

# Молекулярные методы в диагностике ряда инфекционных заболеваний: традиции и инновации

Карань Л.С.

ФБУН ЦНИИ эпидемиологии

2017

<i>Инфекции</i>	<i>ВОЗ<sup>1</sup></i>	<i>Россия<sup>2</sup></i>	<i>СНГ<sup>3</sup></i>	<i>Таможенный союз<sup>4</sup></i>
Оспа				
Полиомиелит, вызванный диким полиовирусом				
Грипп, вызванный новым подтипом вируса				
ТОРС				
Холера				
Чума				
Желтая лихорадка				
КВГЛ (Марбург, Ласса, Эбола)				
Лихорадка Западного Нила				
Лихорадка Денге				
Лихорадка Рифт-Валли				
Менингококковая болезнь				
Малярия				
Крымская геморрагическая лихорадка				
Сибирская язва				
Бруцеллез				
Сап				
Мелиоидоз				
Эпидемический сыпной тиф				
Туберкулез				
Лихорадки Хуниин, Мачупо				
Другие				



Обязательные для уведомления



Требующие оценки и принятия решения об уведомлении

1 ММСП (2005 г.)

2 СП 3.4.2318 – 08

3 СанПиН "Санитарная охрана территорий государств-участников СНГ"

4 Положение о порядке осуществления госсанэпиднадзора ТС, 28.05.2010<sup>2</sup>

# Тест-система для дифференцированного выявления РНК 1-4 типов вируса денге

«АмплиСенс® *Dengue virus type-FRT*», мишень 5'-UTR-C ген

## Объекты для исследования:

Образцы клинического материала: *сыворотка и плазма крови*

Образцы аутопсийного материала: *ткани мозга, печени, селезенки, легких, почек*

Образцы из окружающей среды: *комары*

## Формат тест-системы:

Количество реакционных смесей (пробирок): **1**

Количество каналов детекции: **5 (FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5)**

Амплификаторы: *RotorGene 6000/Q; CFX96*

## Аналитическая и диагностическая чувствительность

Вид биологического материала	Объем исследуемой пробы	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл	Тип вируса денге (дифференцированно)	Диагностическая чувствительность
Плазма / сыворотка крови, суспензия комаров, аутопсийный материал	100 мкл	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	$5 \times 10^3$	1-4 тип	плазма, сыворотка крови - 96%, аутопсийный материал – 100%
Плазма крови, сыворотка крови	1 мл	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	$5 \times 10^2$	1-4 тип	плазма и сыворотка крови - 98%, аутопсийный материал – 100%.

**Аналитическая и диагностическая специфичность – 100%** при тестировании штаммов *WNV* (вирус Западного Нила), *JEV* (вирус японского энцефалита), *OHFV* (вирус омской геморрагической лихорадки), вирус клещевого энцефалита (*TBEV – Tick-borne encephalitis virus*), *LGT* (вирус Лангат), *POWV* (вирус Повассан), *USUV* (вирус Усуту), а также *CCHFV* (вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки), *CHV* (вирус чикунгуни), *Leptospira* spp (штаммы MV5, HS, 3705), риккетсии группы клещевых пятнистых лихорадок (*Rickettsia sibirica*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia slovacica*, *Rickettsia canadensis*), *A.phagocytophillum*, *B.microti*, *B.henselae*, *Y.pestis*, а также геномной ДНК человека.

# Тест-система для выявления РНК вируса денге

«АмплиСенс® Dengue virus-FI», мишень 3'-UTR

## Объекты для исследования:

Образцы клинического материала: *сыворотка и плазма крови, моча, слюна*

Образцы аутопсийного материала: *ткани мозга, печени, селезенки, легких, почек*

Образцы из окружающей среды: *комары*

## Формат тест-системы:

Количество реакционных смесей (пробирок): **1**

Количество каналов детекции: **2 (FAM, JOE)**

Амплификатор: *RotorGene 3000/6000/Q; CFX96*

## Аналитическая и диагностическая чувствительность

Вид биологического материала	Объем исследуемой пробы	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл	Тип вируса денге (без дифференциации)	Диагностическая чувствительность
Плазма / сыворотка крови, моча, слюна, комары (гомогенат)	100 мкл	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	10 <sup>3</sup>	1-4 тип	Плазма и сыворотка крови 95%
Аутопсийный материал	100 мкл	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5x10 <sup>3</sup>	1-4 тип	100%
Плазма крови, сыворотка крови, моча	1 мл	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	10 <sup>2</sup>	1-4 тип	Плазма и сыворотка крови 98%

**Аналитическая и диагностическая специфичность – 100%** при тестировании штаммов *WNV* (вирус Западного Нила), *JEV* (вирус японского энцефалита), *OHFV* (вирус омской геморрагической лихорадки), вирус клещевого энцефалита (*TBEV – Tick-borne encephalitis virus*), *LGT* (вирус Лангат), *POWV* (вирус Повассан), *USUV* (вирус Усуту), а также *CCHFV* (вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки), *CHV* (вирус чикунгуньи), *Leptospira spp* (штаммы MV5, HS, 3705), риккетсии группы клещевых пятнистых лихорадок (*Rickettsia sibirica*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia slovacae*, *Rickettsia canadensis*), *A.phagocytophillum*, *B.microti*, *B.henselae*, *Y.pestis*, а также геномной ДНК человека.

# Завозные случаи лихорадки денге в РФ

В 2014 г. в РФ зарегистрировано 105 случаев ЛД в 15 субъектах, в 2015 г. – 125 случаев в 20 субъектах, в 2016 г. – 145 случаев. Наибольшее количество заболевших выявлено в: г. Москве (84 случая); г. Санкт – Петербурге (24 случая); Новосибирской области (17 случаев).

- Из Таиланда (111 случая)
- Вьетнама (34 случая)
- Индонезии (26 случая)
- Африки
- Индии
- Республики Филиппины
- Республики Малайзия
- Китайской Народной Республики
- Республики Лаос
- С Мальдивских островов

**По данным Роспотребнадзора.**

В ЦНИИ эпидемиологии с 2012 по 2017 год лабораторно подтверждено 160 случаев лихорадки денге. Из них выявлено 26 парных случаев (16%). Ни в одном из случаев не подтвержден половой путь передачи.

- Из Таиланда (86 )
- Индонезии (37)
- Вьетнама (8)
- Индии (6)
- Мальдивских островов (5)
- Филиппин (5)
- Сейшел (2)
- Луанды (1)

# Диагностика лихорадки денге

Образец	метод	д0	д1	д2	д3	д4	д5	д6	д7	д8	д9	д10	д11	д12	д13	д14	д15	м1	м2	м3	м6	
	ПЦР																					
плазма		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						
слюна		■	■	■	■	■	■	■	■	■												
моча		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	Изоляция вируса																					
сыворотка		■	■	■	■	■	■	■	■													
	ИФА																					
сыворотка	IgM					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	IgG									■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	NT									■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

 Оптимальный период для проведения анализа

## Длительность вирусемии и вирурии при лихорадке денге

**Материалы и методы:** для [42 пациентов с лихорадкой денге](#), вернувшихся из стран тропического климата и госпитализированных для лечения в стационары г. Москвы в 2016 году проведено исследование в общей сложности 161 образца клинического материала ([55 образцов плазмы крови, 63 образца мочи, 43 образца слюны](#)) на наличие РНК вируса денге с использованием двух наборов реагентов: «Амплисенс *Dengue virus*–Fl» и «Амплисенс *Dengue virus type* –Fl». С первым набором проводилась детекция РНК вируса денге – со вторым – типирование вируса. Экстракцию РНК вируса денге проводили из 1000 мкл плазмы крови, 1000 мкл мочи с использованием набора «МАГНО-сорб» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва), из 100 мкл слюны, разведенной раствором муколизина в соотношении 1:3 и 1:5 с использованием набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва) по инструкциям производителя, соответственно.

**Результаты:** вирусная РНК обнаружена в 129 из 161 образца. Распределение выявления вирусной РНК в разных типах клинического материала в зависимости от сроков заболевания представлено в таблице.

Дни болезни	Результат ПЦР, число положительных проб/число исследованных проб/%		
	плазмы	мочи	слюны
1-7	28/28/100	23/28/82	18/25/72
8-14	19/21/90	26/28/93	7/16/44
15-63	2/6	5/7	1/2

Максимальными сроками от начала заболевания, на которых была обнаружена РНК вируса денге в крови пациента явились для крови – 23-й день, для мочи – 63-й день, для слюны – 20-й день.

В лабораторной диагностике вирусных лихорадок эффективнее использовать максимально возможный объем клинического материала

### Станция Neon-100 (Xiril)



### Станция QIASymphony SP (QIAGEN, Германия)



### МАГНО-сорб (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии)





# Тест-система для выявления РНК вируса Чикунгунья

«АмплиСенс® Chikungunya virus-FI»

## Объекты для исследования:

Образцы клинического материала: *сыворотка и плазма крови, моча, слюна*

Образцы аутопсийного материала: *ткани мозга, печени, селезенки, легких, почек*

Образцы из окружающей среды: *комары*

## Формат тест-системы:

Количество реакционных смесей (пробирок): **1**

Количество каналов детекции: **2 (FAM, JOE)**

Амплификатор: **RotorGene 3000/6000/Q; CFX96**

## Аналитическая и диагностическая чувствительность

Вид биологического материала	Объем исследуемой пробы	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл	Диагностическая чувствительность
Плазма / сыворотка крови, моча, слюна, комары	100 мкл	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	10 <sup>3</sup>	
Аутопсийный материал	100 мкл	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5x10 <sup>3</sup>	100%
Плазма крови, сыворотка крови, моча	1 мл	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	10 <sup>2</sup>	Плазма и сыворотка крови 96%

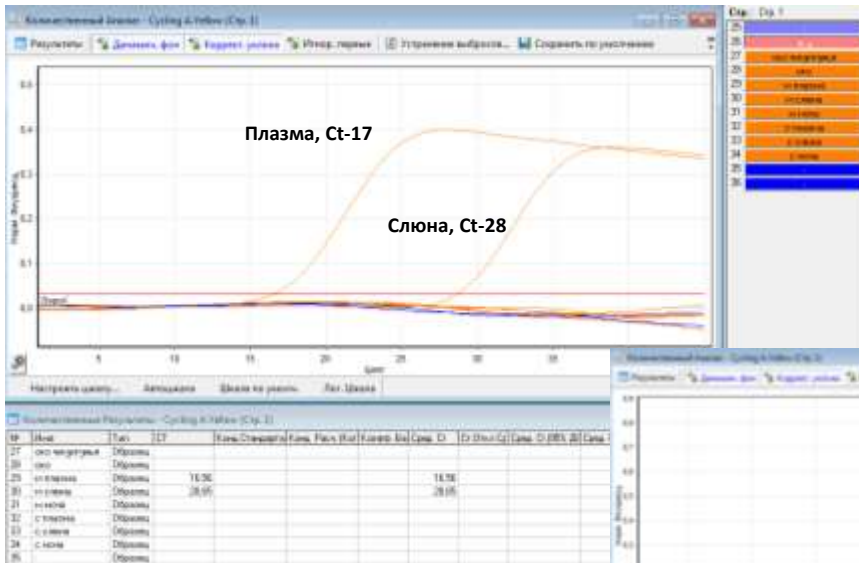
**Аналитическая и диагностическая специфичность – 100%** при тестировании штаммов WNV (вирус Западного Нила), ZIKV (вирус Зика), JEV (вирус японского энцефалита), OCHFV (вирус омской геморрагической лихорадки), вирус клещевого энцефалита (TBEV – Tick-borne encephalitis virus), LGT (вирус Лангат), POWV (вирус Повассан), USUV (вирус Усуту), а также CCHFV (вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки), CHV (вирус чикунгунья), *Leptospira* spp (штаммы MV5, HS, 3705), риккетсии группы клещевых пятнистых лихорадок (*Rickettsia sibirica*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia slovacica*, *Rickettsia canadensis*), *A.phagocytophillum*, *B.microti*, *B.henselae*, *Y.pestis*, а также геномной ДНК человека.

# Диагностика лихорадки Чикунгунья

Образец	метод	д0	д1	д2	д3	д4	д5	д6	д7	д8	д9	д10	д11	д12	д13	д14	д15	м1	м2	м3	м6
	ПЦР																				
плазма		■	■	■	■	■	■	■	■												
	Изоляция вируса																				
сыворотка		■	■	■	■	■	■	■	■												
	ИФА																				
сыворотка	IgM					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	IgG									■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	NT									■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

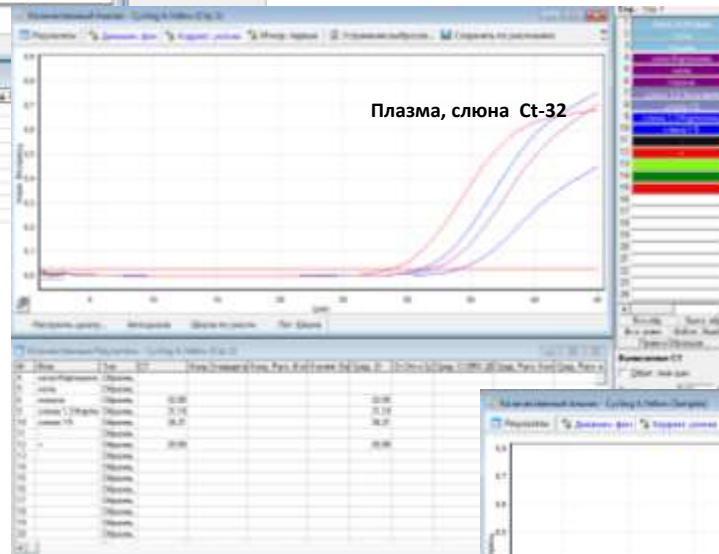


Оптимальный период для проведения анализа

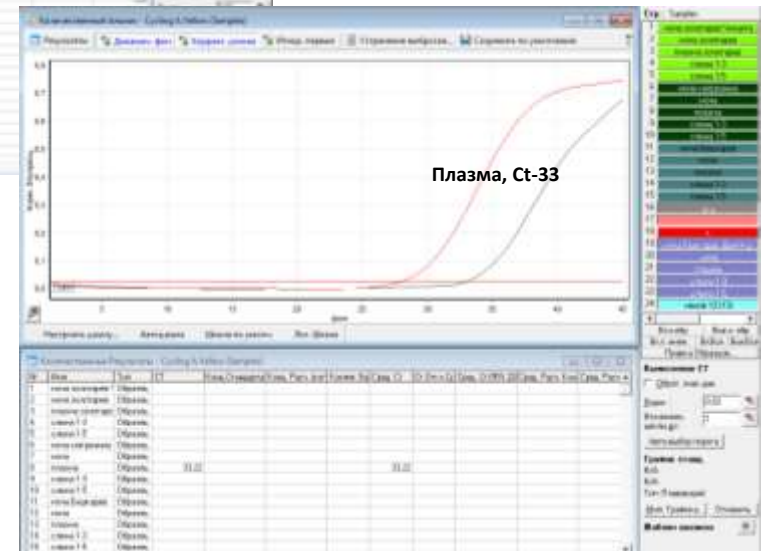


2-й день болезни

Пациентка М, 21 год. Отдыхала в Индонезии.



7-й день болезни



10-й день болезни

# Тест-система для выявления РНК вируса Зика

«АмплиСенс® Zika virus-FI», мишень - NS3 ген

## Объекты для исследования:

Образцы клинического материала: *плазма крови, моча, слюна, амниотическая жидкость, сперма*

Образцы аутопсийного материала: *ткани мозга, печени, селезенки, легких, почек*

Образцы из окружающей среды: *комары*

## Формат тест-системы:

Количество реакционных смесей (пробиорок): **1**

Количество каналов детекции: **2 (FAM, JOE)**

Амплификатор: *RotorGene 3000/6000/Q; CFX96, ДТ-96*

## Аналитическая и диагностическая чувствительность

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность, копий /мл	Диагностическая чувствительность
Плазма крови, моча, слюна, комары (гомогенат)	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	2000	Для мочи – 100%, Для слюны – 82% Для плазмы - 64%
Тканевой материал, плацента, сперма, амниотическая жидкость	50			10000	
Плазма крови	200	«МАГНО-сорб»		1000	
	1000			100	
Моча	1000		500		

**Аналитическая и диагностическая специфичность – 100%** при тестировании штаммов *WNV* (вирус Западного Нила), *JEV* (вирус японского энцефалита), *OHFV* (вирус омской геморрагической лихорадки), вирус клещевого энцефалита (*TBEV – Tick-borne encephalitis virus*), *LGT* (вирус Лангат), *POWV* (вирус Повассан), *USUV* (вирус Усуту), а также *CCHFV* (вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки), *CHV* (вирус чикунгуньи), *Leptospira spp* (штаммы MV5, HS, 3705), риккетсии группы клещевых пятнистых лихорадок (*Rickettsia sibirica*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia slovaca*, *Rickettsia canadensis*), *A.phagocytophillum*, *B.microti*, *B.henselae*, *Y.pestis*, а также геномной ДНК человека.

## **Эпидемиологическая ситуация, связанная с распространением вируса Зика в мире на 31.03.2017**

Общее число пострадавших лиц в странах Американского региона составляет более 551 тыс., у более чем 206 тыс. диагноз подтвержден лабораторно. Зарегистрировано 20 летальных исходов. В Бразилии за время эпидемии ЛЗ зарегистрировано 2366 случаев микроцефалии и неврологических нарушений у новорожденных. Общее число случаев заболевания здесь с подозрением на ЛЗ составляет на 31.03.2017 более 216 тыс. В Доминиканской республике зарегистрировано 4 902 сл. заболевания. За период с января 2016 по февраль 2017 случаи заболевания лихорадкой Зика регистрировались также в отдельных регионах Юго-Восточной Азии – во Вьетнаме (246 случаев), на Филиппинах (57 случаев), в Малайзии (8 случаев), в Таиланде (713 случаев).

### **Завозные случаи лихорадки Зика в РФ**

**В 2013-2017 г. зарегистрировано 18 случаев завоза ЛЗ, из них в 4 случаях диагноз подтвержден ретроспективно**

- Из Доминиканской Республики - 9
- Мексики - 2
- о. Сент-Бартелеми - 2
- Индии -1
- Таиланда – 2
- Колумбии – 1
- Китая -1

**Случаи заболеваний отмечены в  
Москве (9), Санкт-Петербурге (1), Сургуте (1),  
Ханты-Мансийске (1), Екатеринбурге (1),  
Тольятти (1), Челябинске (1),  
Новосибирске (1), Ярославле (1)**

# ДИАГНОСТИКА ЛЗ.1

## 1. Эпидемиологические критерии:

Возникновение заболевания

- не позднее чем через 2 недели после возвращения из эндемичного региона (для беременных не позднее 3 месяцев, если они находились на эндемичной территории, будучи беременными);
- после незащищенного полового контакта, не позднее чем за три недели до развития заболевания, с партнером, у которого либо диагностирована лихорадка Зика, либо он находился на эндемичной территории не позднее чем за два месяца до полового контакта;
- после переливания крови от донора, посещавшего эндемичный регион не позднее чем за 21 день до донации

## 2. Клинические критерии:

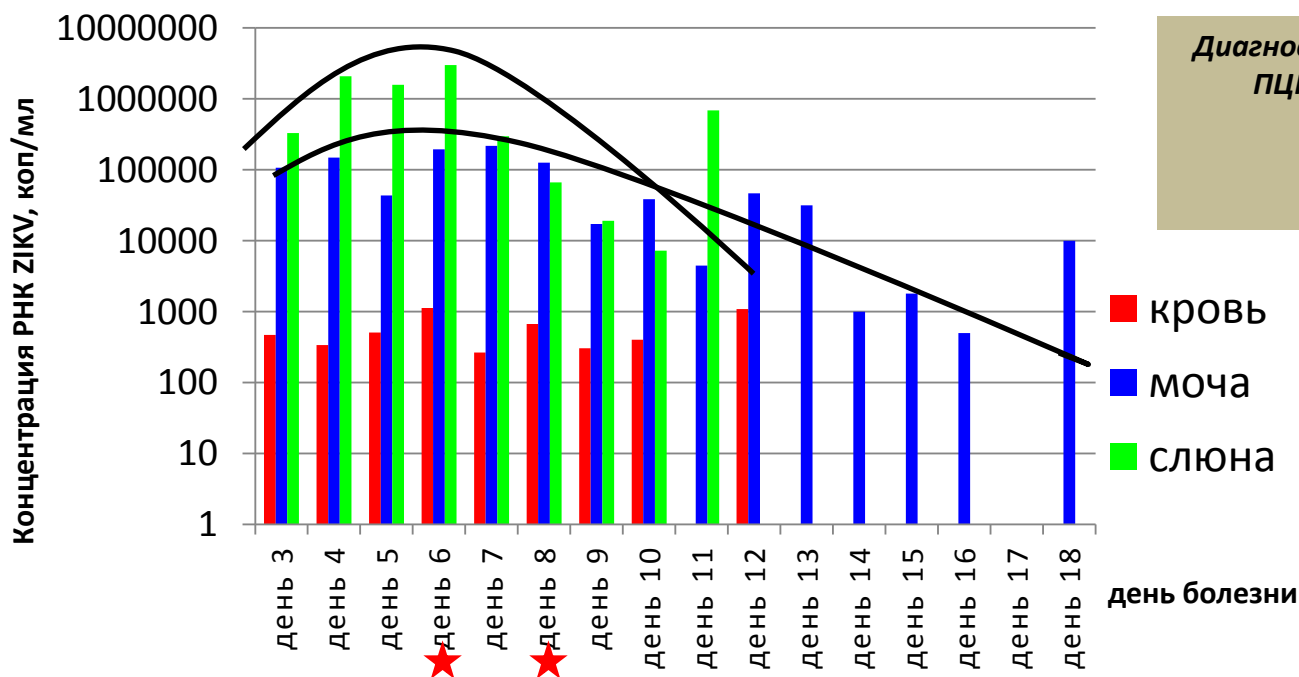
- пятнистая или пятнисто-папулезная сыпь;
- склерит, или негнойный конъюнктивит;
- миалгия, артралгия, лихорадка;
- возникновение синдрома Гийена-Барре не позднее чем через 4 недели (в среднем через неделю) после лихорадочного заболевания, возникшего после посещения эндемичного региона

# ДИАГНОСТИКА ЛЗ.2

## 3. Лабораторные критерии:

- **выявление РНК вируса в клиническом материале: плазме крови, слюне, моче**
- выявление антигена вируса в клиническом материале
- изоляция вируса из клинического материала
- выявление специфических IgM антител и подтверждение результата в реакции нейтрализации;

*Относительная динамика изменения концентрации вируса в крови, моче и слюне*



*Диагностическая чувствительность*

*ПЦР в первые 7 дней болезни:*

Плазма крови – 64%

Слюна – 82%

**Моча - 100%**

# Диагностика лихорадки Зика

Образец	метод	д0	д1	д2	д3	д4	д5	д6	д7	д8	д9	д10	д11	д12	д13	д14	д15	м1	м2	м3	м6
	пЦР																				
плазма		■	■	■	■	■	■	■	■												
слюна		■	■	■	■	■	■	■	■												
моча		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					
сперма		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Изоляция вируса																				
сыворотка		■	■	■	■	■															
моча								■													
сперма																	■				
	ИФА																				
сыворотка	IgM					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	IgG								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	NT								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

 Оптимальный период для проведения анализа



# ПЦР-ДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ ЗИКА У БЕРЕМЕННЫХ, ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРЕНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД.

**1. После первого положительного результата в ПЦР на наличие РНК вируса Зика ПЦР-анализ крови мочи и слюны проводится беременной пациентке 1 раз в два дня в первые 10 дней заболевания. В случае устойчивой регистрации виремии исследуются плазма крови и моча пациентки в динамике 1 раз в неделю до получения двух устойчивых отрицательных результатов в крови.**

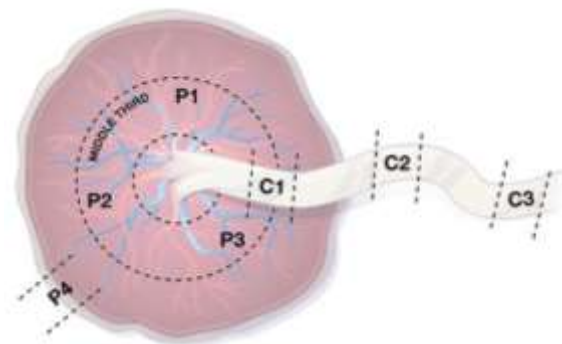
2. УЗИ плода проводится 1 раз в месяц после установления факта инфицирования матери: учитывается вес, бипариетальный размер, длина бедра, окружность живота, окружность головы согласно гестационному возрасту и полу, исследуются аномалии ЦНС плода.

3. При обнаружении поражения ЦНС: кальцификатов в области коры и подкорковых структур, базальных ганглиев, перивентрикулярных пространств, мозжечка; атрофии коры головного мозга, гипоплазии мозжечка и ствола мозга, вентрикуломегалии и др. возможно проведение исследования методом ПЦР амниотической жидкости для установления связи между поражениями и инфицированием плода вирусом Зика.

# ПЦР-ДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ ЗИКА У НОВОРОЖДЕННЫХ, ИССЛЕДОВАНИЯ В ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

- 1. Проводится исследование пуповинной крови, сыворотки или плазмы крови, мочи, при поражении ЦНС – ликвора новорожденного, взятые в первые два дня после рождения.** Обнаружение вируса в вышеуказанном клиническом материале является подтверждением внутриутробного инфицирования плода. Обнаружение РНК вируса в плаценте не является подтверждением внутриутробного инфицирования плода.

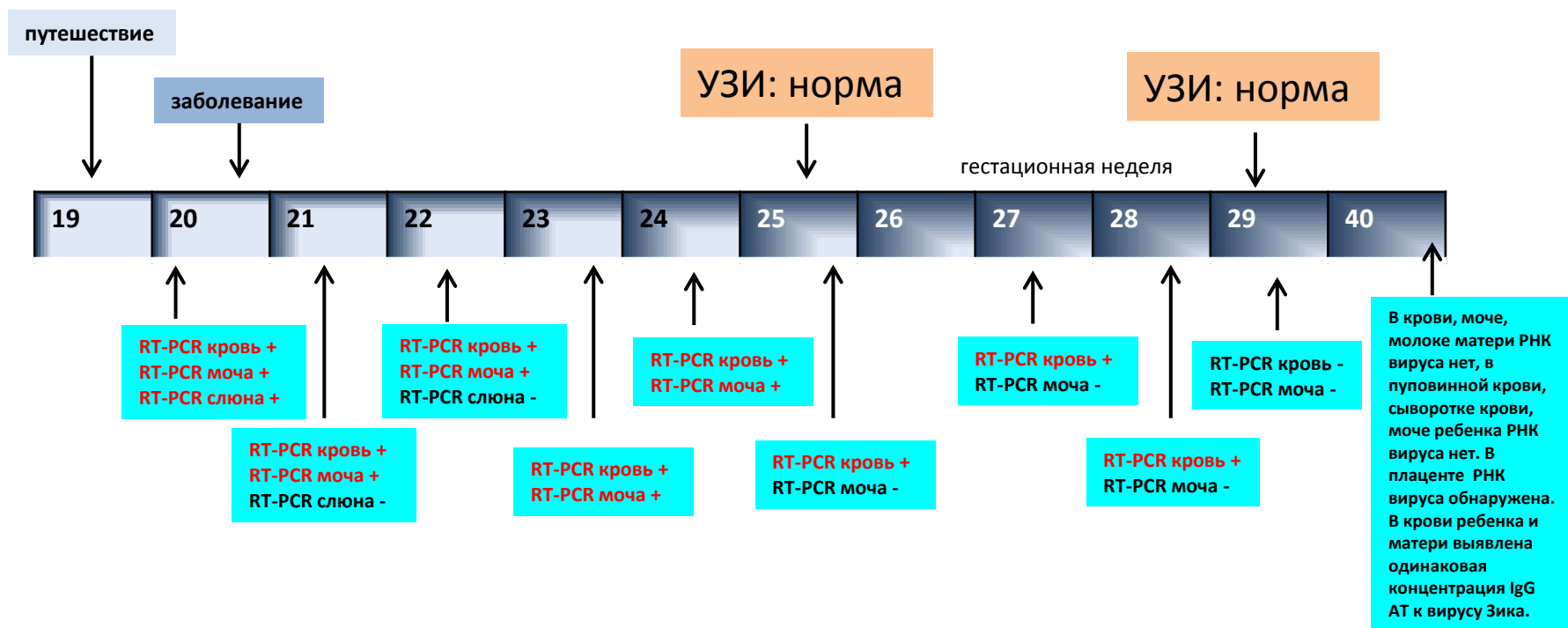
Specimen Type	Fixed Specimens
Placenta and fetal membranes	<ul style="list-style-type: none"><li>•Several full thickness pieces including <b>at least 3</b> full thickness pieces (0.5–1 cm x 3–4 cm in depth) from middle third of placental disk and <b>at least 1</b> from the placental disk margin</li><li>•One 5 x 12 cm strip of fetal membranes</li></ul>
Umbilical cord	<ul style="list-style-type: none"><li>•2.5 cm segments of cord</li><li>•4 or more specimens</li></ul>



- 2. В случае летального исхода исследуются ткани плода: мозг, сердце, легкие, селезенка, печень, почки, мышцы.**
3. При подтверждении внутриутробного инфицирования плода без признаков патологии ЦНС рекомендуется исследование слуха новорожденного методом КСВП на 2-й неделе и через 4-6 месяцев; с патологией ЦНС: описание неврологического статуса, функции щитовидной железы, осмотр офтальмологом и исследование слуха методом КСВП.

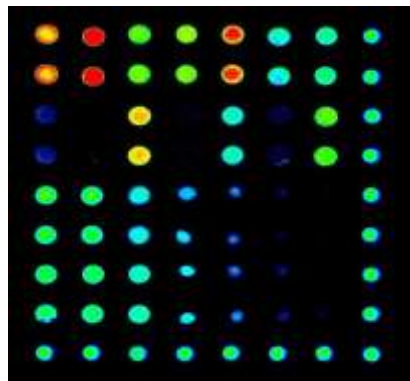
# Случай выявления инфицированной вирусом Зика беременной в РФ

- Пациентка Е. (пациент 2), 1991 г.р., находясь на 19-й неделе беременности, отдыхала в течение недели в августе 2016 года в Доминиканской республике вместе с мужем. Мужчина (пациент 1) заболевает с появлением лихорадки, склерита, сыпи на следующий день после прилета в Москву, пациентка – через 5 дней. Заболевание у беременной пациентки проявляется только в появлении единичных элементов сыпи на руках. Во время острого периода заболевания (6-й день болезни) в сперме мужчины выявляется РНК вируса Зика в концентрации, превышающей  $10^5$  коп/мл. По результатам секвенирования показана полная идентичность геномов вируса, изолированных из клинического материала пациентов 1 и 2, что может свидетельствовать о половом пути передачи инфекции.

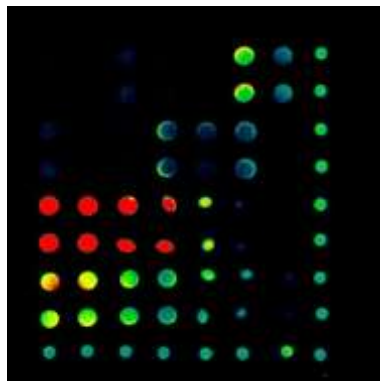


# Разработка биочипа для выявления антител к белкам-антигенам возбудителей арбовирусных инфекций

КАНАЛ Cy5  
(антитела IgG)



КАНАЛ Cy3  
(антитела IgM)



АГ CCHFV	АГ RVFV		АГ WNV	Маркер границы эррея
АГ YFV	АГ DV	АГ CHIKV	АГ ZV	
Референсы для обсчета данных				
Маркер границы эррея				

- Изучена литература, выбраны белки арбовирусов, являющиеся антигенами, и их специфичные фрагменты для клонирования и дальнейшего получения рекомбинантных белков-антигенов арбовирусов
- Собраны образцы сыворотки крови, охарактеризованы в ИФА по наличию IgM и IgG к антигенам CCHFV (40 образцов), DV (64 образца), WNFV (100 образцов), YFV (5 образцов), CHIKV (3 образца)
- Получены очищенные белки-антигены (созданы экспрессионно-векторные конструкции, кодирующие белки-антигены, подобраны условия экспрессии и очистки белков):
  - ✓ Вирус Крым-Конго (CCHFV) – всего 5 белков: эпитопная область нуклеопротеина NP, 3 фрагмента гликопротеина GP и эпитопная область L-белка
  - ✓ Вирус Рифт-Валли (RVFV) - всего 3 белков: эпитопная область нуклеопротеина NP, 2 фрагмента гликопротеина GP
  - ✓ Вирус Западного Нила (WNV) - всего 4 белка: 2 фрагмента E-белка оболочки вируса, 2 фрагмента неструктурного белка NS1
  - ✓ Вирус Денге (DV) – всего 2 белка: E-белок оболочки вируса, 1 фрагмента неструктурного белка NS1
  - ✓ Вирус Чикунгунья (CHIKV) - всего 2 белка: фрагмент капсидного белка, гликопротеин E1

# Разработка биочипа для выявления антител к белкам-антигенам возбудителей арбовирусных инфекций

## Вирус Зика (ZIKV)

**Перекрестные взаимодействия** рекомбинантных белков-антигенов вируса Зика с IgM и IgG в образцах сыворотки крови, охарактеризованных как **положительные по наличию IgG или IgM** к другим вирусам рода *Flavivirus*: вирусу клещевого энцефалита (**TBEV**), вирусу Денге (**DV**) или вирусу лихорадки Западного Нила (**WNV**).

	<b>TBEV</b>	<b>DV</b>	<b>WNV</b>
кол-во IgG пол образцов	4/14 ZV Env пол	12/12 ZV Env pos	15/35 ZV Env pos
	<b>0/14</b> ZV NS1 пол	<b>3/12</b> ZV NS1 pos	<b>2/35</b> ZV NS1 pos
	всего 4/14	всего 12/12	всего 15/35
кол-во IgM пол образцов	0/14 ZV Env пол	1/33 ZV Env pos	3/48 ZV Env pos
	<b>0/14</b> ZV NS1 пол	<b>1/33</b> ZV NS1 pos	<b>1/48</b> ZV NS1 pos
	всего 0/14	всего 1/33	всего 3/48

**Т.о.** по нашим данным **наибольшую диагностическую значимость имеет выявление антител класса М к NS1-белку вируса Зика**, так как в этом случае наблюдается **минимальное перекрестное взаимодействие** между антигеном и антителами из в образцов сыворотки крови, имеющих **IgM** к другим вирусам рода *Flavivirus*

# Разработка биочипа для выявления антител к белкам-антигенам возбудителей арбовирусных инфекций

## Вирус Зика (ZIKV)

- ✓ Получены очищенные белки-антигены (созданы экспрессионно-векторные конструкции, кодирующие белки-антигены, подобраны условия экспрессии и очистки белков). Всего 6 белков: 4 фрагмента Е-белка оболочки вируса нуклеопротеина NP, 2 фрагмента неструктурного белка NS1
- ✓ Доказана диагностическая значимость двух рекомбинантных белков вируса Зика – 1 фрагмента Е белка и 1 фрагмента NS1 белка
- ✓ Протестированы **46 образцов сыворотки крови**, собранных в динамике от **8 больных**, у которых в биологическом материале (плазма/слюна/моча) обнаружена РНК вируса Зика и подтверждено инфекционное заболевание, вызванное вирусом Зика
- ✓ Срок обнаружения **IgM к белкам** вируса Зика в нашей выборке - **3-5й день (8/8)** после появления симптомов
- ✓ Срок обнаружения **IgG к белкам** вируса Зика в нашей выборке - **5-8-й день (8/8)** после появления симптомов
- ✓ IgG к белкам вируса Зика выявляются до 6 месяцев после появления симптомов в образце, полученном от 1/8 пациентов (пока только поздний образец), до 4 месяцев – в образце, полученном от 1/8 пациентов, до 3 месяцев – в образцах, полученных от 2/8 пациентов.

## Сероконверсия специфических антител к вирусу Зика у пациентки З. и новорожденного ребенка. Иммуночип (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии)

	IgM		IgG	
	ZV Env	ZV NS1	ZV Env	ZV NS1
Беременная З. 25.08.16 ( 1-й день заболевания)	43	38	30	5
Беременная З. 26.08.16	62	178	27	10
Беременная З. 29.08.16	48	817	24	153
Беременная З. 01.09.16	45	665	23	764
Беременная З. 07.09.16	53	331	34	879
Беременная З. 14.09.16	51	99	50	1775
Беременная З. 22.09.16	53	47	107	2214
Мать З. 12.01.17	25,0	3,0	376	4949
Пуповинная кровь 12.01.17	0,0	4,0	365	4784
Сыворотка крови ребенка 12.01.17	0,0	3,0	374	4849

# Разработка биочипа для выявления антител к белкам-антигенам возбудителей арбовирусных инфекций

## Вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго.

- 40 парных образцов сыворотки крови от 20 больных КГЛ, положительные на наличие специфических антител класса IgM и IgG к вирусу ККГЛ в наборах реагентов «БиоСкрин-ККГЛ»
- Рекомбинантные белки-антигены CCFV : **CCFV \_ NP sh; CCFV \_ GP1; CCFV \_ GPN\_MBP; CCFV \_ GPC\_MBP; CCFV \_ L**
- Неспецифических реакций не отмечено (0/20 исследованных сывороток), работа будет продолжена

### Структура иммунного IgM ответа на CCFV

	IgM к CCFV _ GP1	IgM к CCFV _ L	IgM к CCFV _ NP sh	IgM к CCFV _ GP C	IgM к CCFV _ GP N	no IgM
1ая сыворотка	2/20	3/20	14/20	2/20	1/20	5/20
2ая сыворотка	4/20	3/20	19/20	3/20	0/20	1/20

	IgM к CCFV _ NP sh	IgM к CCFV _ NP sh без сочетания с IgM к другим белкам-антигенам CCFV	IgM к другим белкам-антигенам CCFV без сочетания с IgM к CCFV _ NP sh
1ая сыворотка	14/20	11/20	1/20
2ая сыворотка	19/20	13/20	-

сероконверсия	10/20	пар сывороток
изменение спектра белков	4/20	пар сывороток



# Разработка биочипа для выявления антител к белкам-антигенам возбудителей арбовирусных инфекций

## Вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго.

### Структура иммунного IgG ответа на CCHFV

	IgG к CCHFV_GP1	IgG к CCHFV_L	IgG к CCHFV_NP sh	IgG к CCHFV_GP C	IgG к CCHFV_GP N	no IgG
1ая сыворотка	2/20	3/20	9/20	1/20	3/20	8/20
2ая сыворотка	1/20	1/20	15/20	2/20	2/20	4/20

	IgG к CCHFV_NP sh	IgG к CCHFV_NP sh b другим белкам-антигенам CCFV
1ая сыворотка	9/20	12/20
2ая сыворотка	15/20	16/20

	чип	ИФА
диагноз по 1-м сывороткам по IgM	15/20	16/20
диагноз по 1-м сывороткам по IgM и IgG	17/20	-
диагноз по парным сывороткам по IgM	18/20	-
диагноз по парным сывороткам по IgM и IgG	20/20	20/20

# Тест-система для выявления возбудителей малярии «АмплиСенс® Plasmodium spp/P.falciparum/P.vivax-FL», мишень – COI, Cytb, 18S гены

## Объекты для исследования:

Образцы клинического материала: **кровь**

Образцы из окружающей среды: **комары**

## Формат тест-системы:

Количество реакционных смесей (пробирок): **1**

Количество каналов детекции: **2 (FAM,JOE,ROX,Red)**

Амплификатор: **RotorGene 6000/Q; CFX96**

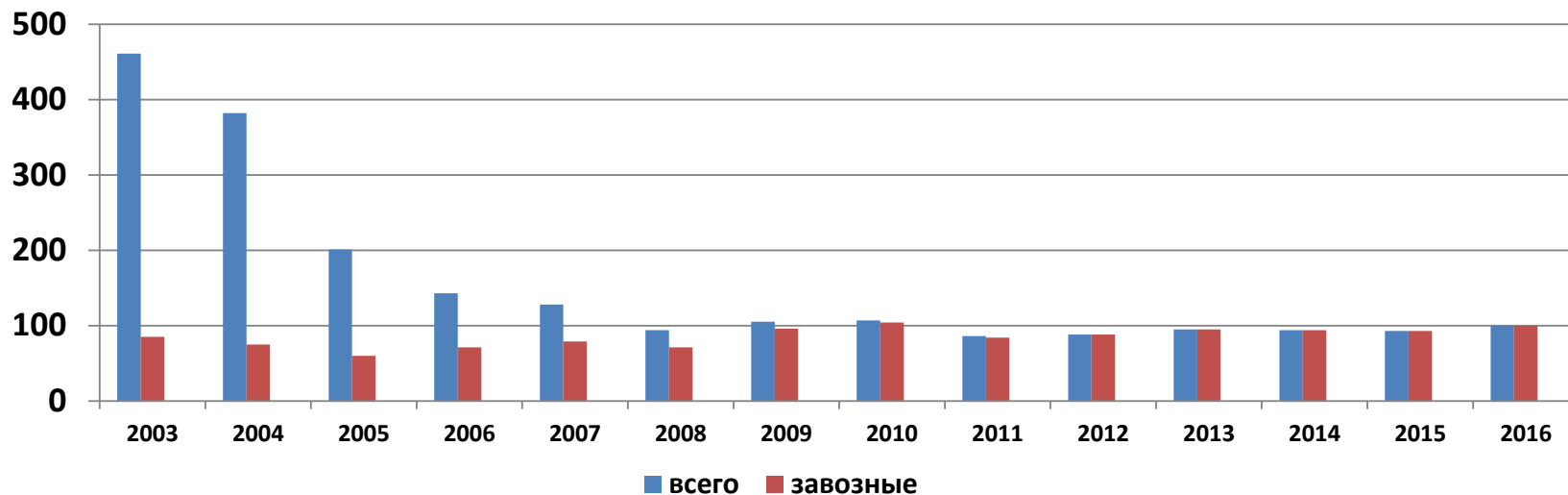
## Аналитическая и диагностическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, коп/мл	Диагностическая чувствительность
кровь	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 <sup>3</sup>	Относительно микроскопии – 100%, относительно ИХА – 96%

**Аналитическая специфичность** при тестировании штаммов R.canadensis, R.prowazekii, R.tarasevichiae, R.sibirica, Leptospira kirschneri, L. borgpetersenii, Shigella sonne, Shigella flexneri, Salmonella typhi, Salmonella enteritidis, Klebsiella pneumonia, Esherichia coli NCTC 9001, Enterococcus faecalis, Bartonella henselae, A.phagocytophillum, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Babesia microti, Enterobacter cloacae, Yersinia pestis, а также геномной ДНК человека составила 100%.

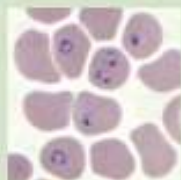
# Малярия в России

Ежегодно в мире регистрируется от 100 до 300 миллионов в год случаев **малярии**, из них 90 % в тропической Африке, где погибает до 1 миллиона человек.



В Россию завоз малярии происходит из стран Африки: Камеруна, Либерии, Конго, Нигерии, Гвинеи, Габона, Ганы, Анголы, Сьерра-Леоне, Судана, Мали, Мозамбика, Кот-д'Ивуár, Уганды, Гвинеи-Биссау; отмечается завоз малярии из Индии, Афганистана, Гайаны, Йемена, Мьянмы, Папуа - Новая Гвинея, Перу, Таиланда, Камбоджи.

# Диагностика



Ring-form trophozoites of *P. falciparum* in a thin blood smear.



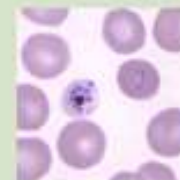
Ring-form trophozoites of *P. vivax* in a thin blood smear.



Trophozoites of *P. ovale* in a thin blood smear.



Band-form trophozoites of *P. malariae* in a thin blood smear.



Schizont and ring-form trophozoite of *P. knowlesi* in a thin blood smear.

(All photos courtesy of [DPDx](#))

## 1. Микроскопия

Чувствительность – 40 плазмодиев/мкл.

Недостатки:

- ложно-отрицательные результаты при низкой паразитемии;
- ложно-положительные результаты при плохом качестве препарата
- ошибки при идентификации видов в случае смешанных инфекций

## 2. Иммунохроматография (RDT).

Результат через 15 мин

Чувствительность -  $\geq 90\%$  при паразитемии

$\geq 500$ /мкл крови для *Pl.falciparum*,

$\geq 5000$ /мкл для *Pl.vivax*

Специфичность - более 85% (до 95%)



# Тест-система для выявления возбудителей малярии

«АмплиСенс® Plasmodium spp/P.falciparum/P.vivax-FL», мишени – COI, Cytb, 18S RNA гены

## Объекты для исследования:

Образцы клинического материала: **кровь**

## Формат тест-системы:

Количество реакционных смесей (пробирок): **1**

Количество каналов детекции: **2 (FAM, JOE, ROX, Red)**

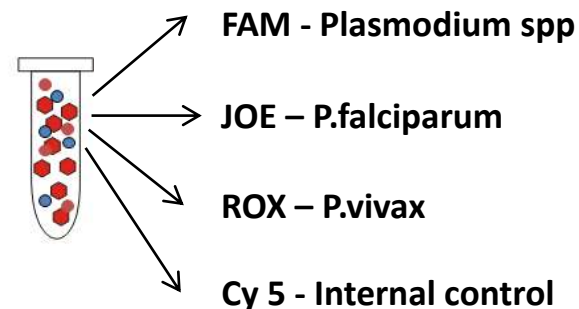
Амплификатор: **RotorGene 6000/Q; CFX96**

## Аналитическая и диагностическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, коп/мл	Диагностическая чувствительность
кровь	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	$1 \times 10^3$ (0,2 плазмодия в 1 мкл)	Относительно микроскопии – 100%, относительно ИХА – 96%

Исследование 307 проб в Гвинее в 2016 г. методом ПЦР и с использованием быстрого иммунохроматографического теста

	ПЦР	ИХА+	ИХА-
307	128 +	90	38
	179 -	5	174



В разработке – апробация

# Тест-система для выявления ДНК риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок

«АмплиСенс® Rickettsia spp. SFG-FRT», мишень – ген *OmpB*

## Объекты для исследования:

Образцы клинического материала: *кровь, ликвор, смыв с очага первичного аффекта, биоптат очага первичного аффекта*

Образцы аутопсийного материала от людей: *ткани мозга, почек, печени, легких*

Образцы из окружающей среды: *клещи*

## Формат тест-системы:

Количество реакционных смесей (пробирок): **1**

Количество каналов детекции: **2 (FAM, JOE)**

Амплификатор: *RotorGene 3000/6000/Q; CFX96*

## Аналитическая и диагностическая чувствительность

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность, копий /мл	Диагностическая чувствительность
лейкоциты крови, ликвор	Осадок+100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10 <sup>3</sup>	Лейкоцитарная фракция крови: R.conorii – 76% R.sibirica – 68% R.heilongjiangensis – 74-82% Смыв с первичного аффекта: R.sibirica – 47-89% R.heilongjiangensis – 89-96% Биоптат с первичного аффекта: R.heilongjiangensis – 100%
тканевой (биопсийный и аутопсийный) материал, смыв с первичного аффекта	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10 <sup>3</sup>	
клещи	100 (для экстракции из Ixodes) или 50 (для экстракции из Dermacentor)	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10 <sup>3</sup>	
клещи	100	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10 <sup>3</sup>	

**Аналитическая чувствительность** при тестировании штаммов риккетсий R.conorii, R.raoultii, R.slovaca, R.heilongjiangensis, R.sibirica составила 100%.

**Аналитическая специфичность** при тестировании штаммов R.canadensis, R.prowazekii, R.tarasevichiae, WNV (вирус Западного Нила), JEV (вирус японского энцефалита), OHFV (вирус омской геморрагической лихорадки), TBEV (вирус клещевого энцефалита), Leptospira kirschneri, L. borgpetersenii, Shigella sonne, Shigella flexneri, Salmonella typhi, Salmonella enteritidis, Klebsiella pneumonia, Esherichia coli NCTC 9001, Enterococcus faecalis, Bartonella henselae, A.phagocytophilum, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Babesia microti, Enterobacter cloacae, Yersinia pestis, а также геномной ДНК человека составила 100%.

## Сравнение диагностической чувствительности ПЦР и ИФА методов при диагностике клещевых риккетсиозов

**Материалы и методы:** клинический материал (цельная кровь, смывы с первичного аффекта, биоптаты с первичного аффекта, парные сыворотки крови) от 140 пациентов с клиническим диагнозом КР, собранный в Хабаровске в 2014-2016 гг., и материал от 69 пациентов, собранный в 2014-2016 гг в Горно-Алтайске, 70 образцов лейкоцитарно-бактериальной фракции крови от пациентов из Астраханской области.

ПЦР анализ с образцами лейкоцитарной фракции крови (анализ выполнялся всегда в дубле с двумя образцами лфк), смывами и/или биоптатами с первичного аффекта проводился с использованием разработанного набора реагентов для детекции *Rickettsia* spp. SFG, а затем с НР для типирования риккетсий. Для проведения ИФА использовали набор [RICKETTSIA CONORII ELISA IgG/IgM](#) (Vircell).

«Amplisens® *Rickettsia* spp SFG-FRT»

«Amplisens® *Rickettsia* sibirica/*R.heilongjiangensis*-FRT»

140 пациентов с диагнозом КР, Хабаровск

ПЦР проведена для 131 пациента  
ДНК *R.heilongjiangensis* обнаружена  
в клиническом материале от 110  
пациентов – 84%

ИФА проведен для 109 пациентов  
Сероконверсия антител выявлена у  
78 пациентов – 72%

Одновременно методом ИФА и ПЦР изучен материал от 101 пациента

ИФА+/ПЦР+ 66 проб

ИФА+/ПЦР- 7 проб

ИФА-/ПЦР+ 21 проба

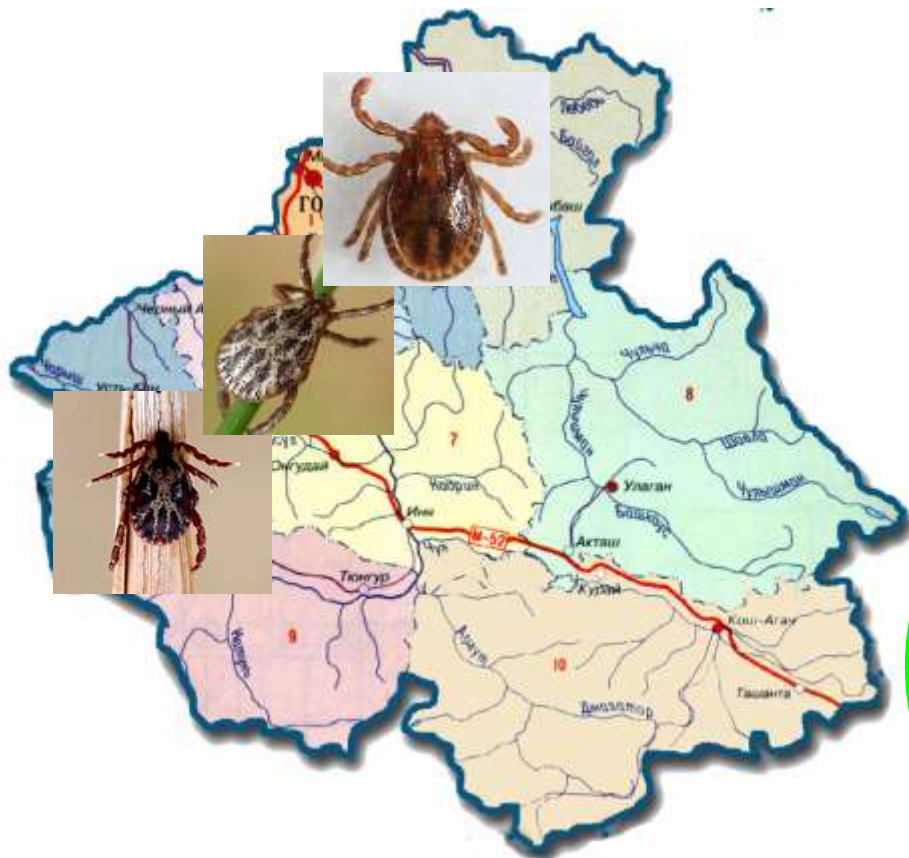
ИФА-/ПЦР- 7 проб

69 пациентов с диагнозом КР, Горно-Алтайск

ПЦР проведена для 65 пациентов  
ДНК риккетсий  
**(3 - *R.heilongiagensis*\*, 44 – *R.sibirica*)**  
обнаружена в клиническом материале от  
47 пациентов – 72%

ИФА проведен для 19 пациентов  
Сероконверсия специфических антител  
выявлена у 15 пациентов – 79%

884 клеща (2016 г.)



Район	Вид клеща	Обнаружение риккетсий, %		
		<i>R.sibirica</i>	<i>R.raoultii</i>	<i>R.heilongjia gensis</i>
Онгудайский	<i>D.nutalli</i>	4	35	
Усть-Коксинский	<i>D.nutalli</i>	6	66	
Усть-Канский	<i>D.nutalli</i>	6	81	
Чемальский	<i>D.nutalli</i>	10	63	
	<i>D.silvarum</i>	10	50	
Чойский*	<i>D.silvarum</i> <i>H.concinna</i>		54	5
Майминский	<i>D.silvarum</i> <i>H.concinna</i> <i>I.persulcatus</i>		94	20-26 4
г. Горно-Алтайск* и пригород	<i>H.concinna</i>			6
Кош-Агач	<i>D.nutalli</i>	0,8	58	





# Тест-система для выявления возбудителей лейшманиозов

«АмплиСенс® Лейшманиозы-FL», мишень – 18S RNA ген

## Объекты для исследования:

Образцы клинического материала: *скарификаты язв, биоптаты костного мозга*

## Формат тест-системы:

Количество реакционных смесей (пробирок): **1**

Количество каналов детекции: **2 (FAM, JOE)**

Амплификатор: *RotorGene 3000/6000/Q; CFX96*

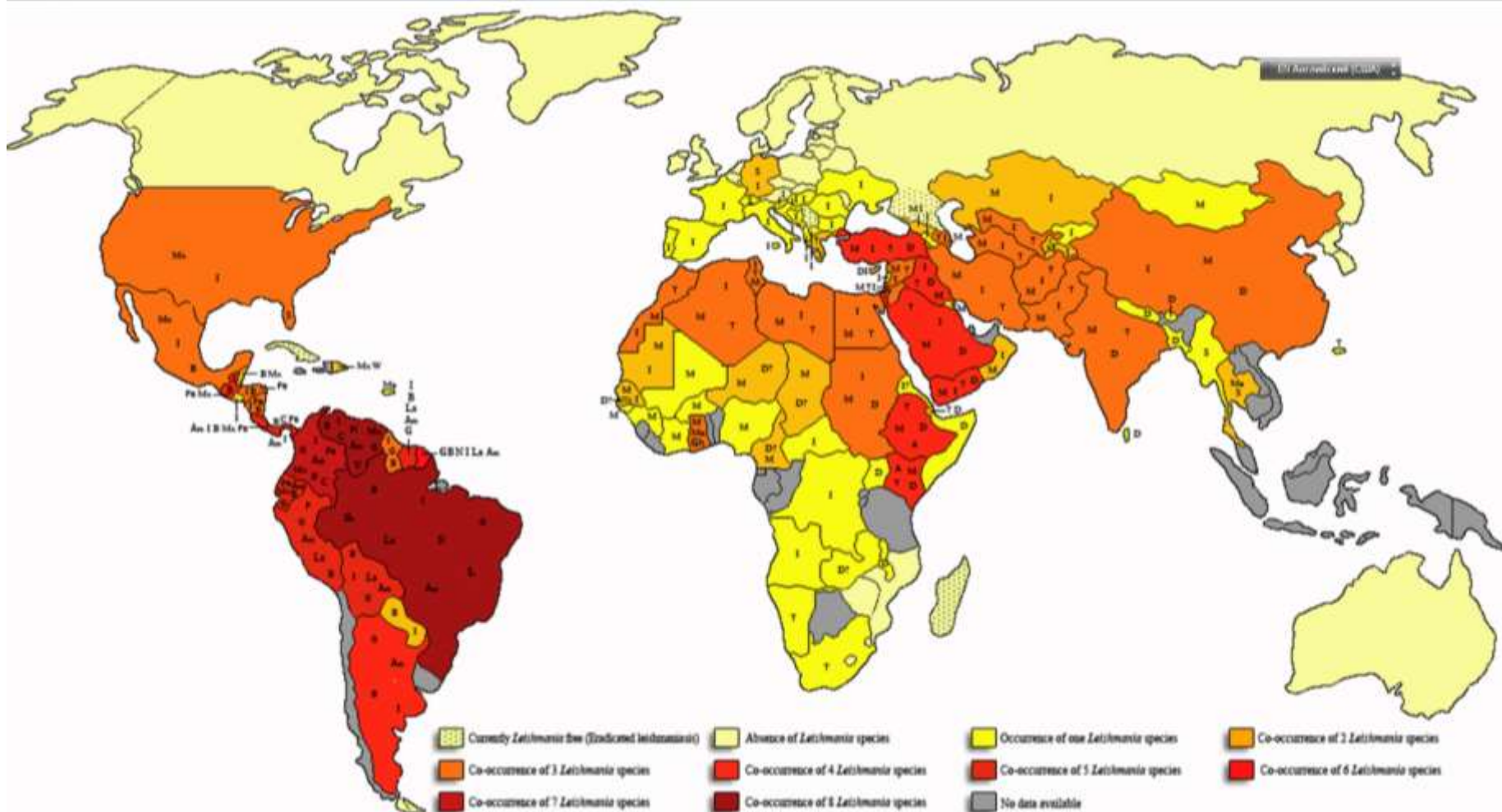
## Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, коп/мл
Скарификаты язв	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	5x10 <sup>3</sup>
Биоптаты костного мозга	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	5x10 <sup>3</sup>

**Аналитическая специфичность** при исследовании следующих штаммов микроорганизмов и образцах ДНК:

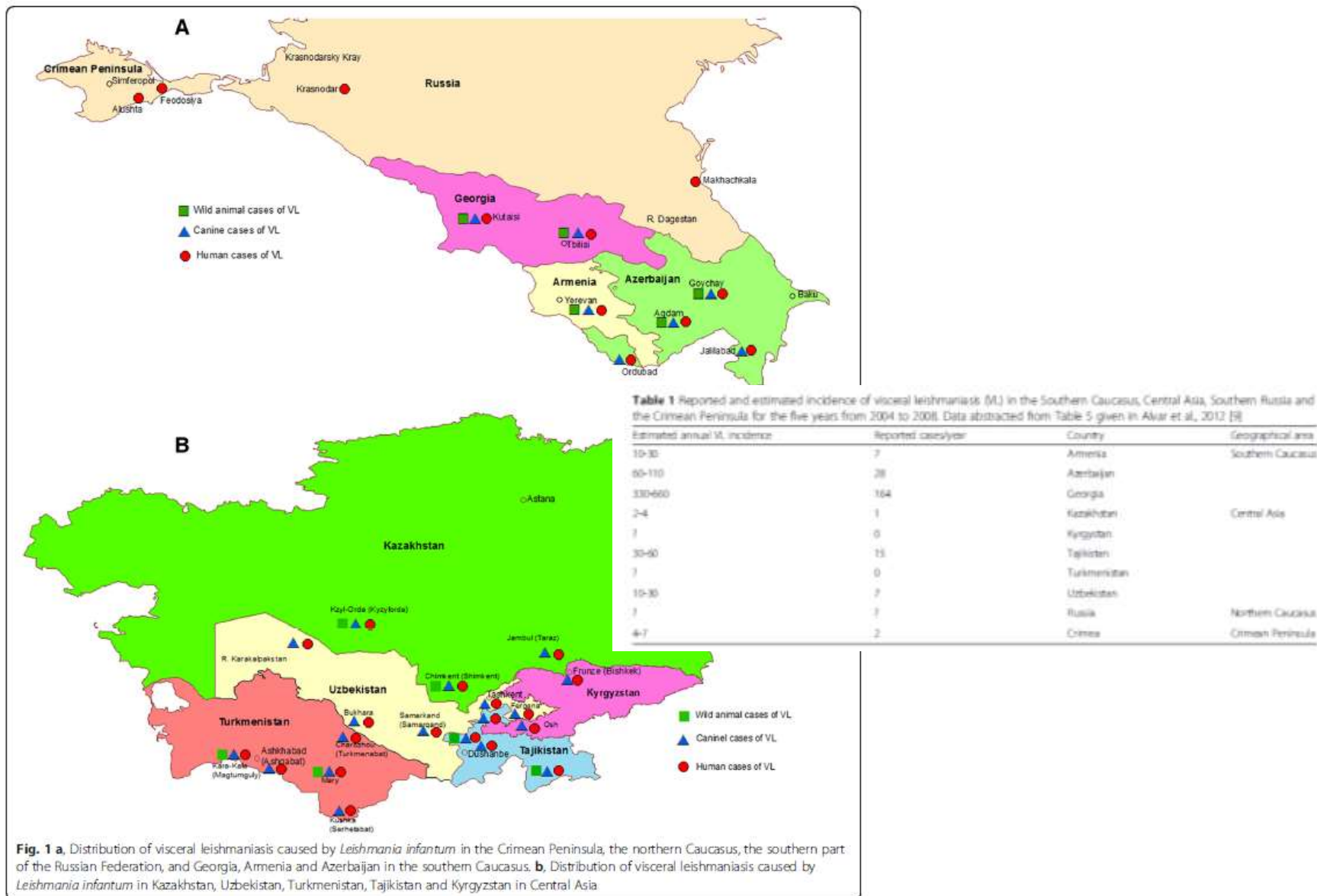
*Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Trichuris trichiura*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*; *Enterococcus faecalis* (ГИСК 29212); *Escherichia coli* (NCTC 9001); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Haemophilus influenzae*; *Haemophilus parainfluenzae*; *Haemophilus haemolyticus*; *Klebsiella oxytoca*; *Klebsiella pneumoniae*; *Listeria monocytogenes*; *Moraxella catarrhalis*; *Neisseria cinerea*; *Neisseria elongate*; *Neisseria flavescens*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Neisseria mucosa*; *Neisseria sicca*; *Neisseria subflava*; *Pantoea agglomerans*; *Proteus mirabilis*; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella enteritidis* (ГИСК 1137); *Salmonella typhi* (Central Public Health Laboratory (London) 5715); *Shigella flexneri* 2a (ГИСК 1270); *Shigella sonnei* (ГИСК 9090); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305); *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus milleri*; *Streptococcus mitis*; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus pyogenes*; *Streptococcus salivarius*; *Streptococcus sanguis*; *Streptococcus suis*; *Streptococcus viridians*; *Yersinia enterocolitica*; *Yersinia pseudotuberculosis* I. составила 100%.

# Распространение лейшманиоза в мире



Около 95% случаев ВЛ приходится на 5 стран: Бангладеш, Индия, Непал, Судан, Бразилия

# Лейшманиоз в РФ и сопредельных странах



# Диагностика лейшманиозов

1. Микроскопия смывов с кожного очага при КЛ и аспиратов костного мозга, селезенки и лимфоузлов при ВЛ.
2. Изоляция лейшманий в культуре in vitro. Диагностическая чувствительность не превышает 70% .
3. Изоляция лейшманий с использованием лабораторных животных.
4. Кожный тест. При висцеральном лейшманиозе становится положительным у 90% пациентов с ВЛ в период с 6-й недели заболевания и до года после выздоровления.
5. РПА-тест. Чувствительность и специфичность около 95 и 85%, соответственно.
- 6. ИФА и иммунохроматографические тесты.**

**Коммерческие быстрые иммунохроматографические тесты на основе антигена rK39** (в РФ не зарегистрированы):

- **IT-LEISH® (Biorad, France),**
- **Kalazar Detect® (InBios International, USA),**
- Onsite Leishmania Ab Rapid Test (СТК Biotech, USA)

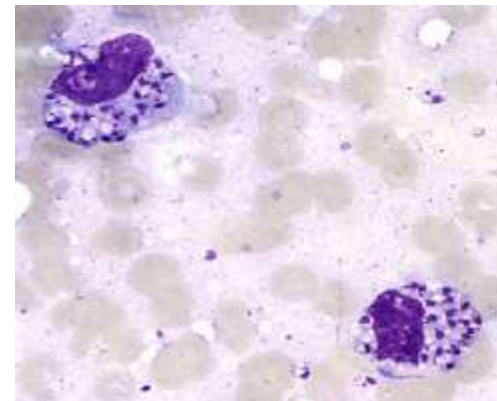
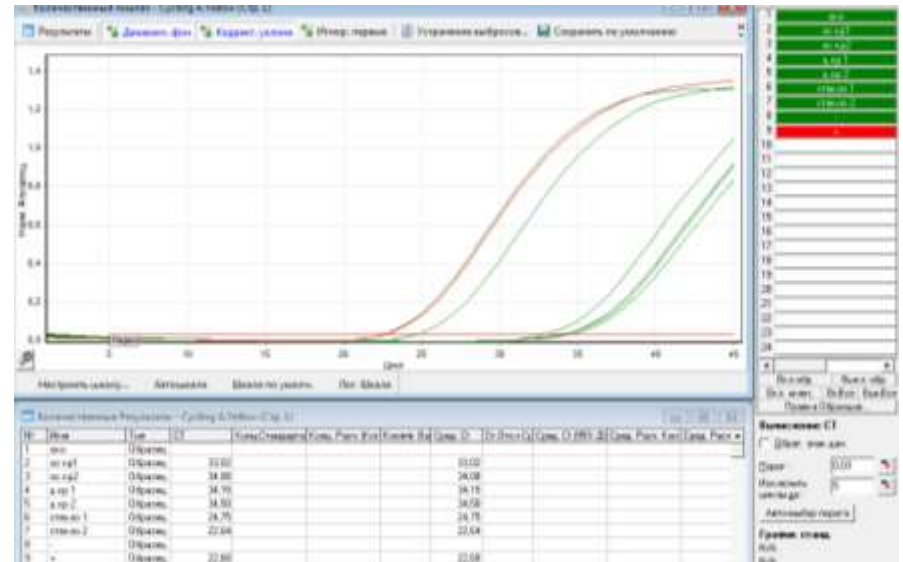
**Коммерчески доступные в России наборы ИФА**

- **(IgG+IgM)-антитела к Leishmania infantum (Vircell, Испания)**
- *В России дистрибьютер Биохиммак [https://biochemmack.ru/catalog/laboratornaya\\_diaagnostika/](https://biochemmack.ru/catalog/laboratornaya_diaagnostika/)*
- [https://biochemmack.ru/catalog/element/13878/41571/?sphrase\\_id=119534](https://biochemmack.ru/catalog/element/13878/41571/?sphrase_id=119534)
- **NovaLisa TM, Leishmania infantum IgG – ELISA (NovaТес, Германия)**
- *В России дистрибьютер Медико-диагностическая лаборатория <http://www.meddialab.ru/index.htm>*
- <http://www.novatec-id.com/de/produkte/novalisa/parasiten/leishmania/>

7. ПЦР-диагностика смывов с кожного очага при КЛ и аспиратов костного мозга, селезенки, а также венозной крови.

# Висцеральный лейшманиоз у пациентки 2 лет, проживающей в Севастополе

Пациентка Г., (2 года), проживающая в Севастополе, поступила с диагнозом «Вторичный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, ассоциированный с висцеральным лейшманиозом». Со слов матери ребенок болен с января 2016 года. В ноябре проведено лечение по протоколу НЛН-2004, на фоне которого сохранялась лихорадка, гепатоспленомегалия и панцитопения. В пунктате костного мозга от 22.11.2016 г. лейшмании не выявлены. При переводе ребенка в марте 2017 года в ФНКЦ ДГОИ им. Д.Рогачева и пересмотре здесь данного препарата лейшмании обнаружены. Новая пункция костного мозга проведена в ФНКЦ ДГОИ им. Д.Рогачева 03.03.2017 с отрицательным результатом микроскопического анализа на лейшмании. В смыве со стекла с мазком аспирата костного мозга от 03.03.2017 и в цельной крови от 14.03.2017 выявлена ДНК *Leishmania* spp.



# Тест-система для выявления возбудителей шистосомоза «АмплиСенс® Schistosoma spp. -FL»

## Объекты для исследования:

Образцы клинического материала: фекалии, моча

## Формат тест-системы:

Количество реакционных смесей (пробирок): **1**

Количество каналов детекции: **2 (FAM, JOE)**

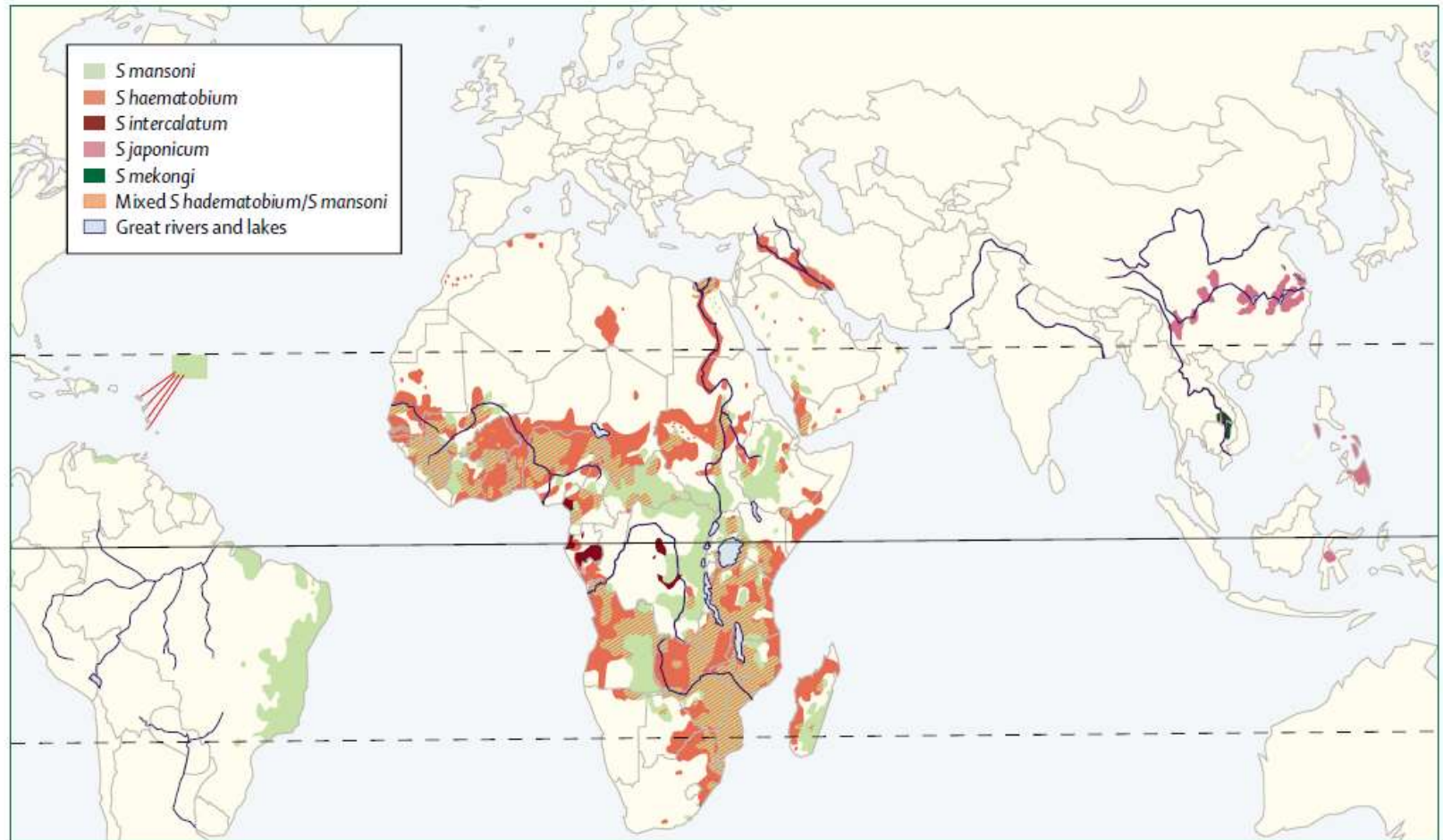
Амплификатор: **RotorGene 6000/Q; CFX96, DT-96**

## Аналитическая и диагностическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, коп/мл
фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 <sup>3</sup>
моча	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 <sup>3</sup>

**Аналитическая специфичность** при тестировании штаммов *Astrovirus*, *Norovirus II*, *Rotavirus A*, *Chlamydia trachomatis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leptospira interrogans*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhi*, *S. Dublin*, *Shigella sonnei*, *Sh. flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *St. saprophyticus*, *Trichomonas vaginalis*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Ureaplasma parvum*, *U. urealyticum*, а также ДНК *Ascaris suis*, *Dirofilaria immitis*, ДНК человека составила 100%.

## Распространенность шистосомоза в мире



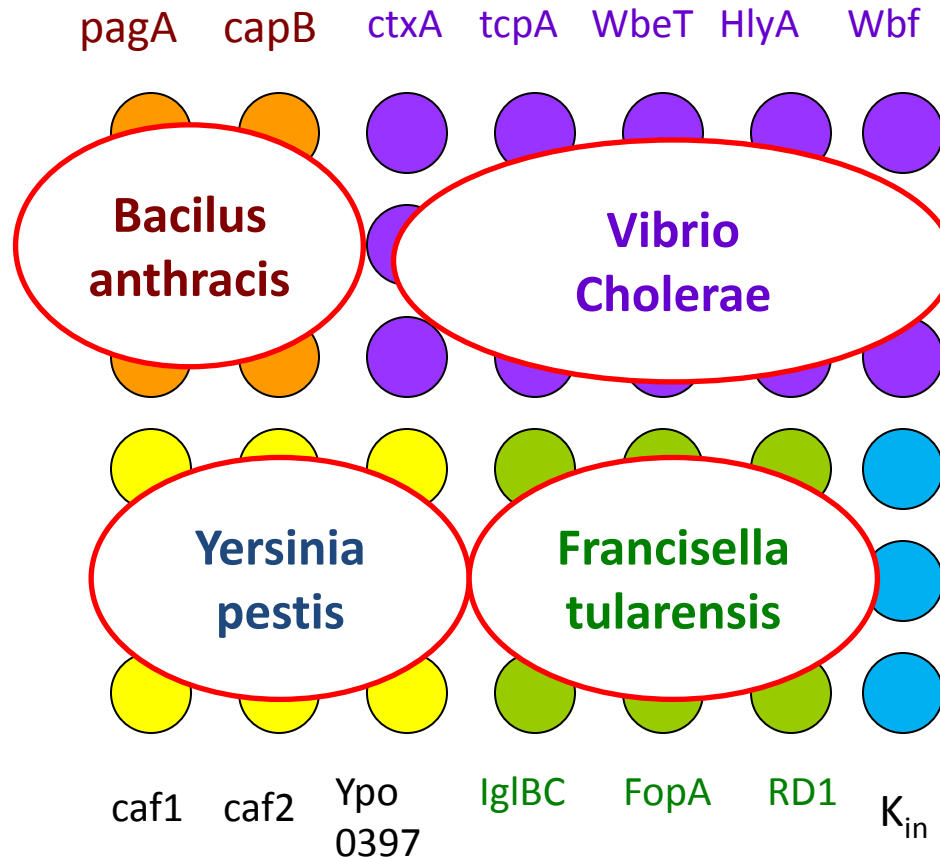
**Figure 2:** Global distribution of schistosomiasis

Based on updated and corrected data from Doumenge and Mott.<sup>3</sup> Main foci: *S. mansoni*—much of sub-Saharan Africa, northeast Brazil, Surinam, Venezuela, the Caribbean, lower and middle Egypt, the Arabian peninsula; *S. haematobium*—much of sub-Saharan Africa, Nile valley in Egypt and Sudan, the Maghreb, the Arabian peninsula; *S. japonicum*—along the central lakes and River Yangtze in China; Mindanao, Leyte, and some other islands in the Philippines; and small pockets in Indonesia; *S. mekongi*—central Mekong Basin in Laos and Cambodia; *S. intercalatum*—pockets in west and central Africa.

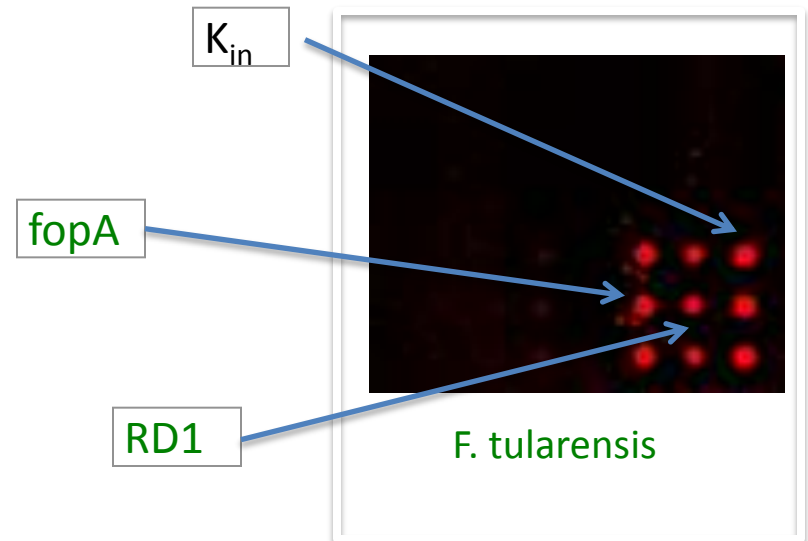
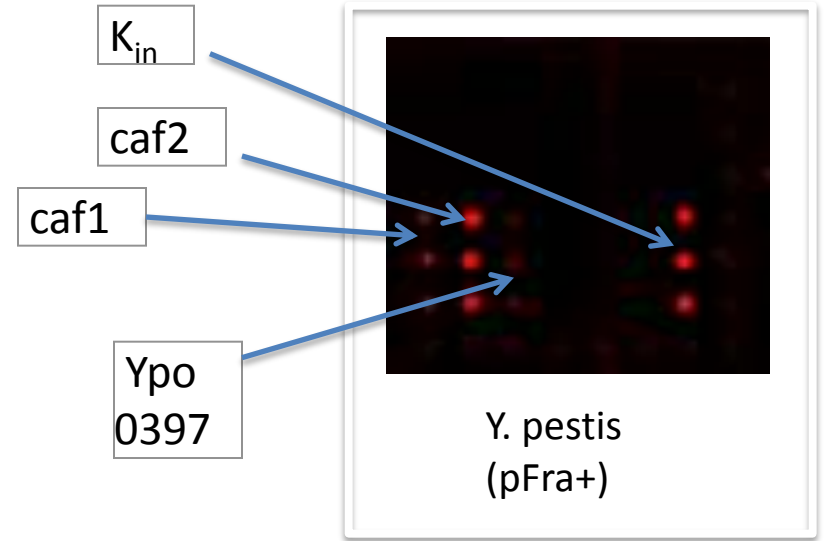
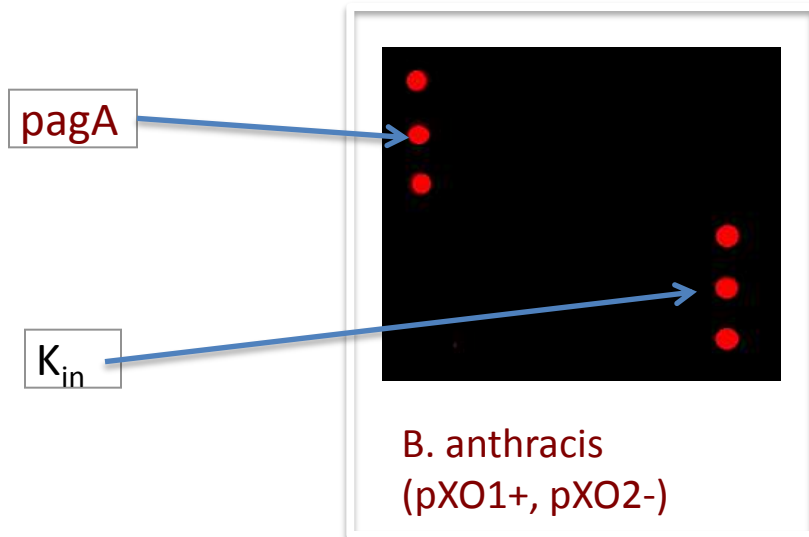
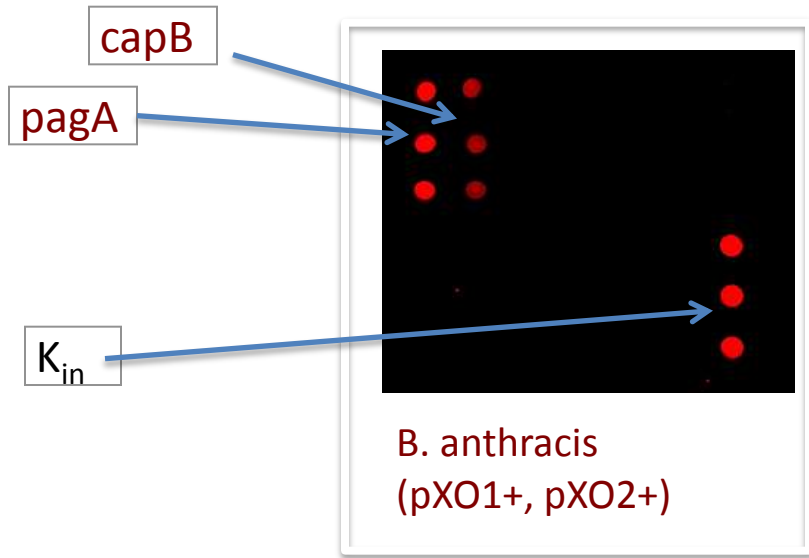




# «ДНК-чип для определения *B.anthraxis*, *Y.pestis*, *F.tularensis* и *V.cholerae*»



# Определение *B.anthraxis*, *Y.pestis* и *F.tularensis* с помощью ДНК-чипа



# Определение *V.cholerae* с помощью ДНК-чипа

