

УДК 616.995.1:577.21

<https://doi.org/10.31016/978-5-6048555-6-0.2023.24.463-469>

## АКТУАЛЬНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ ЛАРВАЛЬНЫХ ГЕЛЬМИНТОЗОВ (ДИРОФИЛЯРИОЗ, ЭХИНОКОККОЗЫ)

Теличева В. О. <sup>1</sup>,

биолог клиники инфекционных и паразитарных болезней

Нагорный С. А. <sup>1</sup>,

кандидат биологических наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории санитарно-паразитологического  
мониторинга, медицинской паразитологии и иммунологии

Киосова Ю. В. <sup>1</sup>,

биолог клиники инфекционных и паразитарных болезней

Ермакова Л. А. <sup>1</sup>,

кандидат медицинских наук,  
заведующая клиникой инфекционных и паразитарных болезней

Стрельникова Г. В. <sup>2</sup>,

врач-лаборант

Корниенко И. В. <sup>3,4</sup>,

доктор биологических наук, главный научный сотрудник,  
заведующий научной лабораторией «Идентификация объектов  
биологического происхождения»

### Аннотация

Ларвальные гельминтозы остаются серьезной медицинской и социально-экономической проблемой во многих странах мира, и в этом отношении Российская Федерация не является исключением. Методы прямой диагностики требуют высокой квалификации специалистов лабораторий. Полимеразная цепная

---

<sup>1</sup> Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора (344000, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, д. 119)

<sup>2</sup> Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» (344019, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. 7-я Линия, д. 67)

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук» (344006, Россия, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, д. 41)

<sup>4</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет» (344006, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, д. 105, корп. 42)

реакция (ПЦР) может стать альтернативой способу морфологической идентификации гельминтов. Нами подобраны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры на основе известных последовательностей видов *Dirofilaria repens* и *D. immitis*, *Echinococcus* spp.; для *E. granulosus*; для *E. multilocularis*. Чувствительность и специфичность разработанных праймеров на *D. repens* и *D. immitis* была подтверждена на практике. Был идентифицирован биологический материал, полученный из различных биотопов 2 больных. Оба возбудителя были идентифицированы как *D. repens* двумя методами. Для диагностики эхинококкозов нами подобраны и синтезированы 3 пары оригинальных специфических праймеров на фрагмент гена COI митохондриальной ДНК для выявления ДНК *Echinococcus* spp.; для *E. granulosus* и *E. multilocularis*. По результатам проведенных работ, оформлена и отправлена заявка на изобретение. Параллельное применение двух методов исследования биологического материала минимизирует ошибки диагностики ларвальных гельминтозов.

**Ключевые слова:** диروفилариозы, эхинококкозы, молекулярно-генетические методы

## THE RELEVANCE OF MOLECULAR GENETIC METHODS IN THE DIAGNOSIS OF LARVAL HELMINTH INFECTIONS (DIROFILARIASIS, ECHINOCOCCOSIS)

**Telicheva V. O.** <sup>1</sup>,

Biologist of the Clinic of Infectious and Parasitic Diseases

**Nagorniy S. A.** <sup>1</sup>,

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Sanitary and Parasitological Monitoring, Medical Parasitology and Immunology

**Kiosova Yu. V.** <sup>1</sup>,

Biologist of the Clinic of Infectious and Parasitic Diseases

**Ermakova L. A.** <sup>1</sup>,

Candidate of Medical Sciences,  
Head of the Clinic of Infectious and Parasitic Diseases

**Strelnikova G. V.** <sup>2</sup>,

Doctor-Laboratory Assistant

---

<sup>1</sup> Federal Budgetary Institution of Science "Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (119, Gazetny lane, Rostov-on-Don, 344000, Russia)

<sup>2</sup> Federal Budgetary Healthcare Institution "Center for Hygiene and Epidemiology in the Rostov Region" (67, 7th Line st., Rostov-on-Don, 344019, Russia)

**Kornienko I. V.**<sup>3,4</sup>,Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher,  
Head of the Scientific Laboratory "Identification of Objects of Biological Origin"**Abstract**

Larval helminth infections remain a serious medical and social economic problem in many countries of the world, and the Russian Federation is no exception in this respect. Methods of direct diagnostics require highly qualified laboratory specialists. Polymerase chain reaction (PCR) can become an alternative to the method of morphological identification of helminths. We have selected and synthesized oligonucleotide primers based on known sequences of the species *Dirofilaria repens* and *D. immitis*; for *E. granulosus*; and for *E. multilocularis*. The sensitivity and specificity of the developed primers for *D. repens* and *D. immitis* has been confirmed in practice. We identified biological material from different biotopes from 2 patients. Both causative agents were identified as *D. repens* by two methods. To diagnose echinococcosis, we selected and synthesized 3 pairs of original specific primers for a fragment of the mtDNA-COI gene to detect *Echinococcus* spp. DNA; for *E. granulosus* and *E. multilocularis*. Based on the results of the performed work, an Application for an invention was executed and sent. The parallel application of two methods for the study of biological material minimizes diagnostic errors of larval helminth infections.

**Keywords:** dirofilariasis, echinococcosis, molecular genetic methods

**Введение.** Среди ларвальных гельминтозов человека в последние годы наиболее актуальными для стран умеренных климатических зон остаются эхинококкозы и диروفилариозы. Несмотря на значительное улучшение диагностических технологий, данные гельминтозы остаются актуальной междисциплинарной проблемой, в связи с тем, что методы прямой их диагностики требуют высокой квалификации специалистов лабораторий [1, 3]. Полимеразная цепная реакция (ПЦР), как прямой метод диагностики может быть альтернативой способу морфологической идентификации гельминтов. Преимуществом ПЦР является минимальное влияние человеческого фактора при проведении исследования в случаях применения отработанного протокола выполнения исследования и высокой специфичности и чувствительности используемых праймеров. Цель работы – разработ-

---

<sup>3</sup> Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Research Center the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences" (41, Chekhova Ave., Rostov-on-Don, 344006, Russia)

<sup>4</sup> Southern Federal University (105, Bolshaya Sadovaya st., Bld. 42, Rostov-on-Don, 344006, Russia)

ка праймеров и условий постановки ПЦР для видовой диагностики дирофилярий и эхинококков.

**Материалы и методы.** В сотрудничестве с Южным научным центром РАН нами подобраны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры на основе известных последовательностей рода *Echinococcus* spp., видов *E. granulosus* и *E. multilocularis*; *D. repens* и *D. immitis*, представленных в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Полученные последовательности нескольких пар праймеров протестированы на специфичность с помощью онлайн-ресурса «NCBI BLAST» (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве контроля специфичности и чувствительности исследуемых праймеров использовались морфологически идентифицированные взрослые особи *D. repens*, выделенные из подкожно-жировой клетчатки больных людей, и *D. immitis*, выделенные из сердца больных собак; личиночные стадии *E. granulosus* из кист от больных, оперированных по поводу кистозного эхинококкоза и *E. multilocularis* из гистологического материала больной, оперированной по поводу альвеококкоза.

Для идентификации ДНК *D. repens* использовали праймеры:

forvard 5'—CCGGTAGACCATGGCATTAT—3'

и revers 5'—CGGTCTTGGACGTTTGGTTA—3'.

Для *D. immitis* — праймеры:

forvard 5'—TGATTGGTGGTTTTGGTAA—3'

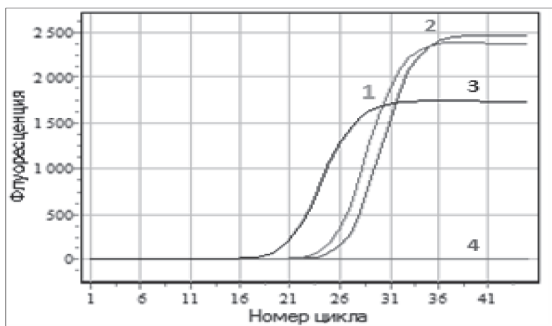
и revers 5'—ATAAGTACGAGTATCAATATC—3'.

Исследование проводили в соответствии с протоколом [2].

**Результаты исследований.** Чувствительность и специфичность разработанных праймеров для *D. repens* и *D. immitis* была подтверждена на практике. Исследован биологический материал от двух больных: из пахового лимфоузла (рис. 1) и образование правого легкого (рис. 2). Оба возбудителя были идентифицированы как *D. repens* параллельно морфологическим и молекулярно-генетическим методами.

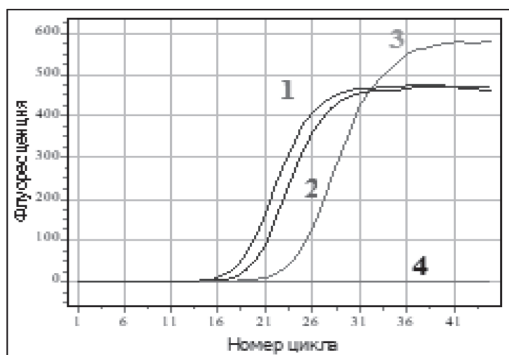
Для диагностики эхинококкозов нами подобраны и синтезированы 3 пары оригинальных специфичных праймеров на фрагмент гена COI митохондриальной ДНК для выявления ДНК *Echinococcus* spp.; для *E. granulosus* и *E. multilocularis*.

С помощью полученных праймеров исследованы 8 образцов биологического материала: 6 эхинококковых кист от разных больных, в которых паразитологическими методами обнаруживались протоско-



**Рис. 1.** Результаты Real-Time материала из пахового лимфоузла:

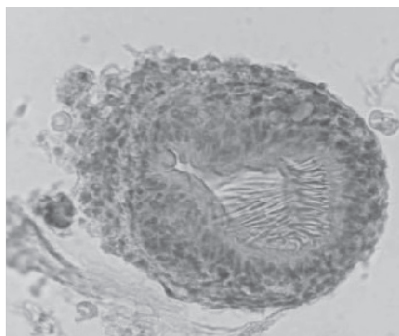
- 1 – положительный контрольный образец, содержащий ДНК *D. repens* с праймерами, специфичными к *D. repens*,
- 2 – исследуемый образец с праймерами, специфичными к *D. repens*,
- 3 – положительный контрольный образец, содержащий ДНК *D. immitis* с праймерами, специфичными к *D. immitis*,
- 4 – исследуемый образец с праймерами, специфичными к *D. immitis*



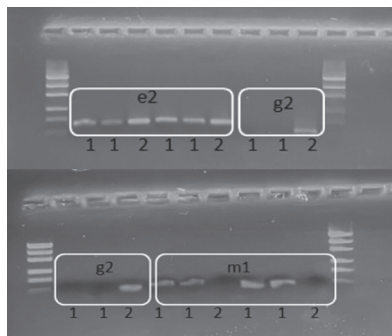
**Рис. 2.** Результаты Real-Time материала из правого легкого:

- 1 – положительный контрольный образец, содержащий ДНК *D. repens* с праймерами, специфичными к *D. repens*,
- 2 – исследуемый образец с праймерами, специфичными к *D. repens*,
- 3 – положительный контрольный образец, содержащий ДНК *D. immitis* с праймерами, специфичными к *D. immitis*,
- 4 – исследуемый образец с праймерами, специфичными к *D. immitis*

лексы *E. granulosus* (рис. 3); 1 эхинококковая киста, полученная от овцы; гистологический препарат больной, оперированной по поводу альвеококкоза. С каждой парой праймеров все образцы исследовались в 4 повторностях. Анализ результатов 192 исследований показал, что праймеры для *Echinococcus* spp. дали положительный результат во всех 192 пробах. Праймеры для *E. granulosus* дали положительный результат в 168 образцах из кист больных и овцы. Праймеры для *E. multilocularis* дали положительный результат в 8 пробах гистологического материала от больной альвеококкозом. Результаты ПЦР РВ подтверждены электрофорезом в агарозном геле (рис. 4) и секвенированием. Оптимальными были выбраны праймеры, при применении которых положительные результаты наблюдались на более ранних циклах.



**Рис. 3.** Протосколекс *Echinococcus granulosus*, ув. x 1000



**Рис. 4.** Электрофорез в агарозном геле с заявленными праймерами к *Echinococcus* spp. (e2); *E. granulosus* (g2) и *E. multilocularis* (m1). Проба 1, содержащая ДНК *E. multilocularis*, дала положительный результат с праймерами e2 и m1, проба 2 - ДНК *E. granulosus* дала положительные результаты с праймерами e2 и g2

По результатам проведенных работ по молекулярной диагностике *Echinococcus* spp., *E. granulosus*, *E. multilocularis* оформлена и отправлена заявка на изобретение.

**Заключение.** Параллельное применение паразитологических и молекулярно-генетических методов исследования биологического материала уменьшит число ошибок при диагностике ларвальных гельминтозов.

#### Список источников

1. Ермакова Л. А., Твердохлебова Т. И., Нагорный С. А., Пшеничная Н. Ю., Болатчиев К. Х. Анализ заболеваемости человека ларвальными гельминтозами (эхинококкоз, токсокароз, диروفилариоз) в Российской Федерации // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2017. Т. 16. № 1. С. 43-46.
2. Патент на изобретение 2773944 С1, 14.06.2022. Заявка № 2021135820 от 06.12.2021. Способ выявления видов возбудителей диروفилариоза *Dirofilaria repens* и *Dirofilaria immitis* с помощью ПЦР в режиме реального времени / И. В. Корниенко, С. А. Нагорный, Л. А. Ермакова и др.: заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии». 15 с.
3. Ermakova L., Nagorny S., Kornienko I., et al. Description of the rare localization of *Dirofilaria repens* in human in the right inguinal lymph node // IDCases. 2021; 23: e01010.

#### References

1. Ermakova L. A., Tverdokhlebova T. I., Nagorniy S. A., Pshenichnaya N. Yu., Boltachiev K. Kh. Incidence analysis for larval helminth infections in humans (echinococcosis, toxocarosis, dirofilariasis) in the Russian Federation. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2017; 16(1): 43-46. (In Russ.)
2. Patent for invention 2773944 C1, 14/06/2022. Application No. 2021135820 dated 06/12/2021. A method for detecting species of the causative agents of dirofilariasis *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* using real-time PCR. I. V. Kornienko, S. A. Nagorny, L. A. Ermakova, et al.: Applicant Federal Budgetary Institution of Science "Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology". 15 p. (In Russ.)
3. Ermakova L., Nagorny S., Kornienko I., et al. Description of the rare localization of *Dirofilaria repens* in human in the right inguinal lymph node. *IDCases*. 2021; 23: e01010.