

ческая картина; инструментальная диагностика; .slgG AT). Для диагностики токсокароза учитывали высокий (1/800-1/3200) и очень высокий ($\geq 1/3200$) титры антител. Для диагностики анизакидоза учитывали очень высокий (КП ≥ 6) и высокий (КП $\geq 3-5,9$) уровни AT.

Показано, что у инфицированных *Asc. lumbricoideus* вырабатываются как неспецифические, так и slgE-антитела к молекулам аскариды. По данным литературы, уровень slgE AT не зависит от количества гельминтов в кишечнике и может отмечаться даже при отсутствии активной инфекции. В состав P1 входят антигены АВА-1 и Asc 13. Уровень slgE ранжировался согласно рекомендациям фирмы производителя: 0,35-0,69 МЕ/мл — минимальный (I класс); 0,7-3,49 МЕ/мл — средний (II- класс); 3,5-17,49 МЕ/мл умеренно высокий (III класс); 3,5 — 17,49 МЕ/мл — высокий (IV класс); 17,5-52,49 МЕ/мл — очень высокий (V класс); 52,5-99,99 МЕ/мл; VI- >100 МЕ/мл крайне высокий. В группе 1 (таб.1) slgE к молекулярным антигенам *Asc Lumbricoideus* регистрировались в 91,6 %, при этом преобладали уровни III (33,3 %), II (28,6 %), IV(19,0 %) классов. Уровень I класса составил 14,3

%, V- 4,8 %. У лиц с высоким уровнем аскарид-slgE AT отмечались повышенные уровни slgE к клещам домашней пыли. SlgE к антигенам *Asc. Lumbricoideus* регистрировались также в группе 2 (15 %), при этом преобладали низкий (66,6 %) уровень slgE. В группе 3 slg E к антигенам *Asc. lumbricoideus* регистрировались в 26,7 %, при этом преобладали низкий (50,0 %) и средний (50,0 %) уровни AT. Данные феномены, по видимому, определяются перекрестными реакциями slgE AT, которые, по данным литературы, связаны с гиперчувствительностью к тропомиозинам. В группе 2 slgE к антигенам *Ani. simpiex* регистрировались в 25,0 %. Уровень I класса составил 40,0 %, II- 40,0 %, III- 20,0 %. Таким образом, при анизакидозе регистрируется преимущественно низкий и средний уровни slg E к антигенам гельминта. В группе 1 slg E к антигенам *Ani. simpiex* отмечались в 4,5 % (уровень I класса), в группе 3 в 5,6 % (уровень I класса). В группе 3 slg E к антигенам *Tox. canis* регистрировались в 80,0 %. Преобладали уровни II (50,0 %) и III (33,3 %) классов. В группе 1 отмечались slg E к антигенам *Tox. canis* в 4,5 % (уровень I класса), в группе 2 в 5,0 % (уровень I класса)

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАГЕНОМНЫХ СООБЩЕСТВ И ГЕНОМА КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМОГО ШТАММА *HELICOBACTER PYLORI* В РАЗВИТИИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Воропаев Е.В.¹, Зятыков А.А.¹, Шафорост А.С.¹, Осипкина О.В.¹, Баранов О.Ю.², Воропаева А.В.³

¹ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

² Национальная Академия наук Республики Беларусь, Минск, Беларусь

³ Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь

Актуальность: На сегодняшний день актуальной проблемой современной диагностики заболеваний в основе которых лежит инфекционный канцерогенез, остается оценка степени генетического вклада патогена-возбудителя и человека-хозяина в развитии патологических состояний. К таким канцерогенным инфекционным агентам безусловно относится патогенная грамотрицательная бактерия *Helicobacter pylori* (HP).

Цель: определить доминирующие метагеномные сообщества у пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) инфицированных HP, изучить уровень инфицированности HP популяции пациентов с заболеваниями ЖКТ и исследовать особенности генетической структуры клинически значимого штамма HP.

Материалы. Биологический банк образцов включает 438 биоптатов слизистой оболочки желудка больных с различной патологией ЖКТ и 110 образцов сыворотки крови пациентов, проживающих в Гомельской области. Геном клинически значимого штамма HP (GenBank NCBI: NZ_CP034314), выделенного в Беларуси.

Методы. При изучении HP-инфекции использовались методы иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для изучения метагенома желудка использовали анализ регионов V3/V4 гена

16S бактерий на платформе Illumina MiSeq. Для изучения особенностей генетической структуры *Helicobacter pylori* использовали метод секвенирования ДНК следующего поколения (NGS) на платформе ION TORRENT.

Результаты. ДНК HP была обнаружена у 60% (263 из 438 биоптатов желудка) пациентов с различными заболеваниями желудка (гастрит, язва желудка и рак желудка). Суммарные антитела к антигену CagA HP ответственному за патогенный потенциал бактерии, обнаружены у 71 из 110 обследованных (65%). Особенности метагенома желудка у пациентов с заболеваниями желудка были следующие: у пациентов, не инфицированных HP, выявлены фракции, соответствующие микроорганизмам — *Enterococcus*, *Capnocytophaga*, *Odoribacter*, *Pseudomonas*, *Eubacterium*, *Catonella*, *Megasphaera*, *Veilonella*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Mycoplasma*, *Streptococcus* *Leptotrichia*, *Bacteroides*.

Выводы: При HP-инфекции отмечено снижение биоразнообразия микробиома желудка — *Helicobacter* (10,7%), *Streptococcus* (6,3%), *Lactobacillus* (6,0%), *Bacteroides* (5,8%), *Catonella* 5,8 (%). Структура генома клинически значимого штамма HP42K (GenBank NCBI: NZ_CP034314), выделенного в Беларуси, показала наличие IS-элемента в хромосомной ДНК и в плазмиде рHP42-1, что может быть ответственно за

его значительные генетические модификации. Наличие в структуре гена *Ca9A* мотива EPIYA-ABC и пяти мотивов ДНК AATAAGATA, а также обнаружение гена *OipA* и идентифи-

цированных аллелей *s1* и *m1a* гена *vacA* вируса *HP* позволяет предположить наличие у этого изолята определенного патогенного, но не канцерогенного потенциала.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ ЧАСТЬЮ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ДНК ПРОСТЕЙШИХ ПАРАЗИТОВ В ФЕКАЛИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Девятов А.А., Давыдова Е.Е., Лупарев А.Р., Полякова В.А., Толоконцева А.А., Шуряева А.К., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Москва, Россия

Введение. Паразитарные заболевания в мире занимают значимую долю в структуре инфекционных заболеваний. В России по данным Роспотребнадзора ежегодно регистрируется около 250 тыс. случаев паразитарных заболеваний в год. При этом, согласно ряду оценок, это количество сильно занижено, и реальное количество людей, заражённых паразитами, может достигать 20 млн. На сегодняшний день золотым стандартом диагностики паразитозов являются методы микроскопии. Однако данные методы требуют высокой квалификации специалистов, что затрудняет их широкое применение. Наиболее остро проблема качественной диагностики стоит для протозойных инфекций, так как простейших труднее обнаруживать в биологическом материале по сравнению с яйцами гельминтов ввиду их меньшего размера и многообразия жизненных форм. Кроме того, отдельные виды простейших, например, *Cryptosporidium spp.* практически невозможно обнаружить без специального окрашивания. Так, согласно статистике Роспотребнадзора, в общей структуре выявленных паразитозов доля гельминтозов в 2022 г. составила 88,3 %, протозоозов — 11,7 %. Кроме того, некоторые простейшие, такие как *Blastocystis spp* или *Dientamoeba fragilis*, не учитываются в государственной статистике ввиду их неопределённого патогенного потенциала. В связи с этим, актуальной является разработка и внедрение более универсальных, стандартизуемых и чувствительных методов молекулярной диагностики протозоозов, таких как ПЦР. Одной из главных проблем на пути внедрения молекулярно-диагностических методов диагностики протозоозов в клиническую практику является отсутствие стандартизованного эффективного метода выделения паразитарной ДНК из клинических образцов. В первую очередь это относится к диагностике внутрикишечных протозоозов, так как фекалии представляет собой многокомпонентную матрицу, содержащую самые разные соединения, в том числе желчные кислоты и другие вещества, которые ингибируют реакцию амплификации.

Цель работы. Разработка тест-системы с выделительной частью для обнаружения в фекалиях человека ДНК простейших паразитов *Cryptosporidium spp*, *Giardia intestinalis*, *Blastocystis spp*, *Dientamoeba fragilis*, *Cystoisospora belli*, *Cyclospora cayetanensis* на основе метода ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Материалы и методы. Для разработки метода выделительного комплекта реагентов использовали модельные

образцы фекалий ($n=10$) от телят, питающихся молоком, предварительно охарактеризованные, как содержащие цисты криптоспоридий. Исходные образцы суспендировали в 70% этиловом спирте в соотношении примерно 1:1. Далее образцы хранили на $+4^{\circ}\text{C}$ для последующего выделения. Для предварительного концентрирования образцов использовали концентраторы фирмы ООО «ГЕМ» (Россия), в которых раствор производителя был заменён на раствор нашей собственной разработки. Для разработки ПЦР-комплекта реагентов использовали образцы ранее выделенной ДНК фекалий ($n=73$) различных людей, предоставленные сотрудником ФГБУ «ЦСП» ФМБА России А.С. Курносковым. Для выбора олигонуклеотидных праймеров и зондов использовали последовательности генов-мишеней из базы данных NCBI, множественное выравнивание проводили в программе UGENE. Оценивали наличие неспецифических вторичных структур с использованием программы PrimerSelect, проверку специфичности проводили с помощью BLAST. Аналитическую чувствительность ПЦР оценивали на плазмидных препаратах с известной концентрацией, содержащих целевые фрагменты ДНК. Концентрацию ДНК определяли с помощью цифровой капельной ПЦР X200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США). ПЦР реакционные смеси содержали целевые праймеры в концентрации 0,32 мкМ, зонды в концентрации 0,16 мкМ каждого, 0,2 мМ dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы в однократном FRT буфере (АО Гентерра, Россия). Объем реакционной смеси 25 мкл, из них объем исследуемого образца — 10 мкл. Условия амплификации — предварительный прогрев при 95°C (15 мин), далее 45 циклов: 95°C — 15 с, 58°C — 30 с, 72°C — 15 с.

Результаты и обсуждения. Комплект для ПЦР-детекции был разработан в мультиплексном формате для одновременной детекции ДНК шести целевых протозойных паразитов в двух ПЦР-смесях. Были выбраны олигонуклеотидные праймеры и зонды, и в предложенных сочетаниях была подтверждена специфичность и отсутствие кросс-реакция с близкородственными видами и клиническим материалом, не содержащим целевых видов. Для каждого показателя установлена аналитическая чувствительность не менее 1×10^3 ГЭ/мл.

В процессе разработки выделительной части набора было показано, что исходный раствор, используемый в концентраторах ООО «ГЕМ» не является оптимальным для целей диагностики с использованием ПЦР, так как основан на 10% растворе формалина. Вследствие этого, был разра-