Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии РЦГЭиОЗ

Международная научно-практическая конференция «Здоровье и окружающая среда», приуроченная к 100-летию санитарно-эпидемиологической службы Республики Беларусь, 19-20.11.2026

Сателлитная конференция «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии»

Получение положительных контрольных образцов на основе плазмидной ДНК, содержащей диагностические фрагменты генома *Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum, Entamoeba histolytica*

Шуманская С.Ю., Григорьева Е.Е., Фомина Е.Г., Дронина А.М.

Актуальность

Кейс Норвегии на примере лямблиоза	**ДО**	«**Привозная**» инвазия; **3** последовательных **исследования** = результат; «**Человеческий**» фактор	**А что в Беларуси по лямблиозу?**	**Основной метод** диагностики – **микроскопия**; **Иммунологический тесты** и **ПЦР** – **вспомогательные**; Стоимость первичного скрининга коммерческими тест-системами~ 75 BYN/ ~ 25,5 USD/ ~ 23 EUR/ ~ 2050 RUB **Мало распространённая инвазия**; В структуре преобладает **детское население**; Генетические группы и подгруппы – **?** Молекулярно-эпидемиологический мониторинг не проводится
	Вспышка в Бергене, 2004 г.	**Водный путь** передачи; **Рутинная микроскопия**; **1252 случая** подтверждено **лабораторно**; **~ 2 500 пролечено**; **Потеряно 33 дня** от момента начала; **Постинвазивные изменения;** **Генотипирование как инструмент для расследования**		Разработка отечественного набора «**Прото-ПЦР/РВ**» направлена на импортозамещение и снижение себестоимости одной постановки в ~ 2–3 раза. ПЦР как первый этап молекулярно-эпидемиологического мониторинга для последующей ПЦР-ПДРФ. Разработка тест-системы для ПЦР – многоэтапная задача.
	ПОСЛЕ	**12** из 14 крупнейших **лабораторий – мультиплексная ПЦР;** **1 исследование = результат**; «**Ложная**» эпидемия – выявление ↑ в 2 раза; Выявляемость *Cryptosporidium* ↑ с **0 до 1,2%** от всех проб; Молекулярно-эпидемиологический мониторинг.		

Этап получение положительных контрольных образцов:

Задача 1 — Определение диагностически значимых сайтов генов

- ✓ *Giardia lamblia* – фрагмент гена рибосомальной РНК малой субъединицы (***SSU rRNA***);
- ✓ *Cryptosporidium parvum* – участок гена, кодирующего J-подобный белок (***J-like protein gene***);
- ✓ *Entamoeba histolytica* – фрагмент гена малой субъединичной РНК (***SSU rRNA***)

Задача 2 — Получение генетического материала простейших

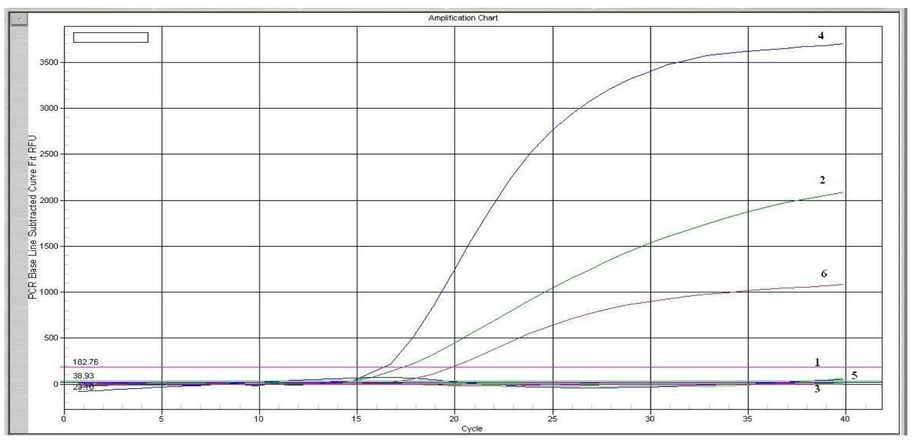
- ✓ Микроскопия фекальных образцов на наличие цист *G. lamblia* и ооцист *C. parvum;*
- ✓ ПЦР положительных образцов на коммерческом наборе «Прото-скрин» (ООО Альфалаб, Российская Федерация);
- ✓ В качестве референса – образцы ДНК *G. lamblia* и *C. parvum* из Референс-центра по изучению криптоспоридий (Cryptosporidium Reference Unit, United Kingdom);
- ✓ Для *E. histolytica* – фрагмент получен путем последовательного отжига искусственно синтезированных протяженных олигонуклеотидов;

Задача 3 — Клонирование целевых генов-мишеней в плазмиду pJET 1.2/blunt

Амплифицированные специфические ДНК-фрагменты вырезались из агарозного геля с их последующей очисткой. Клонирование осуществлялось по «тупым» концам в полилинкер исходного вектора последовательно в два этапа, включавших подготовку фрагмента и его лигирование в вектор.
Полученные лигазные смеси использовались для трансформации в бактерию *E. coli*, штамм *XLBlue*.

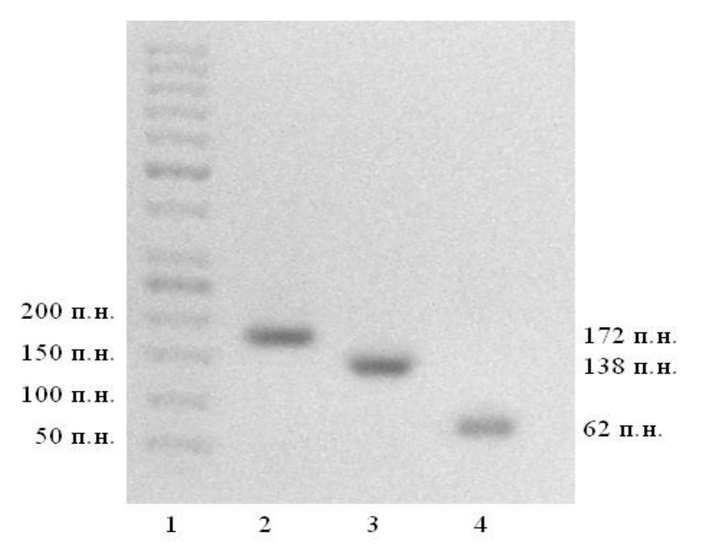
Задача 4 — Подтверждение наличия и специфичности полученного продукта

Специфичность генов-мишеней *E. histolytica*, *C. parvum* и *G.lamblia* в составе рекомбинантных плазмид подтверждена методом ПЦР в режиме реального времени со специфическими парами праймеров и гибридизационными зондами

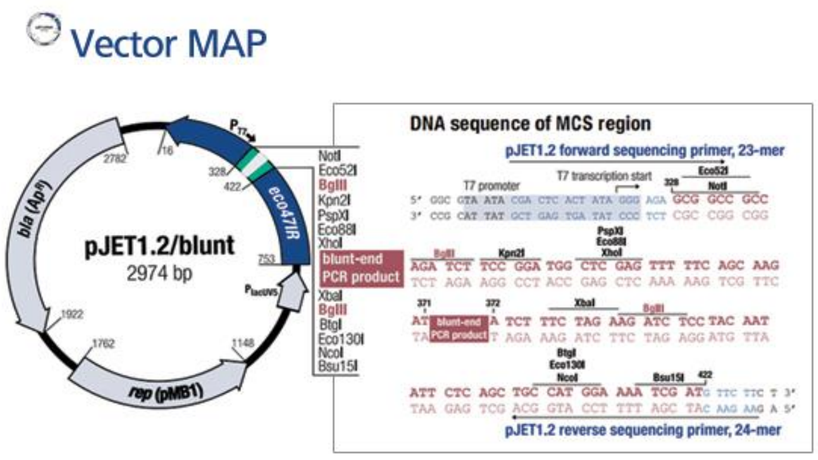


1, 3, 5 – отрицательные контрольные образцы, не содержащие генетический материал *G. lamblia* (FAM), *C. parvum* (ROX), *E. histolytica* (ROX) соответственно;
2 – *G. lamblia* (FAM);
4 – *C. parvum* (ROX);
6 – *E. histolytica* (ROX)

Оценка наличия специфических фрагментов генома *G. lamblia, C. parvum, E. histolytica* в составе рекомбинантных плазмидных ДНК методом ПЦР-РВ



Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс (50 bp DNA ladder, Thermo Scientific);
2 – диагностически значимый фрагмент генома *E.histolytica*;
3 – диагностически значимый фрагмент генома *C. parvum*;
4 – диагностически значимый фрагмент генома *G. lamblia*
Электрофореграмма продуктов амплификации диагностически значимых мишеней E. *histolytica, C. parvum* и *G. lamblia*

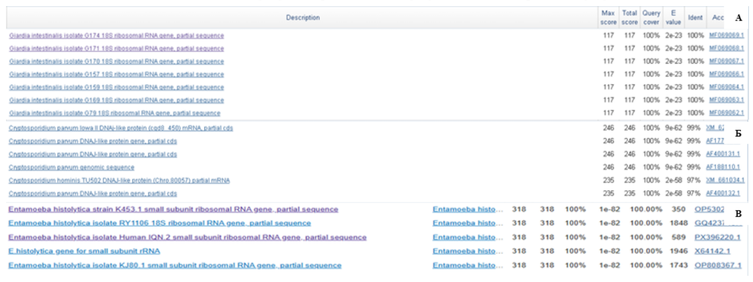


Карта плазмидного вектора *pJET 1.2/blunt*

Задача 5 — Секвенирование и сравнительный анализ

Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности сравнивались с последовательностями, депонированными в международную базу данных GenBank, с использованием программы BLAST: *G. lamblia* (А) и *E. histolytica* (В) – 100%; *C. parvum* (Б) – 97-99%

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности диагностически значимого фрагмента генома *G. lamblia* (А), *C. parvum* (Б), *E. histolytica* (В)



Заключение

В многоэтапном процессе клонирования были получены рекомбинантные плазмидные ДНК, содержащие специфические фрагменты генетического материала *G. lamblia*, *C. parvum* и *E. histolytica*, которые использованы в качестве положительных контрольных образцов, входящих в состав отечественного мультиплексного набора для генодиагностики *Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum, Entamoeba histolytica* «**Прото-ПЦР/РВ**» (НИИ ГТ ЭВМ ГУ «РЦГЭиОЗ», Республика Беларусь)

lab.immuncellbiotech
@belriem.by