

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Медико-профилактический факультет с отделением микробиологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии**

Фаттахова Радмила Рустамовна

Сравнительная оценка обсемененности *Giardia lamblia*
различных объектов внешней среды для оценки степени их
инфекционной опасности

Руководитель:
профессор, д.м.н.

А.Р. Мавзютов

Уфа 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	1
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.Определение <i>Giardia lamblia</i>	6
1.1.Систематическое положение <i>Giardia lamblia</i>	6
1.2.Морфология <i>Giardia lamblia</i>	7
1.3.Экология <i>Giardia lamblia</i>	9
1.4.Эпидемиология . <i>Giardia lamblia</i>	10
1.5.Патогенез <i>Giardia lamblia</i>	12
1.6.Клиническая картина <i>Giardia lamblia</i>	14
1.7.Значение в патологии животных и человека.....	17
1.8.Природный резервуар <i>Giardia lamblia</i>	19
2.1.Лабораторная диагностика лямблиозной инвазии	19
2.1.1.Иммунологическая (серологическая) диагностика лямблиоза.....	21
2.1.2.Копровоскопия.....	22
3.1.Микроскопические методы диагностики лямблиоза.....	22
3.1.1.Исследование дуоденального содержимого путем микроскопии осадка.....	23
4.1.Методы седиментации.....	23
4.1.1.Формалин – эфирный метод.....	23
4.1.2.Уксусно – эфирный метод.....	26
4.1.3.Модификация метода седиментации с применением одноразовых концентратов PARASEP.....	29
4.1.4.Модификация метода седиментации с применением системы Real.....	30
5.1.Методы детекции во внешней среде.....	31
5.1.1.Метод последовательной фильтрации через систему прозрачных аналитически – трековых мембран (АТМ.).....	32

5.1.2.Метод иммуномагнитного разделения и мечения флуоресцирующими антителами (IMS).....	33
6.1.Полимеразная цепная реакция.....	39
7.1.Профилактика.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1.Материалы исследования	43
2.2. Метод осаждения	44
2.2.1.Микроскопический метод исследования	45
2.3.Генетические методы исследования.	
2.3.1.Выделение ДНК.....	45
2.3.2.Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	47
2.3.3.Электрофоретический анализ продуктов амплификации.....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1.Микроскопический метод исследования обсемененности <i>Giardia lamblia</i> объектов окружающей среды в ходе оценки степени их инфекционной опасности.....	52
3.2.ПЦР анализ.....	53
3.3.Сравнение методов микроскопии и ПЦР.....	56
ВЫВОДЫ.....	57
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	58
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	68

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

ТБЕ – трис-боратный буфер

УФ – ультрафиолет

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Лямблиоз является актуальной проблемой как у детей, так и у взрослых, его распространенность в детской популяции составляет 355 случаев на 100000 детского населения. Актуальность лямблиоза у детей во многом обусловлена тем, что его клинические проявления часто маскируются различными вариантами гастроэнтерологической патологии, включая функциональные нарушения желудочно - кишечного тракта, синдромы избыточного роста кишечной микрофлоры в тонком кишечнике, а также развитием аллергических заболеваний.

Источником лямблиозной инвазии является инвазированный человек, который выделяет в окружающую среду зрелые инвазионные цисты. Сравнительно плотная, хорошо очерченная оболочка цист позволяет переносить различные воздействия внешней среды без всякого вреда для себя.

Цисты хорошо приспособляются и сохраняются в окружающей среде: в водопроводной и прудовой воде способны выжить в течение 1 – 3 месяцев при температуре воды от 4 до 20С, в сточной воде в летнее время цисты выживают до 3 – 4 месяцев, в почве способны выживать до 3 недель, на продуктах питания сохраняют жизнеспособность от нескольких часов до нескольких суток. Цисты устойчивы к действию хлора, переносят замораживание и нагревание до 50 градусов.

Так как цистные формы лямблий являются основным фактором передачи лямблиоза, а в распространении большую роль играют объекты окружающей среды необходимо более подробно изучить обсемененность *Giardia lamblia* в объектах окружающей среды.

Цель исследования

Произвести сравнительную оценку обсемененности *G.lamblia* различных объектов окружающей среды для изучения степени их инфекционной опасности.

Задачи исследования

1.Сбор клинического материала в виде смывов с предметов обихода, собранные из детских дошкольных учреждений. Микроскопия микропрепаратов, для определения наличия или отсутствия цист *Giardia lamblia*.

2.Выделение ДНК микроорганизмов из собранного клинического материала.

3.Подбор и синтез праймеров.

4.Проведение ПЦР-анализа выделенной ДНК при помощи подобранных праймеров.

5.Анализ преимуществ и ограничений существующих методов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Giardia lamblia*. Определение

Giardia lamblia впервые была описана в 1681 г. Антони Ван Левенгуком, который обнаружил паразита в собственном стуле, однако особое внимание к лямблиозу как патологическому состоянию было привлечено в начале 1970-х гг. *G. lamblia* вызывает кишечные расстройства у людей, употребляющих зараженную воду [Barbour A.G., Nichols C.R., Fukēashima T, 1976], будучи распространенной по всему миру, но в наибольшей степени – в тропиках и субтропиках [Jones J.E. Hausler W.J., 1988.].

1.1. Систематическое положение *Giardia lamblia*

Лямблиоз (гиардиоз) - антропонозное протозойное заболевание, протекающее как бессимптомное паразитоносительство или в виде манифестных форм с аллергическими, токсическими и диспепсическими проявлениями. Возбудитель впервые обнаружил профессор Харьковского университета Д.Ф. Лямбль (1859) в слизи кишечника детей. По предложению Р. Бланшара (1888) простейшее классифицировали как *Lamblia intestinalis*. В 1915 г. при пересмотре систематики простейших возбудитель отнесен к роду *Giardia*, названному в честь французского биолога А. Жиардиа. Однако в отечественной практике утвердились устаревшие названия паразита (*Lamblia intestinalis*) и вызываемого им заболевания. [Покровский В.И. , Пак С.Г. , Брико Н.И., Данилкин Б.К , 2013]

В настоящее время морфологически дифференцируются 6 видов лямблий: *Giardia intestinalis*, *Giardia muris*, *Giardia agilis*, *Giardia microti*, *Giardia ardeae*, *Giardia psittaci*. *Giardia intestinalis* (*G. duodenalis*, *L. intestinalis*) может вызвать инфекцию у человека и различных видов млекопитающих. Внедрение в практику молекулярных генетических исследований позволило идентифицировать 8 основных генетических

подтипов внутри видового комплекса *L. intestinalis* (A–H). Лямблиоз человека связан с двумя подтипами. А и В лямблий, внутри которых также имеются внутригрупповые различия (AI–AIII, BIII–BIV) [С. В. Бельмер, В. П. Новикова, 2013] Таким образом, при проведении эпидемиологических исследований и оценке риска необходимо различать генотипы, вызывающие заболевание у человека, от остальных генотипов. Из семи видов, входящих в род *Giardia*, только *G. lamblia* заражает человека и некоторых других млекопитающих. Более того, изоляты *G. lamblia* разделяются на семь групп. Разделение основано на различиях в генах, кодирующих глутамат дегидрогеназу (gdh), малую субъединицу рРНК и триозефосфат изомеразе. Генотипы А и В заражают людей и большой круг животных, к которым относятся домашний скот, кошки, собаки и дикие млекопитающие. Генотип А разделяется на подгруппы I и II. Генотип В разделяется на подгруппы III и IV. Генотипические разновидности С, D, E, F и G паразитируют на домашних животных и диких млекопитающих [Bertrand, L. Albertini, J. Schwartzbrod, 2005]

Классификация:

Царство Protozoa

Подцарство Archezoa

Тип Metamonada (кишечные жгутиконосцы)

Класс Tricomonadea

Порядок Diplomonadida

Вид *Giardia lamblia* [P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Tenover, R. H. Tenover, 2003]

1.2.Морфология

Вегетативная форма *Giardia lamblia* — крупная подвижная клетка длиной 12-15 мкм и шириной 8—10 мкм, которая имеет билатеральную симметрию и грушевидную форму с заостренным (суженным) хвостовым

концом. Спереди в расширенной части трофозои́та тело слегка уплощено и несколько вдавлено в зоне присасывательного диска, так что в боковой проекции лямблия имеет вид ковша. За счет 4 пар жгутиков трофозоит активно подвижен и в зависимости от поступательного или вращательного движения вокруг продольной оси можно наблюдать грушевидную или ковшеобразную форму лямблий.

В окрашенных препаратах на светлом фоне присасывательного диска отчетливо видны два симметрично расположенных овальных ядра с крупными, окруженными светлой зоной эндосомами. Ядра смещены к вентральной поверхности клетки, а между ними залегают кинетосомы всех 8 жгутиков трофозои́та, собранные в две симметричные группы. Передние, боковые, центральные и хвостовые (задние) жгуты имеют протяженные внутрицитоплазматические участки — аксонемы. Эти структуры, так же как и поверхность присасывательного диска, образованы трубчатыми фибриллами (микротрубочками), из которых построены и медиальные тела лямблии, лежащие позади диска почти перпендикулярно продольной оси тела лямблии. То есть система трубчатых микрофибрилл трофозои́та обеспечивает постоянство своеобразной формы тела лямблий.

Цисты лямблий имеют овальную форму. Передний конец цисты более узкий по сравнению с задним. Близ него располагаются ядра: два в незрелых цистах и четыре — в зрелых. В ядрах находятся крупные круглые кариосомы, окруженные светлой неокрашенной зоной. В цитоплазме заметны также тонкие нити аксонем, остатки жгутиков и парабазальные тела. Оболочка цисты часто отстает от цитоплазмы и между ними образуется серповидная щель. Длина их 12-14 мкм, ширина 6—10 мкм. Раствором Люголя они окрашиваются в коричневый или желтый цвет. Дегенеративные формы лямблий несколько мельче по размерам, окрашиваются в серо-голубой цвет («голубые цисты»), их внутренняя структура плохо различима.

1.3.Экология

Giardia lamblia - возбудитель лямблиоза - оригинален тем, что обладает удвоенным набором ядер, жгутиков и других органоидов. Лямблии имеют грушевидную форму тела. На переднем конце – 4 пары жгутиков. Посередине лежат два опорных стержня, которые делят тело на 2 симметричные половины. Все структуры, в том числе ядра, присасывательные диски – парные.

В течение жизненного цикла происходит чередование вегетативных форм (трофозоит) и цист. Трофозоит имеет грушевидную форму, выпуклую дорсальную и вогнутую вентральную поверхности, причем последняя обеспечивает диффузию питательных веществ. Размер тропозоида колеблется от 9,5 до 21 мкм в длину и от 5 до 15 мкм в ширину. Он имеет два ядра и четыре пары жгутиков. Трофозоиты очень подвижны, а траекторию их движения иногда сравнивают с таковой падающего листа. Трофозоиты размножаются продольным делением. Цисты имеют овальную форму, а размер – от 8 до 12 мкм в длину и от 7 до 10 мкм в ширину. Зрелая циста содержит четыре ядра как результат деления двухъядерной клетки. Цисты сохраняют жизнеспособность в прохладной и влажной среде, выживая в воде до 3 мес. Они также могут выживать в условиях стандартных концентраций хлора, используемого в системах очистки воды. Цисты попадают в организм с загрязненной пищей или водой и проходят невредимыми через желудок. Эксцистирование происходит в двенадцатиперстной кишке, в результате чего из одной цисты формируются два тропозоида. [Jones J.E. Balows A., Hausler W.J., Ohashi M., Turano A, 1988]

G. lamblia обитает в двенадцатиперстной кишке и верхней части тощей кишки, где щелочной уровень pH является благоприятным для ее роста. Трофозоиты прочно прикрепляются к кишечной поверхности микроворсинок, вторжение их в слизистый и подслизистый слои кишечной стенки происходит крайне редко [Saha T.K., Ghosh T.K 1977] Цисты *G.lamblia* широко распространены в поверхностных водах во всем мире, их

концентрации находятся в диапазоне 0,01 - 100 цист на литр, и они выживают в течение максимум 2 месяцев в воде при температуре 8°C. Цисты чрезвычайно стойки к дезинфекции, в том числе хлорсодержащими препаратами, и их сложно удалить стандартной фильтрацией.

1.4.Эпидемиология

Резервуар и источник инвазии - больной человек или животное с манифестной или субклинической формой лямблиоза. Период контагиозности человека начинается через 7-9 дней после инвазирования и длится месяцами. Выделение цист происходит волнообразно, прерывисто. Наиболее опасен больной в период стихания диареи, так как именно в это время начинает выделяться пропативная стадия возбудителя (цисты). В 1 г фекалий может содержаться до 20 млн. инвазионных цист. Механизм передачи - фекально-оральный, пути передачи - пищевой, водный и контактно-бытовой. Большинство вспышек лямблиоза носит водный характер. Высокий риск заболевания будет при купании в открытых водоемах и бассейнах, зараженных цистами лямблий. Паразиты могут передаваться и через пищевые продукты, на которых цисты лямблий сохраняют жизнеспособность от 6 ч до 2 суток. Известные вспышки лямблиоза пищевого характера связаны в основном с массивным загрязнением цистами лямблий продуктов, которые не подвергались термической обработке (салаты, пудинги и др.). Возможна также и передача от человека к человеку. Этот путь инфицирования особенно широко распространен в ДДУ, где инвазированность лямблиями значительно выше, чем среди взрослых. В качестве факторов передачи основную роль выполняют руки детей и персонала, а также полы, ковры, игрушки, поверхность мебели и предметов в туалетах. Возможна передача лямблий половым путем среди мужчин-гомосексуалистов. [Покровский В.И. , Пак С.Г. ,Брико Н.И., Данилкин Б.К 2013 год]

По данным ВОЗ в период между 2000 и 2010 гг. утроилось число случаев основных болезней водного происхождения, в том числе и лямблиоза. По имеющимся оценкам, 1 млн детей дошкольного возраста и более 3 млн школьников в Европейском регионе поражены данными болезнями. Это отражает необходимость в обеспечении элементарной гигиены, водоснабжения и санитарии в жилищах и других местах длительного нахождения детей. [World Health Organization, 2012]

В странах Европейского экономического пространства заболеваемость практически не меняется, поэтому для оценки заболеваемости ведется наблюдение за теми, кто возвращается из природных очагов лямблиоза, куда относится и Россия. Исследование, проведенное среди шведских туристов, показало, что чаще всего заражение происходило в Российской Федерации, за ней следовали Румыния, Турция, республики бывшей Югославии и Болгария. По предположению исследователей, указанные различия обусловлены тем, что развертывание гостиниц и туристических комплексов опередило развитие вспомогательной инфраструктуры, что привело к недостаточному снабжению очищенной пресной водой. [R. Coker, R. Atun, M. McKee, 2008]

Основным источником инвазии является человек, зараженный лямблиями. Помимо человека этот вид лямблий может быть обнаружен у различных млекопитающих: собак, кошек, овец, крупного рогатого скота, медведей, барсуков и т.д., а также птиц и рептилий. Некоторые из животных, вероятно, являются резервуаром этой инфекции для человека.

Минимальная заражающая доза составляет от 10 до 100 цист. Период выделения у человека цист начинается в среднем на 9-12 сутки после заражения и может длиться многие месяцы. Препатентный период укорачивается при заражении большими дозами возбудителя. Выделение цист происходит волнообразно, прерывисто. Периоды выделения чередуются с периодами затихания процесса, при этом продолжительность пауз между выделением цист может составлять от 1 до 17 суток. Наиболее

опасен как источник инвазии больной в период стихания диареи, т.к. именно в это время начинает выделяться пропативная стадия возбудителя - цисты. В одном грамме фекалий может содержаться до 20 млн инвазионных цист.

Цисты лямблий устойчивы и способны сохраняться во внешней среде до 66 дней при условии увлажнения. Оптимальными являются температура 2-6 °С и относительная влажность воздуха 80-100%. В водопроводной и прудовой воде цисты лямблий выживают в течение 1-3 месяцев при температуре воды от 4 до 20 °С. В сточной воде в летнее время цисты лямблий выживают до 3-4 месяцев. На продуктах питания цисты сохраняются жизнеспособными несколько часов, а при большой влажности продукта - и до нескольких суток.

Кипячение приводит к мгновенной гибели цист, при температуре 55 °С они погибают через 5 мин. Высушивание на воздухе в течение 24 ч приводит к полной гибели цист лямблий. Ультрафиолетовое излучение убивает цисты лямблий в окружающей среде при дозе облучения не менее 40 мДж/см².

Цисты лямблий более устойчивы к действию хлора, чем колиформные бактерии. Концентрации хлора, рекомендуемые для бактериального обеззараживания воды, неэффективны по отношению к цистам лямблий. Поэтому водопроводная вода, отвечающая по санитарным показателям требованиям нормативных документов в отношении микробного загрязнения, может служить фактором передачи лямблий.

1.5.Патогенез

Прикрепление лямблий, которые часто меняют свою локализацию, вызывает микротравмы поверхности эпителиальных клеток и приводит к их разрушению. При прикреплении большого числа лямблий (в эксперименте до 1 млн. особей на 1 см² слизистой оболочки) происходит уплощение ворсинок, расширение и углубление крипт, гиперплазия лимфоидной ткани,

наблюдается инфильтрация слизистого и подслизистого слоев кишки макрофагами.

Вследствие уменьшения нормально функционирующей поверхности слизистой тонкой кишки, часть которой покрывается лямблиями, а часть занята поврежденными и регенерирующими незрелыми клетками, нарушается всасывание питательных веществ, в первую очередь жиров и жирорастворимых витаминов. D-ксилозы и цианокобаламина. Кроме того, часть питательных веществ поглощается самими лямблиями. В результате этого понижается питание организма.

Нарушение активности ферментов (инвертазы, лактазы и др.), играющих существенную роль в гидролизе углеводов, приводит к усилению бродильных процессов, возрастанию численности аэробной микрофлоры, развитию дисбиоза кишечника. Раздражение рецепторов вызывает усиление перистальтики и ускорение - эвакуации пищевого субстрата из кишечника, нередко развивается дискинезия желчевыводящих путей. Установлено, что лямблии находятся в антагонистических отношениях с грамотрицательными бактериями (кишечная палочка и др.), а грамположительные бактерии и дрожжеподобные грибки создают особо благоприятные условия для размножения лямблии, вырабатывая отсутствующие у них ферменты. [Сергиев В.П, 2006]

Важным механизмом в патогенезе лямблиоза является токсико-аллергическое воздействие продуктов обмена паразитов на микроорганизм. Продукты метаболизма и гибели лямблий, всасываясь из кишечника, вызывают сенсibilизацию организма человека, которая может проявляться различными формами аллергической реакции [Торопова Н.П., Сафронова Н.А., Синявская О.А., Плотникова И.А., 2004]

В результате длительной персистенции лямблий, воздействия их токсинов, тропных к нервной системе, у человека формируются неспецифические невротические реакции. По образному выражению Д. Ф. Лямбля, *G. lamblia* — «паразит тоски и печали». Продукты метаболизма

лямблий способствуют появлению синдрома хронической эндогенной интоксикации, вторичной иммунной недостаточности, сенсибилизации организма.

Кроме того, есть данные о том, что некоторые штаммы *G. lamblia* могут индуцировать апоптоз эпителиальных клеток тонкого кишечника и подавлять местный синтез IgA. в результате чего нарушается прочность зоны абсорбции и увеличивается проницаемость эпителиального монослоя для низкомолекулярных белков, обладающих выраженными аллергенными свойствами.

Увеличение числа паразитов после заражения и последующее постепенное спонтанное снижение интенсивности инвазии вплоть до полного освобождения организма от лямблий отмечено для разных видов млекопитающих, включая человека. При наличии иммунодефицита спонтанного выздоровления не происходит. Более того, наличие у пациента селективного иммунодефицита IgA или иммунодефицита различного генеза приводит к развитию тяжелых и длительно протекающих форм лямблиоза.

1.6. Клиническая картина

Клинические проявления лямблиоза характеризуются полиморфизмом симптоматики, которая во многом определяется индивидуальными особенностями организма инвазированного и, в первую очередь, состоянием его иммунной системы. Клинически выраженные случаи встречаются гораздо реже, чем бессимптомные или стертые.

Манифестации заболевания могут способствовать иммунодефициты, первичная гипогаммаглобулинемия у детей, авитаминозы, функциональная недостаточность органов пищеварения (понижение желудочной секреции, недостаточная ферментативная активность и др.), перенесение других инфекции (особенно шигеллезов и сальмонеллезов), нерациональное применение антибиотиков, вызывающее изменение микрофлоры кишечника.

Длительность инкубационного периода при манифестных формах составляет от 7 до 28 дней (в среднем 2 недели).

Клинически выраженная инвазия чаще всего проявляется симптомами поражения желудочно-кишечного тракта. Наиболее часто больных беспокоит тошнота, отрыжка при приеме пищи, изжога, снижение аппетита, схваткообразные боли в животе, повышенное газообразование. Иногда отмечается субфебрильная лихорадка. У большинства больных язык обложен, отмечается болезненность при пальпации в эпигастральной области. Выражены явления энтерита и стеатореи. Стул учащенный (2-4 раза в сутки), водянистый, пенистый, зловонный, без примеси крови.

Изменения нервной системы при лямблиозе выражаются повышенной нервной возбудимостью, раздражительностью, плаксивостью, головными болями, головокружением, беспокойным сном, слабостью, сердцебиением, одышкой, жалобами на боли в области сердца. У некоторых детей отмечают непостоянный субфебрилитет. Такое многообразие симптомов свидетельствует о поражении не только центральной, но и вегетативной нервной системы.

Аллергические проявления при лямблиозе неспецифичны. Их выявляют при любой форме лямблиоза и вне зависимости от тяжести и остроты процесса. Часто отмечают нестерпимый кожный зуд, хроническое течение крапивницы, атопического дерматита, возможны приступы бронхиальной астмы, отека Квинке, аллергического ринита, артралгий, артрита, конъюнктивита, блефарита. Атопический дерматит на фоне лямблиоза у детей протекает более тяжело, имеет хроническое торпидное, непрерывно рецидивирующее течение. У детей раннего возраста экзема носит диффузный, распространенный характер, с непрерывно рецидивирующим течением. Наблюдаются упорное мокнутие и выраженный зуд.

При лямблиозе появляются неспецифические дерматологические симптомы в виде кореподобной сыпи у детей первого года жизни,

фолликулярного точечного кератоза, неравномерной окраски кожи («разноцветная кожа») с иктеричностью, ксерозом. Некоторые пациенты жалуются на упорный хейлит, изолированное поражение ладоней и подошв по типу синдрома Эндрюса. Под глазами нередко заметны темные полукружья. У подростков отмечают появление или усиление юношеской угревой сыпи. Язык обычно обложен налетом, иногда на языке образуются глубокие складки, похожие на трещины, изо рта исходит неприятный запах. У некоторых детей с лямблиозом бледная кожа, особенно кожа лица (при нормальных цифрах гемоглобина) и носа («мраморная» белизна кожи носа) [Бандурина Т.Ю., 2002]

В острой стадии лямблиоз хорошо поддается этиотропной терапии. При соблюдении санитарно-гигиенических норм и правил, предотвращающих суперинвазию, все проявления болезни в иммунокомпетентном организме исчезают в течение 1-4 недель.

Если лечение не проводится, болезнь на фоне иммунодефицита может перейти в хроническое течение и продолжается в течение многих месяцев или лет с периодическими обострениями, во время которых отмечаются недомогание, головные боли, снижение трудоспособности, диспепсические расстройства, симптомы гастродуоденита. Длительный лямблиозный процесс может приводить к нарушению питания и снижению массы тела.

При отсутствии лечения надежного самоизлечения не отмечается как при острой, так и хронической формах инфекции. Степень тяжести заболевания не связывают с интенсивностью инфекции. Более важную роль играют особенности макроорганизма. К факторам, обуславливающим восприимчивость к лямблиозу и определяющим характер его течения, относят нарушения секреторной деятельности пищеварительного аппарата, дисбиоз кишечника и нарушение иммунного статуса.

1.7.Значение в патологии животных и человека

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), лямблиозом страдают примерно 20–25% детей в мире. Лямблии занимают 3-е место по распространенности после энтеробиоза и аскаридоза (ВОЗ, 2006). Ранее считалось, что лямблиоз встречается в эндемичных районах Азии, Африки, Латинской Америки с плохо развитой инфраструктурой. В связи с развитием туризма в развивающихся странах лямблиоз встречается повсеместно. С 2004 по 2010 г. в мире было зарегистрировано 70 вспышек лямблиоза, связанных с водным путем передачи инвазии.[Baldursson S., Karanis P. , 2011]

У человека лямблии паразитируют преимущественно в просвете и на поверхности слизистой оболочки верхних отделов тонкого кишечника. Лямблии в своем развитии проходят две стадии — вегетативную форму и цисту. Размер вегетативной формы от 9 до 18 мкм в длину и от 5 до 10 мкм в ширину. Размер цист 10-14 мкм в длину и 6-10 мкм в ширину. Размножение лямблий происходит на поверхности слизистой оболочки кишечника путем деления вегетативных форм. При проглатывании цисты перемещаются в тонкий кишечник, где из них выделяются вегетативные формы. Часть вегетативных форм лямблий с пищевыми массами перемещается в толстый кишечник, где они инцистируются, и цисты выделяются с фекалиями. Цисты лямблий устойчивы к факторам внешней среды, и степень загрязнения фекалиями окружающей среды является решающим фактором в уровне пораженности населения лямблиозом. Групповые вспышки обычно обусловлены фекальным загрязнением воды и пищи. В частности, фекальное загрязнение фруктов и овощей имеет место в случае использования фекалий в качестве удобрений. Лямблиозом можно заразиться и контактным путем, когда *G. duodenalis* передается от человека к человеку через загрязненные частицами фекалий руки и предметы обихода. Таким путем чаще заражаются дети, особенно младшего возраста. [Бронштейн А.М., Малышев Н.А. , 2010]

Воздействие лямблий на организм хозяина многообразно. Вегетативные формы, фиксируясь на поверхности энтероцитов, не только перекрывают всасывательную поверхность кишки и потребляют готовые питательные вещества, но и вызывают механическое и токсическое повреждение поверхности кишечника, запуская целый ряд патологических механизмов: сенсибилизацию организма продуктами распада лямблий и формирование аллергодерматозов, нарушение синтеза ферментов и развитие вторичного синдрома мальабсорбции, формирование абдоминального синдрома, нарушение функции печени, снижение синтеза иммуноглобулинов, формирование дисбиотических нарушений в кишечнике. Согласно классификации ВОЗ нами ежегодно регистрируются: лямблиоз без клинических проявлений (латентный) в 2% случаев, лямблиоз с клиническими проявлениями (манифестный) в 98% случаев. Из манифестных форм кишечную форму заболевания мы наблюдаем в 15% случаев, билиарно-панкреатическую форму — в 9%, форму с внекишечными проявлениями — в 30%, смешанную форму — в 44% случаев соответственно. Кишечный синдром при различных формах лямблиоза проявляется: болью в животе у 30% больных, диареей у 57%, запорами у 29%, тошнотой и анорексией у 70% пациентов соответственно. У 20–40% детей в зависимости от формы заболевания имеет место лактазная недостаточность. Дисбактериоз кишечника при лямблиозе мы регистрируем у всех детей и подростков — 100% . Под дисбактериозом кишечника понимают клинико-лабораторный синдром, связанный с изменением качественного и/или количественного состава микрофлоры кишечника с последующим развитием метаболических и иммунологических нарушений и возможным развитием желудочно-кишечных расстройств. Комплексное лечение детей с лямблиозом и сопутствующим дисбактериозом кишечника. [Е.Е.Хасанова, 2012]

1.8. Природный резервуар

Инфекция передается непосредственно от человека к человеку фекально-оральным путем, часто – через загрязнение цистами воды [J. Trop. Med. Hyg., 1976.] реже продуктов питания. Значительные вспышки заболевания происходят, как правило, в результате загрязнения фекалиями системы централизованного водоснабжения. [Craun G, 1984] *G. lamblia* часто идентифицируется в качестве этиологического агента при водной диарее, обычно связанной с неэффективной фильтрацией питьевой воды (из скважин, озер и др. источников) [Gradus M.S., 1989] Для развития лямблиоза считается необходимым поступление в организм не менее 100 цист, однако в экспериментальных исследованиях на здоровых добровольцах было показано, что поступление даже 10 цист может привести к заболеванию. [Rendtorff R.C., 1989]

Люди являются основным резервуаром паразитов, но различные животные могут быть носителями лямблий. Животные могут стать источником двух морфологических вариантов *G. lamblia*. Вариантом *G. duodenalis* в естественных условиях заражаются бобры, волки, крупный рогатый скот, кошки и собаки, а в экспериментальных условиях возможно инфицирование и других млекопитающих [Davies R.B., Hibler C.P., 1979] В то же время нет убедительных данных о передаче паразита от собак и кошек [Healy G..R., 1990]

В распространении лямблиоза большую роль играют объекты окружающей среды: вода, почва.

2.1. Лабораторная диагностика лямблиозной инвазии

Исходя из сложившейся в стране эпидемиологической ситуации по лямблиозу, его эффективная и своевременная диагностика приобретает особую актуальность. Основным методом, верифицирующим лямблиозную инвазию, является обнаружение цист (статической формы) или трофозоитов

(пролиферативной формы) возбудителя в образцах кала или дуоденального содержимого с помощью микроскопа. Однако в литературе встречаются мнения, что микроскопический метод в значительной степени субъективен и многое зависит от правильности проведения всех этапов исследования [Katelaris P, 1991] Частота регистрации положительных результатов при использовании микроскопического метода невысока (составляет 2,1 %), а эффективность не превышает 50 % [Turiaf J., 2003] Эффективность простой микроскопии кала составляет около 50% из-за характерной прерывистости в цистовыделении, связанной с особенностями размножения трофозоитов лямблий.[Adam R. D., 2001]

Длительность «немых» промежутков составляет 8–12 дней, по мнению некоторых специалистов — до 14 дней. Причина прерывистого выделения цист не изучена, многие видят ее в изменении иммунореактивных свойств макроорганизма. Сложность представляет также идентификация атипичных цист. Точность диагностики повышается при повторных исследованиях, поэтому многие авторы рекомендуют проводить обследование трехкратно. Для лучшей визуализации цист рекомендуют окрашивание мазка 1% раствором Люголя. В связи со сложностями диагностики лямблиоза в последние годы активно разрабатываются новые, более эффективные методы. В частности, в настоящее время на практике используют выявление специфических антигенов в фекалиях и специфических антител в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа ИФ.[Faubert G., 2000] Чувствительность и специфичность этих иммунологических методов варьируют в зависимости от состава и качества использованных диагностических наборов. В частности, существует проблема перекрестных реакций антигенов лямблий с другими паразитарными и соматическими антигенами, которые дают ложноположительные результаты. Поэтому для повышения надежности и достоверности диагностики лямблиоза рекомендуется комплексное применение тестов на антитела и антигены. [Pennardt M., Cox F. E., 2006]

Диагностика лямблиоза является трудной задачей: у некоторых больных с длительно текущим лямблиозом антитела в сыворотке крови могут отсутствовать, что свидетельствует о неэффективности механизмов гуморальной защиты. Антитела часто отсутствуют у страдающих лямблиозом детей с лимфатическим типом конституции; распространение практики постановки диагноза лямблиоза без проведения копрологического исследования нельзя считать оправданным. [Farthing M.J.G., 1997]

Детекция специфичных ДНК возбудителей паразитарных заболеваний является более чувствительным методом, чем микроскопия [Verweij J., Schinkel J., Laeijendecker D., 2003]

В связи с этим существенно возросла необходимость внедрения новых, более информативных методов диагностики заболеваний человека [Ajampur S.S., Rajendran P., Ramani S., Banerjee I., Monica B., Sankaran P., 2008]

2.1.1. Иммунологическая (серологическая) диагностика лямблиоза

Для серологической диагностики лямблиоза (исследование крови) используют метод иммунофлюоресценции (75-80% достоверности). Специфические антитела обнаруживаются в крови через 2-4 недели после заражения. В основу метода положено определение специфических антител в крови, направленных на борьбу с чужеродными микроорганизмами. Антитела (иммуноглобулины) представляют собой специальные белки со свойствами нейтрализовывать вредные бактерии, вирусы и другие патологические агенты, проникшие в организм человека. Иммуноглобулины обозначаются сокращённо латинскими буквами Ig.

Если обнаруживают IgM, то это обозначает, что имеется острая фаза патологического процесса.

Если обнаруживают IgG, то это обозначает хронический процесс.

Если же выявляют большие концентрации IgM и G, то это значит, что пациент хронически болеет лямблиозом и у него на данный момент времени наблюдается обострение заболевания.

Данный метод диагностики постепенно утрачивает свою ценность, поскольку нет 100% специфичности при определении иммуноглобулинов против лямблий. Это обозначает, что те же иммуноглобулины классов M и G могут появляться в ответ на проникновение других видов паразитов и бактерий.

2.1.2. Копровоскопия

Проводятся методом толстого мазка под целофаном по методу Като и Миура. Обнаруживают неперевавленную клетчатку, измененные и неизмененные мышечные волокна, крахмал, простейшие. [Возианова Ж.И., 2000] Копрологическая диагностика лямблий трудна и может давать ложноотрицательные результаты [Бельмер С.В., Новикова В.П., 2013]

3.1. Микроскопические методы

Наиболее часто применяемым методом при диагностике лямблиоза в лабораторном тестировании - микроскопия осадочных компонентов фекалий или содержимого, полученного при дуоденальном зондировании с целью выявления цист лямблий [Tanyuksel M, Petri W.A., 2003]. К сожалению, микроскопия лямблиоза обладают низкой чувствительностью, подвержено влиянию ряда субъективных и объективных факторов: непостоянное выделение цист при лямблиозе, трудность микроскопической идентификации, требование специальной подготовки персонала, занятого микроскопической диагностикой [Marshall MM., Naumovitz D., Ortega Y., Sterling C.R. 1997]. Главное ограничение микроскопического метода - неспособность дифференцировать близкородственные разновидности, имеющие различное значение в патологии человека [Morgan U.M., Depiazes

P., Forbes D. A., Spano F., Herzberg H., Sargent K. D., Elliot A., Thompson R.C, 1999].

3.1.1. Исследования дуоденального содержимого путем микроскопии осадка

Проводят исследование всех порций дуоденального содержимого сразу после зондирования, пока трофозоиты не разрушились под действием желчи и не утратили подвижность [Волошина Н.Б., 2004[

В желчи обычно обнаруживаются вегетативные подвижные формы лямблий [МУК 4.2.735 – 99]

4.1 Методы седиментации

В основе методов седиментации (осаждения) лежит разность удельного веса используемых химических реактивов и яиц гельминтов: удельный вес яиц высокий, и они концентрируются в осадке.

4.1.1. Формалин - эфирный метод

Необходимые реактивы и оборудование

Контейнеры (полистироловые) объемом 30 мл с ложечкой для сбора кала

Центрифужные пробирки: пластиковые полипропиленовые или стеклянные объемом 12-15 мл (полипропилен устойчив к воздействию эфира и обладает водоотталкивающими свойствами: легко отделяет детритовую пробку)

Пробки для центрифужных пробирок

Воронки пластиковые или стеклянные диаметром 4 или 5 см

Стеклянные палочки или шпатели

Стаканчики пластиковые или стеклянные, мерные на 50 и 100 мл

Обезжиренные предметные стекла, покровные стекла размером 24×24

мм

Пипетки или варипипетки с наконечниками

Штативы для центрифужных пробирок

Центрифуга с горизонтальным ротором на 10-12 пробирок

Марля, бинты или мелкаячеистые ситечки металлические или пластиковые

Микроскоп

Формалин концентрированный

Раствор формалина 5-10%-й

Эфир этиловый

Физиологический раствор

Фиксирующий раствор Турдыева

Раствор Люголя 2%-й

Порядок сбора проб кала в консервант

В полистироловые контейнеры с вмонтированной ложечкой наливают 8-10 мл фиксирующего раствора Турдыева. Ежедневно или с интервалом в 1-2 дня в контейнер добавляют небольшую (объемом с горошину) порцию кала. Объем усредненной пробы кала, помещенной в раствор, не должен превышать 2-3 мл. Материал при каждом добавлении тщательно перемешивают с консервантом и хранят в темном прохладном месте (хранить можно до 2-3 недель). Пациенту рекомендуется не употреблять в пищу грибы, печень, большое количество грубой клетчатки, принимать сорбенты. После масляных клизм и приема бария должно пройти несколько суток. В случае лечения антибиотиками широкого спектра действия или антибактериальными препаратами кал для исследования следует начать собирать спустя 7-10 дней после окончания приема препаратов. Жидкий стул следует собрать однократно в количестве не менее 5 мл в консервант и одновременно доставить в лабораторию пробы кала без консерванта, собранные в этот день в чистую сухую посуду. Особенно это касается случаев "диареи путешественников", вернувшихся из стран тропического и

субтропического пояса. Рекомендации по сбору и подготовке материала к исследованию следует вручать пациентам вместе с контейнером.

Подготовка к исследованию препаратов кала, собранного в консервант

1) Тщательно перемешать содержимое контейнера, содержащего трехкратную пробу кала в консерванте, встряхиванием или стеклянной палочкой.

2) В центрифужную пробирку поместить воронку, на неё - 2 слоя марли (можно также использовать металлические или пластмассовые ситечки).

3) Профильтровать не менее 8 мл суспензии из контейнера (если объем фильтрата будет меньше, добавить 10%-й раствор формалина до 8 мл).

4) Долить в пробирку 2 мл эфира и закрыть пробкой.

5) Энергично встряхивать пробирку не менее 30 с.

6) Центрифугировать при 1500 об./мин в течение 2 мин или при 2000 об./мин в течение 1 мин.

7) После центрифугирования образуются 4 слоя: осадок, раствор формалина, коагулированный белок, фекальный детрит- "пробка", а сверху эфир с растворенными в нем жирами.

8) Верхние 3 слоя удалить резким опрокидыванием пробирки (полипропилен легко отделяет "пробку").

9) Препараты микроскопировать при увеличении: объектив $\times 8$ или $\times 10$, окуляр $\times 7$ или $\times 10$, для уточнения морфологического строения яиц гельминтов - объектив $\times 40$.

10) Просмотр препарата производить без добавления раствора Люголя.

Для продолжения подготовки к исследованию на наличие возбудителей протозойных инфекций необходимо:

1) Осадок суспендировать: одну каплю поместить на предметное стекло, а рядом на вторую каплю нанести 2%-й раствор Люголя. Препараты накрыть покровными стеклами.

2) Микроскопировать сначала при малом увеличении (окуляр×10, объектив×10) - обзорная микроскопия; а затем при увеличении окуляр×10, объектив×40. [МУК 4.2.3145-13]

4.1.2. Уксусно - эфирный метод

Необходимые реактивы и оборудование

Контейнеры (полистироловые) объемом 30 мл с ложечкой для сбора кала

Центрифужные пробирки: пластиковые полипропиленовые или стеклянные объемом 12-15 мл (полипропилен устойчив к воздействию эфира и обладает водоотталкивающими свойствами: легко отделяет детритовую пробку)

Пробки для центрифужных пробирок

Воронки пластиковые или стеклянные диаметром 4 или 5 см

Стеклянные палочки или шпатели

Стаканчики пластиковые или стеклянные, мерные на 50 и 100 мл

Обезжиренные предметные стекла, покровные стекла размером 24×24 мм

Пипетки или варипипетки с наконечниками

Штативы для центрифужных пробирок

Центрифуга с горизонтальным ротором на 10-12 пробирок

Марля, бинты или мелкоячеистые ситечки металлические или пластиковые

Микроскоп

5%-м водный раствор уксусной кислоты

Эфир этиловый

Физиологический раствор

Фиксирующий раствор Турдыева

Раствор Люголя 2%-й

Порядок сбора проб кала в консервант

В полистироловые контейнеры с вмонтированной ложечкой наливают 8-10 мл фиксирующего раствора Турдыева. Ежедневно или с интервалом в 1-2 дня в контейнер добавляют небольшую (объемом с горошину) порцию кала. Объем усредненной пробы кала, помещенной в раствор, не должен превышать 2-3 мл. Материал при каждом добавлении тщательно перемешивают с консервантом и хранят в темном прохладном месте (хранить можно до 2-3 недель). Пациенту рекомендуется не употреблять в пищу грибы, печень, большое количество грубой клетчатки, принимать сорбенты. После масляных клизм и приема бария должно пройти несколько суток. В случае лечения антибиотиками широкого спектра действия или антибактериальными препаратами кал для исследования следует начать собирать спустя 7-10 дней после окончания приема препаратов. Жидкий стул следует собрать однократно в количестве не менее 5 мл в консервант и одновременно доставить в лабораторию пробы кала без консерванта, собранные в этот день в чистую сухую посуду. Особенно это касается случаев "диареи путешественников", вернувшихся из стран тропического и субтропического пояса. Рекомендации по сбору и подготовке материала к исследованию следует вручать пациентам вместе с контейнером.

Подготовка к исследованию препаратов кала, собранного в консервант

1) Тщательно перемешать содержимое контейнера, содержащего трехкратную пробу кала в консерванте, встряхиванием или стеклянной палочкой.

2) В центрифужную пробирку поместить воронку, на неё - 2 слоя марли (можно также использовать металлические или пластмассовые ситечки).

3) Профильтровать не менее 8 мл суспензии из контейнера (если объем фильтрата будет меньше, добавить 5% водный раствор уксусной кислоты до 8 мл).

4) Долить в пробирку 2 мл эфира и закрыть пробкой.

5) Энергично встряхивать пробирку не менее 30 с.

6) Центрифугировать при 1500 об./мин в течение 2 мин или при 2000 об./мин в течение 1 мин.

7) После центрифугирования образуются 4 слоя: осадок, раствор уксусной кислоты, коагулированный белок, фекальный детрит- "пробка", а сверху эфир с растворенными в нем жирами.

8) Верхние 3 слоя удалить резким опрокидыванием пробирки (полипропилен легко отделяет "пробку").

9) Препараты микроскопировать при увеличении: объектив $\times 8$ или $\times 10$, окуляр $\times 7$ или $\times 10$, для уточнения морфологического строения яиц гельминтов - объектив $\times 40$.

10) Просмотр препарата производить без добавления раствора Люголя.

Для продолжения подготовки к исследованию на наличие возбудителей протозойных инфекций необходимо:

1) Осадок суспендировать: одну каплю поместить на предметное стекло, а рядом на вторую каплю нанести 2%-й раствор Люголя. Препараты накрыть покровными стеклами.

2) Микроскопировать сначала при малом увеличении (окуляр $\times 10$, объектив $\times 10$) - обзорная микроскопия; а затем при увеличении окуляр $\times 10$, объектив $\times 40$. [МУК 4.2.3145-13]

4.1.3. Модификация метода седиментации с применением одноразовых концентраторов PARASEP

Необходимые реактивы и оборудование

Комплект концентраторов (разборные пластиковые пробирки) 40 шт.,
содержащие необходимые для работы готовые реактивы

Центрифуга

Микроскоп

Пипетки

Обезжиренные предметные и покровные стекла

Подготовка к исследованию

1) В смесительной камере пробирки-концентратора содержится 2,4 мл 10%-го буферного раствора формалина с 1 каплей тритона-X-100.

2) Перед взятием пробы добавляют в пробирку 0,9 мл раствора этилацетата (флакон с реактивом прилагается в упаковке с модулями "PARASEP").

3) Пробу кала массой 1,0 г лопаткой-фильтром опускают в полученный раствор.

4) Камеру с образцом присоединяют к пробирке, закрыв замок (закрутить до щелчка). Тщательно встряхивают систему в течение 30 с до получения однородной взвеси.

5) В таком состоянии образец может храниться в течение 24 ч при комнатной температуре (18-24 °C) и до 30 суток в холодильнике (4 °C).

6) После получения взвеси систему переворачивают и конической стороной помещают в центрифугу и центрифугируют при скорости 2500-3000 об./мин в течение 1-3 мин, при скорости 1500 об./мин - 5 мин.

7) В конической части пробирки остается жидкая часть пробы с выделившимися в нее яйцами гельминтов, цистами простейших.

8) Отсоединяют модуль с фильтром (держат строго вертикально!),

избегая перемешивания жидкости с осадком. Фильтровальный модуль утилизируется после обеззараживания (кипячением, автоклавированием). Коническая часть пробирки остается для микроскопирования.

9) При образовании "пробки" из этилацетата и жировых частиц необходимое удалить, обведя стеклянной палочкой.

10) Для микроскопирования с помощью пипетки из нижней пробирки на предметное стекло переносят 2 капли пробы осадка.

11) Осадок суспендировать: одна капля осадка помещается на предметное стекло, а во вторую каплю наносится 2%-й раствор Люголя. Препараты накрываются покровными стеклами.

12) Микроскопируют при увеличении: окуляр×10, объективы×10, ×40.

13) При использовании для микроскопии рабочей станции FE-5 из процесса исследования можно исключить предметные и покровные стекла. Применение. Метод модификации облегчает визуализацию искомых патогенов, обеспечивает их качественное и количественное определение в субстрате; исключает необходимость приобретения дополнительных реактивов. [МУК 4.2.3145-13]

4.1.4.Модификация метода седиментации с применением мини системы "Real"

Необходимые реактивы и оборудование

Комплект "концентратор-мини система "Real", содержащий готовые реактивы "Экосаф"

Обезжиренные предметные и покровные стекла

Пипетки

Раствор Люголя 2%-й

Центрифуга

Микроскоп

Подготовка к исследованию

1) Минисистема "Real" состоит из двух герметически соединенных пробирок. Верхняя пробирка содержит 4,0 мл консервирующей смеси "Экосаф", стеклянные бусы и фильтр, в крышку вмонтирована ложечка для сбора кала.

2) В смеси "Экосаф" минисистемы "Real" содержится: ацетат натрия - 0,9%; ледяная уксусная кислота - 2,0%; формальдегид 34-38% - 1,6%; метанол - 0,4%; неионный детергент Тритон X-100 - 0,16%; дистиллированная вода.

3) Пробу кала объемом одной ложечки минисистемы "Real" помещают в верхнюю пробирку со смесью "Экосаф". Крышка пробирки плотно закручивается.

4) Пробирка минисистемы "Real" с пробой кала энергично встряхивается в течение 30 с до получения однородной взвеси.

5) После получения взвеси пробирка переворачивается верх дном, отвинчивается нижняя крышка и к ней плотно закручивается коническая центрифужная пробирка.

6) Герметически соединенные верхняя и нижняя пробирки помещают в центрифугу и центрифугируют в течение 3 мин при скорости 2000 об/мин.

7) В процессе центрифугирования происходит фильтрация суспензии.

8) В конической части нижней пробирки остается жидкая часть пробы с выделившимися в нее возбудителями кишечных паразитозов.

9) Отсоединяют верхнюю пробирку с фильтром, которая помещается в дезинфекционный раствор для обеззараживания.

10) Для микроскопирования с помощью пипетки из нижней пробирки на предметное стекло переносят 2 капли пробы осадка.

11) Осадок суспендируется: одна капля осадка помещается на предметное стекло, а во вторую каплю наносится 2%-й раствор Люголя. Препараты накрываются покровными стеклами.

12) Микроскопируют при увеличении: окуляр×10, объективы×10, ×40.

Модифицированный метод седиментации с применением минисистемы "Real" имеет все преимущества методов седиментации. Дополнительным преимуществом метода является отсутствие летучих ингредиентов в составе реактива "Экосаф". [МУК 4.2.3145-13]

5.1.1.Метод последовательной фильтрации через систему прозрачных аналитических трековых мембран (АТМ)

Химреактивы: дистиллированная вода, 50 %-й раствор глицерина, 1 %-й раствор Люголя.

Ход исследования

1.Предварительно на заборное устройство прибора для фильтрования ПВФ-142 крепят предфильтр в виде капроновой сетки с размерами ячейки 67 - 70 мкм (поставляется в комплекте с АТМ).

2.Аналитическую трековую мембрану (АТМ) с диаметром пор 5,0 мкм помещают на фритту фильтродержателя прибора для фильтрования и сверху укладывают фильтр с размером пор 25,0 мкм, уплотняют кольцом из эластичной резины. Для плотного (без складок) прилегания АТМ к фритте рекомендуется смочить мембрану дистиллированной водой и плотно уложить на фритту фильтродержателя.

3.После фильтрации обе мембраны последовательно по одной осторожно снимают пинцетом с фритты фильтродержателя на заранее подготовленные тонкие пластмассовые квадратные пластинки размером 150×150 мм (поставляются в комплекте с АТМ) и переносят в лоток.

4.Профильтрованную в отдельную емкость пробу воды повторно фильтруют с использованием АТМ с диаметром пор 2,5 мкм, которую укладывают на фритту фильтродержателя между двумя уплотнительными кольцами из полиэтилена или обрезиненного лавсана (поставляются в комплекте с АТМ).

5.После фильтрации АТМ осторожно снимают пинцетом с фритты на пластиковый диск, который должен быть помещен в лоток. Со всех трех

фильтров аккуратно и тщательно, придерживая диск с мембраной пинцетом за край, производят смыв осадка с обеих поверхностей мембран и с пластиковых дисков, на которых эти фильтры лежали. Смыв проводят плоской, средней жесткости кисточкой в лоток с дистиллированной водой. При этом периодически споласкивают мембраны и диски дистиллированной водой из химического стакана. Общий объем дистиллированной воды при смыве осадка со всех 3-х фильтров не должен превышать 300 - 500 мл.

6.Полученный концентрированный смыв сливают из лотка в воронки прибора для фильтрации типа ПВФ-35 или ПВФ-47 и фильтруют через аналитические мембраны АТМ с диаметром пор 3,0 - 2,5 мкм. В зависимости от первоначальной загрязненности воды фильтруют последовательно, меняя мембраны.

7.После фильтрации мембраны АТМ осторожно снимают пинцетом с фильтродержателя (фритты) фильтровального прибора и переносят на предметное стекло, предварительно обработав его 50 %-м раствором глицерина (для этого на поверхность предметного стекла наносят 1 - 2 капли 50 %-го раствора глицерина и стеклянной палочкой распределяют по всей поверхности тонким слоем), затем сверху мембраны наносят каплю 1 %-го раствора Люголя и накрывают покровными стеклами (24×24 мм) всю поверхность мембраны.

8.Микроскопируют препарат при увеличениях: окуляр 7х или 10х; объектив 10х; для идентификации яиц гельминтов и исследования на цисты лямблий - объектив 40х. [МУК 4.2.2314-08]

5.1.2.Исследование воды на цисты лямблий и методом иммуномагнитного разделения и мечения флуоресцирующими антителами (IMS)

Метод представлен двухэтапной реакцией, при которой обнаружение искомого антигена в комплексе антиген-антитело (АГ - АТ) происходит с помощью иммуномагнитной суспензии (для выделения:цист лямблий)

Реагенты и химреактивы диагностического набора AquaGlo G/C:

1)иммунореагент (импортного производства) AquaGlo G/C концентрированный или в рабочем разведении; фосфатный буфер в таблетках (PBS) или концентрированный солевой моющий буфер 20XWash Buffer;

2)защитная среда No-Fade™, M101 или Elvanol No-Fade™, M102;

3)контрастирующий реагент, C101 (Contersain);

4)контроль положительный (взвесь с цистами лямблий) Positiv Control: G.lamblia,

5)Реагенты и химреактивы диагностического набора Aureon CG Kit:

6)Иммуномагнитная суспензия Giardia Beads, специфичная к цистам лямблий;

7)буфер для иммуномагнитной сепарации IMS Buffer™;

8)моющий буфер IT-Wash Buffer™;

9)концентрированный раствор 2-меркаптоэтанола 14,3 М (меркаптоэтанола, готовый раствор 20 мМ готовить свежим непосредственно перед проведением анализа, разбавляя концентрированный 14,3 М раствор в отношении 1 : 700).

Ход исследования

Этап I. Выделение ооцист криптоспоридий и цист лямблий из воды с помощью метода иммуномагнитной сепарации (IMS).

1)Подготовка проб к исследованию

После фильтрации воды осадок с фильтров смывают в 10 мл дистиллированной воды, переливают в центрифужную пробирку и центрифугируют 10 мин при 1 500 об./мин. Удаляют надосадочную жидкость и осадок исследуют. При этом осадок должен быть не более 1 мл. Если получился большой объем осадка, его необходимо ресуспендировать дистиллированной водой и далее обрабатывать как 2и более порции.

2)Процедуры связывания и промывки цист лямблий

1.Внести 5 мл IMS-буфера из диагностического набора в пробирку для иммуномагнитной сепарации (ИМС-пробирку с плоской боковой поверхностью), закрыть пробирку крышкой и вращать пробирку, смачивая буфером ее внутренние стенки.

2.Перенести IMS-буфер в пробирку с осадком исследуемой пробы и ресуспендировать осадок.

3.Ресуспендированный осадок перенести обратно в ИМС-пробирку. Промыть пробирку, в которой был исследуемый осадок, 2,5 мл дистиллированной воды и перенести в ИМС-пробирку. Процедуру промывки повторить. После выполнения процедуры объем ресуспендированной пробы должен составить не более 10 мл.

4.Перемешать весь объем иммуномагнитной суспензии диагностического набора на вортексе в течение 10 - 15 с, отобрать микродозатором из каждого флакона по 100 мкл (0,1 мл) суспензии и перенести ее в пробирку для ИМС, в которой уже находится порция пробы.

5.Закрепить ИМС-пробирку, закрытую крышкой, в штативе лабораторного ротатора и перемешать в течение одного часа при скорости 15 - 25 об./мин. маятникообразными движениями (не переворачивая пробирку!).

6.Извлечь ИМС-пробирку из ротатора и поместить ее в магнитный штатив MagnetOn 4TTM, при этом плоская сторона пробирки должна быть обращена к магниту штатива.

7.Осторожно наклоняют пробирку вместе с магнитным штативом по направлению от дна к крышке пробирки и наоборот в течение 2 мин. (не переворачивать пробирку с магнитным штативом!). По мере движения на плоской стороне ИМС-пробирки будет образовываться осадок (налет).

8.Не вынимая ИМС-пробирку из магнитного штатива, открыть крышку и осторожно слить надосадочную жидкость из пробирки, при этом не повредив осадок (налет) на плоской стороне пробирки.

9.В пробирку добавить 1 мл моющего буфера IT-Wash Buffer (WB). Удалить пробирку из штатива и взболтать с таким расчетом, чтобы смыть в этот раствор осадок с плоской стороны пробирки.

10.Поместить в ИМС-пробирку магнитную ручку SepPen и собрать магнитную суспензию на кончике ручки, осторожно перемешивая содержимое пробирки в течение примерно 1 мин.

11.Удалить из ИМС-пробирки магнитную ручку SepPen, переворачивая ее, нажать на кнопку ручки, чтобы убрать магнитный сердечник из кончика.

12.В микроцентрифужную пробирку Eppendorf (объемом на 1,5 - 2 мл) поместить пипеточным дозатором 1 мл моющего буфера WB и перенести ранее собранную суспензию, вращая кончик ручки SepPen в растворе буфера (при этом магнит убрался из кончика нажатием кнопки ручки).

13. В ИМС-пробирку добавить 1 мл буфера WB (общий объем 2,0 мл), закрыть крышку и, осторожно переворачивая пробирку, промыть буфером внутренние стенки пробирки и крышки.

14.ИМС-пробирку поместить в магнитный штатив MagnetOn 4TTM и осторожно наклонять (вправо-влево) в течение 30 - 60 с, чтобы собрать остатки магнитной суспензии и промыть внутреннюю поверхность ИМС-пробирки.

15.Не вынимая ИМС-пробирку из магнитного штатива, слить моющий буфер WB из пробирки и добавить в пробирку новую порцию моющего буфера WB объемом 1 мл. Закрывать крышку и, осторожно вращая пробирку, промыть буфером внутренние стенки пробирки и крышки (ИМС-пробирка остается в магнитном штативе).

16.ИМС-пробирку удалить из штатива и взбалтыванием смыть суспензию с плоской стороны пробирки.

17.Открыть крышку ИМС-пробирки и поместить в нее магнитную ручку SepPen (для сбора остатков иммуномагнитной суспензии), с тем же кончиком, который использовался, и перенести в микроцентрифужную

пробирку с моющим буфером WB и первой порцией осадка (п. 2.12), при этом пробирка должна быть установлена в магнитный штатив.

18. Микроцентрифужную пробирку периодически наклоняют вместе с магнитным штативом (вправо-влево) 1 мин. Затем оставить штатив вместе с пробиркой в покое на 15 с в вертикальном положении.

19. Не вынимая микроцентрифужную пробирку из магнитного штатива открыть крышку и слить моющий буфер WB из пробирки, добавить в пробирку 1 мл новой порции моющего буфера WB, при этом, не повредив осадок (налет) на стенке пробирки со стороны магнита.

3) Процедуры диссоциации.

1. Приготовить рабочий раствор 2-меркаптоэтанола в концентрации 1 : 700: к 0,1 мл 2-меркаптоэтанола добавить 7 мл дистиллированной воды.

2. Не вынимая микроцентрифужную пробирку из магнитного штатива открыть крышку и слить моющий буфер из пробирки, добавить в пробирку 100 мкл рабочего раствора 2-меркаптоэтанола. Перемешать суспензию на вортексе в течение 30 с.

3. Поместить микроцентрифужную пробирку в термостат или водяную баню при 50 °C на 5 мин.

4. Перемешать суспензию в микроцентрифужной пробирке на вортексе в течение 30 с, установить пробирку в магнитный штатив на 10 - 15 с, не вынимая из магнитного штатива, отобрать супернатант и перенести его на слайд SuperStick™ для последующего иммунофлуоресцентного мечения. (При этом осадок (налет) остается на стенке пробирки и не исследуется.)

5. Во второе окно слайда S100-2 вносят каплю положительного контроля (взвесь с цистами лямблий Positiv Control: G. Lamblia).

6. Перед началом процедуры мечения концентраты проб и контроль, нанесенные на слайды, необходимо подсушить в слабом токе теплого (не горячего!) воздуха или с помощью специального устройства для подсушки слайдов. Не допускается перегрев слайдов!

Этап II. Детекция (идентификация) ооцист криптоспоридий и цист лямблий методом иммунофлуоресцентного мечения.

1) Подготовка к мечению.

1. По одной капле (около 45 мкл) иммунореагента AquaGloTMG/C*** вносят в каждую лунку слайда с подсушенной пробой и контролем. При необходимости с помощью аппликатора или стеклянной палочки распределяют реагент по лунке. Не касаться поверхности лунок! Иммунореагент AquaGloTMG/C рабочий раствор, поэтому не требует дополнительного разведения.

2. Слайды помещают в ячейку влажности в темноте и инкубируют не менее 30 мин при 37 °C или не менее 40 мин. при комнатной температуре. (Допускается более длительное время инкубации.)

3. Нанести по одной капле фосфатного буфера (PBS) или солевого раствора в каждую лунку и выдерживать не менее 2 мин.

4. Наклонить каждый слайд на чистую фильтровальную бумагу и осторожно аспирировать излишек жидкости из нижней части лунки с помощью фильтровальной бумаги или пастеровской пипетки.

Избегать перемешивания пробы. Не касаться пипеткой поверхности лунок!

2) Процедура мечения.

1. Чтобы снизить неспецифическую флуоресценцию и выделить фон для лучшего наблюдения яблочно-зеленой флуоресценции, нанести по одной капле контрастирующего красителя в каждую лунку и выдержать 1 мин при комнатной температуре.

2. Нанести одну каплю фосфатного буфера (PBS) или солевого моющего буфера 20XWash Buffer (предварительно развести концентрированный солевой моющий буфер: 19 частей дистиллированной воды и 1 часть буфера) в каждую лунку и выдержать 1 мин при комнатной температуре.

3. Наклонить каждый слайд на чистую фильтровальную бумагу и осторожно аспирировать излишек жидкости из нижней части лунки с помощью фильтровальной бумаги или пастеровской пипетки.

Избегать перемешивания пробы. Не касаться пипеткой поверхности лунок!

4. Разложить слайды на наклонном штативе и подсушить в слабом токе теплого воздуха.

5. Нанести 1 каплю монтирующей среды No-Fade™ в каждую лунку. Покрывать покровным стеклом, края заклеить канадским бальзамом или бесцветным лаком и микроскопировать под масляной иммерсией на люминесцентном микроскопе [МУК 4.2.2314-08]

6.1. Полимеразная – цепная реакция

Метод полимеразной цепной реакции амплификации ДНК (PCR-анализ) и его модификации позволяют выявлять определенные последовательности нуклеотидов. Этот подход широко используется для обнаружения патогенных микроорганизмов. Высокая достоверность получаемых результатов обеспечивает широкое применение PCR-анализа в научной и клинической практике. Тем не менее, эта современная технология имеет ряд существенных недостатков и ограничений. При исследованиях методом PCR существует вероятность получения ложноотрицательных результатов в случаях, когда выявляемый объект присутствует в пробе в незначительных количествах. Такие ситуации недопустимы при выявлении патогенных микроорганизмов в диагностических и эпидемиологических целях. [Агафонова Е. В., Долбин Д. А., Куликов С. Н., 2008]

Ограничения данного метода связаны с особенностями биологии кишечных форм простейших и спецификой их лабораторной детекции. Имеются сложности экстракции нуклеиновых кислот из фекалий, т.к. все используемые в паразитологии способы консервации фекалий снижают

чувствительность и специфичность ПЦР. [Fotedar R., Stark D., Beebe N., Marriott D., Ellis J., Harkness J., 2007] Принципиальной особенностью требований к ПЦР в санитарной паразитологии является необходимость количественных данных, для получения которых необходимы соответствующие ДНК-мишени. [Wiedenmann A., Kruger P., Botzenhart K., 1998] Показана возможность детекции *G.lamblia* методами гибридизации при использовании в качестве мишени родоспецифичного гена рРНК малой субъединицы рибосом [Abbaszadegan M., Gerba C.P., Rose J.B., 1991] Определенные трудности внедрения ПЦР были связаны с дифференцировкой жизнеспособных вариантов простейших [Fontaine M., Guillot E., 2003], представляющих инфекционную опасность. Указанное удалось преодолеть использованием в качестве мишени термоиндуцируемых генов - hsp70 [Abbaszadegan M., Huber M.S., Gerba C.P., Pepper I.L., 1997] и бета-гитардина *G.lamblia*. Имеется опыт дифференцировки жизнеспособных простейших по транскрипционной активности и наличию мРНК гена бета-гитардина. [Bertrand I., Maux M., Helmi K., Hoffman L., Schwartzbrod J., Cauchie H.M., 2009]

Одной из важнейших проблем диагностики паразитарных, в том числе протозоозных заболеваний является сложность обнаружения низких уровней патогена в объектах окружающей среды. Лямблии невозможно обогатить культуральными методами, таким образом, необходимо находить другие способы обогащения исследуемых проб. Метод ПЦР может использоваться для обнаружения паразитарных патогенов в объектах окружающей среды, но широкое применение этого высокочувствительного метода ограничено наличием в объектах окружающей среды ингибиторов ПЦР. Одним из методов увеличивающих чувствительность и специфичность, позволяющим избегать ингибирования может являться сочетание методов иммуномагнитной сепарации и ПЦР. [Olsvik O., Porovic T., Skjerve E., 1994] Также определенные перспективы связывают с

разработкой модификации ПЦР с обратной транскрипцией в формате real-time. [Baque R.H., Gilliam A.O., Robles L.D., Jakubowski W., Slifko T.R 2011]

7.1 Профилактика

Так как лямблиозная инвазия приводит к нарушениям всасывания белков, нарушается и синтез протективных иммуноглобулинов, в связи, с чем проводимые профилактические прививки на фоне лямблиоза могут оказаться малоэффективными. При наличии лямблиозной инвазии у детей выше частота случаев бактериальных инфекций (пневмонии, бронхиты, отиты, ангины, стоматиты и др.). Тяжелее протекают и поддаются лечению другие соматические болезни. Сезонность лямблиоза наиболее выражена в весенние месяцы (апрель-май), а также летом.

Основными мерами неспецифической профилактики, как и профилактики всех кишечных инфекционных заболеваний, являются меры по предотвращению фекального загрязнения воды, пищевых продуктов и других объектов внешней среды. Необходимо строго соблюдать правила личной гигиены, уничтожать механических переносчиков — мух и тараканов. Особое значение имеет поддержание строгого санитарно-гигиенического режима на объектах питания и водоснабжения, а также в детских учреждениях. Все, поступающие на работу на эти предприятия и в эти учреждения, обследуются на кишечные простейшие. Такому же обследованию подвергаются дети при оформлении в детские сады и интернаты. Выявленные носители санируются. Профилактические мероприятия в детских коллективах целесообразно сочетать с мерами профилактики энтеробиоза. На зараженность кишечными простейшими обследуются также все больные острыми кишечными инфекциями.

Употребление воды, обработанной с помощью бытовых водяных фильтров, не гарантирует защиту организма от лямблий. Это связано с тем, что размеры пор сорбентов, используемых в фильтрах, больше размера

цист. Крупные «водные вспышки» лямблиоза зарегистрированы в США и других странах.

Максимальное число водных вспышек лямблиоза регистрируется в конце зимы — начале весны, что связано с таянием снегов и механическим загрязнением воды открытых водоемов. В это время года на водоочистных станциях не удастся полностью удалить цисты лямблий путем их механического осаждения. В большинстве случаев заражение происходит через воду из открытых водоемов или воду, не подвергшуюся качественной механической очистке.

Контактно-бытовой путь наиболее характерен для детских дошкольных учреждений. В качестве факторов передачи основную роль играют загрязненные руки детей и (в меньшей степени) персонала, полы, ковры, игрушки. Поверхность мебели и предметов в туалетах.

Пищевой путь менее значим. Немногочисленные известные пищевые вспышки лямблиоза были связаны с обсеменением цистами лямблий продуктов питания, не подвергавшихся термической обработке (салаты, пудинги и пр.). Источником инвазии при таких вспышках, как правило, служил инвазированный лямблиями работник пищеблока. Определенное значение в распространении лямблий имеют бытовые насекомые. В кишечнике мух они остаются живыми от 30 часов до нескольких дней, в кишечнике тараканов — до 8 суток.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Взятие материала

Был проведен отбор проб для санитарно-микробиологического исследования предметов обихода и оборудования с детских дошкольно – образовательных учреждений г. Уфа. Всего было собрано 80 образцов.

Метод смывов является основным при отборе проб для исследования твердых поверхностей.

При взятии проб соблюдали определенную очередность. Пробы вначале брали в спальном комнате, затем в столовой, игровой комнате, умывальной и, в заключение, в санузле.

При взятии смывов с оборудования, инвентаря, предметов быта, столовых приборов записывали: номер образца по порядку, место взятия смыва, в каком техническом и санитарном состоянии находилось оборудование (инвентарь, посуда и т. д.), с которого взят смыв, время забора.

Техника взятия смывов

При определении обсемененности возбудителями *Giardia* *Lamblia* предметов обихода смывы брали с мебели, ковров, постельного белья, ночных горшков, игрушек, дверей, парт, спортивного инвентаря, поручней, санузлов.

Смывы с крупных плоских поверхностей (столы, подоконники, полы, стулья, оборудование, инвентарь и т.д.) производили перед началом рабочего дня, либо после санитарной обработки в санитарные дни. При взятии смывов с мелких инструментов обтирали всю поверхность предмета. При взятии смывов с поверхности кровати, двери шкафчика, пола, ковра, подоконника протирали 4 площадки по 25 см².

Взятие смывов производили с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов. Стерильные ватные тампоны на металлических палочках, вмонтированных в пробирки с ватными пробками, заготовили заранее в

лаборатории. В день взятия смывов в каждую пробирку с тампоном налили (в условиях бокса над горелкой) по 3 мл стерильного 0,9% раствора глицерина таким образом, чтобы ватный тампон не касался жидкости. Непосредственно перед взятием смыва тампон увлажняли средой.

Доставка в лабораторию взятого материала должна производиться в термоконтейнерах. Транспортировку в лабораторию взятого материала проводили в максимально короткие сроки (не более 1 – 1,5 часов), так как затягивание этого срока отражается на достоверности результатов анализа.

Оценка результатов

Обнаружение цист *Giardia lamblia* в смывах с поверхностей чистых, подготовленных к работе предметов, инвентаря и оборудования, свидетельствует о нарушении санитарного режима и дает основание для проведения административных мер.

2.2.Метод седиментации (осаждения) клинического материала

В основе методов седиментации (осаждения) лежит разность удельного веса используемых химических реактивов и цист простейших: удельный вес цист высокий, и они концентрируются в осадке

Ход исследования

1.В центрифужные градуированные пробирки налить 7 мл 0,9 %-ного физиологического раствора.

2.Добавить клинический образец 2 мл(чтобы раствор в пробирке поднялся до 10 мл)

3.Содержимое пробирок тщательно перемешать, при помощи палочки(индивидуальный для каждого образца)

4.Смесь центрифугировать при 1500 об/мин в течение 5 минут

После центрифугирования осадок, оставшийся на дне пробирки микроскопировать.

2.3.Бактериоскопическое исследование (микроскопия)

- 1)Перед началом работы необходимо проверили наличие на столе для микроскопии необходимого оборудования и дополнительных материалов;
- 2)Удостоверились в целости оптической системы;
- 3)Включили осветительную систему и убедились в достаточном освещении;
- 4)Протерли линзы объективов микроскопа при помощи бумажной салфетки или марлевого тампона, смоченного спирто-эфирной смесью;

При исследовании на цисты простейших в одну из капель осадка внесли каплю 1 %-ного раствора Люголя. Капли накрыли покровным стеклом (жидкость не должна выступать за края стекла или затекать на покровное стекло). Каплю с раствором Люголя исследуем на цисты *Giardia lamblia*. Микроскопирование: на цисты *G.lamblia* - объектив $\times 40$

Оценивали следующие показатели: при окраске Люголем цисты окрашиваются в золотисто-коричневый цвет. На фоне цитоплазмы заметны ядра, их строение и число. Хорошо виден гликоген, окрашивающийся в разные оттенки коричневого цвета. Оболочка сравнительно толстая, хорошо очерчена, часто в значительной своей части как бы отслоена от тела самой цисты. Этот признак помогает отличать цисты лямблий от других сходных образований.

В ходе микроскопического исследования в клинических образцах вегетативных форм и цист лямблий не было обнаружено.

2.4.Выделение ДНК

Для выделения тотальной ДНК микроорганизмов методом нуклеосорбции использовали стандартный набор «ДНК-сорб-АМ» серии «АмплиПрайм» фирмы «ИнтерЛабСервис».

Клинический материал обрабатывается лизирующим раствором в присутствии сорбента. В результате происходит деструкция клеточных

мембран и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывке. При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования [Boom R. et al., 1990].

Ход работы:

1. Подготовить и расставить в штативе пробирки с клиническим материалом, необходимое количество одноразовых стерильных пробирок объемом 1.5 мл и промаркировать их.
2. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 20 мкл сорбента универсального, после чего внести по 300 мкл лизирующего раствора, используя наконечники с фильтром.
3. Внести по 100 мкл клинического образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.
4. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе и инкубировать 5 мин при температуре 65°C. После окончания инкубации содержимое повторно перемешать на вортексе и оставить при комнатной температуре на 2 мин.
5. Осадить сорбент в пробирках центрифугированием при 10 тыс. об/мин в течение 30 сек. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.
6. Добавить в пробы по 1 мл отмывочного раствора, перемешать на вортексе до полного ресуспензирования сорбента.

7. Повторить п. 5.

8. Поместить пробирки в термостат с температурой 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента, при этом крышки пробирок должны быть открыты.

9. В пробирки добавить по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК, используя наконечник с фильтром. Перемешать на вортексе до полного ресуспензирования сорбента. Поместить в термостат с температурой 65°C на 5 мин.

10. Центрифугировать пробирки при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Полученные пробы можно хранить в течение 1 недели при температуре 2-8°C или в течении года при температуре не выше -16°C.

В дальнейшем полученную ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации нужного фрагмента гена 16S рРНК, выявляемого методом ПЦР.

2.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Амплификацию участков ДНК осуществляли с использованием стандартных наборов для амплификации «Интерлабсервис» на амплификаторе «Терцик МС-2» (г. Москва).

Таблица 1.

Список праймеров использованных для детекции *G.lamblia*

Название	Олигонуклеотидная последовательность
Gia B254f	CCG-CGA-GGA-GGT-CAA-GAA-GT
Gia B419r	GAT-GGC-GTC-GTT-ATG-GAT-GG
Gia B416f	CCA-TCG-CGG-CTC-TCA-GCA
Gia B816r	CAG-GCG-CTT-AGT-GCT-TTG-TG
Gia 16s866f	AGG-CTG-AAA-CTT-GAA-GGC-ATT-GAC
Gia 16s 1432r	CAC-CTA-CGG-ATA-CCT-TGT-TAC-GAC

Амплификацию специфичного фрагмента гена 16 рРНК проводят в реакционной смеси объемом в 25 мкл, содержащей 3 мкл исследуемого образца ДНК, 2.5 мкл 10× Taq – буфера, 2.5 мкл раствора dNTP, по 0.5 мкл каждого праймера (по 2 о.е. каждого), 0.5 мкл Taq-полимеразы и 12.5 мкл mQ. Для предотвращения испарения смеси в процессе реакции в каждую пробирку добавили по одной капле минерального масла.

Реакцию амплификации проводили по программе со следующими параметрами. На начальном этапе проводилась денатурация ДНК при 95°C в течение 2 мин, после чего следовали 45 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации ДНК в течение 30 сек при 95°C, стадию отжига праймеров продолжительностью 30 сек при температуре 55-70°C (в зависимости от длины и нуклеотидной последовательности использованных праймеров) и стадию элонгации в течение 30 сек при температуре 72°C, которая оптимальна для активности Taq-полимеразы. На заключительной стадии реакционная смесь выдерживалась при температуре 72°C в течение 2 мин для завершения построения комплементарных цепей фрагментов ДНК и исключения копий, содержащих не полностью достроенные молекулы.

Таблица 2.

Режим амплификации			
	Температура	Время	Количество циклов
Исходная денатурация	95 °С	2мин	1
Денатурация	95 °С	30 сек	45
Отжиг	55 °С	30 сек	
Элонгация	72 °С	30 сек	
Финальное удлинение	72 °С	2 мин	1

2.6. Электрофорез

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР осуществляли с использованием стандартных наборов фирмы «Интерлабсервис» на сертифицированном оборудовании (Биоком, г. Москва) в 1,5% горизонтальном агарозном геле. В качестве электролита для электрофореза применяли 1х-ный ТБЕ буфер. Параметры электрофореза: сила тока 400 мА, мощность 80Вт, напряжение 120 В. Электрофорез проводили в течение 25-30 минут.

Детекцию результатов проводят путем окрашивания агарозного геля бромистым этидием с последующей визуализацией при освещении УФ на трансиллюминаторе «УВТ-1» (Биоком, Россия). Документирование результатов проводят с использованием системы для фотодокументации: цифровой видеокамеры «Mintron» и программы «Biotest-D» (Биоком, Россия). Продукты амплификации проявляются в виде светящейся оранжево-красной полосы.

Агарозный гель-электрофорез проводили по следующей схеме:

1. Приготовили 1 л 1х-ного ТБЕ буфера путем разбавления 50х-ного ТБЕ буфера в дистиллированной воде. К 20 мл 50х-ного ТБЕ буфера добавили 980 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешали.

2. Взвесили 1,5 г агарозы и добавили 100 мл 1х-ного ТБЕ буфера, перемешали и расплавили смесь в микроволновой печи в течение 2-3 минут. Периодически помешивали. Довели до кипения, но не допускали кипения более 10 секунд. Смесь в колбе стала прозрачного цвета.

3.Разлили агарозу на ровной поверхности в специальную форму (заливка) с одной или двумя пластиковыми гребенками, при этом толщина геля была 2 – 5 мм. Гель полностью застыл за 15-20 минут.

4.Налили в камеру для электрофореза необходимое количество 1х-ного ТБЕ буфера, поместили в него застывший гель. Буфер полностью покрывал гель сверху на 2-10 мм.

5.На специальных плашках перемешали 3-5 мкл смеси красителей (бромфеноловый синий, ксиленцианол, 30% глицерин) с 5-10 мкл выделенных образцов ДНК.

6.Медленно нанесли автоматической пипеткой пробу ДНК с красителем в лунку геля в последовательности, соответствующей нумерации проб. Благодаря глицерину раствор ДНК не всплывал из лунки.

7.Подключили клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (–) находился на старте, а (+) – на финише.

8.Запустили электрофорез при помощи источника питания (Эльф-4, ДНК-Технология) при следующих параметрах: сила тока 400 мА, мощность 80Вт, напряжение 120 В. На старте пузырей было больше, чем на финише. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляли визуально по движению полосы красителя.

9.Электрофорез проводили в течение 20-50 минут, затем вынули гель из формы и поместили в кювету для окрашивания. Налили в кювету слабый раствор бромистого этидия. Окрашивали в течение 10-15 мин.

10.Слили краситель в колбу. Промыли гель проточной водой. Поместили его на стекло УФ-трансиллюминатора. Включили трансиллюминатор и проанализировали результаты анализа.

11.Фрагменты анализируемой ДНК проявлялись в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм. Сфотографировали гель при помощи цифрового фотоаппарата.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время для санитарно – паразитологического контроля объектов окружающей среды существуют прямые и косвенные методы. Относительно новым методом в этой области является полимеразная цепная реакция (ПЦР).

К прямым методам выявления возбудителя причисляют паразитологический метод (макро-, микроскопия). Преимуществами метода является его дешевизна и быстрота, минимальные требования к организации лаборатории. К недостаткам относят субъективность оценки результатов; невысокую чувствительность.

Метод ПЦР является косвенным методом выявления возбудителя. Среди его достоинств отмечают прямое обнаружение возбудителя, высокую специфичность, чувствительность, высокую скорость получения результата анализа, универсальность процедуры выявления возбудителя, возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций. К недостаткам следует отнести высокие требования к оснащению лаборатории, неоднозначная оценка положительных результатов.

Исходя из этого, видно, что и метод микроскопии и ПЦР имеют определенные достоинства и недостатки.

В связи с этим, нами была проведена работа по исследованию обсемененности *G.lamblia* в объектах окружающей среды, применяя микроскопический метод исследования и ПЦР.

Объектом данного исследования являлись образцы клинического материала (смывы) с поверхностей предметов быта детского дошкольного образовательного учреждения.

Практическая часть исследовательской работы проводилась на базе БГМУ и ИБГ УНЦ РАН, ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии и включала в себя следующие этапы:

- 1) Сбор материала
- 2) Микроскопия проб материала;
- 3) Выделение ДНК набором «ДНК-сорб АМ»;
- 4) Постановка ПЦР – анализа;
- 5) Проведение электрофореза продуктов ПЦР.
- 6) И, в заключение, сравнение полученных результатов.

3.1. Микроскопический метод исследования

Циста в нативном мазке отличается от вегетативной стадии постоянной формой благодаря оболочке. Строение цист в нативном препарате плохо заметно, невидны ядра. Поэтому для уточнения вида применяли мазок, окрашенный раствором Люголя. При этом цисты окрасились в золотисто-коричневый цвет. На фоне цитоплазмы стали заметны ядра, их строение и число. Хорошо виден гликоген, окрашивающийся в разные оттенки коричневого цвета. Оболочка сравнительно толстая, хорошо очерчена, часто в значительной своей части как бы отслоена от тела самой цисты.

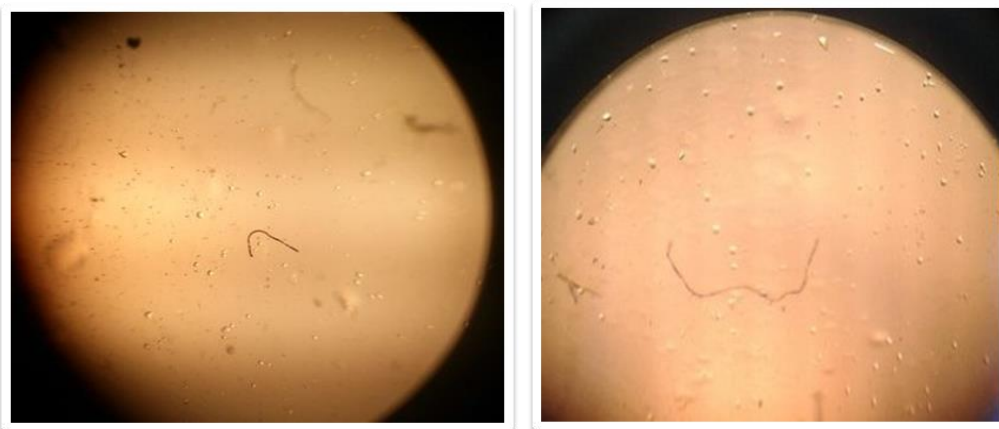


Рисунок 1. Микроскопическое исследование смывов

В ходе микроскопического метода исследования цист и вегетативных форм *G.lamblia* в объектах окружающей среды не было обнаружено.

3.2.ПЦР - анализ

Для проведения ПЦР – анализа нами были подобраны праймеры к консервативным участкам гена 16S рРНК. Для этого из международного банка нуклеотидных последовательностей GenBank были получены нуклеотидные последовательности депонированных генов 16S РНК *G.lamblia*. Было проведено множественное выравнивание, выявлены консервативные участки, специфичные только к *G.lamblia* которым в дальнейшем были подобраны видоспецифичные праймеры. Специфичность полученных праймеров определяли на различных образцах ДНК эукариотических объектов, включая ДНК, выделенной из самого паразита.

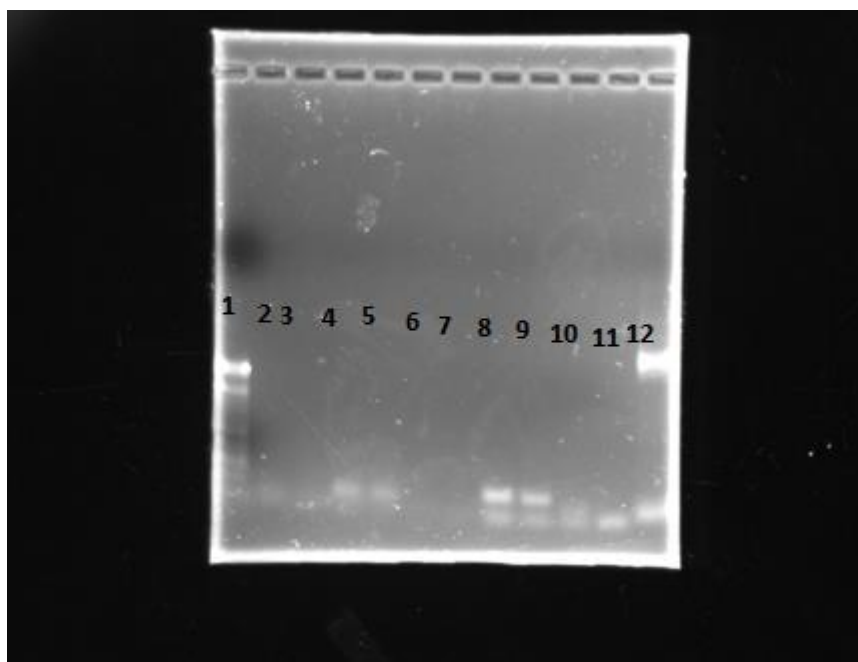


Рисунок 2.Проверка специфичности и чувствительности разработанных праймеров для детекции ДНК *G.lamblia* на контрольных образцах.

В дальнейшем было проведено выделение ДНК из клинического материала. Выделение ДНК проводила набором «АмлиПрайм ДНК-сорб-

АМ». ПЦР-анализ проводили в мультиплексном варианте с праймерами, и с детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

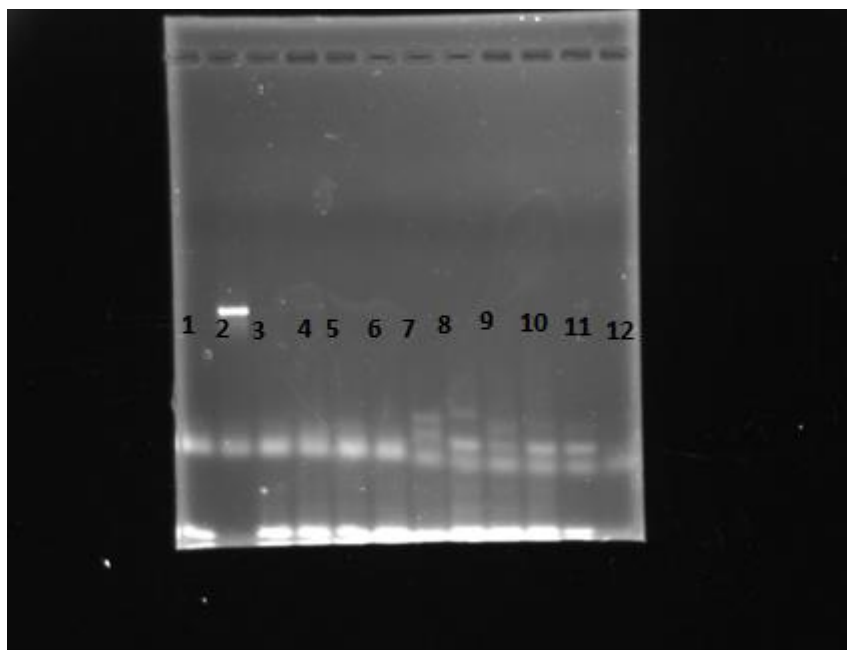


Рисунок 3. Электрофореграмма ПЦР-анализа образцов смывов с поверхности объектов на территории детского сада на наличие в них фрагментов гена 16 рРНК *G.lamblia*.

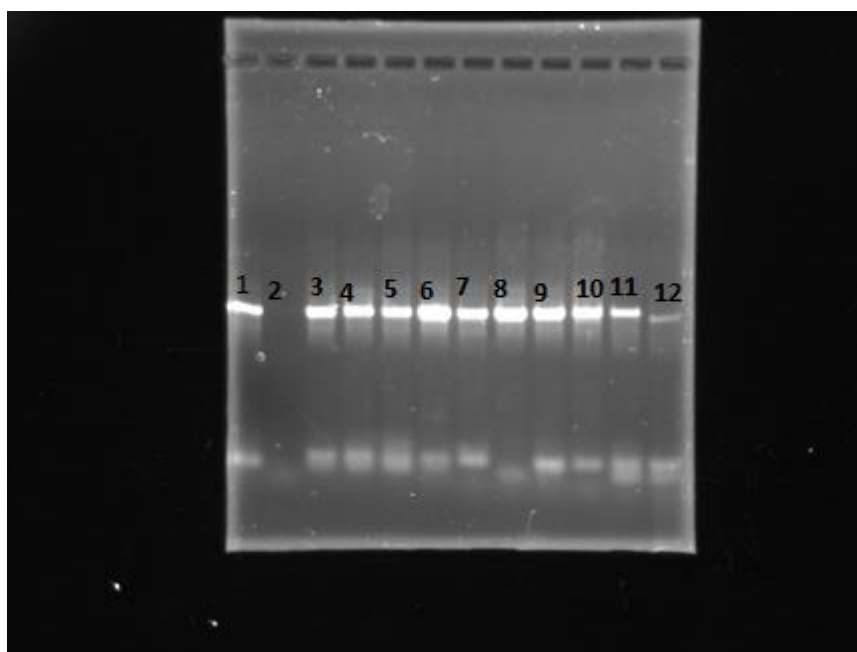


Рисунок 4. Электрофореграмма ПЦР-анализа образцов смывов с поверхности объектов на территории детского сада на наличие в них фрагментов гена 16 рРНК *G.lamblia*.

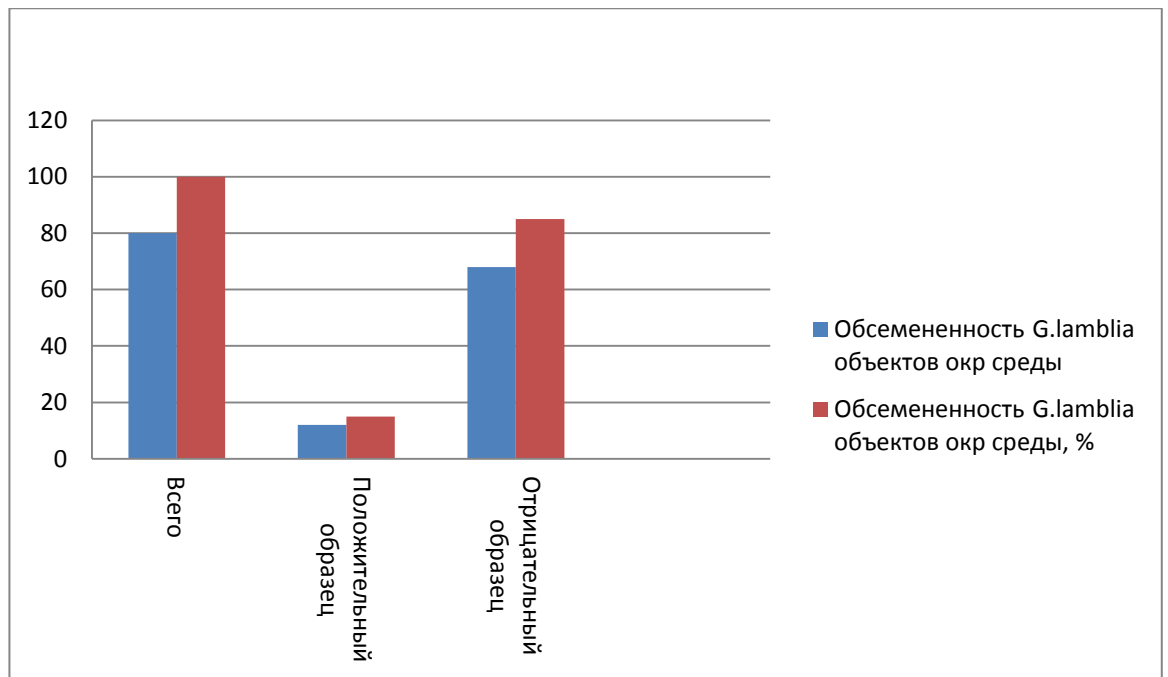


Рисунок 5. Результат ПЦР анализа объектов окружающей среды на наличие цист *G. lamblia*.

3.3. Сравнение методов микроскопия и ПЦР

Исходя из полученных данных, в ходе проведенного исследования можно сделать вывод о том, что ПЦР анализ может быть пригоден для обнаружения *G.lamblia* в объектах окружающей. Показана большая чувствительность ПЦР анализа по сравнению с методом микроскопии. Данные ПЦР анализа, могут использоваться для санитарно-паразитологических исследований при детекции *G.lamblia* в объектах окружающей среды.

ВЫВОДЫ

1. Объекты внешней среды в детских дошкольных учреждениях обсеменены *Giardia lamblia* и инфекционную угрозу для детей.
2. При использовании традиционных методов детекции *G.lamblia* характерна низкая чувствительность, т.к. не было обнаружено ни одного положительного результата.
3. Геном *G.lamblia* включает консервативные участки, к которым могут быть подобраны праймеры, применимые для конструирования тест-систему по детекции указанных микроорганизмов.
4. При исследовании объектов внешней среды может использоваться ПЦР, поскольку в наших исследованиях этот метод позволил выявить специфические фрагменты ДНК лямблий .
5. Информативность ПЦР в сравнении с микроскопией существенно выше, т.к. выявляемость *G.lamblia* методом ПЦР составила 15%, при микроскопии – 0%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.Пак В.И., Брико С.Г., Данилкин Б.,К Инфекционные болезни и эпидемиология, учебник Покровский 3-е издание – с.1008 Глава 6 Паразитарные заболевания, 2013;
- 2.Бельмер С.В. и Новикова В.П. Лямблиоз у детей: принципы базисной терапии, "Российский медицинский журнал", № №24, с. 1201-1205, 2013;
- 3.W. a. J. R. Betancourt Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*, 2010;
- 4.Albertini L., Schwartzbrod J, Comparison of Two Target Genes for Detection and Genotyping of *Giardia lamblia* in Human Feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, *J. of Clin. Microbiol.*, № 43, pp. 5940-5944, 2005;
- 5.Sterling K. M. a. C. R., Sensitivity of Nested PCR in the Detection if Low Numbers of *Giardia lamblia* Cysts, *Appl. Environ. Microbiol.*, № 73, pp. 5949-5950, 2007;
- 6.Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H. , Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover H. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed., ASM Press, Washington, D.C, 2003;
- 7.Jones J.E., Balows A., Hausler W.J., Ohashi *Giardiasis. Laboratory diagnosis of infectious diseases*, 2000;
- 8.Turano A.M., (ed.). New York: Springer-Verlag, 1988. Vol. 1. P. 872–882.;
- 9.Saha T.K., Ghosh T.K. Invasion of small intestinal mucosa by *Giardia lamblia* in man // *Gastroenterol* 1977. Vol. 72. P. 402–405;
- 10.Organization W. H., «Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*). Guidelines for drinking water quality. Addendum to the second edition of the guidelines for drinking water quality,» Geneva, Switzerland, 2002;

11. Baldursson S., Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010 // *Water Res.* 2011. Vol. 15; 45(20). P. 6603–6614;
12. Хасанова Е. Е., журнал Лечащий врач №6, июнь 2012г.;
13. Пак В.И., Брико С.Г., Данилкин Н.И. Инфекционные болезни и эпидемиология, учебник 3-е издание– 1008 стр. Глава 6 Паразитарные заболевания 2013;
14. World Health Organization. Regional office for Europe., «"Health 2020. A European policy framework and strategy for the 21st century",» Paris, 2012;
15. Coker R., Atun R., McKee M., Health systems and the challenge of communicable diseases. Experiences from Europe and Latin America, "Open University Press", 2008;
16. Wolfe M.S., Current concepts in parasitology: giardiasis // *N. Engl. J. Med.*, Vol. 298. P. 319–321, 1978;
17. Gradus M.S., Water quality and waterborne protozoa // *Clin. Microbiol. News.* Vol. 11. P. 121–125, 1989;
18. Hotez P.J., Gurwith M. ,Europe's neglected infections of poverty // *Int. J. Infect. Dis.* 2011. Vol.15(9). P. e611–619;
19. Muhsen K., Levine M.M. A systematic review and meta-analysis of the association between Giardia // *J. Trop. Med. Hyg.*, Vol. 25. P. 384–389, 1976;
20. Craun G., Waterborne giardiasis in the United States 1965-1984 // *Lancet*, P.513–514, 1986;
21. Gradus M.S. Water quality and waterborne protozoa // *Clin. Microbiol. News.*, Vol. 11. P. 121–125, 1989;
22. Davies R.B., Hibler C.P. , Animal reservoirs and cross-species transmission of Giardia. In W.Jakubowski, J.C. Hoff (ed.), *Waterborne transmission of giardiasis* // *Environm. Protection Agency Cincinnati*, P. 104–126, 1979;

- 23.Healy G.R., Giardiasis in perspective: the evidence of animals as a source of human Giardia infections/ E. A. Meyer (ed.), Giardiasis. Elsevier Science Publishing. New York, P. 305–313, 1990;
- 24.Farthing M.J.G. // Journal of Pediatric Gastroent and nutrition – V. 24. – P. 79 – 88, 1997;
- 25.Katellaris P. The effect of Giardia lamblia trophozoites on lipolysis in vitro / P. Katellaris, F. Seow, M. Ngu // Parasitology Vol. 103, Pt. 1. – P. 35–3, 1991;
- 26.Seow F. The effect of Giardia lamblia trophozoites on trypsin, chymotrypsin and amylase in vitro / F. Seow, P. Katellaris, M. Ngu // Parasitology Vol. 106, Pt. 3. – P. 233–238, 1993;
- 27.Turiaf J. Pancreatic lithiasis associated with intestinal lamblasis / J. Turiaf, P. Blanchon // Rev. Prat Vol. 2. – N. 30. – P. 2003–2005, 1952;
- 28.H. P. F. a. T. E. Hans-Anton Keserue, «Rapid Detection and Enumeration of Giardia lamblia Cysts in Samples by Immunomagnetic Separation and Flow Cytometric Analysis,» Applied and environmental microbiology, № aug, pp. 5420-5427, 2011;
- 29.Olsvik O., Popovic T., Skjerve E., «Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology,» Clinical Microbiology Reviews, т. 7, № 1, pp. 43-54, 1994;
- 30.Monteiro L., Bonnemaïson D., Vekris A., Petry K., Bonnet J., Vidal R., Cabrita J., Megraud F., «Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model,» J. clin. microbiol., № 35, pp. 2405-2407, 1997;
- 31.Verweij J., Schinkel J., Laeijendecker D., M.A.A. van Rooyen, Van Lieshout L., Polderman A., «Real-time PCR for the detection of Giardia lamblia,» Mol. Cell. Probes, № 17, pp. 223-225, 2003;
- 32.Adam R. D. Biology of Giardia lamblia // Clinical Microbiology Reviews, V. 14. — P. 447–475, 2014;
- 33.Faubert G. Immune Response to Giardia duodenalis // Clinical Microbiology Reviews, V. 1. — P. 35–54, 2000;

34. Pennardt M., Cox F. E. Human parasitology. Giardiasis // Clin. Microbiol. Rev, V. 15, № 4. — P. 595–612, 2006;
35. Родионов В.А., Иванова И.Е., Кузнецова С.А., Романова П.А., Смирнов М.М., Эффективность диагностики гельминтозов и лямблиозов в амбулаторных условиях 2012;
36. Ajjampur S.S., Rajendran P., Ramani S., Banerjee I., Monica B., Sankaran P., et al. Closing the diarrhoea diagnostic gap in Indian children by the application of molecular techniques. J Med Microbiol. 57: 1364–1368, 2008;
37. Fotedar R., Stark D., Beebe N., Marriott D., Ellis J., Harkness J. Laboratory Diagnostic Techniques for Entamoeba Species. Clinical Microbiology Reviews. 20 (3): 511–532, 2007;
38. Lebbad M., Svard S. G. PCR differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar from patients with amoeba infection initially diagnosed by microscopy. Scand. J. Infect. Dis. 37: 680–685, 2005;
39. Gomez-Couso H., Freire-Santos F., Amar C.F.L., Grant K.A., Williamson K., Ares-Mazas M.E. et al. Detection of Cryptosporidium and Giardia in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. Int. J. Food Microbiol. 91: 279–288, 2007;
40. Stroup S., Tongjai S., Swai N., Maro A., Kibiki G., Houpt E.R. Dual probe DNA capture for sensitive real-time PCR detection of Cryptosporidium and Giardia. Mol Cell Probes. 26 (2): 104–106, 2007;
41. Jiang J., Alderisio K.A., Singh A., Xiao L. Development of procedures for direct extraction of Cryptosporidium DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. Applied and Environmental Microbiology. 71 (3): 1135–1141, 2005;
42. Wiedenmann A., Kruger P., Botzenhart K. PCR detection of Cryptosporidium parvum in environmental samples—a review of published protocols and current developments. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 21: 150–166, 1998;

43. Abbaszadegan M., Gerba C.P., Rose J.B. Detection of *Giardia* cysts with a cDNA probe and application to water samples. *Applied Environmental Microbiology*. 57: 927-931, 1991;
44. Mahbubani M.H., Bej A.K., Perlin M., Schafer III F.W., Jakubowski W., Atlas R.M. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clin Microbiol*. 30: 74-78, 1992;
45. Guy R.A., Payment P., Krull U.J., Horgen P.A. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Applied Environmental Microbiology*. 69: 5178-5185, 2003;
46. Fontaine M., Guillot E. Study of 18S rRNA and rDNA stability by real-time RT-PCR in heat-inactivated *Cryptosporidium parvum* oocysts. *FEMS Microbiol. Lett*. 226: 237-243, 2003;
47. Abbaszadegan M., Huber M.S., Gerba C.P., Pepper I.L. Detection of viable *Giardia* cysts by amplification of heat shock induced mRNA. *Applied Environmental Microbiology*. 63: 324-328, 1997;
48. Bertrand I., Maux M., Helmi K., Hoffman L., Schwartzbrod J., Cauchie H.M., Quantification of *Giardia* transcripts during in vitro excystation: interest for estimation of cyst viability. *Water Research*. 43: 2728-2738, 2009;
49. Baque R.H., Gilliam A.O., Robles L.D., Jakubowski W., Slifko T.R. A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters. *Water research*. 45 (10): 3175-3184, 2011;
50. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology*. 27: 1135-1145, 1997;
51. Mahbubani M.H., Bej A.K., Perlin M., Schafer III F.W., Jakubowski W., Atlas R.M. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clin Microbiol*. 30: 74-78, 1992;

52. Kim J., Shin M.H., Song K.J., Park S.J. Evaluation of α -Tubulin as an Antigenic and Molecular Probe to Detect *Giardia lamblia*. Korean. J Parasitol. 47 (3): 287-291, 2009;
53. Barbour A.G., Nichols C.R., Fukēashima T. An outbreak of giardiasis in a group of campers // Am.J. Trop. Med. Hyg. 1976. Vol. 25. P. 384–389;
54. Jones J.E. Giardiasis. Laboratory diagnosis of infectious diseases. Balows A., Hausler W.J., Ohashi New York: Springer-Verlag, 1988. Vol. 1. P. 872–882;
55. MYK 4.2.2314-08;
56. Abbaszadegan M., Huber M.S., Gerba C.P., Pepper I.L. Detection of viable *Giardia* cysts by amplification of heat shock induced mRNA // Applied Environmental Microbiology - 1997; - 63: - P. 324-328.
57. Adamska M., Leońska-Duniec A., Maciejewska A., Sawczuk M., Skotarczak B. Recovery of DNA of *Giardia intestinalis* cysts from surface water concentrates measured with PCR and real-time PCR // Parasite - 2011; - 18: - P. 341-343.
58. Agency USEP., editor. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. <http://www.epa.gov/microbes/1623de05.pdf> 2005.
59. Ajajampur S.S., Rajendran P., Ramani S., Banerjee I., Monica B., Sankaran P. Closing the diarrhoea diagnostic gap in Indian children by the application of molecular techniques // J. Med. Microbiol. - 2008; - 57: - P. 1364–1368.
60. Baque R.H., Gilliam A.O., Robles L.D., Jakubowski W., Slifko T.R. A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters // Water research. - 2011; - 45 (10): - P. 3175-3184.
61. Baruch A.C., Isaac-Renton J., Adam R.D. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach // J. Infect. Dis., - 1996; - 174: - P. 233-236.

62. Bertrand I., Maux M., Helmi K., Hoffman L., Schwartzbrod J., Cauchie H.M., Quantification of *Giardia* transcripts during in vitro excystation: interest for estimation of cyst viability // *Water Research*. - 2009; - 43: - P. 2728- 2738.
63. Evangelopoulos A., Spanakos G., Patsoula E., Vakalis N., Legakis N. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and 164 differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces // *Ann. Trop. Med. Parasitol.* - 2000; - 94(3): - P. 233–240.
64. Evangelopoulos A., Legakis N., Vakalis N. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece // *Parasitol. Int.* - 2001. - 50: - P. 185–189.
65. Fontaine M., Guillot E. Study of 18S rRNA and rDNA stability by real-time RT-PCR in heat-inactivated *Cryptosporidium parvum* oocysts // *FEMS Microbiol. Lett.* - 2003; - 226: - P. 237–243.
66. Fotedar R., Stark D., Beebe N., Marriott D., Ellis J., Harkness J. Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2007; - 20(3): - P. 511–532.
67. Freitas M.A., Vianna E.N., Martins A.S., Silva E.F., Pesquero J.L., Gomes M.A. A single step duplex PCR to distinguish *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar* // *Parasitology* - 2004; - 128: - P. 625–628.
68. Gomez-Couso H., Freire-Santos F., Amar C.F.L., Grant K.A., Williamson K., Ares-Mazas M.E. et al. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR // *Int. J. Food Microbiol.* - 2004. - 91: - P. 279–288.
69. Gonin P., Trudel L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay // *J. Clin. Microbiol.* - 2003; - 41: - P. 237–241.
70. Guy R.A., Payment P., Krull U.J., Horgen P.A. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage // *Applied Environmental Microbiology*. - 2003; - 69: - P. 5178-5185.

71. Heckendorn F., NGoran E.K., Felgar I., Vounatsou P., Yapi A., Oettli A. et al. Species-specific field-testing of *Entamoeba* spp. in an area of high endemicity // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* - 2002; - 96: - P. 521–528.

72. Hopkins R.M., Meloni B.P., Groth D.M., Wetherall J.D., Reynoldsonm J.A., Thompson R.C. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and animals in Germany // *J Parasitol.* - 1997; - 83: - P. 44-51.

73. Jiang J., Alderisio K.A., Singh A., Xiao L. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors // *Applied and Environmental Microbiology.* - 2005; - 71 (3): - P. 1135-1141.

74. Johnson D.W., Pieniazek N.J., Griffin D.W., Misener L., Rose J.B. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples // *Appl Environ Microbiol.* - 1995; - 61: - P. 3849–3855.

75. Kim J., Shin M.H., Song K.J., Park S.J. Evaluation of α -Tubulin as an Antigenic and Molecular Probe to Detect *Giardia lamblia*. Korean // *J Parasitol.* - 2009; - 47(3): - P. 287-291. 165

76. Lebbad M., Svard S.G. PCR differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from patients with amoeba infection initially diagnosed by microscopy // *Scand. J. Infect. Dis.* - 2005; - 37: - P. 680–685.

77. Mahbubani M.H., Bej A.K., Perlin M., Schafer III F.W., Jakubowski W., Atlas R.M. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes // *J Clin Microbiol.* - 1992; - 30: - P. 74-78.

78. Mahbubani M.H., Bej A.K., Perlin M., Schaefer F.W., Jakubowski W., Atlas R.M. Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts // *Applied Environmental Microbiology* - 1991; - 57: - P. 3456-3461.

79. Nunez Y.O., Fernandez M.A., Torres-Nunez D., Silva J.A., Montano I., Maestre J.L. et al. Multiplex polymerase chain reaction amplification and

differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* - 2001; - 64: - P. 293–297.

80. Paglia M.G., Visca P. An improved PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in formalin-fixed stools // *Acta Trop.* - 2004; - 92: - P. 273–277.

81. Painter J.E., Gargano J.W., Collier S.A., Yoder J.S. Giardiasis surveillance - United States, - 2011-2012 // *MMWR.* - 2015; - 64(3): - P. 15-25.

82. Roy S., Kabir M., Mondal D., Ali I.K., Petri W.A.Jr., Haque R. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection // *Clin. Microbiol.* - 2005; - 43: - P. 2168–2172.

83. Schriewer A., Wehlmann A., Wuertz S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8 // *Journal of Microbiological Methods* - 2011; - 85: - P. 16-21.

84. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections // *International Journal for Parasitology* - 1997; - 27: - P. 1135-1145.

85. Stroup S., Tongjai S., Swai N., Maro A., Kibiki G., Houpt E.R. Dual probe DNA capture for sensitive real-time PCR detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* // *Mol Cell Probes.* - 2012; - 26(2): - P. 104–106.

86. Hove R., Schuurman T., Kooistra M., Moller L., van Lieshout L., Verweij J.J. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR // *Clin Microbiol Infect.* - 2007; - 13: - P. 1001–1007.

87. Verweij J.J., Blotkamp J. Bienen E.A., Aguirre A., Polderman A.M. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts using polymerase chain reaction on DNA isolated from faeces with spin columns // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* - 2000; - 19: - P. 358–361.

88. Verweij J.J., van Lieshout L., Blotkamp C., Bienen E.A., van Duivenvoorden S., van Esbroeck M. et al. Differentiation of *Entamoeba* 166

histolytica and Entamoeba dispar using PCR-SHELA and comparison of antibody response // Arch. Med. Res. - 2000; - 31: - P. 44–46.

89. Weiss J.B., van Keulen H., Nash T.E. Classification of subgroups of Giardia lamblia based upon ribosomal RNA gene sequence using polymerase chain reaction // Mol Biochem Parasitol. - 1992; - 54: - P. 73-86.

90. Wiedenmann A., Kruger P., Botzenhart K. PCR detection of Cryptosporidium parvum in environmental samples-a review of published protocols and current developments // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. - 1998; - 21: - P. 150–166.

91. Wilkes G., Brassard J., Edge T.A., Gannon V., Jokinen C.C., Jones T.H. et al. Bacteria, viruses, and parasites in an intermittent stream protected from and exposed to pasturing cattle: prevalence, densities, and quantitative microbial risk assessment // Water Res. - 2013; - 47(16): - P. 6244-6257.

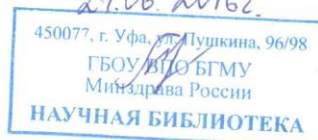
92. Yong T.S., Park S.J., Hwang U.W., Yang H.W., Lee K., Min D.Y. et al. Ribosomal DNA sequencing for genotyping of Giardia lamblia recovered from humans in China and Korea // J. Parasitol. - 2000; - 86: - P. 887-891

ПРИЛОЖЕНИЕ

Справка об антиплагиате студентки МБ 401 Фаттаховой Р.Р.

Информация о документе:

Имя исходного файла: Диплом на антиплагиат.docx
Имя компании: Башкирский государственный медицинский университет
Тип документа: Прочее
Имя документа: Фаттахова
Текстовые статистики:
Индекс читаемости: сложный
Неизвестные слова: в пределах нормы
Макс. длина слова: в пределах нормы
Большие слова: выше нормы!
Оригинальные блоки: 78.65%
Заимствованные блоки: 21.35%
Заимствование из "белых" источников: 0%
Итоговая оценка оригинальности: **78.65%**



Отзыв
научного руководителя на дипломную работу
«Сравнительная оценка обсемененности *Giardia lamblia* объектов
окружающей среды»», выполненную студенткой 4 курса
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Фаттаховой Радмилы Рустамовны

Студентка Фаттахова Р.Р. проходила дипломную практику в Башкирском государственном медицинском университете, на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии, в ходе которой приняла участие в комплексной совместной работе с ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» РБ.

Фаттахова Р.Р. проработала значительный объем научно-методической литературы, освоила паразитологические методы, применяемые для лабораторной диагностики возбудителей лямблиоза.

При выполнении дипломной работы показала себя как ответственный, исполнительный, инициативный экспериментатор. Овладела целым рядом паразитологических методов исследования, что позволило ей решить все поставленные задачи. Особо следует отметить уровень освоения Фаттаховой Р.Р. всех этапов санитарно-паразитологических исследований, включая умение брать смывы и многое другое.

Она ориентируется в современных биологических базах данных и хорошо теоретически подготовлена.

Резюмируя вышеизложенное необходимо заключить, что Фаттахова Р.Р. освоила весь объем теоретических данных и приобрела необходимые практические навыки, подпадающие под компетенции бакалавра по направлению 06.03.01 Биология, и заслуживает положительной оценки.

Научный руководитель:
д.м.н., проф., заведующий кафедрой
фундаментальной и прикладной микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава
России



А.Р. Мавзютов

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико - профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Фаттаховой Радмилы Рустамовны

Возможность детекции *Giardia lamblia* в объектах окружающей среды, особенно на предметах обихода в детских учреждениях, где частота заболеваемости лямблиозом является наиболее высокой, на сегодняшний день остается весьма актуальной. В связи с этим тема данного исследования, посвященного проблеме обнаружения *Giardia lamblia* в объектах окружающей различными методами является актуальной.

Фаттаховой Р.Р. обработано большое количество научного материала, на высоком теоретическом и методологическом уровне. Материал в дипломной работе (проекте) логически структурирован, написан научным стилем изложения. Объем дипломной работы (проекта) составляет 69 страниц, среди которых 5 рисунков и 2 таблицы.

Очевидным достоинством рассматриваемой дипломной работы является подробный анализ существующих методов с подробным разбор всех их плюсов и минусов.

Вместе с тем, считаю возможным сделать следующее замечание:

В качестве объекта окружающей среды были использованы смывы лишь с детских дошкольных учреждений, что несколько снижает показательность проведенной работы.

Однако отмеченный недостаток не может повлиять на общее положительное впечатление от работы, которая соответствует всем предъявляемым требованиям.

Дипломная работа Фаттаховой Р.Р. является самостоятельным исследованием, удовлетворяет требованиям, предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и заслуживает положительной оценки.

Д.м.н., профессор
Заведующий кафедрой биологии
ГБОУ ВПО БГМУ



Викторова Т.В.

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Фаттаховой Радмилы Рустамовны.

На рецензию представлена дипломная работа на тему:
«Сравнительная оценка обсемененности *Giardia lamblia* объектов
окружающей среды».

Возможность детекции *Giardia lamblia* в объектах окружающей
среды, особенно на предметах обихода в детских учреждениях, где частота
заболеваемости лямблиозом является наиболее высокой, на сегодняшний
день остается весьма актуальной. В связи с этим тема данного
исследования, посвященного проблеме обнаружения *Giardia lamblia* в
объектах окружающей различными методами является актуальной.

План работы выстроен по традиционной схеме и включает
следующие разделы: введение, литературный обзор, описание методов
исследований, представление полученных данных и их обсуждение,
выводы, список цитируемой литературы, приложения. Во введении четко
поставлены цель и задачи исследования, показаны актуальность, научная
новизна и практическая значимость результатов исследования.
Литературный обзор широко освещает современное положение изучаемой
проблемы. В главах, посвященных результатам исследования, подробно
изложены основные итоги проведенной работы.

Дипломная работа Фаттаховой Р.Р. соответствует требованиям,
предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и
заслуживает положительной оценки.

Зав. лаб. бак.исследований
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии
в Республике Башкортостан»



Кобяков А.И.