наманганской области Республики Узбекистан были зарегистрированы еще в 1987 г., ранее в этих населенных пунктах случаи заболевания никогда не выявляли [26]. С 1987 по 2000 гг. число случаев колебалось от 0 до 5 случаев заболевания в год (всего 20 случаев). С 2001 г. наблюдается ежегодный рост случаев заболевания (всего 75 случаев). Кроме того, за последние 9 лет более чем в два раза выросло число очагов, где был зарегистрирован ВЛ (таблица 5.5.1) [26, 35].

Таблица 5.5.1

Распределение больных висцеральным лейшманиозом по очагам в Папском районе Наманганской области (1987-2009 гг.)

Наименование населенного пункта	Число больных		Всего	
	1987-2000 гг.	2001-2009 гг.	Число больных	Процент (%)
Чодак	8	35	43	45,3
Чоркесар	2	14	16	16,8
Олтинкан	7	6	13	13,7
Гулистан	3	1	4	4,2
Хонабад	-	4	4	4,2
Янгиобад	-	10	10	10,5
Маданият	-	2	2	2,1
Янгиер	-	2	2	2,1
Голиб	-	1	1	1,1
Всего	20	75	95	100

Наибольшее число новых случаев было отмечено в кишлаках Чодак – 43 (45,3%), Чоркесар – 16 (16,8%), Олтинкан – 13 (13,7%) и Янгиобад – 10 (10,5%).

В период наших исследований в Папском районе Наманганской области в 2007-2009 гг. было зарегистрировано 30 больных. Анализ выявленных случаев за 9 месяцев 2009 г. показал, что из 22 больных с подтвержденным диагнозом ВЛ, выявленных в Папском районе Наманганской области, в населенном пункте Чодак было зарегистрировано 4 больных, Чоркесар - 7, Янгиобад - 7, Хонабад - 2, Олтинкан - 1 и в Янгиер - 1. После санитарно-просветительной работы среди населения за медицинской помощью заболевшие жители стали обращаться в более ранние сроки, в основном, через 2-3 дня от начала клинических проявлений заболевания [35]. Такого раннего обращения медицинские работники ранее не отмечали. Основными жалобами при обращении были лихорадка и слабость. Однако только в двух случаях диагноз ВЛ был поставлен как первичный. Как правило, первоначальными диагнозами были ОРВИ или анемия, что говорит о недостаточной клинической настороженности и знаниях врачей в отношении ВЛ.

Среди обследованных методом ПЦР детей были выделены 4 группы.

Первую группу составили 4 ребенка с классическими симптомами ВЛ: лихорадкой и гепатоспленомегалией. Возраст двух больных девочек - 8 лет, одного мальчика – 1 год, другого мальчика – 2 года. У всех детей диагноз ВЛ был подтвержден обнаружением лейшманий в мазках костного мозга и положительной ПЦР. У 3-х из 4-х больных ВЛ посев материала костного мозга на питательную среду дал положительный результат. У 1 ребенка для исследования методом ПЦР были взяты 2 образца: пунктат костного мозга и кровь из пальца. В образце крови ДНК лейшмании не была обнаружена, а образец костного мозга дал положительный результат [24, 25, 26, 35].

Таким образом, было установлено, что при использовании ПЦР для диагностики ВЛ следует использовать не кровь, а пунктат костного мозга. Кровь следует исследовать только в том случае, когда получение препарата костного мозга невозможно. В таком случае надо стремиться исследовать не один, а несколько препаратов крови. Использование нескольких препаратов крови повышает вероятность обнаружения лейшманий. Однако чувствительность ПЦР-диагностики ВЛ по крови ниже, чем по костному мозгу. Вероятность постановки ПЦР-диагноза ВЛ существует только при высокой паразитемии [24, 25, 26, 35].

Вторая группа. Были обследованы 13 детей, переболевших ВЛ в прошлые годы. Во время болезни все дети прошли курс лечения глукантимом. На момент обследования дети выглядели здоровыми. Однако у 6 (46,2%) реакция ПЦР была положительная. Положительной была реакция не только у 3-х из 8 детей, выздоровевших менее года назад, но даже у детей, переболевших 2, 7 и даже 10 лет назад. Правда, в соответствующих группах детей было выявлено только по одному ПЦР-положительному переболевшему. Анализ возраста возникновения заболевания показал, что один ребенок перенес ВЛ в возрасте до года, 10 (76,9%) детей - в возрасте 1-3 года и по 1 ребенку в возрасте 7 и 12 лет [24, 25, 26, 35].

Среди переболевших были выявлены дети из одной семьи (2 сестры), проживающие в кишлаке Олтикан, которые перенесли заболевание в разные годы - 2000 и 2007 гг. соответственно. Старшая сестра заболела в возрасте 3 лет, а младшая – в возрасте двух лет. Временной интервал между этими случаями ВЛ

составил семь лет. На момент исследования обе переболевшие оставались ПЦР-положительными. Кроме этих двух сестер в этой семье было еще семь детей в возрасте от 2 до 11 лет, из которых было обследовано еще пять человек. Все обследованные дети оказались ПЦР-положительными, хотя в анамнезе у них отсутствовал клинически выраженный ВЛ [24, 25, 26, 35].

По данным некоторых авторов лейшмании после лечения исчезают не сразу. В пунктате селезенки, лимфатических узлов и подвздошной кости у 6,1% вылеченных больных могут быть паразиты сразу после курса лечения. Через 1,5-2 года после лечения лейшмании обнаруживали у 3,5% больных [67]. По данным наших исследований ДНК паразитов может сохраняться в периферической крови до 10 лет после лечения [24, 25, 26, 35]. В этом случае нельзя исключить повторные заражения, которые поддерживали ПЦР-положительный статус таких лиц. Гипотезу о повторном инфицировании людей ВЛ выдвигал ряд авторов. Однако до настоящего времени прямые доказательства этого предположения отсутствуют.

Третья группа - дети, находящиеся на лечении в больницах с различными диагнозами: 27 детей с диагнозами: ОРВИ, ОКИ, сепсис, ревматизм, пиелонефрит, анемия, отит, гепатит, лихорадка неясной этиологии. Из них 20 находились на лечении в больнице Чоркесара – жители этого кишлака, а 7 – в больнице Олтинкана: 3 человека из Чодака, 1- из Хонабада, 1 – из Гулистана, 2 – из Олтинкана. У 18 пациентов исследовали кровь, взятую из пальца, у 9 – кровь из вены. И те, и другие образцы оказались ПЦР-положительными. ПЦР-положительная реакция на ВЛ была обнаружена у больных с диагнозом ОРВИ, анемия, анемия+пиелонефрит, пиелонефрит и ОКИ (таблица 5.5.2). Следует сказать, что такие болезни, как ОРВИ и анемия, имеют ряд общих симптомов с ВЛ [24, 25, 26, 35].

Возбудитель ВЛ обладает иммунно-супрессивным действием, т.е. может создавать благоприятные условия для заражения, развития и более тяжелого клинического течения сопутствующей инфекции. Известно, что у ВИЧ-

инфицированных людей, проживающих в очагах лейшманиоза, случаи ВЛ участились. Поэтому можно допустить, что у исследованных нами детей, госпитализированных в больницах Олтинкана и Чоркесара, течение основного заболевания протекало тяжело на фоне заражения возбудителем ВЛ. С другой стороны, ВЛ без специфического этиотропного лечения привел к высокой лейшманиальной паразитемии, что и предопределило положительную ПЦР-диагностику по крови.

Таблица 5.5.2

Результаты исследования крови на наличие ДНК *L. infantum* у детей, находящихся в больницах с различными диагнозами, 2008 г.

Диагноз	Всего исследовано	Клинический материал			
		ПК*	ПЦР+ из них	ВК**	ПЦР+ из них
ОРВИ	8	6	4	2	1
Анемия	7	6	2	1	0
Анемия+пиелонефрит	2	0	0	2	1
Пиелонефрит	2	0	0	2	1
ОКИ	1	1	1	0	0
Ревматизм	2	0	0	2	0
Отит	2	2	0	0	0
Ранний сепсис	1	1	0	0	0
Вирусный гепатит	1	1	0	0	0
Лихорадка	1	1	0	0	0
Всего	27	18	7	9	3

Примечания. ПК* - периферическая кровь (из пальца); ВК** - венозная кровь

Четвёртая группа практически здоровых детей насчитывала 190 человек. На момент обследования все дети этой группы чувствовали себя хорошо, у них не было симптомов каких-либо заболеваний [24, 25, 26, 35]. Среди детей этой группы оказалось 85 (44,7%) ПЦР-положительных. Распределение ПЦР-положительных детей среди практически здоровых по 5 населенным пунктам показано в таблице 5.5.3.

Таблица 5.5.3

Обследование детей методом ПЦР на наличие возбудителя ВЛ

Кишлак	Число обследованных	ПЦР-положительные	ПЦР-отрицательные
Чодак	51	24 (47,1% ± 2,1%)	27
Гулистан	36	11 (30,6% ± 2,1%)	25
Олтинкан	75	38 (50,7% ± 2,1%)	37
Чоркесар	5	2 (66,7% ± 2,1%)	3
Хонобад	23	10 (43,5% ± 2,1%)	13
Итого	190	85 (44,7%)	105 (55,3%)

Анализ повозрастного распределения ПЦР-положительных среди обследованных здоровых детей показывает, что во всех возрастных группах доля ПЦР-положительных была высока. Однако в группе детей в возрасте 0-3 лет, наиболее подверженной риску заражения, ПЦР-положительных было несколько меньше, чем в группах 4-7 и 8-15 лет (таблица 5.5.4).

Одним из возможных объяснений меньшего числа бессимптомных носителей среди обследованных практически здоровых детей младших возрастов может быть то обстоятельство, что среди таких детей чаще развивается клинически выраженный ВЛ, чем среди детей более старших возрастов [24, 25, 26, 35].

Таблица 5.5.4

**Распределение результатов ПЦР анализа на наличие возбудителя
ВЛ по возрастным группам**

Возрастная группа	Всего	ПЦР +	ПЦР -
0-3 года	43	16 (37,2%)	27
4-7 лет	66	33 (50,0%)	33
8-15 лет	81	36 (44,4%)	45
Всего	190	85 (44,7%)	105

Следует отметить, что из 85 детей среди 190 практически здоровых, у которых обнаружена ДНК *L. infantum*, иммунный ответ методом ИФА установлен лишь у 4 (4,7%) [24, 25, 26, 35]. Поэтому вторым объяснением меньшего числа ПЦР-положительных среди детей младших возрастов может быть тот факт, что у некоторых детей, особенно младших возрастных групп, иммунный ответ на внедрение возбудителя не развивается или имеются лица с низким уровнем образования антител. Однако в этом случае нельзя исключить, что таких детей обследовали ПЦР на ранних этапах развития инфекции ещё до развития IgG.

Следует отметить два момента: использованная нами модификация ПЦР обнаруживает ДНК *L. infantum*, но не распознает ее жизнеспособность. Известно, что ДНК сохраняется достаточно продолжительное время. Из 18 доноров крови, проживающих в эндемичных областях, у которых обнаружена ДНК *L. infantum*, при обследовании через год положительный результат сохранился у 9 человек, при этом клинических проявлений заболевания за все время исследования не обнаружено. Наблюдения за здоровыми, но ПЦР-положительными детьми, свидетельствуют, что никто не заболел лейшманиозом в течение последующего (второго) года наших исследований [24, 25, 26, 35].

Считается, что болезнь у детей протекает в острой форме, симптомы болезни и осложнения нередко нарастают стремительно. Бессимптомное носительство чаще отмечали у взрослых. Такое положение обычно объясняют особенностями иммунитета: незрелого, не способного противостоять паразитам -

у детей и компетентного, способного защитить от лейшманиоза - у здоровых взрослых. Полученные результаты заставляют усомниться, что у детей болезнь всегда протекает остро и свидетельствуют, что бессимптомное носительство возможно у детей всех возрастных групп, в том числе и младших.

Среди обследованных 104 мальчиков и 86 девочек значительное преобладание ПЦР-положительных было среди девочек – 59,3% против 32,7% у мальчиков. Эти различия статистически достоверны ($\chi^2=13,48$; $p<0,001$). Выявленные различия между девочками и мальчиками среди ПЦР-положительных возможно определяются различной степенью контакта детей с москитами [24, 25, 26, 35]. По каким-то причинам в обследованных населенных пунктах москиты нападали на девочек активнее, чем на мальчиков. Это нельзя объяснить особенностями одежды, т.к. девочки в сельской местности Узбекистана носят более закрытую одежду. Одним из объяснений может быть предположение, что девочки проводят больше времени в доме, где на них нападает *P. longiductus* - классический эндофил и очень агрессивный в отношении человека вид москита, а мальчики больше времени проводят на улице и более подвижны. Но это предположение требует дальнейшего изучения.

ПЦР-положительные дети были обнаружены как в семьях, где были собаки, так и там, где собак не было. При этом число ПЦР-положительных детей было практически одинаковым (таблица 5.5.5).

Таблица 5.5.5

Распределение результатов ПЦР в зависимости от наличия собак в семье

Собака живет во дворе		Собаки нет	
ПЦР-положительные дети	ПЦР-отрицательные дети	ПЦР-положительные дети	ПЦР-отрицательные дети
43	50	42	55

Присутствие собаки в непосредственной близости от детей не сказывалось на возможности заражения ВЛ ($\chi^2=0,0002$; $p=0,99$). Такой неожиданный вывод,

по-видимому, можно объяснить очень высокой численностью собак в целом в обследованных населенных пунктах, а также близким расположением соседних домов, в том числе тех, в которых были собаки, что определяло возможность разлета зараженных москитов – переносчиков между усадьбами с собаками и домовладениями, в которых животные отсутствовали [24, 25, 26, 35].

5.6. Результаты скрининга носителей бластоцист

Скрининг на носительство бластоцист был проведен среди контингентов медицинских работников Клинического центра Первого МГМУ им.И.М.Сеченова, проходивших периодическое плановое профилактическое обследование на отсутствие кишечных инфекций в Клинико-диагностическом центре Университета. Эту группу мы обозначили как «декретированные контингенты» (всего 337 человек). При микроскопическом исследовании фекалий у 31-ого (9,2%) обследованного в клиническом материале были выявлены бластоцисты в количестве от 10 до нескольких десятков в одном поле зрения (3-я группа). Значительно реже были обнаружены другие простейшие: *E. coli* – у 6 человек (1,5%), *D. fragilis* – у 4 человек (1,2%) (рисунок 5.6.1). При посеве образцов кала на питательные среды патогенная бактериальная флора в группе «декретированных» не выявлена.

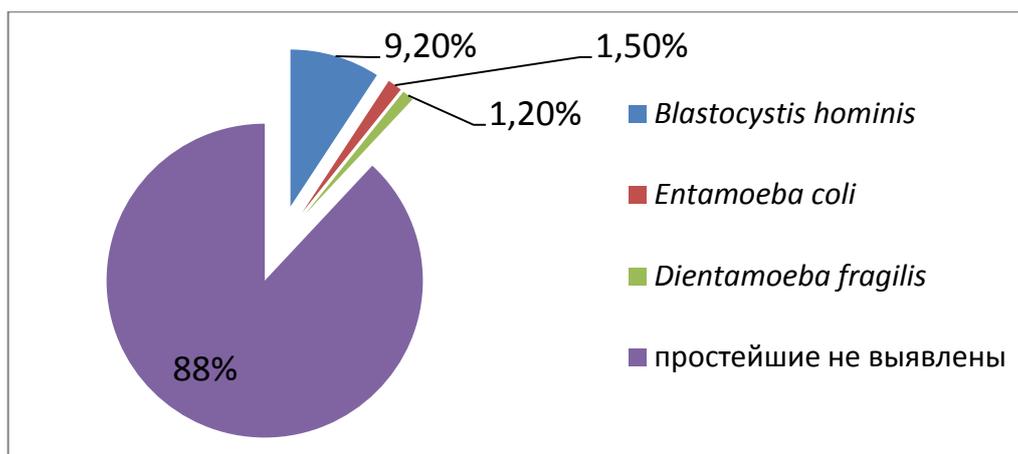


Рисунок 5.6.1. Результаты выявления простейших в кале пациентов при профилактических осмотрах

Среди 31 выделителя бластоцист женщины составили подавляющее большинство - 93%. Эту особенность можно объяснить высоким риском заражения сотрудников клиники акушерства и гинекологии им. В.Ф.Снегирева Первого МГМУ им. И.М.Сеченова, которые составили «декретированный» контингент в этом исследовании. Возраст выявленных носителей бластоцист варьировал от 18 до 63 лет. Возрастная структура характеризовалась преобладанием лиц от 50 до 59 лет (рисунок 5.6.2), что может быть связано с увеличением числа хронических заболеваний в этом возрастном периоде.

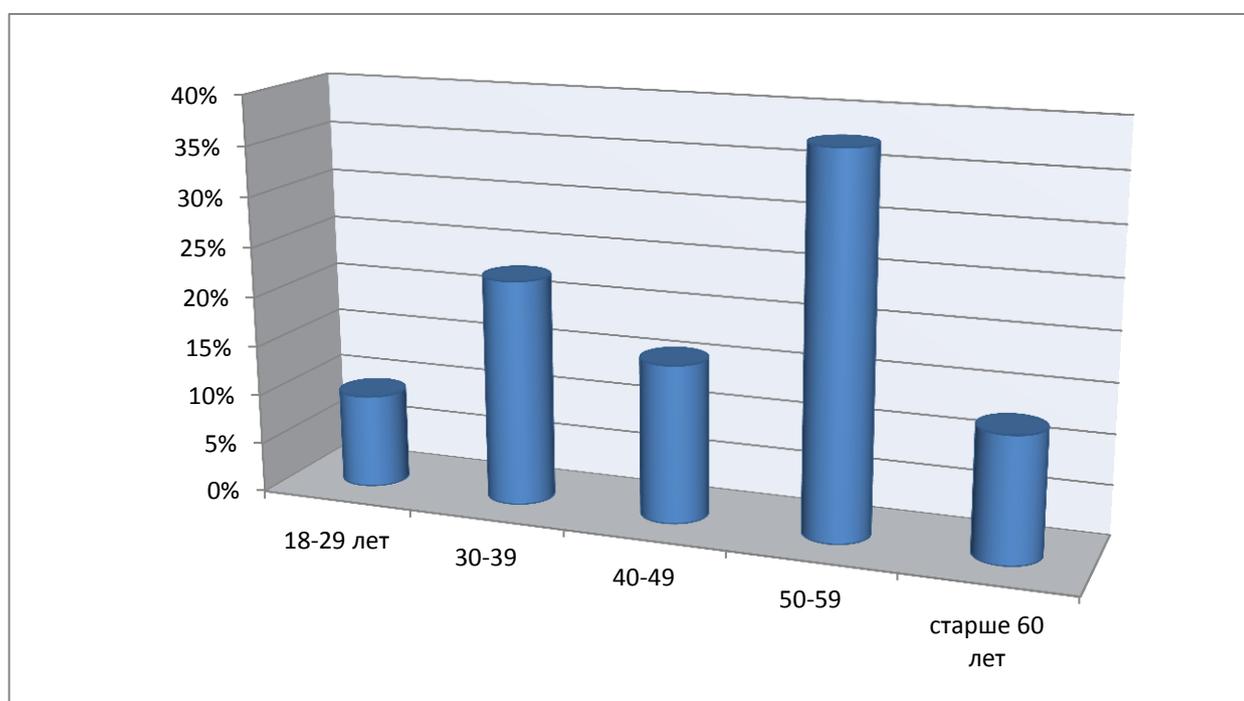


Рисунок 5.6.2. Распределение по возрасту пациентов – носителей бластоцистога

В результате обследования 337 пациентов (декретированные контингенты), у 240 (71,2%) не выявлено никаких болезней, а у остальных 97 (28,8%) были выявлены различные хронические заболевания (таблица 5.6.1).

Среди носителей бластоцист, достоверно чаще ($p < 0,05$) определялись сопутствующие заболевания (в $67,7 \pm 8,4\%$), что можно расценить как проявление патогенных свойств самих бластоцист, способствовавших развитию другой

патологии, или как результат наличия патологии непаразитарной природы, создававшей благоприятные условия для более частого инвазирования кишечника *Blastocystis spp.* (рисунок 5.6.3).

Таблица 5.6.1

Выявляемость сопутствующих заболеваний у декретированных контингентов

Сопутствующие заболевания	Общее число обследованных, n=337		Число лиц, носителей бластоцист, n=31	
	Абсолютное число	%	Абсолютное число	%
Лица, не имеющие сопутствующих заболеваний	240	71,2±2,5	10	32,3±8,4
Лица с сопутствующими заболеваниями	97	28,8±2,5	21	67,7±8,4
Всего	337	100	31	100

У двух третей (67,7±8,4%), выявленных нами носителей бластоцист была обнаружена сопутствующая патология (21 человек), а именно: девять человек (29,1±8,2%) имели различные заболевания желудочно-кишечного тракта, семь человек (22,6±7,5%) – аллергозы, два человека (6,5±4,4%) – сахарный диабет. Патологию пищеварительного тракта и аллергические проявления можно связать с клиникой, вызванной самими бластоцистами. У оставшихся десяти 10 человек (32,3±8,4 %) сопутствующих заболеваний выявлено не было.

Таким образом, в наших исследованиях было показано, что при хронических заболеваниях органов пищеварения бластоцисты обнаруживаются значительно чаще. Следует отметить, что наиболее высокие показатели инфицированности данными простейшими установлены при хроническом холецистите - 16,1±6,6%, при бронхиальной астме - 12,9±6%, что может свидетельствовать о влиянии патологии гепатобилиарной системы на развитие

бластоцистной инвазии, и позволяет рассматривать данных простейших как этиопатогенетический ко-фактор развития этих заболеваний.

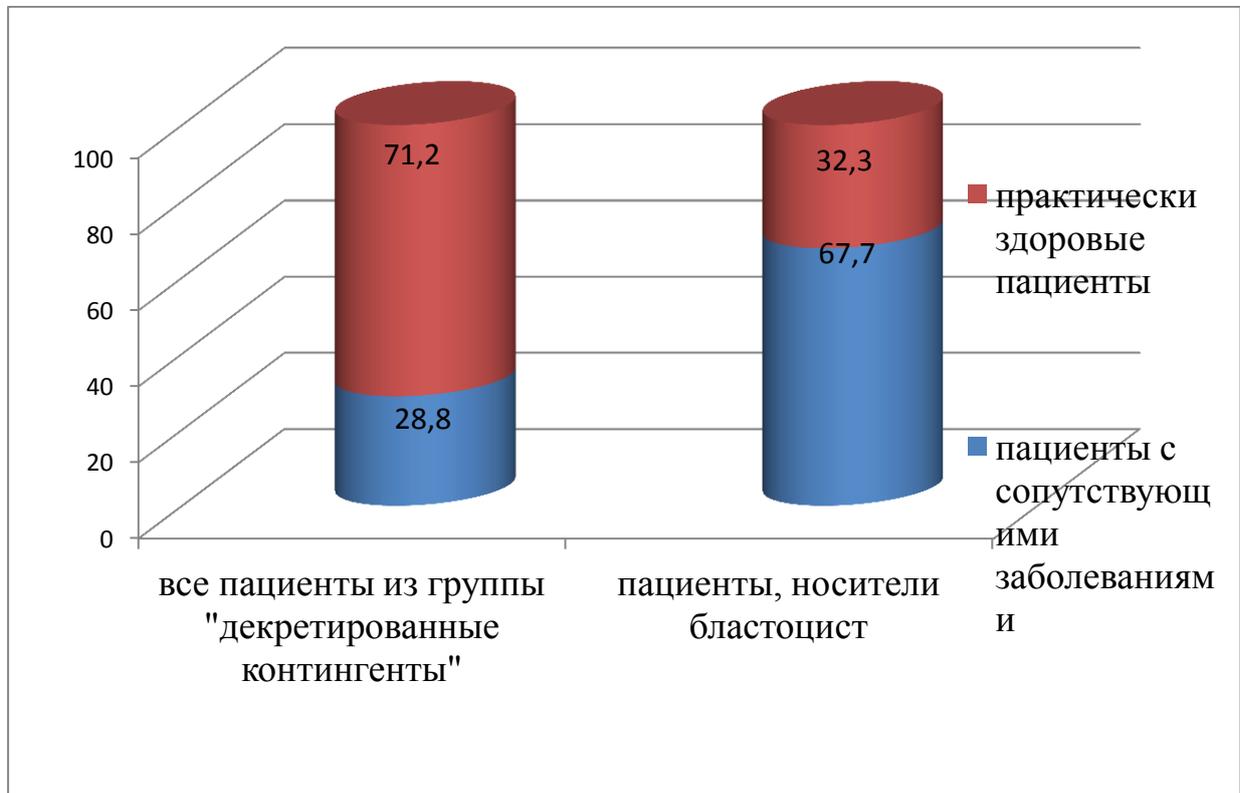


Рисунок 5.6.3. Доля хронических заболеваний у пациентов – носителей бластоцист

В результате сбора анамнеза и осмотра 31 пациента с установленным наличием *B.hominis* были выявлены следующие клинические проявления (таблица 5.6.2).

Клинические проявления бластоцист у пациентов

Клинические проявления	Число обследованных, группа 3 (n=31)	
	абс.	%
Диспепсические явления	17	54,8±8,9
Аллергический синдром	9	29,1±8,2
Астено-невротические	2	6,5±4,4
Отсутствие жалоб	3	9,7±5,3

При этом жалобы на периодически возникающую тошноту, преимущественно по утрам, боли в животе различной локализации, метеоризм предъявляли 17 человек (54,8±8,9%). При осмотре полиморфные высыпания на коже, трещины, сухость кожи, кожный зуд отмечали девять человек (29,1±8,2%). Два человека (6,5±4,4%) жаловались на общую слабость, головокружение, утомляемость. Нередко регистрировалось несколько синдромов у одного и того же пациента [56, 103, 104, 105].

Только три пациента (9,7±5,3%), которые выделяли бластоцист, никаких жалоб не предъявляли. Именно этих лиц можно с полным основанием считать истинными бессимптомными носителя бластоцист.

При сборе анамнеза у выявленных нами выделителей бластоцист – 80% лиц отмечали регулярное употребление некипяченой воды. Из всех пациентов, у которых выделили бластоцист, 19 человек (61,3±8,7%) отмечали склонность к частому кашицеобразному (2-3 раза в день) или неустойчивому (чередование запоров с поносами) стулу. Жалоб на жидкий стул ни у одного пациента не было [56, 103, 104, 105].

При сравнении способов детекции бластоцист в кале микроскопическим методом и ПЦР при использовании праймеров Bh1 совпадение положительных результатов отмечено в 88,8% – 32 положительные пробы в ПЦР с праймером Bh1

среди 36 положительных проб, подтвержденных микроскопически; и 94,4% при использовании праймеров Bh2 – 34 положительные пробы в ПЦР с праймером Bh2 среди 36 положительных проб, подтвержденных микроскопически) (таблица 5.6.3.).

Таблица 5.6.3

Сравнение эффективности различных наборов праймеров для диагностики бластоцистоа у больных

Результаты обследования 77 пациентов микроскопическим методом	Результаты ПЦР, применение праймеров Bh1				Результаты ПЦР, применение праймеров Bh2			
	положительные		отрицательные		положительные		отрицательные	
Положительные, n=36 (100%)	32	88,8%	4	11,2%	34	94,4%	2	5,6%
Отрицательные, n=41 (100%)	3	7,3%	38	92,7%	9	21,9%	32	78,1%

Из таблицы следует, что при исследовании микроскопически отрицательных проб методом ПЦР с использованием праймеров Bh1 у 3 пациентов (7,3%) был получен положительный результат. При использовании праймеров Bh2 в группе пациентов с микроскопически отрицательными результатами, амплификационный метод позволил обнаружить нуклеотидные последовательности ДНК бластоцист в 21,9% случаев (9 пациентов). При этом следует отметить, что все положительные результаты, полученные с использованием праймеров Bh1 при исследовании микроскопически отрицательных проб, были также положительными при проведении ПЦР с праймерами Bh2 [56, 103, 104, 105].

Полученные нами данные свидетельствуют о высокой степени совпадения результатов метода ПЦР с использованием праймеров Bh1 и Bh2 и микроскопической индикации, что свидетельствует о высокой чувствительности идентификации ДНК бластоцист в пробах кала.

Отрицательные результаты ПЦР в пробах с заведомым содержанием бластоцист, полученные в четырех пробах (11,2%) при использовании праймеров

Vh1 и в двух пробах (5,6%) при использовании праймеров Vh2, возможно обусловлены техническими ошибками в методике постановки реакции, результатом чего, вероятнее всего, явилось попадание в рабочий раствор ингибирующих примесей. Несмотря на это, результаты проведенных исследований демонстрируют, что два метода – микроскопический и молекулярно-биологический, при комплексном использовании увеличивают выявляемость бластоцист, то есть повышают эффективность диагностики этого протозооза.

Более высокая «пропускная» способность метода ДНК-диагностики делает его предпочтительным при массовых обследованиях различных контингентов населения на наличие возбудителей паразитарных болезней – патогенных простейших и гельминтов.

Глава 6. ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ПАРАЗИТОЗАМИ

Как показали практические испытания созданных нами ПЦР-диагностикумов применение молекулярно-биологических методов в эпиднадзоре за паразитарными болезнями возможно при работе в стационарных условиях для:

- рутинной диагностики паразитарных болезней, например, при массовых обследованиях, или в сложных для традиционных методов диагностики случаях
- оперативного определения степени контаминации окружающей среды паразитарными объектами патогенными для человека и оценки уровня биологической опасности этих объектов
- определения наличия лекарственной устойчивости паразитов и возможности выбора оптимальной тактики лечения (сохранение возбудителя на фоне стандартной этиотропной терапии служит признаком появления резистентности патогена к используемому лекарственному препарату)
- верификации изменения ареалов паразитарных болезней, более широкое распространение которых, можно предполагать на основании результатов изучения изменения климата, полученных современными компьютерными картографическими методами – географическими информационными системами (ГИС)

Расширение спектра диагностических методов за счет увеличения доли ПЦР в рутинной диагностике паразитарных болезней позволяет оптимизировать лабораторную диагностику, улучшить дифференциальную диагностику в сложных случаях и при микст-инфекциях/инвазиях, а также снизить трудозатраты при массовых обследованиях. Это достигается за счет более высокой по сравнению с другими методами чувствительностью, специфичностью и более низкой зависимостью от квалификации персонала, то есть от так называемого «человеческого фактора».

Быстрое обнаружение присутствия маркеров лекарственной устойчивости малярийных паразитов у больного молекулярными методами позволяет сократить число смертельных случаев от этой инфекции за счет оперативного изменения тактики лечения. Это особенно важно в условиях выявления исключительно завозных случаев потенциально летальной тропической малярии на территории Российской Федерации.

Другой важной сферой использования молекулярно-биологической индикации и идентификации в области диагностики малярии является раннее обнаружение у больных возбудителей трехдневной малярии типа Чессон. Этим штаммам *P.vivax* свойственна продукция большого числа ближних рецидивов и относительно меньшая податливость традиционной противомаларийной терапии, что требует корректировки стандартных протоколов специфической противомаларийной терапии у таких больных.

Выявление завозных больных трехдневной малярии типа Чессон и доказательство эпидемиологической роли штаммов типа Чессон в развитии у них малярийной инфекции позволит своевременно скорректировать тактику лечения таких пациентов и сократить число неизбежных повторных обращений за квалифицированной медицинской помощью.

Значительные возможности представляются при комбинировании молекулярных методов с методами медицинской географии. При наложении данных, полученных с помощью молекулярно-паразитологических методов на цифровые тематические карты ГИС можно отслеживать изменения ареалов распространения различных видов и штаммов возбудителей паразитарных болезней, а также их переносчиков. Особое значение это имеет при мониторинге распространения паразитарных и тропических заболеваний на новые территории, как следствие соответствующих климатических изменений. Точность и адекватность компьютерных карт ареалов паразитарных болезней и их переносчиков радикально увеличивается, если для их построения использовать данные, подтвержденные молекулярно-биологическими методами.

Применение ПЦР при амебиазе не ограничивается исследованием тканей и жидкостей организма. Перспективным является использование ПЦР для дифференциации амебных ДНК, выявляемых при исследовании фекалий лиц, выделяющих амебные трофозоиты и/или цисты *E.histolytica*, *E.dispar* и *E.moshkovskii*, различить которые микроскопически (копроскопически) невозможно.

6.1. Мобильная паразитологическая лаборатория

В настоящее время ПЦР-диагностика – это удел крупных лечебно-профилактических учреждений системы Министерства здравоохранения Российской Федерации, некоторых частных лечебных центров и учреждений системы Роспотребнадзора. На периферии в первичном звене здравоохранения пока не существует материальных и кадровых ресурсов для рутинного использования возможностей ПЦР-диагностики.

В некоторых ситуациях, особенно при возникновении эпидемических осложнений, применение ПЦР может стать критической технологией в оперативном установлении этиологической причины эпидемической вспышки и непосредственном экстренном принятии оптимального управленческого решения по купированию эпидемического осложнения и не допущению дальнейшего распространения заболеваемости и увеличения числа больных.

Экономически обоснованным решением для работы в условиях отсутствия стационарных ПЦР-лабораторий в отдаленных районах нашей страны, может стать разработка и создание мобильных ПЦР лабораторий, оснащенных стандартным набором апробированного оборудования, смонтированного на базе доступных, выпускаемых промышленностью передвижных платформ на колесном или гусеничном ходу.

Указанный подход способен обеспечить повышение эффективности эпидемиологического надзора за паразитарными болезнями и укрепить возможности органов и учреждений Роспотребнадзора и Министерства здравоохранения России в области борьбы с паразитарной патологией на основе

повсеместного использования новых информационных телекоммуникационных технологий и инновационных диагностических систем.

В соответствии с этими задачами нами была создана и обоснована рабочая концепция мобильной ПЦР лаборатории для целей усиления профилактических и противоэпидемических мероприятий по сокращению социального и экономического ущерба от массовых и социально значимых паразитозов. В дальнейшем в содружестве и кооперации со специалистами ГАОУ ВПО «Московский физико-технический институт» (МФТИ) была разработана рабочая конструкторская документация мобильной паразитологической лаборатории на базе автобуса ПАЗ, серийно выпускающегося ОАО «Павловский автобус» [55]. Также был получен патент Российской Федерации № 2568516 «Мобильная паразитологическая лаборатория» (Приложение 2).

В предлагаемом нами совместно с инженерным корпусом МФТИ научно-конструкторским решением мобильная паразитологическая лаборатория оснащается исчерпывающим набором современного молекулярно-биологического, энтомологического и санитарно-паразитологического оборудования, преимущественно отечественного производства. Указанный набор призван обеспечить возможность комплексного выполнения оптимально необходимого набора экстренных лабораторных и диагностических исследований, необходимых для принятия оперативных управленческих решений по купированию неблагоприятной эпидемической ситуации на основе полученных достоверных данных об этиологической причине вспышки и основных задействованных факторах передачи возбудителя паразитарной болезни, приведшей к возникновению эпидемической вспышки.

В лаборатории предусмотрены рабочие места микроскописта, молекулярного паразитолога и энтомолога (рисунок 6.1.1.). Также лаборатория будет оснащена компьютерным оборудованием с подключением к системе спутниковой навигации GPS/ГЛОНАСС, что обеспечит оптимизацию сбора, хранения, обработки, доступа, отображения и распространения пространственно-координированных данных, которые будут использоваться для оперативной связи

с федеральными и региональными центрами индикации и идентификации патогенов, проведения обобщенного компьютерного анализа и решения научных и прикладных задач, мониторинга, поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия и оптимизации профилактики населения по социально значимым паразитозам в интересах обеспечения биологической безопасности нашей страны.

Конструктивно мобильная лаборатория состоит из двух отсеков: кабина водителя и лабораторный (рабочий) отсек, - между которыми располагается перегородка (Приложение 1). При этом лаборатория оборудована системами, обеспечивающими комфортные условия для проведения запланированных работ.



Рисунок 6.1.1. 3D модель мобильной паразитологической лаборатории.

В соответствии с предложенной рабочей конструкторской документацией мобильная паразитологическая лаборатория оборудуется всеми необходимыми системами обеспечения соблюдения всех требований противоэпидемического режима, регламентированного для стационарных лабораторий подобного класса, а также системами жизнеобеспечения, призванными создать комфортные гигиенические условия для проведения запланированных работ. В мобильной паразитологической лаборатории монтируются и функционируют:

1. система отопления;
2. система кондиционирования воздуха;
3. система освещения;
4. система энергообеспечения отсеков лаборатории, оборудования и приборов.

В лабораторном отсеке предусмотрены монтаж и установка следующего технологического оборудования для выполнения необходимых исследований:

1. Комплект оборудования для проведения ПЦР в реальном времени
2. Микроскоп с фотоприставкой, состоящей из насадки с малошумящей матрицей ПЗС, модуля первичной аппаратной видеобработки и специализированного ПО для автоматического анализа видеоизображения.
3. Три независимых беспроводных 3G модема с маршрутизатором для гарантированного доступа в интернет
4. Компьютерное оборудование со стандартным набором операционных программ и специфическим программным обеспечением для выполнения медико-географических задач на основе использования GIS-технологий.

Специальное конструкторское решение призвано обеспечить повышенную прочность корпуса автобуса, в котором размещается мобильная паразитологическая лаборатория. Крыша кузова должна быть дополнительно снабжена сварным каркасом, боковые стенки, крыша соединены между собой неразъемным соединением, салон кузова-фургона исполнен герметично. Промежуток между наружной и внутренней обшивками стенок, потолка и дверей

кузова автобуса должен быть заполнен соответственно герметиком, фанерной плитой и термошумоизоляционным материалом. Внутренняя обшивка стенок и потолочной части рабочего помещения должна быть выполнена из пластика, устойчивого к дезинфектантам, пол рабочего помещения выполнен в виде уложенного на основание фургона соответственно утеплителя и кафельной плиты, или металлического профиля, выполненного из нержавеющей стали. Указанные поверхности обеспечивают проведение всего комплекса дезинфекционных работ в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими нормативами, правилами и указаниями. Внутреннее лабораторное помещение снабжено жестко закрепленным в каркасном основании боксом биологической безопасности III класса, снабженным системой вытяжной принудительной вентиляции с фильтрацией выбрасываемого воздуха через биологические фильтры. Вдоль стен салона закреплены рабочие столы-тумбы, в которых размещены приборы для отбора проб воды и воздуха, диагностическое оборудование для проведения молекулярно-генетических, иммуносерологических диагностических исследований, на одном из столов жестко закреплен ПЦР-бокс [55, 100].

Над столами крепятся светильники, выключатели, бактерицидный облучатель и два навесных шкафа для хранения соответственно чистой и необеззараженной защитной одежды, между столом и боксом биологической безопасности размещена универсальная укладка для забора материала/проб от людей и из окружающей среды, кроме того, на внешней стороне фургона над дверью закреплены сигнальные цветные фонари оповещения. В кабине водителя на передней панели установлен блок управления спутниковой связью, и дополнительно к входной двери предусмотрен разборный тамбур и лестница [55, 100].

Система жизнеобеспечения экипажа включает в себя санитарно-гигиенический блок, образованный душем и биотуалетом, блок вентиляции, блок кондиционирования и дезинфекции воздуха, блок отопления, блок водоснабжения с запасами питьевой и технической воды, блок обеспечения пожаробезопасности

и блок предотвращения несанкционированного проникновения в перемещаемое здание [55, 100].

Выбор в качестве базового транспортного средства грузопассажирского автобуса Павловского автобусного завода обусловлен следующими его преимуществами:

- Оптимальные размеры (возможность перемещения в необходимый регион авиатранспортом);
- Высокая проходимость (в полноприводной версии), что имеет особое значение в отдаленных районах Азиатской части России, а также севера Европейской части;
- Возможность ремонта и доступность запчастей на всей территории Российской Федерации;
- Оптимальное соотношение цены и качества.

Возможно изменение комплектации лаборатории за счёт замены ПЦР оборудования на оборудование для иммуноферментного анализа для регионов, где краевая патология представлена возбудителями, для которых использование ПЦР-диагностики не является оптимальным (описторхоз, трихинеллез и пр.) [9].

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОРУДОВАНИЯ МОБИЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Таблица 6.1.1

Список оборудования мобильной лаборатории

№	Наименование	Кол-во
1	2	3
1	Микроскоп с фотоприставкой, подключенной к компьютеру	1
2	Комплект оборудования для проведения ПЦР в реальном времени	1

1	2	3
3	Комплект оборудования для выделения нуклеиновых кислот из биоматериала	1
4	Ноутбук	2
5	GPS/Глонасс модуль с внешней антенной	1
6	GSM/3G/LTE модуль с внешней антенной	1
7	ИБП с комплектом салазок для установки в стойку	1
8	Преобразователь напряжения	4
9	Двухкамерный холодильник с объемной морозильной камерой	1
10	Бензогенератор	1
11.	Вычислительный модуль с операционной системой реального времени QNX 6.5.1 с модулем аппаратной первичной обработки видеопотока на базе ПЛИС Xilinx Virtex 7 (или аналога).	1

Система отопления и кондиционирования

Помещения ПЦР-лаборатории оборудуют приточно-вытяжной или вытяжной вентиляцией, соответствующей требованиям пп. 2.3.16. и 2.4.3. СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Внутреннее помещение снабжено жестко закрепленным в каркасном основании боксом биологической безопасности III класса, снабженным системой вытяжной принудительной вентиляции, при этом вход расположен на боковой поверхности бокса и снабжен ULPA фильтром, выход - через воздуховод выведен во внешнюю среду и снабжен вентилятором и двумя ULPA или HEPA фильтрами, или биологическими фильтрами с тканью Петрянова. Выходное отверстие ПЦР-бокса, жестко закрепленного на одном из столов снабжено вентилятором, двумя ULPA фильтрами и через воздуховод соединено с крышей. На внешней стороне автобуса над дверью закреплены сигнальные цветные фонари оповещения, по обе

стороны от которых расположены входное отверстие, снабженное вентилятором и ULPA или HEPA фильтрами, или биологическими фильтрами с тканью Петрянова и заслонкой.

При выполнении ПЦР воздухообмен внутри и между помещениями может повышать опасность контаминации проб из-за вероятности проникновения молекул нуклеиновых кислот и продуктов амплификации через фильтры. Снижение этой опасности достигается указанной ниже системой вентиляции лаборатории:

- следует полностью исключить воздухообмен между помещением для детекции продуктов амплификации (пост-ПЦР – помещение) и остальными объемами ПЦР-лаборатории, а также другими отсеками рабочей зоны лаборатории (давление воздуха в пост-ПЦР-помещении должно быть ниже, чем в указанных помещениях);

- при смежном расположении отсека приема материала и отсека выделения нуклеиновых кислот давление в последнем должно быть не ниже, чем в отсеке приема материала;

- если оба названных отсека, входящих в пре-ПЦР-помещение, имеют смежное расположение с отсеком для проведения ПЦР, давление воздуха в них должно быть ниже, чем в ПЦР-помещении; при отдаленном размещении ПЦР-помещения давление воздуха в нем должно быть не ниже, чем в пре-ПЦР-помещении.

- Разница в давлении воздуха в помещениях ПЦР-лаборатории создается за счет различий в кратности воздухообмена в них.

- При отсутствии системы вентиляции, указанной в пп. 5.18-5.19, уменьшение вероятности контаминации проб достигается мерами по ограничению воздухообмена между помещениями ПЦР-лаборатории.

- При необходимости в ПЦР-лаборатории могут быть установлены кондиционеры в соответствии с п. 2.4.5. СП 1.3. 1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

Мобильная лаборатория содержит входной санитарно-шлюзовой отсек,

отсек диагностики, образованный зоной выделения ДНК/РНК, зоной раскапывания реактивов для амплификации, а также зоной амплификации и детектирования, служебно-медицинский отсек, оснащенный рабочей станцией с монитором, сервером, маршрутизатором, коммутатором и телемедицинским терминалом, отсек для пациентов и приема проб и транспортный отсек, оснащенный средствами обеспечения его автономного функционирования, включающий систему энергоснабжения, систему жизнеобеспечения экипажа, систему связи с возможностью обеспечения режима видеоконференцсвязи.

Зона выделения ДНК/РНК оснащена, по крайней мере, одной микроцентрифугой, автоматическим дозатором с подставкой, ламинарным шкафом с биозащитой, термостатом, штативом для микропробирок и вакуумным отсасывателем, двумя термоциклерами, амплификатором и люминисцентным анализатором [55, 100].

В рабочих зонах должен быть свой набор холодильников:

- в отсеке приема материала от 4 до 8°C, минус 20°C и минус 70°C (при необходимости длительного хранения материала);
- в отсеке выделения нуклеиновых кислот от 4 до 8°C и минус 20°C для хранения набора выделения НК; от 4 до 8°C – для хранения препаратов НК; не допускается хранение проб материала или препаратов НК в одном холодильнике с компонентами набора для выделения НК;
- в отсеке ПЦР-амплификации от 4 до 8°C и минус 20°C – для хранения наборов обратной транскрипции и амплификации НК;
- в комнате детекции продуктов амплификации от 4 до 8°C – для хранения наборов электрофоретической детекции и ГиФА.

В качестве лабораторного холодильника используется Медицинский автомобильный холодильник объемом 140 л типа WAECO COOLFREEZE T0140 для перевозки чувствительных к температуре грузов. Рассчитан на напряжение 12/24 В постоянного тока и 110-240 В переменного тока.

Условия использования лаборатории могут широко отличаться как климатически, так и географически, поэтому оборудование, в том числе и

ноутбуки, должны быть работоспособны в любых погодных-климатических условиях.

Наиболее часто для таких жестких технических условий используют компьютеры Panasonic. Разработкой ноутбуков данной категории занимается компания Panasonic, которая самостоятельно осуществляет разработку и производство ноутбуков серии TOUGHBOOK.

Ноутбуки Panasonic широко применяются для автоматизации работ в полевых и промышленных условиях по всему миру: в армиях и службах силовых структур, предприятиях добывающего сектора, строительной отрасли, на транспорте, в машиностроении, автомобильной промышленности, геологии, биологии и т.д.

Однако мы не исключаем возможность оснащения мобильной паразитологической лаборатории компьютерным оборудованием других производителей, если оно отвечает всем заявляемым техническим и технологическим требованиям. В соответствии с разработанной нами в содружестве со специалистами Московского физико-технического института рабочей технической документацией для данной лаборатории предлагается использовать компьютер типа Panasonic Toughbook CF-53, который прошел испытания на защищенность в лаборатории Panasonic (9 различных тестов защищенности), выдерживает падение с высоты 76 см, клавиатура защищена от проливов жидкости.

В мобильной лаборатории предусмотрен монтаж локальной вычислительной компьютерной сети, с подключением к автоматизированной информационно-справочной системе, содержащей подсистему ведения электронных историй болезни и автоматизированной системы хранения и поиска данных лабораторных исследований.

Сеть включает в свой состав автоматизированное рабочее место врача-диагноста (биолога), выполненное конструктивно на базе карманного микрокомпьютера в виде носимого комплекта диагностики, содержащего микроинтегральную плату программного алгоритма, блок для применения

иммуноферментного, иммунофлуоресцентного анализа и блок амплификации нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции.

Локальная сеть содержит один сегмент, состоящий из проводной части и двух беспроводных радиосетей стандарта IEEE 802.11b/g/n/ac на частотах 2.4ГГц и 5ГГц. Сеть развернута на базе маршрутизатора ASUS RT-AC66R.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Начало XXI века характеризуется появлением новых для нашей страны потенциально опасных паразитарных болезней и инвазивных переносчиков, способных передавать экзотических для России возбудителей тропических арбовирусных лихорадок и возникновением лекарственной устойчивости у возбудителей ряда паразитарных болезней к лекарственным препаратам. Это приводит к значительному удорожанию лечения и борьбы с такими болезнями, с другой стороны диктует настоятельную необходимость создания и широкого использования новых более чувствительных, эффективных и экономичных методов диагностики. Одним из возможных путей решения этой важной социально-экономической проблемы должны стать разработка и внедрение в практику здравоохранения и Государственного санитарно-эпидемиологического надзора молекулярно-биологических методов индикации и экспресс-идентификации геномов эпидемически опасных паразитарных патогенов или их фрагментов непосредственно в клиническом материале без длительной стадии культивирования и получения чистых культур возбудителей. Оптимальным решением для сформулированных задач представляется разработка широкого спектра диагностикумов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Различные варианты исполнения ПЦР требуют разных трудозатрат и времени для получения конечного результата, поскольку необходимо использовать разное по набору и стоимости оборудование. Это предполагает, что в зависимости от конкретных целей на разных уровнях структуры практического здравоохранения и органов учреждений Государственного санитарно-эпидемиологического надзора, можно будет создавать оптимальные наборы оборудования для наиболее экономного оснащения соответствующих лабораторий или использования уже существующих в системе практического здравоохранения или Роспотребнадзора ПЦР-лабораторий.

Наибольшая потребность в новых методах молекулярной диагностики существует в области трансмиссивных паразитозов: малярии, лейшманиозов и дирофиляриозов. Это связано с тем, что ПЦР в этом случае будет использована не только как диагностический инструмент, но и как эффективная методология поиска генетических различий между штаммами (малярия), видами и подвидами (лейшманиозы), а также обнаружения паразитов в переносчике (диروفилариозы). В этих случаях ПЦР используется как предварительный метод перед применением прямого секвенирования или других молекулярно-генетических методов [56].

Применение ПЦР при диагностике малярии и лейшманиозов имеет особую ценность в условиях референс-центров, так как дает возможность накопления значительных количеств препаратов, присланных на контроль. При применении ПЦР в референс-центре используется методика выделения ДНК паразита из препаратов крови толстая капля, ранее окрашенных по Романовскому-Гимза, разработанная в НИИМПитМ им.Е.И.Марциновского [56]. Высокая чувствительность ПЦР дает большие преимущества для выявления скрытых источников инфекции с субклинической паразитемией, например, при расследовании случаев прививной малярии у реципиентов крови или среди наркоманов, а также для поиска источников инфекции в очагах с местной передачей при элиминации малярии. Кроме того, ПЦР позволяет легко выявить смешанную инфекцию, что вызывает определенные сложности микроскопическими методами, поскольку при микст-инфекции один из видов (*P.falciparum*) обычно превалирует и маскирует единичных паразитов другого вида.

Сформулированный подход чрезвычайно важен и для некоторых нозоформ нетрансмиссивных паразитозов, например, амебиоза. Быстрая и надежная дифференциация патогенной инвазивной *E.histolytica* от комменсалов *E.dispar* или *E.moshkovsky* невозможна на основе морфологических микроскопических исследований. Для осуществления дифференциальной диагностики подобного,

критически важного для постановки диагноза возбудителя и определения тактики лечения, необходимо использование молекулярно-биологических технологий.

Ограничения применения ПЦР при рутинной диагностике паразитозов связаны со сложным жизненным циклом паразитов, когда паразит на разных стадиях жизненного цикла изменяет свою локализацию в организме хозяина и невозможно определить, какой материал оптимально пригоден для исследования. Так, например, применение ПЦР диагностики у больных геогельминтозами нецелесообразно, поскольку микроскопия дает достаточно быстрый видоспецифический результат. Наши исследования показали, что применение ПЦР при геогельминтозах возможно при проведении санитарно-паразитологических исследований. В этом случае постановка ПЦР позволяет значительно сократить трудозатраты [56]. Для оптимизации ПЦР диагностики паразитозов нами были обобщены в виде таблицы данные о возможности применения различного клинического материала в качестве источника ДНК на разных стадиях развития паразитов в организме человека (Приложение 3).

Значительное сокращение трудозатрат при постановке ПЦР в сравнении с другими методами достигается только при массовых обследованиях так как время, необходимое для постановки 1 или 50 проб, отличается не более чем на 10%. Еще более значительного сокращения трудозатрат удастся добиться при применении ПЦР в реальном времени, поскольку при применении этого метода отсутствует стадия электрофореза, а длительность ПЦР сокращена до 1 часа. Таким образом, молекулярно биологические методы имеют значительные перспективы в паразитологии как в научных исследованиях, так и в практическом здравоохранении [56].

Обобщено указанное новое для медицинской паразитологии научное направление мы обозначили как «молекулярная паразитология». Подключение методологии молекулярной биологии и молекулярной медицины к изучению паразитарных болезней в перспективе должно привести к созданию принципиально новых способов диагностики, лечения и профилактики этой социально значимой патологии. Расшифровка молекулярных механизмов

взаимодействия паразита и хозяина позволит направленно конструировать инструменты управления патогенезом различных паразитозов и модулировать защитные системы организма хозяина. Уже сейчас начинают создаваться лекарственные препараты для «таргетной терапии» некоторых гельминтозов. Именно такой подход образно сформулировал лауреат Нобелевской премии Дж. Ледерберг, указав, что «в гонке за выживание с микробными генами нашим оружием должен стать человеческий разум, а не естественный отбор наших генов» [88].

Настоящая диссертация содержит результаты разработанной методологии мониторинга за социально значимыми паразитарными болезнями с использованием ПЦР-технологий в рамках сформулированной концепции «молекулярной паразитологии»

В области молекулярно-биологической диагностики трансмиссивных паразитозов была разработана оригинальная технология ПЦР-диагностики малярии на основе выделения ДНК из препарата крови «толстая капля». Определены оптимальные режимы постановки ПЦР-диагностики малярии. Предложен метод одноэтапной ПЦР с использованием флуоресцентной детекции в реальном времени. Доказано, что качество и сроки хранения препарата «толстая капля» не влияют на результаты ПЦР-диагностики.

Усовершенствована методика постановки ПЦР для диагностики висцерального лейшманиоза. Экспериментальным путем была установлена оптимальная температура отжига праймеров – 53⁰С и число циклов амплификации (40), обеспечивающих получение наибольшего количества ПЦР продукта.

Выбраны и синтезированы праймеры для диагностики *Dirofilaria repens* и *D.immitis*. Подобраны наиболее эффективные режимы амплификации для этих праймеров. Использование созданных нами ПЦР-диагностикумов дирофиляриоза доказало свою эффективность в диагностике подкожного дирофиляриоза человека. С использованием наших праймеров впервые в России удалось выявить заболевание человека системным дирофиляриозом, вызванным *D.immitis*.

Новым важным для задач эпидемиологического надзора за паразитарными болезнями стала разработка методологии определения уровня зараженности диروفилляриями переносчиков – комаров родов *Culex*, *Aedes* и *Anopheles* на основе постановки ПЦР.

С целью оптимизации мониторинга и экспресс диагностики нетрансмиссивных паразитозов были выбраны праймеры для обнаружения генома криптоспоридий и лямблий в клиническом материале, питьевой воде и объектах среды обитания человека. Показано, что для *Cryptosporidium parvum* оптимальной температурой отжига является 45⁰С, число циклов амплификации – 35. Соответствующие параметры для *Lambliа intestinalis* составили – 62⁰С и 45 циклов амплификации.

Праймеры для диагностики амебиаза подбирали по базам данных генетической информации Genbank с помощью компьютерной программы Blast о нуклеотидной последовательности генома *Entamoeba histolytica* и по материалам собственных клинических исследований. В результате были выбраны прямой и обратный праймеры. Экспериментальным путем было установлено, что для детекции паразитов *Entamoeba histolytica* оптимальной температурой отжига праймеров является 65⁰С, а увеличение количества продукта ПЦР достигается при 35 циклах амплификации.

Принципиально новые для науки данные были получены нами и другими сотрудниками НИИМП и ТМ им. Е.И. Марциновского в отношении патогенного простейшего *Blastocystis hominis*, до недавнего времени, считавшегося непатогенным. В этих исследованиях было показано, что *B.hominis* не только ассоциируется с патологией желудочно-кишечного тракта, но и может вызывать генерализованную патологию у иммунокомпрометированных субъектов. Во всех таких случаях диагноз бластоцистоза ставился на основании микроскопических и ПЦР исследований.

Для этого нами были выбраны и синтезированы праймеры для диагностики *B.hominis*. Подобраны наиболее эффективные режимы амплификации для этих праймеров.

Из 36 микроскопически подтвержденных лиц, выделявших бластоцист, у 32 наличие бластоцист в фекалиях было подтверждено в ПЦР с оригинальным набором праймеров Bh1 и у 34 – с оригинальным набором праймеров Bh2. Полученные результаты свидетельствуют о высокой степени совпадения результатов в ПЦР с обоими использованными праймерами и классических микроскопических исследованиях.

Использование созданного в НИИМПитМ ПЦР-диагностикума бластоцистоза доказало свою эффективность не только в диагностике больных, но и в процессе обследования декретированных контингентов. Выделители бластоцист составили около 9,2% среди 337 планово обследованных лиц, проходивших регулярный профилактический осмотр и обследование на наличие возбудителей кишечных инфекций («декретированные контингенты»). Среди лиц, выделяющих бластоцисты, достоверно чаще выявлялась сопутствующая кишечная патология, что можно расценить, как проявление патогенности бластоцист или повышенный риск инвазирования этими паразитами на фоне хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта. Только у трех выделителей бластоцист жалобы на состояние здоровья отсутствовали.

Наиболее высокие показатели инфицированности *B.hominiss* были установлены при хроническом холецистите – $16,1 \pm 6,6\%$, при бронхиальной астме – $12,9 \pm 6\%$, что позволяет рассматривать данных простейших как потенциальный этиопатогенетический ко-фактор развития этих заболеваний [105].

Не всё так однозначно оказалось с ПЦР-диагностикой такого массового и социально значимого паразитоза, как токсоплазмоз. В настоящее время в России выпускается несколько коммерческих тест-систем для ПЦР-диагностики токсоплазмоза. В качестве материала для исследования наставления к этим тест-системам предлагают исследовать кровь, амниотическую жидкость и слезную жидкость.

Токсоплазмы крайне редко присутствуют в кровеносной системе даже в период активных клинических проявлений. Тем более паразита нет в крови во время латентной стадии бессимптомного токсоплазмоза. Поэтому ни у одной из

150 обследованных нами женщин с серологически верифицированным диагнозом токсоплазмоз в пробах крови не было обнаружено фрагментов генома *Toxoplasma gondii* с помощью реакции ПЦР. 48 исследований было выполнено с помощью ПЦР в реальном времени [204].

Широкие перспективы применения молекулярных методов открываются при проведении массовых обследований населения для установления истинных уровней пораженности различных контингентов паразитами [56]. Для этих целей более целесообразным представлялось использование не моно-ПЦР-диагностикумов, а комплексных систем, позволяющих одновременно осуществлять ПЦР-диагностику важнейших, наиболее массовых для нашей страны кишечных протозоозов (лямблиоз, амебиаз, бластоцистоз, криптоспоририоз).

В процессе создания комплексной системы ПЦР-диагностики был составлен набор оптимальных праймеров к четырем основным возбудителям кишечных протозоозов в сочетании с выпускаемым отечественной микробиологической промышленностью набором реагентов для ПЦР (PCR-core). Следует отметить, что представленная комплексная система может использоваться в постановке классической ПЦР и легко адаптируется для ПЦР в реальном времени.

Практическая апробация созданных ПЦР-диагностикумов была осуществлена в серии полевых эпидемиологических исследований, выполненных в разных очагах паразитарных болезней.

Энтомологический мониторинг зараженности комаров-переносчиков дирофиляриями проводился в 2006-2011 гг. в ЦАО России. Зараженность комаров разных родов *D.repens* различалась незначительно – от 1,9% у *Aedes* до 3,3% у *Anopheles*. Для *D.immitis* эти показатели составили – от 0,8% у *Aedes*, до 1,3% у *Culex*. Этот патоген был обнаружен только у одной самки *Anopheles* за все время наблюдений.

Изучение пораженности населения малярией проводилось в 2006 г. в двух городах и трех сельских населенных пунктах Республики Кыргызстан. В

результате обследования 60 больных с клиническими признаками малярии, диагноз был верифицирован в ПЦР у всех. Одновременное обследование 157 здоровых членов семей больных малярией ни в одном случае не выявило присутствия фрагментов ДНК *P.vivax* в крови здоровых лиц.

Изучение молекулярно-генетической структуры популяций возбудителей трехдневной малярии в разных очагах Кыргызстана показало, что все возбудители связаны с периодически происходящим завозом штаммов из соседних Республик Таджикистана и Узбекистана. На территории Кыргызстана завозные штаммы циркулируют непродолжительное время, что в значительной степени определяет отсутствие укоренения инфекции в очагах.

С помощью ПЦР была проведена необходимая для Таджикистана проверка достоверности отсутствия местной передачи трехдневной малярии. Исследования были проведены в 2012-2014 гг. на территории четырех ранее эндемичных по малярии районов Республики Таджикистан. Кроме ПЦР-диагностики одновременно использовали диагностические экспресс-тесты, предоставленные ВОЗ и микроскопию препаратов крови. Всего было обследовано свыше 2000 человек. ПЦР-диагностикой было охвачено – 750. Ни в одном исследовании не было обнаружено присутствие возбудителей малярии. Указанные исследования стали достаточным основанием для подтверждения элиминации малярии на территории Таджикистана в соответствии с требованиями ВОЗ.

Скрининг населения в очагах висцерального лейшманиоза в Папском районе Узбекистана (2007-2009 гг) впервые показал наличие бессимптомных носителей *Leishmania infantum* среди детей – жителей очагов висцерального лейшманиоза в Узбекистане. Ранее не только в Узбекистане, но и в других эндемичных по висцеральному лейшманиозу странах СНГ не было известно о наличии бессимптомных носителей *L.infantum*. В дополнение к обнаружению бессимптомных носителей было доказано, что возбудитель способен длительно персистировать в организме переболевших – от одного до десяти

лет – даже после проведения полноценного курса специфической этиотропной терапии глюкантимом.

Проведенный комплекс разноплановых экспериментальных и эпидемиологических исследований обеспечил создание широкого спектра актуальных ПЦР-диагностикумов для индикации и идентификации геномов и фрагментов геномов патогенных простейших и гельминтов как в клиническом материале, так и при проведении полевых исследований в очагах паразитарных болезней в разных климато-географических провинциях умеренного и субтропического климата.

Созданные ПЦР-диагностикумы позволяют выявлять наличие возбудителей трансмиссивных паразитарных болезней (малярия, лейшманиозы, дирофиляриозы) и паразитозов нетрансмиссивной природы (лямблиоз, амебиаз, бластоцистоз, криптоспориоз).

Помимо клинической лабораторной работы очень перспективным представляется использование молекулярных методов в эпидемиологических исследованиях. Апробация ПЦР-диагностикумов в очагах трансмиссивных паразитозов позволила получить важные для науки и практики эпиднадзора данные о сроках функционирования очагов и достоверности отсутствия передачи возбудителей на конкретных территориях.

Изучению и определению реальной пораженности населения кишечными протозоозами будет способствовать созданная комплексная система выявления массовых кишечных протозоозов (лямблиоз, амебиаз, бластоцистоз, криптоспориоз).

Таким образом, удалось не только создать разнообразный инструментарий (ПЦР-диагностикумы) для выявления возбудителей актуальных паразитозов, но материально наполнить разработанную методологию молекулярного мониторинга за социально значимыми паразитарными болезнями.

ВЫВОДЫ

1. В рамках концептуально нового понятия «молекулярная паразитология» разработана методология мониторинга за социально значимыми паразитарными болезнями на основе использования молекулярно-биологических методов.
2. Показана возможность индикации и идентификации фрагментов генома паразитарных патогенов не только в тканях и жидкостях организма больного, но в фекальных массах и организме членистоногих – переносчиков.
3. Подобраны уникальные праймеры и экспериментально определены оптимальные параметры выполнения молекулярно-биологической диагностики как трансмиссивных: малярия, лейшманиозы, дирофиляриозы, так и нетрансмиссивных – лямблиоз, амебиаз, бластоцистоз, криптоспоридиоз – паразитозов.
4. Возможность применения молекулярных методов диагностики паразитозов лимитируется наличием генетических фрагментов патогена в доступном для исследования биологическом материале пациента. Поэтому малоэффективной оказалась ПЦР-диагностика токсоплазмоза в образцах периферической крови.
5. Сопоставление эффективности ПЦР-диагностики бластоцистоза с «золотым стандартом» - микроскопическим определением патогена показало совпадение в 88,8% с набором праймеров Bh1 и 94,1% - с набором Bh2.
6. Для проведения массового скрининга населения на инвазированность кишечными протозоозами создана комплексная ПЦР-система для одновременного выявления в одной пробе кала фрагментов генома возбудителей наиболее массовых и социально значимых протозоозов – лямблиоза, амебиаза, бластоцистоза и криптоспоридиоза.
7. С помощью ПЦР-диагностики удалось доказать формирование в эндемичных по висцеральному лейшманиозу очагах детей – бессимптомных носителей

Leishmania infantum.

8. Показано, что в очагах висцерального лейшманиоза в Узбекистане в организме лиц, переболевших этой инфекцией, возможно персистирование возбудителя на протяжении 1-10 лет после выздоровления на фоне проведенной специфической этиотропной терапии глюкантимом.
9. ПЦР-исследование комаров родов *Culex*, *Aedes* и *Anopheles* в Центральном административном округе России доказало наличие местной циркуляции *Dirofilaria repens* и *D.immitis*; и позволило оценить риск заражения людей дирофиляриозами. Применение методов молекулярной паразитологии в диагностике паразитозов у пациентов с подозрением на паразитарную патологию позволяет оптимизировать диагностику и сократить трудозатраты.
10. С помощью массового ПЦР-обследования населения ранее эндемичных очагов трехдневной малярии в Республике Таджикистан удалось доказать достижение элиминации малярии в республике, что послужило основанием для ВОЗ начать процесс сертификации элиминации малярии в Таджикистане.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Широкое внедрение ПЦР в клиническую лабораторную диагностику паразитарных болезней требует повышения уровня информированности медицинских работников о теоретических основах и возможностях ПЦР, и повышения квалификации в современных методических подходах к интерпретации результатов ПЦР-анализа.

2. С целью увеличения диагностической эффективности в комплексном обследовании больных с диарейным синдромом при анализе фекалий рекомендуется сочетать микроскопический метод с молекулярно-биологическим (ПЦР), что наиболее целесообразно при массовых профилактических осмотрах декретированных лиц, детей в организованных коллективах, при расследовании вспышек ОКИ на предприятиях общественного питания.

3. Для определения особенностей этиотропной терапии пациентов с диарейным синдромом, вызванным патологическими морфологически сходными между собой простейшими кишечника необходимо применение методов молекулярной паразитологии, позволяющих точно определить этиологическую причину.

4. Молекулярные методы позволяют не только идентифицировать возбудителя, но и выявить его источник (больные люди, домашние, сельскохозяйственные, дикие животные). Рекомендуется использовать эти методы для выявления источника биологической угрозы и повышения биобезопасности систем коммунального водоснабжения.

5. С целью повышения выявляемости объектов паразитарной природы рекомендуется максимально широкое использование молекулярно-биологических методов в санитарной паразитологии.

6. Рекомендуется расширить спектр исследований существующих центров молекулярной диагностики за счет увеличения числа анализов на паразитозы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКО – внутренний контрольный образец

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГИС – географическая информационная система

ДМСО (DMSO) – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ (dNTP) – дезоксинуклеотидтрифосфаты

ЗТБ – забытые тропические болезни

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – комплементарная ДНК

ЛЦР – лигазная цепная реакция

мРНК – матричная РНК

НК – нуклеиновая кислота

ОЕ – оптическая единица

ОКО – отрицательный контрольный образец

ОТ – обратная транскрипция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рДНК – рибосомальная ДНК

рекДНК – рекомбинантная ДНК

РИФ – реакция иммунофлуоресценции

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная РНК

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

b.p. – basepair - пара оснований

FLASH – флуоресцентная детекция результатов ПЦР

NASBA – амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдюхина, Т.И. Дирофиляриоз в РФ и некоторых странах СНГ: ситуация и тенденция ее изменения / Т.И. Авдюхина, В.Ф. Постнова, Л.М. Абросимова // Мед. паразитол. – 2003. - № 4. – С. 44-48.

2. Авдюхина, Т.И. Дирофиляриоз в странах СНГ: анализ случаев за 1915-1996 годы / Т.И. Авдюхина, В.Г. Супряга, В.Ф. Постнова // Мед. паразитол. – 1997. - № 4. – С. 3-7.

3. Аракельян, Р.С. Эпидемиолого-эпизоотологические особенности дирофиляриоза на территории Астраханской области. : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.19 / Аракельян Рудольф Сергеевич. – М., 2007. – 25 с.

4. Асланова, М.М. Эффективная лабораторная диагностика – основа мониторинга паразитарных болезней / М.М. Асланова, К.Ю. Кузнецова, Е.Н. Морозов // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. –№1. – С. 34-37.

5. Байрамгулова, Г.Р. Биоэкологические аспекты эпидемиологии, эпизоотологии, профилактики кишечных инвазий человека и животных в Республике Башкортостан : автореф. дис. ... док. биол. наук : 03.00.19 / Байрамгулова Гульфира Равилевна. – Тюмень, 2010. – 38 с.

6. Баранова, А.М. Современная маляриологическая ситуация в странах СНГ (2011-2012 гг.) / А.М. Баранова, М.Н. Ежов, Т.М. Гужеева, Л.Ф. Морозова // Мед. паразитол. – 2013. - № 4. – С. 7-10.

7. Безжонова, О.В. Комплексы видов кровососущих комаров рода *Anopheles* (*Diptera*, *Culicidae*) России и ближнего зарубежья : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.05, 03.02.07 // Безжонова Оксана Владимировна. – М., 2011. – 23 с.

8. Бронштейн, А.М. Дирофиляриоз человека в Московском регионе / А.М. Бронштейн, В.Г. Супряга, Б.И. Ставровский // Мед. паразитол. – 2003. - № 3. – С. 51-56.

9. Брусенцев, И.И. ДНК-диагностика микст-инвазий *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis* с помощью ПЦР / И.И. Брусенцев, А.В. Катохин, З.В. Сахаровская, А.Э. Сазонов, Л.М. Огородова, О.С. Федорова, Н.А. Колчанов, В.А. Мордвинов // Мед. паразитол. – 2010. – № 2. – С.10-13.
10. Бычков, В.Г. Холангиоканцерогенез при суперинвазионном описторхозе. Актуальные аспекты паразитарных заболеваний / В.Г.Бычков, А.Х.Сабилов, Е.Д.Хадиева, Г.Г.Крылов // Тезисы докладов. Тюмень, 2008, с. 44-45.
11. Бычков, В.Г., Молекулярно-генетические подходы в паразитологии (на примере описторхоза). / В.Г.Бычков, В.П.Сергиев, А.Х.Сабилов, Г.Г.Крылов, Е.Д.Хадиева, Т.В.Бычкова // Мед. Паразитол. (Москва) 2007, №2, с. 3-6.
12. Ганушкина, Л.А. Оценка риска возникновения арбовирусных инфекций в России / Л.А. Ганушкина, Е.Н.Морозов, И.В.Патраман, О.И.Вышемирский // Мед. паразитол. – 2017. – № 1. – С. 9-14.
13. Ганушкина, Л.А. Энтомологический мониторинг территории для оценки возможности передачи дирофилярий / Л.А. Ганушкина, В.М. Ракова, И.Б. Иванова, В.Г. Супряга, В.П. Сергиев // Мед. паразитол. – 2014. – № 3. – С. 9-12.
14. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: монография / Б. Глик, Дж. Пастернак – М. : Мир, 2002. – 589 с.
15. Гончаров, Д.Б. Токсоплазмоз: роль в инфекционной патологии человека и методы диагностики / Д.Б. Гончаров // Мед. паразитол. – 2005. - № 4. – С. 52-58.
16. Горохов, В.В. Возвращающиеся паразитозы и паразитарные болезни / В.В. Горохов, А.В. Успенский и др. // Мед. паразитол. - 2008. - №1. - 54 - 56.
17. Горохов, В.В. Забытые паразитозы / В.В. Горохов // Мед. паразитол.- 2003. - № 1. - С. 33-36.
18. Гринев, А.Б. Методологические особенности выделения ДНК для постановки nestedPCR с целью дифференциальной диагностики малярии / А.Б.

Гринев, А.К. Токмалаев, Н.В. Чебышев, С.А. Рабинович, О.В. Исаева, С.В. Бегунова, В.Д. Садыков, Н. Галанин // Мед. паразитол. – 2013. – № 2. – С. 30-33.

19. Губарева, Е.В. Использование иммунологических и молекулярно-биологических методов для диагностики церебрального токсоплазмоза при ВИЧ-инфекции / Е.В. Губарева, Д.Б. Гончаров, Э.А. Домонова, О.Ю. Сильвейстрова, А.Б. Перегудова, О.А. Тишкевич, Е.С. Иевлева, Н.В. Кобец, О.Ю. Шипулина // Мед. паразитол. – 2013. - № 1. – С. 7-12.

20. Гузеева, Т.М. Состояние диагностики паразитарных заболеваний в Российской Федерации / Т.М. Гузеева, В.П. Сергиев // Мед. паразитол. – 2011. – №4. – С.43-45.

21. Гузеева, Т.М. Состояние заболеваемости паразитарными болезнями в Российской Федерации и задачи в условиях реорганизации службы / Т.М. Гузеева // Мед. паразитол. – 2008. – № 1. – С.3-11.

22. Дарченкова, Н.Н. Распространение дирофиляриоза человека в России / Н.Н. Дарченкова, В.Г. Супряга, М.В. Гузеева, Е.Н. Морозов, Л.А. Жукова, В.П. Сергиев // Мед. паразитол. – 2009. – № 2. – С.3-7.

23. Державина, Т.Ю. Мониторинг за малярией в Тульской области, как результат системного взаимодействия с референс-центром / Т.Ю. Державина, М.А. Мертешева, А.А. Чернышева, Е.Н. Морозов, Е.А. Черникова, В.П. Сергиев // Мед. паразитол. – 2010. – № 2. – С. 24-26.

24. Жиренкина, Е.Н. Изучение лейшманиозов методом полимеразной цепной реакции / Е.Н. Жиренкина // Сеченовский вестник. – 2012. – № 1 (7). – С. 49-53.

25. Жиренкина, Е.Н. Особенности очага висцерального лейшманиоза в папском районе Наманганской области Узбекистана : автореф. дис. ... канд.биол.наук : 03.02.11 / Жиренкина Екатерина Николаевна. – М., 2013. – 24 с.

26. Жиренкина, Е.Н. Особенности эпидемиологии висцерального лейшманиоза в Папском районе Наманганской области Узбекистана, выявленные при обследовании детей методом ПЦР / Е.Н. Жиренкина, Е.Н. Понировский, М.В. Стрелкова, Е.Н. Морозов, П.Н. Флегонтов, А.А. Колесников, В.И. Пономарева,

Р.М. Насырова, Д.А. Коваленко, А.А. Фатуллаева, Ш.А. Раззаков, Л. Шнур, Ч. Джаф, Г. Банет, А. Варбург, Г. Шониан // Мед. паразитол. – 2011. – № 3. – С. 37-41.

27. Загней, Е.В. Эпидемиологическая ситуация по гельминтозам и протозоозам в Приморском крае / Е.В. Загней, Ю.В. Нестерова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – Т. 58. - № 4. – С. 142-148.

28. Зорина, В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР): методическое пособие / В.В. Зорина. – М.: ДНК-технология, 2012. – 80 с.

29. Иванова, Н.В. Последовательность ITS1, 5.8S и ITS2 рДНК А-типа *Plasmodium vivax* и разработка метода ретроспективной ПЦР-диагностики малярии по окрашенным препаратам крови «толстая капля» / Н.В. Иванова, Е.Н. Морозов, И.В. Кукина, Е.В. Максаковская, С.А. Рабинович, А.Б. Полтараус // Молекулярная биология. – 2001. – Т. 35. - № 3. – С. 515-525.

30. Кайденак, Т.В. Совершенствование эпидемиологического надзора за аскаридозом на основе особенностей его проявления в муниципальных образованиях Республики Башкортостан / Т.В. Кайденак, Г.Е. Ефимов, А.Р. Мавзютов, А.М. Фархутдинова, Е.В. Сенькина, Г.М. Шайхиева // Медицина в Кузбассе. – 2013. – № 2. – С. 63-69.

31. Калмыкова, М. Основы полимеразной цепной реакции с разными форматами детекции: учебник для вузов / М. Калмыкова, М. Калмыков, Р. Белоусова. – Спб. : Изд-во Лань, 2009. – 96 с.

32. Квасова, Н. А. Биологические свойства простейших *Blastocystis hominis* и их влияние на микроэкологию кишечника. : дис. ... канд.биол.наук : 03.00.16 / Квасова, Наталья Анатольевна. – Ульяновск, 2002. – 147 с.

33. Кешишьян, А. Генетический анализ малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Армении / А. Кешишьян, М.И Гордеев, О.В. Безжонова, И.И. Горячева, А.Б. Званцов, В.А. Давидянц, М.Н. Ежов // Мед. паразитол. – 2009. – № 3. – С.24-28.

34. Кишкун, А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики / А.А. Кишкун. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 800 с.

35. Коваленко, Д.А. Висцеральный лейшманиоз у людей и собак в Папском районе Наманганской области Узбекистана: сероэпидемиологические и серозооэпидемиологические исследования / Д.А.Коваленко, Р.М.Насырова, В.И.Пономарева, А.А.Фатуллаева, Ш.А.Разаков, Е.Н.Понировский, М.В.Стрелкова, Е.Н.Жиренкина, Е.Н.Морозов, Ч.Джаф, Г.Банет, Л.Шнур, А.Варбург, Г.Шониан // Мед. паразитол. – 2011. - № 3. – С. 32-37.

36. Конг, Л.Д. Эффективность и специфичность КАТ-теста при экспресс-диагностике тропической малярии / Л.Д. Конг, В.П. Сергиев, С.А. Рабинович, Д.Х. Ньан, Н.В. Хуонг, Е.Н.Морозов, И.В. Кукина, Т.Т. Тин, Е.В. Максаковская, Л.М. Дао, В.Ф. Чалый, Д.Т. То, В.А. Фандеев, Н.В. Хоа, Н. Т. Дук // Мед. паразитол. – 2002. - № 2. – С. 17-20.

37. Кондрашин, А.В. К эпидемиологии осложненной трехдневной малярии // А.В. Кондрашин, А.М.Баранова, Л.Ф. Морозова, А.К. Токмалаев, Е.В.Степанова, Е.Н. Морозов, Ф.С.Саипов // Мед. паразитол. – 2016. – № 4. – С. 12-18.

38. Кондрашин, А.В. Клинико-эпидемиологические особенности малярии в сочетании с другими инфекциями и инвазиями // А.В. Кондрашин, А.К. Токмалаев, Е.Н. Морозов, Морозова Л.Ф. // Мед. паразитол. – 2016. – № 2. – С. 53-59.

39. Кондрашин, А.В. Прививная малярия // А.В. Кондрашин, А.М.Баранова, Л.Ф. Морозова, Т.М.Гузеева, Е.Н. Морозов, Е.В.Степанова // Мед. паразитол. – 2017. – № 2. – С. 21-26.

40. Кондрашин, А.В. Клинико-лабораторные аспекты настороженности к малярии в постэлиминационном периоде / А.В. Кондрашин, Н.И. Тумольская, Л.Ф. Морозова // Мед. паразитол. – 2013. - № 4. – С. 11-16.

41. Кондрашин, А.В. Современное состояние устойчивости возбудителей малярии к противомалярийным препаратам / А.В. Кондрашин, А.М. Баранова, Е.Н. Морозов, Л.Ф. Морозова, Е.В. Степанова // Мед. паразитол. – 2013. – № 2. – С. 51-60.

42. Коренберг, Э.И. Молекулярно-биологические методы и изучение феномена природной очаговости болезней / Э.И. Коренберг // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132. - № 5. – С. 448-462.
43. Куимова, И.В. Клинические особенности иксодовых клещевых боррелиозов у детей / И.В. Куимова, О.А. Радионова, Е.И. Краснова // Лечащий врач. – 2014. - № 3. – С. 65.
44. Ларина, С.Н. Генетическая устойчивость к малярии / С.Н. Ларина, Т.В.Сахарова, Н.В. Чебышев // Мед. паразитол. – 2009. - № 2. – С. 51-56.
45. Литвинов, С.К. Вакцинация против малярии: реальность и перспективы / С.К. Литвинов, А.М.Бронштейн, Е.Н. Морозов // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2017. – № 3 (Том 22). – С. 153-156
46. Литвинов, С.К. Возможна ли элиминация геогельминтозов в рамках реализации программы ВОЗ «забытые тропические болезни» / С.К. Литвинов, Е.Н. Морозов, К.Ю. Кузнецова, Е.Н. Жиренкина // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2016. – № 1 (Том 21). – С. 40-43.
47. Малышева, Н.С. Паразитологическая характеристика объектов окружающей среды на урбанизированных территориях Курской области / Н.С. Малышева, Н.А. Самофалова, Н.А. Плехова, А.Н. Борзосекова // Ученые записки. Электронный научный журнал Курского государственного университета. – 2008. - № 3. – С. 1-4.
48. Момыналиев, К.Т. Перспективы применения методов ДНК-диагностики в лабораторной службе / К.Т. Момыналиев, В.М. Говорун // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. - №4. – С. 25-32.
49. Морева, Ж.Г. О возможности выявления различных форм *Trichomonas vaginalis* при помощи метода люминесцентного анализа / Ж.Г. Морева, Е.Н. Морозов, М.М.Васильев, А.Ю.Миронов, Е.А. Венедиктов // Мед.паразитол. – 2015. – №2. – С.35-40.
50. Мороз, Н.В. Лабораторный контроль за объектами окружающей среды как составная часть санитарно-паразитологического мониторинга / Н.В.

Мороз, Е.П. Хроменкова, Л.Л. Димидова, Г.В. Стрельникова //Мед.паразитол. – 2008. – №2. – С.29-32.

51. Морозов Е.Н. Анализ патентов по различным аспектам изучения возбудителей эхинококкоза / Е.Н. Морозов, Е.Н. Жиренкина // Патенты и лицензии. Интеллектуальные права. – 2016. – № 2. – С. 43-49.

52. Морозов, Е.Н. Генодиагностика малярии: роль препарата крови толстая капля : автореф. дис. ... канд.мед.наук : 03.02.11 / Морозов Евгений Николаевич. – М., 1999. – 24 с.

53. Морозов, Е.Н. Дирофиляриоз человека: клинико-диагностические признаки и методы диагностики / Е.Н.Морозов, В.Г. Супряга, В.М. Ракова, Л.Ф. Морозова, Л.А. Жукова // Мед. паразитол. – 2014. – № 2. – С. 13-17.

54. Морозов, Е.Н. Комплексная лабораторная диагностика возбудителей малярии в предэлиминационном периоде / Е.Н.Морозов, С.С. Каримов, Д.С. Сайбурхонов, А.М. Баранова // Мед.паразитол. – 2015. – №3. – С.60-62.

55. Морозов, Е.Н. Мобильная паразитологическая лаборатория. Патент РФ RU 2568516 С1. / Е.Н. Морозов, В.П.Сергиев, К.Ю. Кузнецова, Л.Ф. Морозова, Е.В. Степанова, Н.А. Турбабина, Д.А. Гаврилов, Н.Н. Щелкунов, А. В. Мелерзанов // Опубликовано: 20.11.2015. – Бюл. №32.

56. Морозов, Е.Н. Молекулярная диагностика паразитарных болезней / Е.Н. Морозов, К.Ю. Кузнецова // Инфекционные болезни. – 2014. - № 1. – С. 36-38.

57. Морозов, Е.Н. О концепции ликвидации инфекционных болезней / Е.Н. Морозов, С.К. Литвинов, Е.Н. Жиренкина // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2016. – № 2 (Том 21). – С. 68-73.

58. Морозов, Е.Н. Перспективы применения методов молекулярной паразитологии в мониторинге социально значимых паразитозов / Е.Н. Морозов // Справочник заведующего КДЛ. – 2011. – № 4. – С. 13-20.

59. Морозова, Л.Ф. Опыт использования ГИС в эпидемиологических исследованиях (на примере малярии и дирофиляриозов) /Л.Ф.Морозова,

В.П.Сергиев, А.М.Баранова, Л.А.Ганушкина, А.В.Кондрашин, В.Г.Супряга, ,
Е.В.Степанова, М.С.Максимова, Н.А.Турбабина, Е.Д.Тимошенко, Е.Н.Морозов //
Мед.паразитол. – 2017. – №1. – С.14-20.

60. Морозова, Л.Ф. Оценка риска возможного возникновения местного заражения аскаридозом на территории Российской Федерации (методологические принципы и подходы) /Л.Ф.Морозова, Н.А.Турбабина, В.П.Сергиев, Е.Н.Морозов, Е.В.Степанова, М.С.Максимова, Е.Н.Жиренкина // Мед.паразитол. – 2016. – №3. – С.40-44.

61. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2014. – 191 с.

62. Огородова, Л.М. Характеристика эпидемиологических и молекулярных взаимоотношений аллергических и гельминтных болезней в эндемичном очаге описторхоза / Л.М. Огородова, О.С.Фёдорова, М.Б. Фрейдин, М.В. Васильева, Н.А. Черевко, А.Э. Сазонов, И.В. Петрова, И.В. Салтыкова, Е.Ю. Брагина, Е.С. Куликов, И.А. Деев // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – Т. 7. - № 4. – С. 37-43.

63. Онищенко, Г.Г. Контроль за инфекционными заболеваниями – стратегическая задача здравоохранения России в XXI веке / Г.Г. Онищенко // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2005. - №4.- С. 8-16.

64. Онищенко, Г.Г. Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территорий в современных условиях / Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев, С.Д. Кривуля, Ю.М. Федоров, В.П. Топорков //Проблемы особо опасных инфекций. – 2006. - вып. 92. – С. 5-9.

65. Пальцев, М.А. Молекулярная медицина как важнейшее направление обеспечения биобезопасности / М.А. Пальцев // Молекулярная медицина. – 2004. - №3.- С. 4-7.

66. Панкова, Т.Г. Изучение возможности реверсии устойчивости к хлорохину верапамилом у *Plasmodium berghei* – возбудителя малярии грызунов /

Т.Г.Панкова, Т.Г.Иголина, Т.В.Майер, С.А.Рабинович, Е.В.Максаковская, Е.Н.Морозов // Мед.паразитол. – 2008. – №4. – С.19-22.

67. Петрищева, Г.В. Видовой состав иксодовых клещей в различных ландшафтных провинциях Оренбургской области / Г.В. Петрищева, П.Н. Зойнов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2011. – № 16 (135). – С. 319-321.

68. Печкуров, Д.В. Глистные инвазии у детей: клиническое значение, диагностика и лечение / Д.В. Печкуров, А.А. Тяжева // Российский медицинский журнал. – 2014. – Т. 22. - № 3. – С. 242-246.

69. Покровский, В.И. Эпидемиологический подход и причинная обусловленность болезней человека / В.И. Покровский // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2005. - №4.- С. 21-26.

70. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее применение в бактериологии : учебно-методическое пособие для врачей-бактериологов. / под. ред. акад РАМН А Л. Гинцбурга. - М., 2006. - 142 с.

71. Полимеразная цепная реакция и ее применение для диагностики в дерматовенерологии: учебное пособие для студентов медицинских вузов, интернов, ординаторов и врачей / А.А. Воробьев. - М. : Медицинское информационное агентство, 2004. - 72 с.

72. Просяникова, М.Н. Диагностика переносчиков возбудителя болезни лайма методом ПЦР на территории Приморского края / М.Н. Просяникова, М.Е. Мазур // Здоровье населения и среда обитания. – 2008. - № 11. – С.20-21.

73. Профилактика дирофиляриоза: [МУ 3.2.1880-04: принят Главным государственным санитарным врачом, Первым заместителем Министерства здравоохранения Российской Федерации 03 марта 2004 г.]. – М.: Минздрав России, 2005. – 18 с.

74. Рабинович, С.А. Мониторинг эффективности делагила (хлорохин) в отношении завозных штаммов *Plasmodium vivax* / С.А. Рабинович, А.К.

Токмалаев, И.В. Кукина, Е.Н. Морозов, Е.В. Максаковская, В.Д. Садыков, М.А. Бурчик, Т.Н. Иванова, В.П. Сергиев // Мед. паразитол. – 2010. – № 4. – С. 46-53.

75. Рабинович, С.А. Эффективность экспресс-теста КАТ-R.f. («КАТ Medical» ЮАР) среди популяций лекарственно-устойчивых паразитов / С.А. Рабинович, Л.Д. Конг, Н.В. Ха, Е.Н. Морозов, Д.Е. Торопов, И.В. Кукина, Е.В. Максаковская, М.А. Яковенко, В.Ф. Чалый, В.А. Фандеев, Е.А. Позднякова, Ю.Е. Никитюк, В.П. Сергиев// Мед. паразитол. – 2006. - № 2. – С. 10-12.

76. Ракова, В.М. Молекулярно-биологическая диагностика дирофиляриоза в организмах дефинитивного хозяина и переносчиков : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.11, 03.02.05 / Ракова Вера Михайловна. – М., 2013. – 142 с.

77. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Самматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семенов, А.М. Савилолва, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : БИНОМ. Лаборатория знания, 2009. – 223 с.

78. Романова, Е.А. Использование Полимеразной цепной реакции для идентификации ДНК гельминтов из родов *Trichinella*, *Fasciola*, *Echinococcus*, *Nematodirus*, *Taenia* / Е.А. Романова, С.К. Семенова, И.И. Бенедиктов, А.П. Рысков // Паразитология. – 1997. - № 1. – С. 53-65.

79. Рябова, Т.Е. Обнаружение комаров *Aedes aegypti* в г. Сочи. / Т.Е.Рябова, Ю.В.Юничева, Н.Я.Маркович, Л.А.Ганушкина, В.Г.Орабей, В.П. Сергиев // Мед. паразитол. – 2005. – № 3. – С. 3-5.

80. Сергиев, В.П. «Новые и возвращающиеся» гельминтозы как потенциальный фактор социально-эпидемических осложнений в России // В.П. Сергиев, А.В. Успенский, Н.А. Романенко, В.В. Горохов, В.Г. Супряга, Т.В. Старкова, Е.Н. Морозов, Е.А. Черникова // Мед. паразитол. – 2005. - № 4. – С. 6-8.

81. Сергиев, В.П. Дирофиляриоз человека: диагностика и характер взаимоотношений возбудителя и хозяина / В.П.Сергиев, В.Г.Супряга, Е.Н. Морозов, Л.А.Жукова //Мед. паразитол. – 2009. – №3. – С. 3-6.

82. Сергиев, В.П. Инфекционные болезни на рубеже веков. Осознание биологической угрозы / В.П. Сергиев, Н.Н. Филатова : – М.: Наука, 2006. – 572 с.

83. Сергиев, В.П. Итоги изучения дирофиляриоза человека в России / В.П. Сергиев, В.Г. Супряга, А.М. Бронштейн, Л.А. Ганушкина, В.М. Ракова, Е.Н. Морозов, Л.В. Федянина, А.А. Фролова, Л.Ф. Морозова, И.Б. Иванова, Н.Н. Дарченкова, Л.А. Жукова // Мед. паразитол. – 2014. – № 3. – С. 3-9.
84. Сергиев, В.П. Малярия: угроза, методы борьбы, профилактики и лечения / В.П. Сергиев, А.М. Баранова, Е.Н. Морозов // Молекулярная медицина. – 2008. – № 4. – С. 51-55.
85. Сергиев, В.П. Молекулярная паразитология: подходы и перспективы/ В.П. Сергиев// Молекулярная медицина. – 2008. – №3. – с. 15-21.
86. Сергиев, В.П. Паразитарные болезни и биобезопасность России. / В.П. Сергиев // Молекулярная медицина. – 2004. - № 3. – С. 32.
87. Сергиев, В.П. Появление экзотических переносчиков арбовирусных лихорадок – новая недостаточно оцениваемая биологическая угроза южным регионам России. / В.П. Сергиев // Инфектология. – 2011. – Том 3. – №3. – С. 59-63.
88. Сергиев, В.П. Роль межвидовой борьбы в эволюции человека, возбудителей и патологии. / В.П. Сергиев // Дезинфекционное дело. – 2004. – №3. – С. 30-34.
89. Сергиев, В.П. Современные проблемы в сфере паразитарных болезней и их терапии / В.П. Сергиев, К.Ю. Кузнецова // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2014. – № 1. – С. 12-16.
90. Сергиев, В.П., Пальцев М.А. Современное понимание проблемы биологической безопасности. / Биозащита и биобезопасность. – 2011. – том 3. – № 2. – С. 9-13.
91. Сергиев, В.П., Филатов Н.Н. Человек и его паразиты. Соперничество геномов и молекулярное взаимодействие. М., Наука, 2010, 398 с.
92. Сергиев, П.Г., Духанина Н.Н., Демина Н.А., Шипицина Н.К., Озерецковская Н.Н., Лысенко А.Я., Рабинович С.А., Семашко И.Н., Фонарева К.С. Мелария. В кн.: Многотомное руководство по микробиологии, клинике и

эпидемиологии инфекционных болезней. Т. IX. Протозойные болезни, гельминтозы, членистоногие, имеющие медицинское значение, и ядовитые животные. М., Медицина, 1968, с. 37-115.

93. Сергиев, В.П. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней – Практическое руководство / В.П. Сергиев, Е.Н. Морозов, Л.Ф. Морозова // в кн.: под ред. акад. РАМН Г.Г.Онищенко, акад. РАМН В.В. Кутырева – 2-е изд., перераб. и доп. – М. :Изд-во Шико, 2013. – 560 с.

94. Сергиев, В.П. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке – Руководство для врачей / В.П.Сергиев, Н.А.Романенко, М.Н.Лебедева, А.А.Фролова, Е.Н.Морозов // в кн.: под ред. В.И.Покровский, Г.Г.Онищенко, Б.Л.Черкасский – М. : Медицина, 2003 – С. 599-615.

95. Сигидаев, А.С. Изучение генетического профиля *Blastocystis species* у жителей Санкт-Петербурга с патологией желудочно-кишечного тракта в разных возрастных группах / А.С. Сигидаев, С.С. Козлов, Е.А. Тарасова, М.А. Суворова // Мед. паразитол. – 2013. - № 4. – С. 19-23.

96. Сигидаев, А.С. Лабораторная характеристика бластоцистной инвазии у больных с хроническими вирусными гепатитами / А.С. Сигидаев, В.С. Сукачев, М.В. Куртуков, К.В. Жданов, С.С. Козлов, К.В. Козлов, А.В. Ласкин, Е.А. Тарасова, М.А. Суворова // Журнал инфектология. – 2011. - Т. 3. - № 4. – С. 62-66.

97. Супряга, В.Г. Дирофиляриоз человека: особенности клинической диагностики, связанные с различными стадиями развития возбудителя/ В.Г. Супряга, Л.Ф.Морозова, В.М.Ракова, Е.Н. Морозов, В.П.Сергиев, Т.Н.Иванова, Н.А.Турбабина // Мед. паразитол. – 2017. - № 2. – С. 3-8.

98. Супряга, В.Г. Первый случай диагностики дирофиляриоза по микрофиляриям, обнаруженным в пунктате подкожной опухоли человека / В.Г. Супряга, Т.Н. Цыбина, Т.Н. Денисова, Е.Н. Морозов, Н.А. Романенко, Т.В. Старкова // Мед. паразитол. – 2004. - № 4. – С. 6-8.

99. Супряга, В.Г. Современное представление об облигатности и факультативности взаимоотношений человека и возбудителя *Dirofilaria (N.) repens*/ В.Г. Супряга, В.М.Ракова, Е.Н. Морозов // Мед. паразитол. – 2016. - № 2. – С. 3-7.
100. Тарнопольский, В.И. Мобильная медицинская лаборатория диагностики методом полимеразной цепной реакции. Патент РФ 72340. / В.И. Тарнопольский, М.Я. Натензон // Опубликовано: 07.02.2008.
101. Твердохлебова, Т.И. Состояние и перспективы развития технологического направления в области диагностики и терапии паразитарных болезней / Т.И. Твердохлебова, Э.А. Яговкин // Мед. паразитол. – 2014. - № 1. – С. 3-6.
102. Теоретические основы полимеразной цепной реакции – М.: ДНК-технология, 1998. – 32 с.
103. Тихонова, Д.В. ДНК-диагностика бластоцистоза с помощью метода ПЦР / Д.В. Тихонова, И.В. Волкова, Е.Н. Морозов, Л.В. Федянина // Мед. паразитол. – 2012. – № 4. – С.27-29.
104. Тихонова, Д.В. Проблема бластоцистоза в мире / Д.В. Тихонова // Сеченовский вестник. – 2012. - № 1 (7). – С.ю 54-58.
105. Тихонова, Д.В. Разработка метода верификации диагноза бластоцистоза при диарее неясной этиологии : дис. ... канд. мед. наук : 03.02.11 / Тихонова Дина Валерьевна. – М., 2013. – 109 с.
106. Токмалаев, А.К. Клиническая паразитология: протозоозы и гельминтозы : учебное пособие для системы послевузовского и дополнительного профессионального образования врачей / А.К. Токмалаев, Г.М. Кожевникова. – М. : Изд-во Мед.информ. агенство, 2010. – 426 с.
107. Трифонов, С.В. Психолого-педагогические задачи оптимизации подготовки медицинских работников по специальности «Паразитология» / С.В.Трифонов, Е.Н.Морозов // Мед. паразитол. – 2016. – № 2. – С. 45-47.
108. Усенбаев, Н.Т. Эпидемиологический надзор за малярией элиминация городских вспышек трехдневной малярии в Кыргызской Республике :

: автореф. дис. ... канд.мед.наук : 03.02.11, 14.02.02 / Усенбаев Нурболот Толошович. – М., 2010. – 26 с.

109. Федянина, Л.В. Микрофиляриемия при дирофиляриозе человека, вызванном *Dirofilaria repens* Ralet et Henry, 1911. Описание случая / Л.В. Федянина, С.М. Шатова, В.М. Ракова, В.М. Шайтанов, М.Н. Лебедева, А.А. Фролова, Е.Н. Морозов, Л.Ф. Морозова // Мед. паразитол. – 2013. – № 2. – С. 3-7.

110. Федянина, Л.В. Случаи, подтверждающие концепцию, что человек – факультативный хозяин *Dirofilaria repens* / Л.В. Федянина, А.А. Фролова, Г.Л. Плющева, А.И. Чернышенко, Е.Н. Морозов, В.М. Ракова // Мед. паразитол. – 2011. – № 4. – С. 37-38.

111. Ха, Н. В. Применение Nested ПЦР для диагностики малярии и изучение структуры малярийных паразитов человека в гиперэндемичных малярийных районах Вьетнама / Н. В. Ха, Д. Д. Ле, С.А. Рабинович // Биомедицинские технологии. – 2001. - Вып.16. – С. 153-163.

112. Хаитов, Р.М. Иммуногенетика и биобезопасность / Р.М. Хаитов, Л.П. Алексеев – М. : ООО «Миттель Пресс», 2014. – 232 с.

113. Шайкевич, Е.В. Идентификация комаров рода *Culex* (Diptera, Culicidae) методом рестрикционного анализа продуктов амплификации / Е.В. Шайкевич // Мед. паразитол. – 2009. – № 3. – С.28-32.

114. A World United Against Infectious Diseases: Connecting Organizations for Regional Disease Surveillance (CORDS) – Emerging Health Threats Journal – Supplement 1, 2012. – 79 p.

115. Alonso, J.L. Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples / J.L. Alonso, I. Amoros, I. Caniquel // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 89. – No. 4. – P. 1203-1211.

116. Alyousefi, N.A. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in Yemen / Naela A. Alyousefi, Mohammed A.K. Mahdy, Lihua Xiao, Rohela Mahmud, Yvonne A.L. Lim // Experiment. Parasitol. – 2013. – Vol. 134. – Iss. 2. – P. 141-147.

117. Basuni, M. Detection of selected intestinal helminthes and protozoa at Hospital Sains Malaysia using multiplex real-time PCR / M. Basuni, Z. Mohamed, M. Ahmad, N.Z. Zakaria, R. Noordin // Trop. Biomed. – 2012. – Vol. 29. – No. 3. – P. 434-442.
118. Bell, A.S. Real-time quantitative PCR in parasitology / A.S. Bell, L.C. Ranford-Cartwright // Trends Parasitol. – 2002. – Vol. 18. – No. 8. – P. 337-342.
119. Bretagne, S. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays / S. Bretagne // Clin. Microbiol. Infect. – 2003. – Vol. – 9. – Iss. 6. – P. 505-511.
120. Burg, J.L. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction / J.L. Burg, C.M. Grover, P. Pouletty, J.C. Boothroyd // J. Clin. Microbiol. – 1989. – Vol. 27. – No. 8. – P. 1787-1792.
121. Carlton, J.V., Hirt R.P., Silva J.C., deicer A.L., Schatz V., Zhao Q. Draft genjme sequence of sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. Science. 2007, v. 315, p. 207-212.
122. Chaudry, J.Z. Real time polymerase chain reaction for the detection of malarial parasite / J.Z. Chaudry, S. Ahmed, T.Z. Qureshi, N. Ali // J. Coll Physiciansa Surg Pak. – 2012. – Vol. 22. – No. 2. – P. 98-100.
123. Chen, J. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara spp.* / J. Chen, D.H. Zhou, A.J. Nisbet, M.J. Xu, S.Y. Huang, M.W. Li, C.R. Wang, X.Q. Zhu // Infect. Genet. Evol. – 2012. – Vol. 12. – No. 7. – P. 1344-1348.
124. Choe, S.C. Differentiation of Korean isolates of *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar* / S.C. Choe, M. Lee, S.K. Lee, K. Im, E. Tannich, S.H. Lee, S.T. Hong // Korean. J. Parasitol. – 1996. - Vol. 34. – No. 1. – P. 15-20.
125. Choi, K.M. Study of the genetic discrimination between imported and autochthonous cases of malaria in South Korea / K.M. Choi, Y.K. Choi, Y.A. Kanq, S.Y. Seo, H.W. Lee, S.H. Cho, W.J. Lee, H.G. Rhie, H.S. Lee, J.Y. Kim // J. Travel. Med. - 2013. – Vol. 18. – No. 1. - P. – 63-66.

126. Clinical applications of PCR : methods in molecular biology / Y.M. Dennis Lo – NY : Humana Press, 2010. – 216 p.
127. Cruz, I. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assay for diagnosis of human leishmaniasis / Israel Cruz, Aurélie Millet, Eugenia Carrillo, Mehdi Chenik, Poonam Salotra, Sandeep Verma, Nicolás Veland, Marlene Jara, Vanessa Adai, Carlos Castrillón, Jorge Arévalo, Javier Moreno, Carmen Cañavate // *Experimental Parasitol.* – 2013. – Vol. 134. – Iss. – 3. – P. 281-289.
128. De Almeida, M.E. Identification of *Leishmania spp.* by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2 / M.E. De Almeida, F.J. Steurer, O.Koru, B.L. Herwaldt, N.J. Pieniazek, A.J. da Silva // *J. Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 49. – No. 9. – P. 3143-3149.
129. De Silva, J.R. Genotyping of the Duffy blood group among *Plasmodium knowlesi* – infected patients in Malaysia / J.R. De Silva, Y.L. Lau, M.Y. Fong // *PLoS One.* – 2014. – 9(9):e108951. – doi: 10.1371.
130. Diaz, J.H. Increasing Risks of human Dirofilariasis in Travelers / J.H. Diaz // *J Travel Med.* – 2014. – doi: 10.1111/jtm.12174.
131. Dolan, N. Infectious disease surveillance update / N. Dolan // *The Lancet Infectious Diseases.* - 2014. – Vol. 14 № 9. – P. 801.
132. Edoh, D. PCR amplification of DNA from malaria parasites in fixed and stained thick blood films / D. Edoh, S. Steiger, B. Genton, H.P. Beck // *Trans. Royal Soc. Tropical Medicine and Hygiene.* – 1999. - Vol. 93 (1). – P. 50-53.
133. Fontecha, G.A. Comparison of molecular tests for the diagnosis of malaria in Honduras [Электронный ресурс] / G.A. Fontecha, M. Mendoza, E. Banegas, M. Poorak, A.M. De Oliveira, T. Mancero, V. Udhayakumar, N.W. Lucchi, R.E. Mejia // *Malar. J.* – 2012. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3407797/pdf/1475-2875-11-119.pdf>.
134. Forseca D.M., Keyghobadi N., Malcolm C.A., Dchaffner F., Mogi M., Flescher R.C., Wilkerson R.C. Emerging vector in the *Culex pipiens* complex. *Science.* 2004. V. 303, p. 1535-1538.
135. Ganushkina L.A. Detection of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and

Aedes koreicus in the Area of Sochi, Russia / L.A. Ganushkina, I.V. Patraman, G. Rezza, L. Migliorini, S.K. Litvinov, V.P. Sergiev // Vector-borne and zoonotic diseases. – 2016. – Vol. 16. – No. 1. – P. 58-60.

136. Garcia, L.Sh. Medical parasitology / Lynne Shore Garcia. – 5th ed. U.S.A. : ASM Press, 2006. – 1202 p.

137. Guimaraes, V.C. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies in a cutaneous and visceral leishmaniasis endemic area in northeastern Brazil / V.C. Guimaraes, P.L. Costa, F.J. Silva, F.L. Melo, F. Dantas-Torres, E.H. Rodrigues, S.P. Brandao Filho // Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. – 2014. – Vol. 64. – No. – 4. - P. 357-360.

138. Hadfield, S.J. Detection and differentiation of *Cryptosporidium spp.* in human clinical samples by use of real-time PCR / S.J. Hadfield, G. Robinson, K. Elwin, R.M Chalmers // J/ Clin. Microbiol. – 2011. - Vol. 49. – No. 3. - P. – 918-924.

139. Haditsch, M. Quality and reliability of current malaria diagnostic methods / M. Haditsch. // Travel Medicine and Infectious Disease. – 2004. – Vol. 2. - No.3-4. – P.149-161.

140. Hanscheid, T. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? T. Hanscheid, M. P. Grobusch // Trends Parasitology. - 2002. – Vol. 18. – Iss. 9. – P. 395-398.

141. Hawash, Y. Prevalence of *Cryptosporidium*- associated diarrhea in a high altitude-community of Saudi Arabia detected by conventional and molecular methods // Y. Hawash, L.S. Dorgham, A.S. Al-Hazmi, M.S. Al-Ghamdi // Korean J Parasitol. – 2014. – Vol. 52. - № 5. – P. 479-485.

142. Herbinger, K.H. Epidemiological, clinical and diagnostic data on intestinal infections with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* among returning travelers / K.H. Herbinger, E. Fleischmann, C. Weber, P. Perona, T. Loscher, G. Bretzer // Infection. – 2011. – Vol. 39. – No. 6. – P. 527-535.

143. Hong, S.H. Molecular detection and seroprevalence of *Babesia microti* among stock farmers in Khutul city, Selenge province, Mongolia / S.H. Hong, D. Anu, Y.I. Jeong, D. Abmed, S.H. Cho, W.J. Lee, S.E. Lee // Korean J Parasitol. – 2014. - №

4. – P. 443-447.

144. Hyde, J.E. *Molecular parasitology* / John E. Hyde. – Open University Press, 1990 – 302 p.

145. Imwong, M. Association of genetic mutations in *Plasmodium vivax* dhfr with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine: geographical and clinical correlate / M. Imwong, S. Pukrittakayamee, S. Looareesuwan, G. Pasvol, J. Poirreiz, N.J. White, G. Snounou // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – 45:3122–3127.

146. Inpankaew, T. Simple fecal flotation is a superior alternative to quadruple Kato Katz Smear examination for the detection of hookworm eggs in human stool [Электронный ресурс] / T. Inpankaew, F. Schar, V. Khieu, S. Muth, A. Dalsgaard, H. Marti, R.J. Traub, P. Odermatt // *PLOS Negl Trop Dis* – 2014. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4270685/>.

147. Ishenqoma, D.S. Using rapid diagnostic tests as source of malaria parasite DNA for molecular analyses in the era of declining malaria prevalence [Электронный ресурс] / D.S. Ishenqoma, S. Lwitiho, R.A. Madebe, N. Nyaqonde, O. Persson, L.S. Vesterqaard, I.C. Byqbjerd, M.M. Lemnge, M. Alifrangis // *Malar. J.* – 2011. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3025907/>.

148. Johnson, D.W. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples / D.W. Johnson, N.J. Pieniazek, D.W. Griffin, L. Misener, J.B. Rose // *Appl Environ Microbiol.* - 1995. – No. 11. – Vol. 61. – P. 3849-3855.

149. Jones, S. Filter paper collection of *Plasmodium falciparum* mRNA for detecting low-density gametocytes [Электронный ресурс] / S. Jones, C.J. Sutherland, C. Hermsen, T. Arens, K. Teelen, R. Hallett, P. Corran, M. van der Vegte-Bolmer, R. Sauerwein, C.J. Drakeley, T. Bousema // *Malar. J.* – 2012. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3441243/>

150. Kamau, E. Measurement of parasitological data by quantitative real-time PCR from controlled human malaria infection trials at the Walter Reed Army Institute of research [Электронный ресурс] / E. Kamau, S. Alemayehu, K.C. Feghali, J. Komisar, J. Regules, J. Cowden, C. F. Ockenhouse // *Malar. J.* – 2014/ Vol. 13. –

Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4128310/>.

151. Kenji, M. Global distribution of polymorphisms associated with delayed *Plasmodium falciparum* parasite clearance following artemisinin treatment: Genotyping of archive blood samples / M. Kenji, R. Culleton, T. Hisaoka, H. Endo, T. Mita // *Parasitol Int.* – 2014. – 11 – P. 1-7.

152. Khademvatan, S. Diagnosis and identification of *Leishmania spp.* from Giemsa-stained slides, by real-time PCR and melting curve analysis in south-west of Iran / S. Khademvatan, N. Neisi, S. Maraghi, J. Saki // *Ann Trop Med Parasitol.* – 2011. – Vol. 105. – No. 8. – P. 559-565.

153. Khalifa, K el-S Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis / K el-S Khalifa, A. Roth, B. Roth, K.N. Arasteh, K. Janitschke // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – No. 11. – Vol. 32. – P. 2813-2819.

154. Kim, J.Y. Development and efficacy of real-time PCR in the diagnosis of vivax malaria using field samples in the Republic of Korea [Электронный ресурс] / J.Y. Kim, Y.K. Goo, S.Y. Ji, H.I. Shin, E.T. Han, Y. Hong, D.I. Chung, S.H. Cho, W.J. Lee // *PloS One.* – 2014. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25148038>.

155. Kondrashin, A.V. Elimination of *Plasmodium falciparum* malaria in Tajikistan / A.V.Kondrashin, A.S.Sharipov, D.S.Kadamov, S.S.Karimov, E.Gasimov, A.M.Baranova, L.F.Morozova, E.V.Stepanova, N.A.Turbabina, M.S.Maksimova, E.N.Morozov // *Malaria Journal.* – 2017. – 16. – 226.

156. Latrofa, M.S. Molecular xenomonitoring of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time PCR coupled with melting curve analysis [Электронный ресурс] / M.S. Latrofa, F. Montarsi, S. Ciocchetta, G. Annoscia, F. Dantas-Torres, S. Ravagnan, G. Capelli, D. Otranto // *Parasit. Vectors.* – 2012.- Режим доступа: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/76>

157. Leterrier, M. *Trichomonads* in pleural effusion: case report, literature review and utility of PCR for species identification / M. Leterrier, F. Morio, B.T.

Renard, A.S. Poirier, m. Miegeville, G. Chambreuil // *New Microbiol.* – 2012. – Vol. 35. – No. 1. – P. 83-87.

158. Li, J. Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax* / J. Li, W.E. Collins, R.A. Witz, D. Rathore, A. Lal, T.F. McCutchan // *Emerg. Infect. Dis.* – 2001. – 7(1): 35–42.

159. Li, J. *Plasmodium*: genus-conserved primers for species identification and quantitation / J. Li, R.A. Wirtz, G.A. McConkey, J. Sattabongkot, A.P. Waters, M.J. Rogers, T.F. McCutchan // *Experimental parasitology.* – 1995. – Vol.81 (2). – P. 182-190.

160. Lima, G.F. Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale / G.F. Lima, J.E. Levi, M.P. Geraldi, M.C. Sanchez, A.A. Segurado, A.D. Hristove, J. Inoue, J. Mde Costa-Nascimento, D.M. Di Santi // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2011. – Vol. 106. – No. 6. – P. 691-700.

161. Macpherson, Calum N.L. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance / Calum N.L. Macpherson // *Inter. J. Paras.* – Vol. 43. – Iss. 12-13. – P. 999-1008.

162. Madarova, L. A real-time PCR diagnostic method for detection of *Naegleria fowleri* / Lucia Maďarová, Katarína Trnková, Soňa Feiková, Cyril Klement, Margita Obernauerová. – 2010. – Vol. 126. – Iss. 1. – P. 37-41.

163. Manser, M. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in clinical laboratories in Europe – a comparative study / M. Manser, M. Granlund, H. Edwards, A. Saez, E. Petersen, B. Evengard, P. Chiodini // *Clinic. Microbiol. Infect.* – 2014.- Vol. 20. – Iss. 1. – P. O65-O71.

164. Martin-Ampudia, M. Under-notification of cryptosporidiosis by routine clinical and laboratory practices among non-hospitalised children with acute diarrhea in Southern Spain / M. Martin-Ampudia, A. Mariscal, R.M. Lopez-Gigoss, L. Mora, J. Fernandez-Crehuet // *J. Infection.* – 2012. – Vol. 40. – No. 2. – P. 113-119.

165. Martin-Rabadan, P. Clinical microbiology laboratory and imported parasitic diseases / P. Martin-Rabadan, R. Martinez-Ruiz, J. Cuadros, C. Canavate // *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* – 2010. - Vol. 28. – No. 10. – P. 719-725.
166. Mathis, A. PCR and vitro cultivation for detection of *Leishmania spp.* In diagnostic samples and dogs / A. Mathis, P. Deplazes // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – No. 33. – Vol. 5. – P. 1145-1149.
167. McManus, D.P. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics / D.P. McManus, J. Bowles // *Inter. J. Parasitol.* – 1996. - Vol. 26. – Iss. 7. – P. 687-704
168. Mendis, K.N. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria / K.N. Mendis, B.J. Sina, P. Marchesini, R. Carter // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2001. – 64: 97–106.
169. Minodier, P. Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis / P. Minodier, R. Piarroux, F. Gambarelli, C. Joblet, H. Dumon // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – No. – 10. – P. 2551-2510.
170. Moghaddassani¹, H. Molecular Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection by PCR detection of Specific DNA in Human Stool Samples / H. Moghaddassani¹, H. Mirhendi¹, M. Hosseini, M.B. Rokni, Gh. Mowlavi, Eb. Kia // *Iranian J Parasitol:* - 2011. - Vol. 6. - No.2 - P. 23-30.
171. Molecular diagnostics / G. Patrino, W. Ansorge. - U.S.A. : Academic Press, 2005. – 488 p.
172. Montoya, J.G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis / J.G. Montoya // *J. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 185 (Suppl. 1). – P. S73-S82.
173. Mwape, K.E. *Taenia solium* infections in a rural area of Eastern Zambia—a community based study / K.E. Mwape, I.K. Phiri, N. Praet, J.B. Muma, G. Zulu, P. Van den Bossche, R. de Deken, N. Speybroeck, P. Dorny, S. Gabriel // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2012. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3313923/>.
174. Najafzadeh, N. The existence of only one haplotype of *Leishmania*

major in the main and potential reservoir hosts of zoonotic cutaneous leishmaniasis using different molecular markers in a focal area in Iran / N. Najafzadeh, M.M. Sedaghat, S.S. Sultan, A. Spotin, A. Zamani, R. Taslimiar, A. Yaghoubinezhad, P. Parvizi // *Rev Soc Bras Med Trop.* – 2014. – 47 (5):599-606.

175. New perspectives: Malaria Diagnosis. Report of a joint WHO/USAID informal consultation 25-27 oct. 1999. WHO, Geneve. - 57 p.

176. Odintseva, V.E. Methods of diagnostics and treatment of intestinal helminth-protozoal invasions in children with diseases of intestinal tract / V.E. Odintseva, V.A. Aleksandrova // *Детские инфекции.* – 2010. - Т. 9. - № 2. – С. 58-61.

177. Osman, O.F. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis / O.F. Osman, L. Oskam, E.E. Zijlsta, N.C. Kroon, G.J. Schoone, E.T. Khalil, A.M. El-Hassan, P.A. Kager // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – No. – 10. – P. 2454-2407.

178. Oyebola, M. K. Genetic diversity and complexity of *Plasmodium falciparum* infections in Lagos, Nigeria / M. K. Oyebola, E.T. Idowu, Y.A. Olukosi, B.A. Iwalokun, C.O. Agomo, O.O. Ajibaye, M. Tola, A.O. Otubanjo // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* – 2014. – Vol. 4. – No. 1. – P. S87-91.

179. Parmley, S.F. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid AIDS patients by polymerase chain reaction / S.F. Parmley, F.D. Goebel, J.S. Remington // *J. Clin. Microbiol.* – 1992. – No. 11. – Vol. 30. – P. 3000-3002.

180. PCR Protocols : methods in molecular biology (Vol. 226) / John M.S. Bartlett, D. Stirling. – NY : Humana Press, 2nd ed., 2003. – 556 p.

181. PCR Strategies / M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky. – U.S.A. : Academic Press, 1995. – 373 p.

182. Pinar, A. Adaptation of a sensitive DNA extraction method for detection of *Entamoeba histolytica* by real-time polymerase chain reaction / A. Pinar, Y. Akyon, A. Alp, S. Erquven // *Microbiyol. Bul.* – 2010. - Vol. 44. – No. 3. – P. 453-459.

183. Premawansa, S. Plasmodium vivax: recombination between potential allelic types of the merozoite surface protein MSP1 in parasites isolated from patients / S. Premawansa, V.A. Snewin, E. Khouri, K.N. Mendis // *Exp. Parasitol.* – 1993. – 76: 192–199.

184. Prieto Tato, L.M. Visceral childhood leishmaniasis: diagnosis and treatment / L.M. Prieto Tato, E. La Orden Izquierdo, S. Guillen Martin, E. Salcedo Lobato, C. Garcia Esteban, I. Garcia-Bermrjo, J.T. Ramos Amador // *An Pediatr (Barc)*. – 2010. – Vol. 72. – No. 5. – P. 347-351.
185. Rahumatullah, A. Triplex PCR using new primers for the detection of *Toxoplasma gondii* / A. Rahumatullah, B.Y. Khoo, R. Noordin // *Exp. Parasitol.* – 2012. – Vol. 131. – No. 2. – P. 231-238.
186. Ramana, K.V. Molecular diagnostic methods and their application to patient care: clinical microbiologist's perspective / K.V. Ramana // *American J. of Clinical Med. Research.* – 2014. – Vol. 2. – No. 1. – P. 8-13.
187. Rao, J.R. Molecular diagnostics. Current technology and applications / J.R. Rao, C.C. Fleming, J.E. Moore. – UK: Caister Academic press (1 edition), 2006. – 260 p.
188. Reboredo-Fernandez, A. *Gardia* and *Cryptosporidium* in cetaceans on the European Atlantic coast / A. Reboredo-Fernandez, E. Ares-Mazas, J.A. Martinez-Cedeira, R. Romero-Suances, S.M. Caccio, H. Gomes-Couso // *Parasitol. Res.* – 2014. – Vol. 10. – P. 4235-4238.
189. Rochelle, P.A. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. / P.A. Rochelle, R. De Leon, M.H. Stewart, R.L. Wolf // *Appl Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63. – No. 1. – P. 106-114.
190. Salam, M.A. PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients on Bangladesh / M.A. Salam, D. Mondal, M. Kabir, A.R.M.S. Ekram, R. Haque // *Acta Tropica.* – 2010. – Vol. 113. – Iss. 1. – P. 52-55.
191. Santin, M. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals / M. Santin, M.T. Gomez-Munoz, G. Solano-Aguilar, R. Fayer // *Parasitol. Res.* – 2011. – Vol. 109. – No. 1. – P. 205-212.
192. Santos, T.R. Comparison of PCR with stained slides of bone marrow and nodes aspirates with suspect diagnosis for leishmaniasis / T.R. Santos, V.S. Carreira, H.F. Ferrari, M.A.B. Moreira, M.C.R. Luvizotto // *Acta Tropica.* – 2014. – Vol. 140. –

P. 137-140.

193. Sarkari, B. Molecular and serological evaluation of *Toxoplasma gondii* infection in reared Turkeys in Fars Province, Iran [Электронный ресурс] / B. Sarkari, Q. Asqari, N. Baqherian, A. Esfahani, M. Kalantari, I. Mohammadpour, M. Amerinia, F.S. Sarvestani // Jundishapur J Microbiol. – 2014. – 7 (7): e11598 Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368800>

194. Saugar, J.M. Application of real-time PCR for the of *Strongyloides spp.* In clinical samples in a reference center in Spain / J.M. Saugar, F.J. Merino, P. Martin-Rabadan, P. Fernandez-Soto, s, Ortega, T, Garate, E. Rodriques // Acta. Trop. – 2015. - Vol. 142. – P. 20-25.

195. Schaffner, F. Public Health significance of invasive mosquitoes in Europe / F. Schaffner, J.M. Medlock, W. Bortel / Clinical microbiology and Infection. – 2013. – Vol. 10 – P. 1469-1489.

196. Seo, J.H. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* by PCR in men attending a primary care urology clinic in South Korea [Электронный ресурс] / J.H. Seo, H.W. Yang, S.Y. Joo, S.M. Song, Y.R. Lee, J.S. Ryu, E.S. Yoo, W.K. Lee, H.H. Kong, S.E. Lee, W.J. Lee, Y.K. Goo, D.I. Chung, Y. Hong // Korean J Parasitol. – 2014. – 52 (5):551-5 Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352707>.

197. Shawn, V. Molecular diagnostic and parasitic disease / V. Shawn, B.S. Pritt // Clinics Labor. Med. – 2013. – Vol. 33. – Iss. 3. – P. 461-503.

198. Sirisena, U.M. Prevalence and identification of *Cryptosporidium* species in paediatric patients with diarrhea / U.M. Sirisena, W.M. Iddawela, F. Noordeen, S. Wickramasinghe // Ceylon Med J. – 2014. - № 3. – 75-78.

199. Smits, H.L. PCR amplification reactions in parasitology / H.L. Smits, r.A. Hartskeerl // J. Microbiol. Methods. – 1995. - Vol. 23. - Iss. 1. – P. 7-12.

200. Snounou, G. Identification of the four human malaria parasites species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infection / G. Snounou, S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaithong, K.N. Brown // Molecular Biochemical Parasitology. - 1993. – Vol.58 (2). – P.283-292.

201. Snounou, G. The use of PCR-genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial treatment / G. Snounou, H. Beck – *Parasitol. Today.* - 1998. – 14. – P. 462–467
202. Sorosjinda-Nunthawarasilp, P. Ecotope-based Entomological surveillance and molecular xenomonitoring of multidrug resistant malaria parasites in *Anopheles* vectors [Электронный ресурс] / P. Sorosjinda-Nunthawarasilp, A. Bhumiratana // *Interdiscip Perspect Infect Dis.* – 2014. – Режим доступа: [http:// dx. doi. org/ 10.1155/ 2014/ 969531](http://dx.doi.org/10.1155/2014/969531).
203. Stensvold, C.R. Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms / C.R. Stensvold, H.V. Nielsen // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50. – No. 2. – P. 540-541.
204. Stepanova, E.V. Significance of chronic toxoplasmosis in epidemiology of road traffic accidents in Russian Federation / E.V.Stepanova, A.V.Kondrashin, A.S.Sharipov, V.P.Sergieiev, L.F.Morozova, N.A.Turbabina, M.S.Maksimova, A.I.Brazhnikov, S.B.Shevchenko, E.N.Morozov // *PLoS ONE.* – 12(9). – e0184930.
205. Strelkova, M.V. A narrative review of visceral leishmaniasis in Armenia, Azerbaijan, Georgia, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Tajikistan, Turkmenistan, Uzbekistan, the Crimean Peninsula and Southern Russia / M.V.Strelkova, E.N.Ponirovsky, E.N.Morozov, E.N.Zhirenkina, S.A.Razakov, D.A. Kovalenko, L.F.Schnur, G.Schönian // *Parasites & Vectors.* – 2015. – Vol. 8. - No.1. – P.330.
206. Svet-Moldavsky, G.J., Shaghijian G.S., Litovchenko T.A., Ozeretskovskaya nN.N. Mouse transplantation immunity depressed by *Trichinella spiralis*. *Lancet*, 1969, v. 27615. P. 320
207. Taylor, B.J. Real-time PCR detection of *Plasmodium* directly from whole blood and filter paper samples [Электронный ресурс] / B.J. Taylor, K.A. Martin, E. Arango, O.M. Agudelo, A. Maestre, S.K. Yanow // *Malar. J.* – 2011. – Режим доступа: [http://www. ncbi. nlm.nih. gov/pmc/ articles/ PMC3171379/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3171379/).
208. Troll, H. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin

concentration and PCR / H. Troll, H. Marti, N. Weiss // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35. – No. – 7. – P. 1701-1705.

209. Tumolskaya, N.I. *Dirofilaria immitis* in a child from the Russian Federation/ N.Tumolskaya, E.Pozio, V. Rakova, V.Supriaga, V.Sergieiev, E.Morozov, L.Morozova, G.Rezza, S.Litvinov // Parasite. – 2016. – 23. – 37.

210. Turcekova, L. Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* in pregnant women / L. Turcekova, F. Spisak, P. Dubinsky, A. Ostro // Bratisl. Lek. Listy. – 2012. – Vol. 113. – No. 5. – P. 3017-310.

211. Vejdani, M. Immunofluorescence assay and PCR analysis of cryptosporidium oocysts and species from human fecal specimens / M. Vejdani, R. Mansour, Y. Hamzavi, S. Vejdani, N. Nazeri, A. Michaeli // Jundishapur J Microbiol. – 2014. – Vol. 7. – No. 6. – P. 1084-1088.

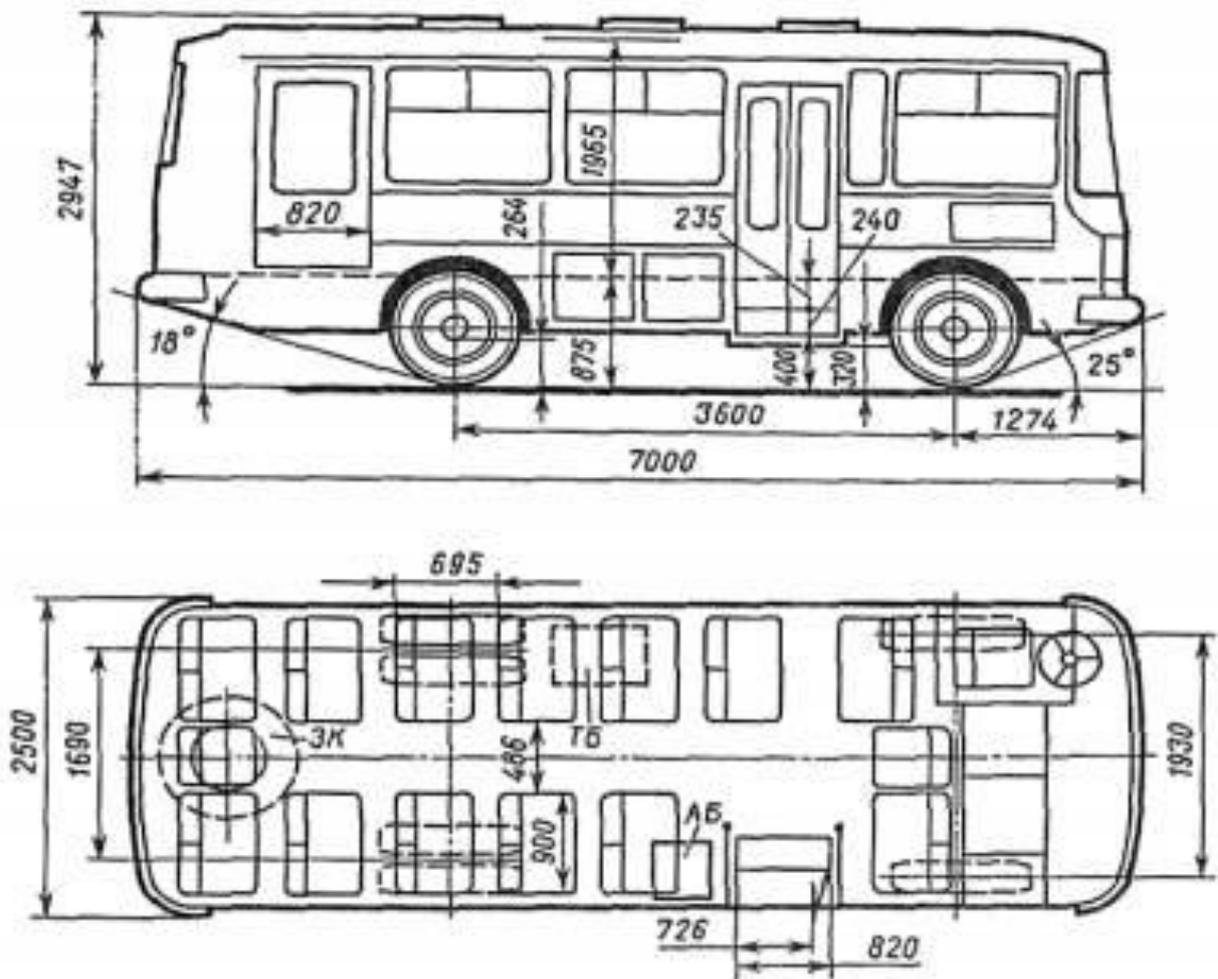
212. Veron, V. Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax*, и *P. malariae* in human blood samples / V. Veron, S. Simon, B. Carme // Experiment. Parasit. – Vol. 121. – Iss. 4. – P. 346-351.

213. Year, H. Molecular biology for detection and characterization of protozoan infections in humans / H. Year, MonZen Tzen, J. Dupouy-Camet // European J. Parasitol. – 2003. – Vol. 39. – Iss. 4. – P. 435-443.

214. Zakeri, S. Molecular surveillance of *Plasmodium vivax dhfr* and *dhps* mutations in isolates from Afganistan [Электронный ресурс] / S. Zakeri, M. Afsharpad, F. Ghasemi, A. Raeisi, N. Safi, W. Butt, H. Atta, N.D. Djadid // Malaria Journal. – 2010. – Режим доступа: <http://www.malariajournal.com/content/9/1/75>.

215. Zhu, H. Amebic lung abscess with coexisting lung adenocarcinoma: a unusual case of amebiasis / H. Zhu, X. Min, S. Li, M. Feng, G. Zhang, X. Yi // Int. j. Clin. Exp. Pathol. – 2014. – Vol. 7. – No. 11. - P. – 8251-8254.

Схема размещения мобильной паразитологической лаборатории в автобусе ПАЗ



Размеры автобуса ПАЗ-32053

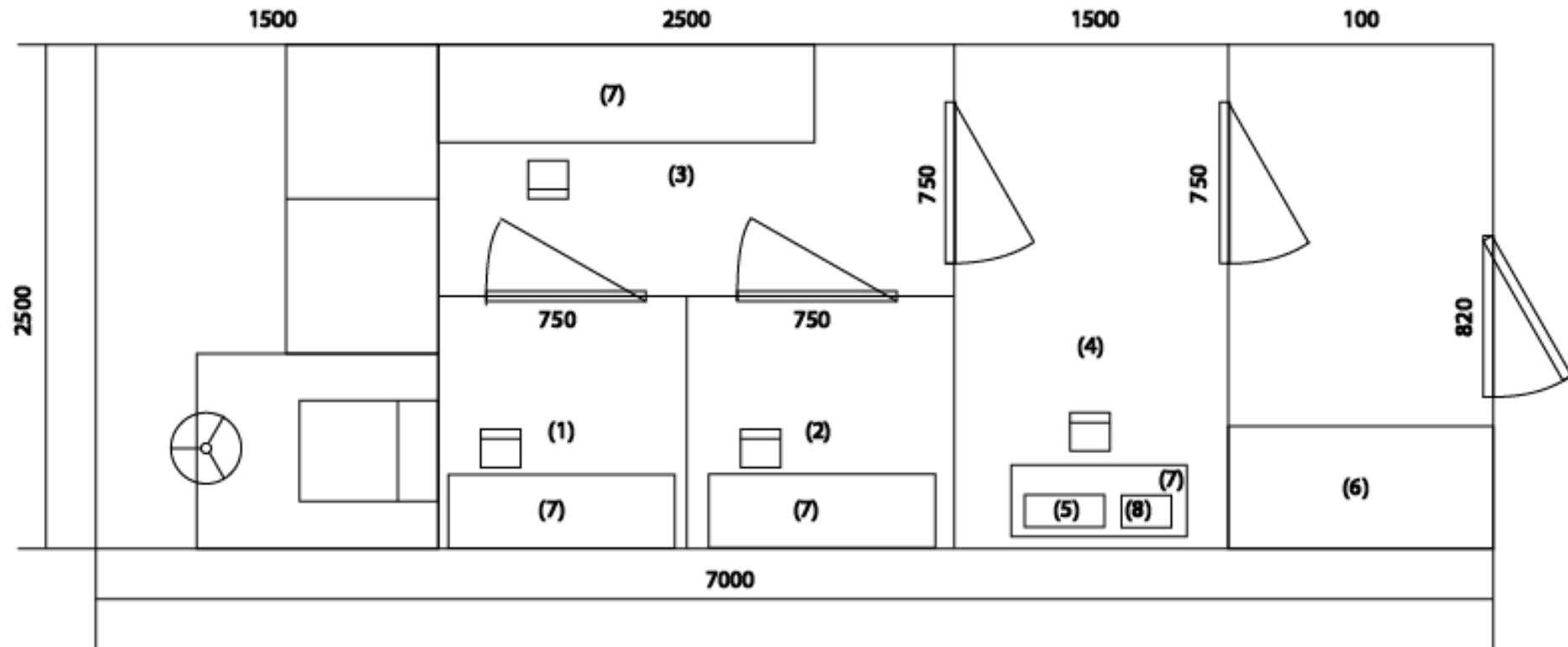


Схема размещения ПЦР-лаборатории

Обозначения:

1. Зона приема, разбора и первичной обработки материала; комната обеззараживания материала;
2. Зона подготовки проб и выделения НК;
3. Зона приготовления реакционных смесей, проведения ОТ и ПЦР;
4. Комната анализа результатов;
5. Микроскоп с фотоприставкой
6. Предбокс;
7. Лабораторный стол
8. Ноутбук

Патент «Мобильная паразитологическая лаборатория»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



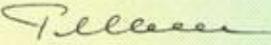
ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2568516

МОБИЛЬНАЯ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ

Патентообладатель(ли): *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU), Общество с ограниченной ответственностью Малое инновационное предприятие "Научно-образовательный паразитологический центр имени П.Г. Сергеева" (RU), Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский физико-технический институт (государственный университет)" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014130118
Приоритет изобретения **22 июля 2014 г.**
Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **19 октября 2015 г.**
Срок действия патента истекает **22 июля 2034 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности
 **Г.П. Извиев**



**Регистрационное удостоверение на тест-систему для детекции вируса ЗИКА в
клиническом материале**



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**
от 26 сентября 2017 года № РЗН 2017/6293

На медицинское изделие
Набор реагентов для обнаружения РНК вируса Зика (Zika virus) методом полимеразной цепной реакции "ФЛАВИСКРИН-ZIKV" для диагностики in vitro по ТУ 9398-801-17253567-2016

Настоящее регистрационное удостоверение выдано
Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственная фирма "ЛИТЕХ" (ООО НПФ "ЛИТЕХ"), Россия, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 3

Производитель
Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственная фирма "ЛИТЕХ" (ООО НПФ "ЛИТЕХ"), Россия, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 3

Место производства медицинского изделия
ООО НПФ "ЛИТЕХ", Россия, 107023, Москва, ул. Малая Семеновская д. 3А, стр. 2

Номер регистрационного досье № РД-11181/20303 от 29.04.2016

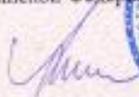
Вид медицинского изделия 109200

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 3

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение по форме, утвержденной приказом Росздравнадзора от 26 сентября 2017 года № 8240, допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения


М.А. Мурашко


8034434

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 26 сентября 2017 года № РЗН 2017/6293

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для обнаружения РНК вируса Зика (Zika virus) методом полимеразной цепной реакции "ФЛАВИСКРИН-ZIKV" для диагностики in vitro по ТУ 9398-801-17253567-2016, в составе:

1. Комплект 1, в составе:

- раствор 1 - 1 флакон (45 мл);
- раствор 2 - 1 флакон (40 мл);
- раствор 3 - 1 флакон (100 мл);
- раствор 4 - 1 флакон (40 мл);
- сорбент - 3 пробирки (по 1 мл);
- раствор для элюции - 5 пробирок (по 2 мл).

2. Комплект 2, в составе:

- реакционная смесь - 1 пробирка (1100 мкл);
- Taq-полимераза (20 ед/мкл) - 1 пробирка (60 мкл);
- обратная транскриптаза (100 ед/мкл) - 1 пробирка (12 мкл);
- разбавитель - 2 пробирки (по 2 мл);
- дитиотрейтол - 1 пробирка (15 мкл);
- ингибитор рибонуклеаз (20 ед/мкл) - 1 пробирка (60 мкл);
- ВКО - 2 пробирки (по 20 мкл) лиофилизированные;
- положительный контрольный образец - 2 пробирки (по 20 мкл) лиофилизированные;
- раствор для восстановления - 2 пробирки (по 2 мл).

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



М.А. Мурашко

0037444

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Биологический материал, рекомендуемый для лабораторных исследований методом полимеразной цепной реакции на разных стадиях паразитозов

№	Заболевание, шифр по МКБ-10	Возбудитель	Формы и стадии болезни	Места локализации возбудителя	Биологический материал	Достоверност ь обнаружения
1	2	3	4	5	6	7
ПРОТОЗООЗЫ						
	Малярия: Малярия, вызванная <i>Plasmodium falciparum</i> B50 Малярия, вызванная <i>Plasmodium vivax</i> B51 Малярия, вызванная <i>Plasmodium malariae</i> B52 Другие виды паразитологически подтвержденной малярии B53 Малярия неуточненная B54	<i>Plasmodium falciparum</i> ; <i>Plasmodium vivax</i> ; <i>Plasmodium malariae</i> ; <i>Plasmodium ovale</i> ; <i>Plasmodium knowlesi</i>	Инкубация	Печень, кровеносная система	Периферическ ая кровь	Крайне низкая
			Клинические проявления	Кровеносная система	Периферическ ая кровь	Высокая
			Осложнения	Кровеносная система	Периферическ ая кровь	Средняя
			Реконвалесценци я	Кровеносная система	Периферическ ая кровь	Высокая

1	2	3	4	5	6	7
	Висцеральный лейшманиоз B55.0	<i>Leishmania donovani</i> ; <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i> (= <i>L. infantum</i>)	Инкубация	Кровеносная система	Периферическая кровь	Крайне низкая
			Клинические проявления	Костный мозг	Пунктат костного мозга	Высокая
				Кровеносная система	Периферическая кровь	Низкая
			Осложнения (пост кала-азарный кожный лейшманиоз)	Кожные покровы	Соскоб кожи	Высокая
			Реконвалесценция	Костный мозг	Пунктат костного мозга	Высокая
Кровеносная система	Периферическая кровь	Низкая				
	Кожный лейшманиоз B55.1	<i>Leishmania major</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopica</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i>	На всем протяжении заболевания	Кожные покровы	Пунктат бугорка; Соскоб язвы	Высокая
	Кожно-слизистый лейшманиоз (эспундия) B55.2	<i>Leishmania brasiliensis</i> <i>L. peruviana</i>	На всем протяжении заболевания	Кожные и слизистые покровы	Пунктат бугорка; Соскоб язвы,	Высокая

1	2	3	4	5	6	7
					Соскоб слизистой с пораженной области	
	Африканский трипаносомоз: гамбийский трипаносомоз Западно- африканская сонная болезнь B56.0, родезийский трипаносомоз Восточно- африканская сонная болезнь B56.1	<i>Trypanosoma gambiense;</i> <i>Trypanosoma rhodesiense</i>	На всем протяжении заболевания	Кровеносная и лимфатическая система	Периферическ ая кровь, пунктат шанкра и лимфатически х узлов, спинномозгова я жидкость	Высокая
	Американский трипаносомозБолезн и Шагаса:Острая форма болезни Шагаса с поражением сердца B57.0;	<i>Trypanosoma cruzi</i>	На всем протяжении заболевания	Органы и ткани организма, кровеносная система	Периферическ ая кровь	Высокая

1	2	3	4	5	6	7
	<p>Острая форма болезни Шагаса без поражения сердца 57.1;</p> <p>Болезнь Шагаса (хроническая) с поражением сердца B57.2;</p> <p>Болезнь Шагаса (хроническая) с поражением пищеварительной системы B57.3;</p> <p>Болезнь Шагаса (хроническая) с поражением нервной системы B57.4;</p> <p>Болезнь Шагаса (хроническая) с поражением других органов B57.5</p>					
	Амебиаз A06.0-9	<i>Entamoeba histolytica</i>	Кишечная форма	Толстый кишечник	Свежий кал, биопсия пораженной	Высокая

1	2	3	4	5	6	7
					слизистой оболочки толстой кишки	
			Внекишечная форма	Органы и ткани организма, кровеносная система	Периферическая кровь	Средняя
	Трихомоноз кишечный A07.8	<i>Pentatrichomonas (Trichomonas) hominis</i>	На всем течении заболевания	Толстый кишечник	Свежий кал	Высокая
	Трихомоноз мочеполовой A59.0 Урогенитальный трихомоноз A59.8 Трихомоноз других локализаций A59.9 Трихомоноз неуточненный	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Острая стадия	Слизистая уретры, влагалища	Отделяемое уретры, влагалища, моча	Высокая
Хроническая стадия			Высокая			
Носительство			Средняя			
	Криптоспоридиоз A07.2	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Мерогония	Желудок, тонкий кишечник	Свежий кал	Низкая
			Гаметогония	Тонкий и толстый кишечник	Свежий кал	Низкая
			Спорогония	Толстый кишечник	Свежий кал, бронхиально-	Высокая

1	2	3	4	5	6	7
					альвеолярный лаваж	
Токсоплазмоз В58	<i>Toxoplasma gondii</i>	Врожденный	Острая стадия	Нервная и лимфатическая система, органы зрения, скелетные мышцы, миокард и др.	Периферическая кровь	Низкая
					Околоплодные воды, ликвор, биопсийный материал	Высокая
			Хроническая стадия	Нервная и лимфатическая система, органы зрения, скелетные мышцы, миокард и др.	Периферическая кровь	Низкая
		Приобретенный	Острая стадия	Нервная и лимфатическая система, органы зрения, скелетные мышцы, миокард и др.	Периферическая кровь	Низкая
					Ликвор, биопсийный материал	Высокая
			Хроническая стадия	Нервная и лимфатическая система, органы зрения, скелетные мышцы, миокард и др.	Периферическая кровь	Низкая

1	2	3	4	5	6	7
	Лямблиоз А07.1	<i>Lambliа intestinalis</i>	Острая стадия	Тонкий кишечник	Свежий кал Дуоденальное содержимое	Высокая
			Хроническая стадия			
	Бластоцистоз	<i>Blastocystis hominis</i>	На всем протяжении заболевания	Тонкий и толстый кишечник	Свежий кал	Высокая
ГЕЛЬМИНТОЗЫ						
	Описторхоз В66.0 Инвазия, вызванная кошачьим печеночным сосальщиком	<i>Opisthorchis felineus</i> ; <i>Opisthorchis viverrini</i>	Острая стадия Хроническая стадия	Гепатобилиарная система; поджелудочная железа	Дуоденальное содержимое Свежий кал	Высокая
	Клонорхоз В66.1 Болезнь, вызванная китайским печеночным сосальщиком	<i>Clonorchis sinensis</i>	Острая стадия Хроническая стадия	Гепатобилиарная система; поджелудочная железа	Дуоденальное содержимое Свежий кал	Высокая
	Фасциолез В66.3 Инвазия, вызванная овечьим печеночным сосальщиком	<i>Fasciola hepatica</i> ; <i>Fasciola gigantica</i>	Острая (миграционная) стадия Хроническая стадия	Печень; желчевыводящие пути	Дуоденальное содержимое Свежий кал,	Высокая
	Фасциолез В66.5 Кишечный дистоматоз	<i>Fasciola buski</i>	Бессимптомная форма; Легкая форма;	Желудочно- кишечный тракт	Свежий кал; рвотная масса, фрагменты	Высокая

1	2	3	4	5	6	7
			Среднетяжелая форма; Тяжелая форма		гельминта	
Инвазии, вызванные другими двуустками В66.8	Эхиностомоз	<i>Echinostoma lindoense</i> , <i>E. ilocanum</i> , <i>E. hortense</i>	На всем протяжении заболевания	Тонкий кишечник	Свежий кал	Высокая
	Гетерофиоз	<i>Heterophyes heterophyes</i>		Тонкий кишечник; мозг	Свежий кал (яйца), фрагменты гельминта	Высокая
	Метагонимоз	<i>Metagonimus yokogawai</i>		Тонкий кишечник	Свежий кал(яйца),	Высокая
	Нанофиетоз	<i>Nanophyetus schikhobalowi</i>		Тонкий кишечник	Свежий кал	Высокая
	Уотсониоз	<i>Watsonius watsoni</i>		Тонкий кишечник	Свежий кал	Высокая
Дикроцелиоз В66.2	<i>Dicrocoelium dendriticum (lanceatum)</i>	На всем протяжении заболевания	Гепатобилиарная система	Дуоденальное содержимое Свежий кал	Высокая	
Парагонимоз В66.4 Инвазия, вызванная разными видами <i>Paragonimus</i> Болезнь, вызванная	<i>Paragonimus westermanii</i>	Острая стадия Хроническая стадия	Тонкий кишечник Легкие	Свежий кал Мокрота	Высокая	

1	2	3	4	5	6	7
	легочным сосальщиком Легочный дистоматоз					
	Мочеполовой шистосомоз B65.0	<i>Schistosoma haematobium</i>	Острая стадия	Мочеполовая система, печень, кровеносная система	Биоптат паразитарных гранулем мочевого пузыря, моча свежая, суточная	Высокая
			Хроническая стадия			
	Кишечный шистосомоз B65.1	<i>Schistosoma mansoni</i>	Острая стадия	Толстый кишечник, печень, кровеносная система	Свежий кал, биоптат слизистой оболочки толстой кишки	Высокая
			Хроническая стадия			
	Азиатский шистосомоз B65.2	<i>Schistosoma japonicum</i>	Острая стадия	Толстый кишечник, печень, кровеносная система	Свежий кал, биоптат слизистой оболочки толстой кишки	Высокая
			Хроническая стадия			
	Дифиллоботриоз B70.0 Инвазия, вызванная	<i>Diphyllobotrium latum</i>	На всем течении заболевания	Тонкий кишечник, толстый кишечник	Свежий кал, фрагменты гельминта,	Высокая

1	2	3	4	5	6	7
	<i>Diphyllobothrium (latum) (pacificum)</i> (половозрелой формой) Лентец широкий (инвазия)				перипанальный соскоб	
	Тениаринхоз В68.1 Бычий или невооруженный цепень (инвазия)	<i>Taeniarhynchus saginatus</i>	На всем течении заболевания Субклиническое течение	Тонкий кишечник, толстый кишечник, перипанальные складки	Фрагменты гельминта, перипанальный соскоб Свежий кал (яйца)	Высокая Средняя
	Тениоз В68.0 Солитер свиной или вооруженный (инвазия) цепень	<i>Taenia solium</i>	На всем течении заболевания Субклиническое течение	Тонкий кишечник, толстый кишечник	Свежий кал, фрагменты гельминта перипанальный соскоб	Высокая
	Цистицеркоз Цистицеркоз ЦНС В69.0, Цистицеркоз глаза В 69.1, Цистицеркоз других локализаций В 69.8, Цистицеркоз неутонченный В 69.9	Личинка <i>Taenia solium</i> – <i>Cysticercus cellulose</i>	На всем течении заболевания	Подкожная клетчатка, головной мозг, глаза, мышцы, сердце, печень, легкие, брюшина	Биоптат цистицеркозных узелков (в случае подкожной локализации), спинномозговая жидкость	Высокая

1	2	3	4	5	6	7
	<p>Эхинококкоз Инвазия печени, вызванная <i>Echinococcus granulosus</i> B67.0, Инвазия легкого вызванная <i>Echinococcus granulosus</i> B67.1, Инвазия кости, вызванная <i>Echinococcus granulosus</i> B67.2, Инвазия другой локализации и множественный эхинококкоз вызванный <i>Echinococcus granulosus</i> B67.3, Инвазия, вызванная <i>Echinococcus granulosus</i>, неутонченная B67.4</p>	<p><i>Echinococcus granulosus</i></p>	<p>На всем течении заболевания</p>	<p>Печень, легкие, брюшина, сальник, мышцы, селезенка, почки, кости, центральная нервная система</p>	<p>Постоперацион ный материал кисты, мокрота, дуоденальное содержимое, моча</p>	<p>Высокая</p>

1	2	3	4	5	6	7
	<p>Альвеококкоз Инвазия печени, вызванная <i>Echinococcus</i> <i>multilocularis</i> D67.5, Инвазия другой локализации и множественный эхинококкоз, вызванные <i>Echinococcus</i> <i>multilocularis</i> B67.6, Инвазия, вызванная <i>Echinococcus</i> <i>multilocularis</i>, неуточненная B67.7</p>	<p><i>Echinococcus</i> <i>multilocularis</i></p>	<p>На всем протяжении заболевания; Субклиническое течение</p>	<p>Печень, легкие, брюшина, сальник, мышцы, селезенка, почки, кости, центральная нервная система</p>	<p>Постоперацион ный материал кисты</p>	<p>Высокая</p>
	<p>Спарганоз Инвазия, вызванная: <i>Sparganum</i> (<i>mansoni</i>) (<i>proliferum</i>) личинками <i>Spirometra</i> Личиночный дифиллоботриоз Спирометроз B70.1</p>	<p><i>Spirometra</i> <i>erinacei</i> <i>europaei</i> плероцеркоид <i>Sparganum</i> (<i>mansoni</i>) (<i>proliferum</i>)</p>	<p>На всем протяжении заболевания</p>	<p>Подкожная клетчатка, внутренние органы, органы зрения, головной мозг</p>	<p>Постоперацион ный материал (личинка)</p>	<p>Высокая</p>

1	2		3	4	5	6	7
Гименолепидоз В71.0	Карликовый цепень (инвазия)	<i>Hymenolepis nana</i>	На всем протяжении заболевания; Субклиническое течение	Тонкий кишечник	Свежий кал (яйца) Фрагменты гельминта	Высокая	
	Крысиный цепень (инвазия)	<i>Hymenolepis diminuta</i>					
Дипилидиоз В71.1 Собачий или тыквовидный цепень (инвазия)		<i>Dipylidium caninum</i>	На всем протяжении заболевания	Желудочно-кишечный тракт	Свежий кал (яйца) Фрагменты гельминта	Высокая	
Аскаридоз В77: Аскаридоз с кишечными осложнениями В77.0, Аскаридоз с другими осложнениями В77.8		<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ранняя (миграционная)	Легкие, Печень (образование паразитарных гранулем)	Мокрота	Низкая	
			Поздняя (кишечная)	Желудочно-кишечный тракт	Свежий кал (яйца), Половозрелая особь	Высокая	
Трихуроз (Трихоцефалез) В79		<i>Trichocephalus trichiurus</i>	На всем протяжении заболевания; Субклиническое течение	Желудочно-кишечный тракт	Свежий кал (яйца), фрагмент гельминта	Высокая	

1	2	3	4	5	6	7
	Анкилостомидозы: Анкилостомоз В76.0 Некатороз В76.1 Другие анкилостомидозы В76.9	<i>Ancylostomadu odenale Necatorameric anus</i>	На всем протяжении заболевания	Двенадцатиперстна я и начальная часть тощей кишки	Свежий кал Дуоденальное содержимое (яйца)	Высокая
	Стронгилоидоз В78 Кишечный стронгилоидоз В78.0 Кожный стронгилоидоз В78.1 Диссеминированный стронгилоидоз В78.7 В78.9 Стронгилоидоз неуточненный	<i>Strongyloidesst ercoralis</i>	Кишечная Дуоденально- желчнопузырная Нервно- аллергическая Смешанная	Желудочно- кишечный тракт Диссеминация за пределы ЖКТ	Свежий кал Дуоденальное содержимое Мокрота Биоптат слизистой желудка и кишечника Моча (при генерализованн ой форме) (личинка)	Высокая
	Энтеробиоз В80	<i>Enterobius vermicularis</i>	На всем протяжении заболевания	Перианальные складки	Перианальный соскоб Свежий кал	Высокая Средняя
	Трихинеллез Инвазия, вызванная видами <i>Trichinella</i> Трихиноз В75	<i>Trichinella spiralis; Trichinella pseudospiralis</i>	Кишечная	Тонкий кишечник	Свежий кал Периферическая кровь	Низкая
			Миграционная	Кровеносная система	Периферическая кровь	Низкая

1	2	3	4	5	6	7
			Мышечная	Поперечно-полосатая мускулатура	Биоптат дельтовидной или икроножной мышцы	Высокая
Вухерериоз B74.0	<i>Wuchereria bancrofti</i>	Бессимптомная	Кровеносная и лимфатическая система	Периферическая кровь	Низкая	
		Остро рецидивирующая		Периферическая кровь		Высокая
		Хроническая		Периферическая кровь, моча, водяночная жидкость, пунктат лимфатических узлов	Высокая	
		Тропическая легочная эозинофилия		Периферическая кровь	Низкая	
Бругиоз: Филяриатоз, вызванный <i>Brugia</i>	<i>Brugia malayi</i> ;	Бессимптомная	Кровеносная и лимфатическая система	Периферическая кровь	Низкая	

1	2	3	4	5	6	7
	<i>malayi</i> B74.1, Филяриатоз, вызванный <i>Brugia timori</i> B74.2	<i>Brugia timori</i>	Остро рецидивирующая		Периферическая кровь	Высокая
Хроническая			Периферическая кровь, моча, водяночная жидкость, пунктат лимфатических узлов		Высокая	
Тропическая легочная эозинофилия			Периферическая кровь		Низкая	
	Онхоцеркоз: Инвазия, вызванная <i>Onchocerca volvulus</i> Речная слепота B73	<i>Onchocerca volvulus</i>	На всем протяжении заболевания	Кожа, органы зрения, лимфатическая система	Биоптат подкожных узелков, содержащих гельминтов	Высокая
	Лоаоз: Калабарская опухоль Африканская болезнь, вызванная глазным червем Инвазия, вызванная <i>Loa loa</i>	<i>Loa loa</i>	Обострение Ремиссия	Кожа, подкожная клетчатка, конъюнктура глаза, серозные оболочки, мочеполовая	Периферическая кровь	Низкая

1	2	3	4	5	6	7	
					Фрагменты гельминта		
				система		Высокая	
					Спинномозгова я жидкость	Низкая	
	Мансонел лез (филярио з) В74.4: Инвазия, вызванна я <i>Mansonella</i> <i>ozzardi</i> . <i>perstans</i> . <i>streptocerc</i> <i>ca</i>	Мансонелл ез	<i>Mansonella</i> <i>ozzardi</i>	На всем протяжении заболевания	Кожа и подкожная клетчатка (половозрелые паразиты), коллагеновый слой кожи (микрофилярии)	Периферическая кровь	Высокая
		Акантохей лонематоз	<i>Mansonella</i> <i>perstans</i>	На всем протяжении заболевания	Брыжейка тонкой кишки, околопочечная забрюшинная соединительная ткань, перикард, плевральная полость, конъюктива и периорбитальная	Периферическая кровь Спинномозгова я жидкость Фрагменты гельминта	Высокая

1	2	3	4	5	6	7
				область(половозрелые паразиты), ЦНС (микрофилярии)		
	Стрептоце рkoz	<i>Mansonella streptocerca</i>	На всем протяжении заболевания	Кожа и подкожная клетчатка (половозрелые паразиты), коллагеновый слой кожи (микрофилярии)	Биоптат пораженной кожи	Высокая
	Дирофиляриатоз B74.8		На всем протяжении заболевания	Подкожная клетчатка Параорбитальная область	Периферическая кровь,	Высокая при наличии в организме разнополых особей. При наличии особей одного пола ПЦР не информативна
					Пунктат из опухоли (микрофилярии) Фрагменты гельминта	Высокая

1	2	3	4	5	6	7
		<i>Dirofilaria immitis</i>	На всем протяжении заболевания	Легкие, сердце	Периферическая кровь	Высокая при наличии в организме разнополых особей. При наличии особей одного пола ПЦР не информативна
					Фрагменты гельминта Биоптат тканей	Высокая
	Дракункулез В72 Ришта Инвазия, вызванная <i>Dracunculus medinensis</i>	<i>Dracunculus medinensis</i>	На всем протяжении заболевания	Подкожная клетчатка, суставы	Фрагменты гельминта, пунктат из папулы (личинки)	Высокая
	Токсокароз (солитарная гранулема) Висцеральная форма заболеваний, вызываемых миграцией личинок	<i>Toxocara canis</i>	Острый Хронический Латентный	Висцеральная Глазная	Периферическая кровь	Никакая

1	2	3	4	5	6	7
	гельминтов (висцеральная <i>Larva migrans</i>) B83.0				Гистологический материал (гранулемы)	Высокая
	Анизакидоз B81.0	Личинки нематод семейства <i>Anisakidae</i> , родов <i>Anisakis</i> , <i>Contracaecum</i> , <i>Pseudoterranova</i> , <i>Hysterothylacium</i>	Острая Хроническая	Желудок, Кишечник	Биопсия слизистой желудка и тонкой кишки (личинки)	Высокая
					Рвотные массы (личинки)	Крайне низкая
	Кишечный капилляриоз B81.1 Капилляриоз БДУ Инвазия, вызванная <i>Capillaria philippinensis</i>	<i>Capillaria philippinensis</i>	На всем протяжении заболевания	Слизистая оболочка тощей кишки	Биоптат кишечника (половозрелые особи и личинки), свежий кал (яйца)	Высокая

1	2	3	4	5	6	7
	Печеночный капилляриоз Другие уточненные гельминтозы В83.8	<i>Capillaria</i> (<i>Hepaticola</i>) <i>hepatica</i>	На всем протяжении заболевания	Печень	Биоптат печеночной ткани (яйца)	Высокая
	Легочный капилляриоз (томинкоз) Гельминтозы неустановленной этиологии В83.9	<i>Capillaria</i> (<i>Thominx</i>) <i>aerophilus</i>	На всем протяжении заболевания	Легкие, бронхи, ЖКТ	Мокрота, кал	Высокая
	Диактофимоз Гельминтозы неустановленной этиологии В83.9	<i>Dioctophyme</i> <i>renale</i> (<i>свайник-</i> <i>великан</i>)	На всем протяжении заболевания	Желудочно- кишечный тракт, почки, печень	Моча, асцитическая жидкость (яйца)	Высокая
	Гнатостомоз В83.1	<i>Gnathostoma</i> <i>spinigerum</i>	На всем протяжении заболевания	Кожа Подкожная клетчатка Желудок Легкие Печень ЦНС	Биопсия подкожных узлов, слизистой желудка, легких	Высокая
Параорбитальная область				Посоперационн ый материал (личинка)	Высокая	