

АСЛАНОВА МАРИЯ МИХАЙЛОВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ
ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ОПАСНОСТИ
КОНТАМИНАЦИИ ЦИСТАМИ *LAMBLLIA INTESTINALIS* И
ООЦИСТАМИ *CRIPТОSPORIDIUM PARVUM* ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ
СРЕДЫ И БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

**14.02.01 – Гигиена
03.02.11- Паразитология**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации в лаборатории санитарной микробиологии и паразитологии.

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

Доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Синицына О.О.

Кандидат медицинских наук

Кузнецова К.Ю.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Доктор медицинских наук,
ФБУН «Ростовского НИИ микробиологии и паразитологии»
Роспотребнадзора
Руководитель лаборатории санитарной микробиологии
водных объектов и микробной экологии

Журавлев П.В

Доктор биологических наук,
ФБУН «Тюменского научно-исследовательского
института краевой инфекционной патологии»
Роспотребнадзора
Руководитель лаборатории экологического мониторинга
природно-очаговых паразитозов

Фаттахов Р.Г.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования Российская Медицинская академия непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится "27" декабря 2017 г. в 11.00 на заседании диссертационного совета Д 208.133.01 в федеральном государственном бюджетном учреждении «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Погодинская, д.10, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте Центра www.sysin.ru

Автореферат разослан «_» _____ 2017

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Ингель Фаина Исааковна

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Паразитарные болезни в мире занимают ведущее место в структуре инфекционной заболеваемости населения. По данным ВОЗ около 4,3 млрд. человек населения Земли имеют паразитарные инвазии. В России ежегодно регистрируется около 1 млн. больных паразитарными болезнями, однако, их реальное число превышает 20 млн. человек (*Онищенко Г.Г., Сергеев В.П., 2013*). Эти болезни получили название «neglected diseases» («незамеченные болезни»), отчасти потому, что их названия трудны для произношения, «однако ущерб, наносимый паразитарной патологией, неизмеримо больше, чем несколько сот выявленных случаев «птичьего гриппа», которым нас пугают уже 10 лет» (*Chen M., 2010*). Известно более 350 видов возбудителей паразитарных болезней в мире (*Taylor L.N., et al, 2001*). На территории Российской Федерации распространено более 30 видов возбудителей паразитарных болезней, и только 13 из них включены в официальную статистику (*Сергеев В.П., 2006*).

Процессы урбанизации населения, повышение антропогенной нагрузки, а также изменение климата, природные катастрофы (недавние наводнения в Краснодарском, Алтайском, Пермском краях, Амурской области, Сибири, приводят к созданию благоприятных условий для развития, длительного выживания и распространения в различных объектах окружающей среды возбудителей паразитарных болезней. Многообразие угроз этих возбудителей здоровью человека и определяют их роль в экологии человека и гигиене окружающей среды (*Рахманин Ю.А., Сеницына О.О., 2013*).

Паразитарная безопасность объектов окружающей среды регламентирована санитарными правилами и нормативами СанПиН 3.2.3215-14 "Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации", техническим регламентом Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и другими нормативно-правовыми документами.

Одними из контролируемых показателей в смывах с плодоовощной продукции и поверхностей объектов окружающей среды, питьевой воде, в том числе расфасованной в емкости, в воде плавательных бассейнов и поверхностных водных объектов, почве являются цисты *Lambliа intestinalis* и ооцисты *Cryptosporidium parvum*, имеющие наибольшее эпидемиологическое значение в возникновении и развитии паразитарной заболеваемости среди населения (СанПиН 2.1.4.1074-01, СанПиН 2.1.5.980-00, СанПиН 2.1.4.1116-02, СанПиН 2.1.7.1287-02).

Данные федеральной статистической отчетности о санитарном состоянии объектов окружающей среды нерепрезентативны в отношении оценки паразитарного загрязнения, так как получены в результате применения архаичных методов паразитологических исследований. В связи с низкой инфицирующей дозой цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* (*Chappell C.L, 2006*) чрезвычайно важным является методика определения этих показателей в объектах окружающей среды, которая позволяла бы получать достоверные результаты отличные от нуля и прогнозировать инфекционную паразитарную заболеваемость. Применение эффективных методов лабораторной диагностики паразитарных болезней и определение их

возбудителей в окружающей среде является актуальной задачей практического здравоохранения.

Новым этапом усовершенствования методов лабораторных исследований явилась разработка и применение сорбентов с магнитными свойствами (*Giawer E.V., 1974; Smith Y.B. 1977; Leaetal G.O. 1985*) в сочетании с методом иммунофлуоресценции, утвержденного в МУК 4.2.2314-08 «Методы санитарно-паразитологического анализа воды». Однако по-прежнему в паразитологических лабораториях при определении *L.intestinalis* и *C.parvum* в воде применяют архаичные классические методы, обладающие очень низкой чувствительностью. Это связано с острым дефицитом подготовленных квалифицированных специалистов-паразитологов, владеющих новыми методами лабораторной диагностики; недостаточным материально-техническим оснащением лабораторных центров. Кроме того, уровень российской нормативной базы, регламентирующей паразитологические показатели в объектах окружающей среды, опережает состояние соответствующей методической базы, что на практике приводит к применению малочувствительных, морально устаревших методов контроля.

Высокие технологические характеристики метода иммуномагнитной сепарации с последующим иммунофлуоресцентным мечением (ИМС-ИФМ) явились толчком для научного поиска возможных вариантов его применения при определении паразитарных патогенов в объектах окружающей среды.

Степень научной разработанности темы

Идентификация паразитарного патогена на современном этапе развития лабораторной медицины возможна с использованием микроскопических, иммунных, иммунохимических и высокотехнологических методов анализа, в т.ч. ПЦР и комплекса цифровой и сканирующей автоматизированной микроскопии (*Бейер Т.В., 2001, Чобанов Р. Э., 2001, Кузнецова К.Ю., 2004г, др.*). В настоящее время разработан ряд нормативно-методических документов, регламентирующие порядок проведения клинико-диагностических (МУК 4.2.3145-13 «Лабораторная диагностика гельминтозов и протозоозов») и санитарно-паразитологических исследований (МУК 4.2.2661-10 «Методы санитарно-паразитологических исследований»).

Однако при экспертной оценке отмечают значительное отставание применяемых лабораторных технологий при гигиенической оценке контаминации паразитарными патогенами объектов окружающей среды, отсутствие стандартизированных процедур пробоподготовки, соответствующих международным критериям по воспроизводимости, точности и параллелизма исследований. Все известные модификации унифицированных методов санитарно-паразитологических исследований улучшали эффективность методов, но не предлагали алгоритм стандартизации процедуры подготовки проб и количества подготовленных препаратов для исследований (*Туперцева Г. Т., 2008*).

Существует потребность в разработке новых подходов методического обеспечения санитарно-паразитологического анализа, такие как разработка и применение сорбентов с магнитными свойствами при выделении и идентификации различных микроорганизмов и их антигенов (*Романенко Н. А., 2008, Ройтман В. А., 2008, Сергиев В. П., 2010*).

Применение ускоренных методов лабораторных исследований, основанные на применении иммунных и иммунохимических анализов с высокой степенью

специфичности и целевой (диагностической) направленности, что подтверждено на методе ИМС при санитарно-паразитологическом анализе воды, могут способствовать технологическому прорыву в данной области.

Таким образом, возможность унификации методов паразитологических исследований разных объектов окружающей среды и биологического материала на основе метода ИМС позволит достигнуть методического единообразия при гигиенической оценке рисков возникновения и распространения паразитарных заболеваний среди населения.

В связи с вышеизложенным, **целью** настоящей работы явилось совершенствование методического обеспечения гигиенической оценки опасности контаминации цистами *L. intestinalis* и ооцистами *C. parvum* объектов окружающей среды (смывы с поверхностей, смывы с плодоовощной продукции, почва) и биологического материала (кала).

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

1. Определить информативность и достоверность федеральных статистических данных о санитарном состоянии объектов окружающей среды по паразитологическим показателям и о паразитарной заболеваемости населения Российской Федерации для оценки риска возникновения паразитарных заболеваний.

2. Разработать методы пробоподготовки образцов почвы, смывов с поверхностей и с плодоовощной продукции, биологического материала (кала) для внедрения метода ИМС-ИФМ в паразитологические исследования на наличие цист *L. intestinalis* и ооцист *C. parvum*.

3. Дать сравнительную оценку чувствительности метода ИМС-ИФМ и утвержденных методов санитарно-паразитологического анализа при выявлении цист *L. intestinalis* и ооцист *C. parvum* по ретроспективным данным лабораторного контроля и результатам собственных натурных исследований объектов различного природного происхождения.

4. Разработать практические рекомендации по применению метода ИМС-ИФМ для обеспечения методического единообразия в санитарных и клинических паразитологических исследованиях на наличие цист *L. intestinalis* и ооцист *C. parvum* с целью оптимизации и стандартизации лабораторного контроля за паразитарной заболеваемостью населения.

Научная новизна

Доказана низкая чувствительность утвержденных методов паразитологического анализа, используемых в клинической и санитарной практике, которые не позволяют адекватно оценить уровень загрязнения паразитарными патогенами объектов окружающей среды и биологического материала (кала).

Впервые установлено, что применение разработанных методик определения цист простейших с использованием метода ИМС-ИФМ позволит обнаруживать в объектах окружающей среды и клиническом материале 90-100% цист *L. intestinalis* и 70-100% ооцист *C. parvum* в отличие от методов, утвержденных в действующих нормативных документах, показатель выявляемости которых по определению цист лямблий составляет 55-95%, ооцисты криптоспоридий не обнаруживают.

Впервые разработаны методики обнаружения ооцист *C. parvum* методом ИМС-ИФМ.

Показана зависимость степени выявляемости цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum* от применяемого метода паразитологического анализа объектов окружающей среды и биологического материала на наличие цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum*.

Практическая значимость и внедрение результатов исследования

Метод ИМС-ИФМ позволит провести индикацию цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum* в пробах из объектов окружающей среды и в клиническом материале и определить единый этиотропный возбудитель в очагах острых кишечных инфекций (ОКИ) паразитарного генеза. Метод ИМС-ИФМ позволит вывести организацию контроля за распространенностью протозоозов на уровень мировых стандартов используемых лабораторных технологий по чувствительности, комплексности и интенсификации применяемых процедур, а также проводить эпидемиологические расследования очагов ОКИ единым методом, что существенно снизит финансовые затраты и сократит время для получения результата при определении источника загрязнения паразитарными патогенами и способствует эффективному социально-гигиеническому мониторингу за циркуляцией паразитарных патогенов в объектах окружающей среды.

Применение метода ИМС-ИФМ для определения цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum* в объектах окружающей среды и клиническом материале позволяет выполнять требования действующего СанПиНа 3.2.3215-14 «Профилактика паразитарных болезней на территории РФ».

Метод ИМС-ИФМ определения цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum* включен в методические указания МУК 4.2.3016-12 «Санитарно-паразитологические исследования плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции».

Поданы 4 заявки на патенты: «Способ пробоподготовки образцов почвы для определения цист лямблий и ооцист криптоспоридий» (№2016148897), «Способ пробоподготовки смывов с поверхностей для определения цист лямблий и ооцист криптоспоридий» (№2016148898), «Способ определения цист лямблий и ооцист криптоспоридий в клиническом материале, смывах с объектов окружающей среды, в овощах, в почве адаптированным методом иммуномагнитной сепарации с последующим иммунофлуоресцентным мечением» (№2016148899), «Способ пробоподготовки биологического материала кала для определения цист лямблий и ооцист криптоспоридий» (№2016148900).

Материалы диссертационной работы включены в программу циклов повышения квалификации в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (Справка о внедрении № 11-3ФЦ/2754 от 15.08.2017 г.), ФГБУ «ЦСП» Минздрава России (ранее ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» Минздрава России) (Справка о внедрении №18-5/705 от 28.12.2016 г.), НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского Первого МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Справка о внедрении №03.04-13/500 от 04.10.2017 г.), проводимых для специалистов санитарно-эпидемиологической службы (с 2009 г. по настоящее время).

Положения, выносимые на защиту:

1. Недостаточная информативность статистических данных о загрязнении объектов окружающей среды цистами *L.intestinalis* и ооцистами *S.parvum* и об

уровне паразитарной заболеваемости населения не позволяет проводить релевантную оценку риска возникновения паразитарных заболеваний.

2. Отсутствие единообразия в применяемых методах санитарно-паразитологического анализа проб из объектов окружающей среды и клинического материала приводит к получению ложноотрицательных данных о распространенности заболеваемости лямблиозом и криптоспориديозом, а также к отсутствию возможности получения достоверной информации о приоритетных источниках инвазий цистами *L.intestinalis* и ооцистами *C.parvum*.

3. Разработанные методы подготовки проб почвы, смывов с предметов и с плодоовощной продукции, биологического материала (кала) для внедрения метода ИМС-ИФМ в паразитологические исследования на наличие цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* позволяют достигнуть высокой чувствительности паразитологических исследований по сравнению с утвержденными методами.

4. Разработанные практические рекомендации по применению метода ИМС-ИФМ обеспечат индикацию цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* в клиническом материале и в пробах из объектов окружающей среды с высокой чувствительностью, что позволит определять этиотропный возбудитель в очагах острых кишечных инфекций паразитарного генеза, а также проводить количественную оценку риска возникновения паразитарных заболеваний.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на X съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (г. Москва, 12-13 апреля 2012 г.); X Международном симпозиуме «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения» (Ялта, 24 октября – 1 ноября, 2015 г.), Научном совете НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского (2016 г.); VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов с международным участием «Окружающая среда и здоровье. Гигиена и экология урбанизированных территорий», посвященной 85-летию ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» Минздрава России (г. Москва, 13-14 сентября 2016 г.), Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных и паразитарных заболеваний на юге России» (г. Ростов-на-Дону, 13-14 октября 2016 г.), Международном форуме Научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды, посвященном 85-летию ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» Минздрава России (г. Москва, 15-16 декабря 2016 г.).

Личный вклад автора в работе составляет более 80% и заключается в формулировании проблемы, постановке цели и задач работы, выборе методов исследования, выполнении аналитической и экспериментальной работы, обобщении и интерпретации полученных данных, подготовке научных публикаций.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 19 работ, из них 9 – в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 105 страницах компьютерной верстки и состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, 10 приложений. Диссертация иллюстрирована 28 таблицами, 5 рисунками. Библиография включает 215 источников (из них 146 отечественных, 69 – зарубежных работ).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для выполнения поставленных задач был использован комплекс гигиенических, паразитологических и статистических методов, которые обеспечивали реализацию и оценку экспериментальных и натуральных исследований. Образцы различного природного происхождения (пробы воды плавательных бассейнов, почвы, смывов с поверхностей и с плодовоовощной продукции, биологического материала (кала)) анализировали на наличие цист патогенных кишечных простейших. Основные направления работы и выполненный объем исследований представлены в таблицах 1 и 2.

Натурные исследования всех проб объектов различного природного происхождения проводили в параллельных сериях с применением метода ИМС-ИФМ и методов паразитологических исследований, рекомендуемых действующими нормативно-методическими документами (*МУК 4.2.3145-13; МУК 4.2.2661-10; МУК 4.2.3016-12*).

Чувствительность метода ИМС-ИФМ оценена при сравнении попарных данных ряда серий натуральных и экспериментальных сличительных исследований проб объектов окружающей среды и клинического материала утвержденными методами паразитологических исследований и их статистической обработкой.

Достоверность различий между результатами паразитологических исследований с применением методов количественного учета цист (ооцист), рекомендованного ВОЗ, приготовления постоянно окрашенных препаратов по Цилю-Нильсену и ИМС-ИФМ оценивали по критерию Манна-Уитни, при сравнении частот, а также с использованием метода ранговой корреляции по Спирмену (при $n < 30$). Значимыми считали различия при $p < 0,05$. Кроме того, учитывали критерий t-Стьюдента для множественных сравнений с поправкой Бонферрони ($p < 0,05$) при его трехкратном применении.

В экспериментальной работе использованы оборудование, материалы, реактивы, красители, регламентированные для проведения метода ИМС-ИФМ в соответствии с МУК 4.2.3016-12: диагностический набор реагентов иммунофлуоресцентного мечения Cript-a-Clo A400 BIOT (производитель Waterborne, INC., Нью Орлеан, Великобритания); контрольные образцы с содержанием взвеси антигенов мечения Cript-a-Clo A400 BIOT (производитель Waterborne, INC., Нью Орлеан, Великобритания); контрольные образцы с содержанием взвеси антигенов

Таблица 1 – Направления, объекты, показатели и объем исследований

Направления	Объекты	Показатели	Объем
1. Анализ федеральных статистических данных о санитарном состоянии объектов	Федеральная статистическая отчетность, литера-	Уровень заболеваемости населения лямблиозом и криптоспориозом; сани-	Формы федеральной статистической отчетности №2-15 – 10

окружающей среды в 2011-2015 гг. по паразитологическим показателям и о паразитарной заболеваемости населения РФ.	турные данные	тарное состояние объектов окружающей среды по показателям загрязненности возбудителями лямблиоза и криптоспориоза	ед. информации; Формы федерального статистического наблюдения №2 за 2011-2015 гг. – 35 ед. информации 45 ед. информации
2. Разработка методов пробоподготовки образцов почвы, смывов с поверхностей и с плодовоовощной продукции, биологического материала (кала) для исследования на наличие цист <i>L.intestinalis</i> и ооцист <i>S.parvum</i> методом ИМС-ИФМ.	Экспериментальные и натурные исследования	Параметры пробоподготовки: устойчивость цист <i>L.intestinalis</i> и ооцист <i>S.parvum</i> к механическим повреждениям (измельчение, центрифугирование); их сохранность без деградации в водных растворах; подбор диагностического набора для мечения; наладка технических параметров и совместимости насадки Опти-Люм и световых микроскопов разной марки.	Исследования: воды плавательных бассейнов – 32; почвы – 2240; смывов с поверхностей – 1640; смывов и почвенного осадка с плодовоовощной продукции – 2000; кала – 2240. Всего 8212 исследований 18304 ед. информации
3. Сравнительная оценка чувствительности метода ИМС-ИФМ и утвержденных санитарно-паразитологического анализа воды поверхностных водоемов при выявлении цист <i>L.intestinalis</i> и ооцист <i>S.parvum</i> по ретроспективным данным лабораторного контроля и результатам собственных исследований объектов различного природного происхождения.	Федеральные статистические данные по субъекту РФ – Башкортостану (2014). Результаты собственных исследований	Содержание цист <i>L.intestinalis</i> и ооцист <i>S.parvum</i> в воде: - питьевой; - поверхностных водных объектов; -плавательных бассейнов.	621 проба – 2580 исследований 5160 ед. информации
4. Сравнительная оценка чувствительности разработанной методики паразитологических исследований образцов различного природного происхождения в экспериментальных и натуральных исследованиях.	Пробы с искусственным заражением и без: - почвы; - смывов с поверхностей; - смывов с плодовоовощной продукции и их почвенного осадка; - кала.	Содержание цист <i>L.intestinalis</i> и ооцист <i>S.parvum</i> методами: эфир-формалинового осаждения; последовательной фильтрации через АТМ; Падченко; Романенко; приготовления постоянно окрашенных препаратов по Цилю-Нильсену; количественного учета цист (ооцист), рекомендованного ВОЗ, метод ИМС-ИФМ)	100 проб - 400 исследований = 800 ед. информации
Всего 24264 ед. информации			

L.intestinalis, *S.parvum* из 35 диагностических наборов А 100FLK Agua-Glo G/C Direct, FL (производитель Waterborne, INC., Нью Орлеан, Великобритания); 8 наборов с содержанием взвеси цист патогенных простейших (производитель Waterborne, INC., Нью Орлеан, Великобритания), из них 4 набора со взвесью цист

Таблица 2 – Количество исследованных проб различными методами

Объекты исследования	Методы исследований					Всего
	ИМС – ИФМ	МФ с АТМ	ЭФС	МП	МР	

Вода плавательных бассейнов	16	16	-	-	-	32
Кал	1120	-	1120	-	-	2240
Почва	1180	-	-	1060	-	2240
Смывы с поверхностей	320	-	-	-	1320	1640
Смывы с плодовоовощной продукции	500	-	-		500	1000
Почвенный осадок с плодово-овощной продукции	500	-	-	500	-	1000
Валидация	100	-	100	100	100	400
Итого	4736	16	1220	1660	1920	9552

лямблий (*L.intestinalis*) по 20 единиц патогена, 4 набора со взвесью ооцист криптоспоридий (*C.parvum*) по 20 единиц патогена.

Перед внесением цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* образцы проверялись на степень чистоты утвержденными методами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ статистических данных о санитарном состоянии объектов окружающей среды по паразитологическим показателям и паразитарной заболеваемости населения Российской Федерации

Анализ статистических данных показал, что в течение 2011-2015 гг. заболеваемость ОКИ установленной этиологии на 100 тыс. населения РФ сохранялась на высоком уровне: от 165,81 в 2011 г. до 167,65 в 2015 г. В их число входит и регистрируемая заболеваемость лямблиозом, которая не имеет выраженной тенденции к снижению (40,24 – в 2011 г. и 35,29 – в 2015 г.), а также заболеваемость криптоспоридиозом, регистрируемая в единичных случаях (от 0,01 в 2011 г. до 0,02 – в 2015 г.) (рис. 1).

Официальные статистические данные о заболеваемости ОКИ не в полной мере соотносятся с динамикой нестандартных проб различных видов вод, почвы, смывов, воды и пищевых продуктов по показателям, характеризующим их паразитарную безопасность (таблицы 3, 4).

Анализ паразитарного состояния различных видов вод в 2011-2015 гг. (таблица 3) показал, что в воде питьевого централизованного водоснабжения, в т.ч. горячего, цисты лямблий выделены в 0,07-0,1% проб, в воде поверхностных водных объектов – в 0,2-0,5%, в воде плавательных бассейнов – в 0,02-0,07%; ооцисты криптоспоридий определялись в 2014-2015 гг., что, по-видимому, свидетельствует о внедрении в паразитологических лабораториях ИЛЦ Роспотребнадзора метода ИМС согласно МУК 4.2.2314-08.

При значительном количестве нестандартных проб почвы, смывов и пищевой продукции в общем объеме исследований (таблица 4) доля проб с содержанием цист *L.intestinalis* невысокая и колеблется в пределах от 0,004-0,03% (в почве),

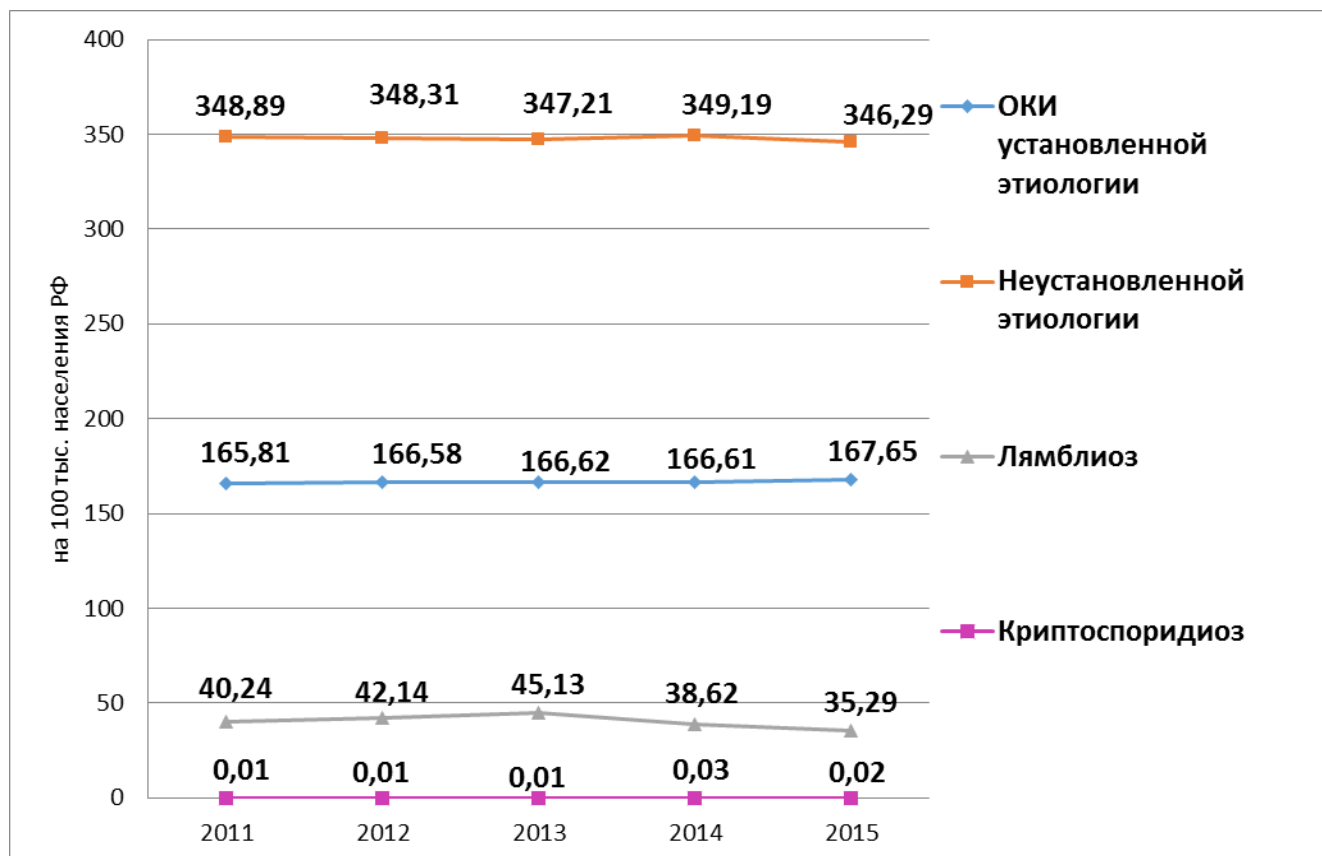


Рисунок 1 – Заболеваемость населения Российской Федерации острыми кишечными инфекциями, в том числе лямблиозом и криптоспоридиозом (2011-2015 гг.)

Таблица 3 – Паразитарное состояние различных видов вод в 2011-2015 гг. в Российской Федерации (число нестандартных проб)

Год	Вода питьевая централизованного водоснабжения, в т.ч. горячая		Вода поверхностных водных объектов		Вода плавательных бассейнов	
	Из них выявлено		Из них выявлено		Из них выявлено	
	Цисты <i>L.intestinalis</i> абс. (%)	Ооцисты <i>S.parvum</i> абс. (%)	Цисты <i>L.intestinalis</i> абс. (%)	Ооцисты <i>S.parvum</i> абс. (%)	Цисты <i>L.intestinalis</i> абс. (%)	Ооцисты <i>S.parvum</i> абс. (%)
2011	17 (0,07)	0	198 (0,4)	0	6 (0,02)	0
2012	33 (0,1)	0	231 (0,4)	0	17 (0,07)	0
2013	22 (0,09)	0	244 (0,5)	0	9 (0,03)	0
2014	14 (0,06)	0	175 (0,3)	13 (0,02)	7 (0,02)	0
2015	12 (0,05)	0	151 (0,2)	14 (0,02)	9 (0,02)	12 (0,03)

0,001-0,004% (смывы с предметов обихода), 0,004-0,001% (пищевые продукты), а ооцисты *S.parvum* определялись в единичных случаях (почва) или не определялись совсем.

Таким образом, данные федеральной статистики о состоянии объектов окружающей среды по показателям их загрязненности цистами *L.intesninalis* и ооцистами *S.parvum* нерепрезентативны для релевантного анализа паразитологиче-

Таблица 4 – Паразитарное состояние почвы, пищевых продуктов и предметов обихода в 2011-2015 гг. в Российской Федерации (число нестандартных проб)

Год	Почва		Смывы с поверхностей		Пищевые продукты	
	Из них выявлено		Из них выявлено		Из них выявлено	
	Цисты <i>L.intestinalis</i> абс. (%)	Ооцисты <i>S.parvum</i> абс. (%)	Цисты <i>L.intestinalis</i> абс. (%)	Ооцисты <i>S.parvum</i> абс. (%)	Цисты <i>L.intestinalis</i> абс. (%)	Ооцисты <i>S.parvum</i> абс. (%)
2011	13 (0,004)	2 (0,001)	38 (0,004)	0	4 (0,004)	0
2012	39 (0,004)	0	53 (0,004)	0	2 (0,004)	0
2013	51 (0,03)	2 (0,001)	40 (0,001)	0	12 (0,01)	0
2014	54 (0,01)	2 (0,001)	38 (0,004)	0	10 (0,01)	0
2015	34 (0,02)	0	94 (0,001)	0	12 (0,01)	0

ской ситуации из-за их несоответствия стабильно высокой заболеваемости лямблиозом населения, а также для оценки риска развития криптоспориоза на территории РФ.

Основной причиной такого несоответствия является отсутствие эффективных методов контроля паразитарной безопасности объектов окружающей среды и методов диагностики ОКИ, обусловленных цистами *L.intestinalis* и ооцистами *S.parvum*. Для их обнаружения как в клинических, так и санитарно-гигиенических исследованиях в настоящее время применяют малочувствительные, неспецифичные методики. Кроме того, лишь 10% отбираемых в ходе социально-гигиенического мониторинга проб объектов окружающей среды проверяют на содержание паразитарных агентов.

Таким образом, существует связь между регистрируемым уровнем паразитологической заболеваемости населения и низкой чувствительностью методов паразитологического анализа, используемых в клинической и санитарной лабораторной практике, а также недостаточной степенью их применения.

Разработка методов подготовки проб почвы, смывов с поверхностей и плодово-овощной продукции, биологического материала (кала) для внедрения метода ИМС-ИФМ по определению цист *L. intestinalis* и ооцист *S.parvum*

В России все используемые утвержденные методики паразитологического анализа состоят из следующих этапов: фильтрация проб; отмывка материала до и после центрифугирования; флотация; прокрашивание очищенного концентрата контрастирующими веществами, при использовании которых часто встречаются ложноположительные результаты; микроскопия. Ручная (неавтоматизированная) обработка, многоэтапность и нерациональная повторяемость однотипных операций при проведении процедуры санитарно-паразитологических исследований утвержденными методами приводит к значительной потере паразитарных патогенов на этапе их пробоподготовки.

Объекты различного природного происхождения имеют разные физико-химические и структурные особенности, поэтому для их подготовки к проведению анализа методом ИМС-ИФМ на наличие цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum* впервые разработаны и применены специальные методики. Оценка пригодности разработанных методов пробоподготовки по критериям воспроизводимости, точ-

ности и параллелизма подтверждена серией экспериментальных и натуральных исследований и статистической обработкой полученных результатов.

Разработка метода подготовки проб почвы. Утвержденный метод исследования проб почвы по Падченко основан на разности удельного веса воды и цист патогенных простейших. После 3-х кратных промывок и отстаиваний взвеси в 1 л воды собирают надосадочную жидкость, ее отстаивают в течение 24 ч и проводят анализ осадка (МУК 4.2.2661-10). Методика не регламентирует стандартное количество исследований из образующегося до 300 мл взвеси осадка и определяет один вид простейших – цисты *L.intestinalis*. Так как метод Падченко является единственным утвержденным методом, применяемым для определения загрязненности почвы цистами кишечных простейших, то в нашей работе он был выбран для сравнительной оценки чувствительности и специфичности с адаптированным методом ИМС-ИФМ.

Для проведения исследований проб почвы методом ИМС-ИФМ разработана специальная методика пробоподготовки (рис.2), которая позволяет проводить весь ход исследования в день их поступления в лабораторию без многократной промывки и длительной (суточной) экспозиции диагностической взвеси почвы, что значительно сокращает время пробоподготовки и устраняет возможные потери паразитарных патогенов.

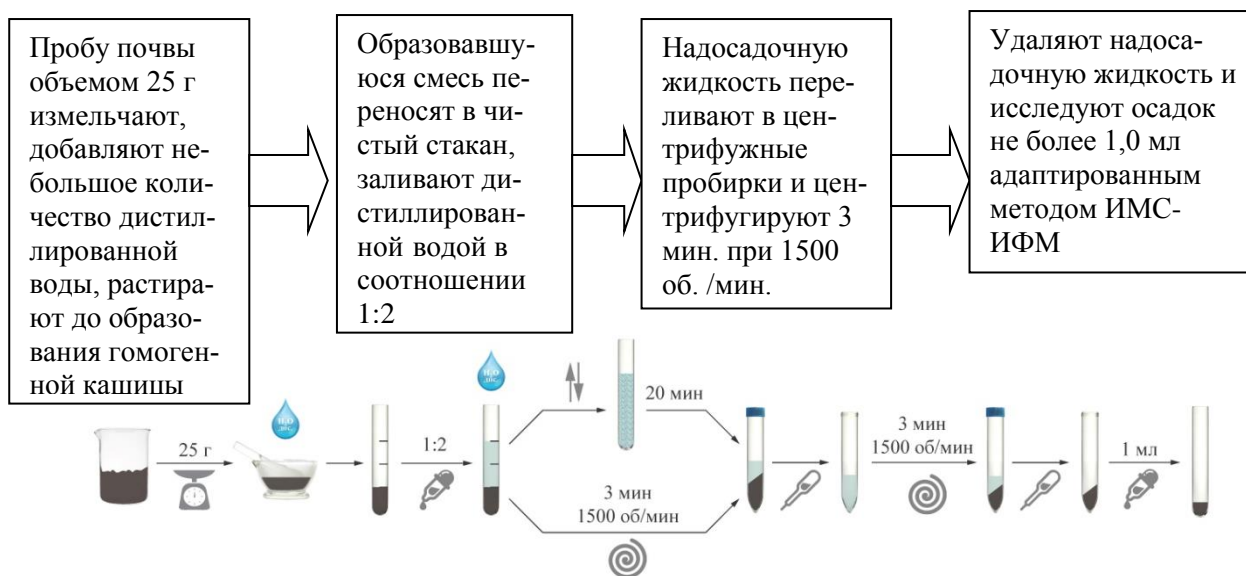


Рисунок 2 – Схематичное изображение пробоподготовки почвы к методу ИМС-ИФМ

Разработка метода подготовки проб смывов с поверхностей и плодоовощной продукции. Утвержденный метод исследования проб смывов с поверхностей и плодоовощной продукции по Романенко (МУК 4.2.2661-10) основан на получении осадка из надосадочной жидкости с последующим отстаиванием водной суспензии объемом 1 л. Метод достаточно трудоемкий, и суммарно весь ход исследования составляет свыше 24 часов. В методике не регламентировано количество исследований из одной пробы, что не обеспечивает эффективный поиск патогенов, снижает достоверность результатов, а главное – не позволяет адекватно сравнивать результаты разных исследований. Методика определяет один вид простейших – цисты *L.intestinalis*.

Принцип разработанной методики пробоподготовки смывов для исследова-

ния методом ИМС-ИФМ основан на проведении одноступенчатого хода исследования без ресуспендирования в больших объемах воды натуральных проб с сохранением в полученном осадке паразитарных патогенов и с последующей их меткой иммунофлуоресцирующей краской и идентификацией (рис. 3).

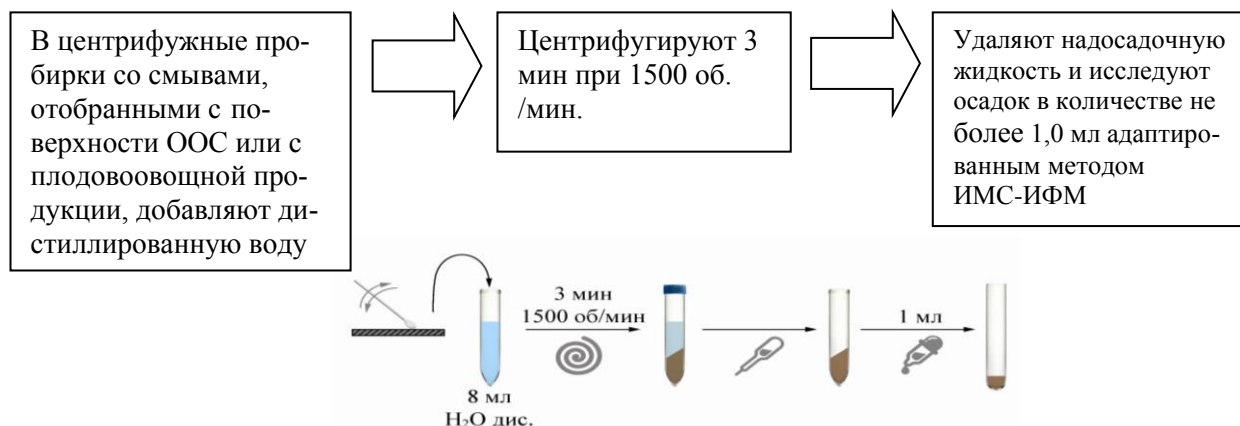


Рисунок 3 – Схематичное изображение способа пробоподготовки смывов с поверхностей методом ИМС-ИФМ

Разработка метода подготовки проб кала. Утвержденный метод эфир-формалиновой седиментации (ЭФС) для проведения паразитологического анализа кала основан на разности удельного веса используемых химических реактивов (10% раствора формалина) и яиц гельминтов, которые концентрируются в осадке и дополнительно обезжириваются эфиром. Методика является унифицированной для обнаружения яиц и личинок гельминтов и цист *L.intestinalis*. Ооцисты *S.parvum* не обнаруживает.

Разработанная методика пробоподготовки кала для анализа методом ИМС-ИФМ (рис. 4) основана на промывке пробы физиологическим раствором или дистиллированной водой с последующей фильтрацией взвеси через марлю.

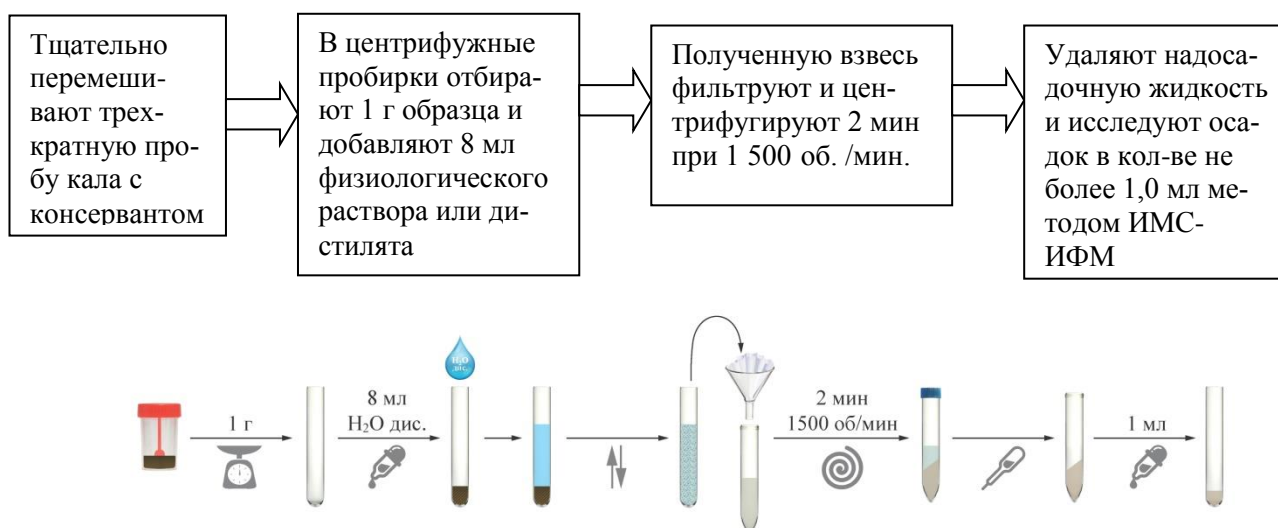


Рисунок 4 – Схематичное изображение способа пробоподготовки кала к методу ИМС-ИФМ

Методика позволяет значительно сократить время пробоподготовки до 5 мин, заменяет высокотоксичные реактивы на водные суспензии без потери патогенов и улучшает гигиенические условия труда персонала.

Таким образом, разработка специальных методов пробоподготовки объектов различного природного происхождения (почвы, смывов с поверхностей и с плодовоовощной продукции, биологического материала) с учетом особенностей их физико-химических и структурных различий позволила адаптировать метод ИМС-ИФМ для обнаружения в окружающей среде и биологическом материале цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum*, а также сократить время на проведение исследований, снизить количество подготовительных процедур, стандартизировать этапы и количество исследований из одной пробы.

Сравнительная оценка чувствительности и специфичности метода ИМС-ИФМ и утвержденных методов санитарно-паразитологического анализа для определения цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* в серии натуральных исследований

Вода. Проведены натурные исследования 16 проб воды плавательных бассейнов. Полученный после фильтрования каждой пробы концентрат разделяли на равные части для исследования двумя методами: методом последовательной фильтрации через АТМ (МУК 4.2.1884-04) и методом ИМС-ИФМ (МУК 4.2.2314-08). Как видно из таблицы 5, первым методом цисты *L.intestinalis* и ооцисты *C.parvum* не обнаружены. При постановке метода ИМС-ИФМ в трех пробах обнаружены цисты *L.intestinalis* (18,7%), в четырех – ооцисты *C.parvum* (25%), что свидетельствуют о более высокой чувствительности нового метода при выявлении цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum*.

Таблица 5 – Сравнительная оценка результатов исследования воды плавательных бассейнов на наличие цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* с применением двух методов

Общее число проб / исследований	Метод последовательной фильтрации через АТМ		Метод ИМС-ИФА			
	<i>L.intestinalis</i>	<i>C.parvum</i>	<i>L.intestinalis</i> (M+m)	% проб	<i>C.parvum</i> (M+m)	% проб
16/32	0	0	2,7±0,3	18,7	4,6 ±0,4	25

Аналогичные результаты были получены в исследованиях С.Н. Власовой, В.Н. Закатова, В.Е. Ларина (2013) при исследовании 300 проб воды поверхностных водных объектов Московской области. Так, методом ИМС-ИФМ ооцисты *C.parvum* обнаружены в 8 пробах (2,7%), цисты *L.intestinalis* – в 12 пробах (4%), тогда как утвержденные методы свидетельствовали об отсутствии цист патогенных кишечных простейших.

В результате анализа данных, полученных санитарно-паразитологической лабораторией ФБУЗ «ФЦГиЭ» Республики Башкортостан, где в 2014 г. для анализа воды плавательных бассейнов, поверхностных водных объектов и питьевой воды применяли параллельно методы ИМС-ИФМ и последовательной фильтрации, установлено, что выявляемость цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* значительно выше при использовании метода ИМС-ИМФ. Так, в 5 из 347 проб воды плавательных бассейнов методом ИМС-ИМФ обнаружены цисты *L.intestinalis* (1,44%), в 7 пробах – ооцисты *C.parvum* (2%); в 12 из 224 проб воды открытых водных объектов обнаружены цисты *L.intestinalis* (5,4%), в 10 пробах – ооцисты *C.parvum* (4,47%); в 2 из 50 проб питьевой воды обнаружены ооцисты *C.parvum* (4%). В то же время классическим методом ни в одной пробе не выявлены цисты

L.intestinalis и ооцисты *C.parvum*.

Почва. Всего проведено 27 исследований проб почвы, отобранных на детских игровых площадках, в параллельных постановках двумя методами. Методом Падченко цисты *L.intestinalis* обнаружены в 23,5% проб, ооцисты *C.parvum* не обнаружены, тогда как методом ИМС-ИФМ – в 60% и 30% проб, соответственно (таблица 6).

Таблица 6 – Сравнительная оценка результатов исследования проб почвы на наличие цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* с применением двух методов

Метод исследования	Общее количество исследований	% нестандартных проб	Число обнаруженных цист патогенных кишечных простейших
Метод Падченко	17	<i>L.intestinalis</i> – 23,5 <i>C.parvum</i> – 0	<i>L.intestinalis</i> – 4 <i>C.parvum</i> – 0
Метод ИМС-ИМФ	10	<i>L.intestinalis</i> – 60 <i>C.parvum</i> – 30	<i>L.intestinalis</i> – 6 <i>C.parvum</i> – 3

Смывы с поверхностей объектов окружающей среды исследовали утвержденным методом по Романенко и методом ИМС-ИФМ, всего проведено 160 исследований. Методом Романенко цисты *L.intestinalis* обнаружены в 7,5% проб, ооцисты *C.parvum* не обнаружены. Методом ИМС-ИФМ цисты *L.intestinalis* и ооцисты *C.parvum* обнаружены в 27,5% и 15% проб, соответственно (таблица 7).

Таблица 7 - Сравнительная оценка результатов исследования смывов с поверхностей на наличие цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* с применением двух методов

Метод исследования	Общее количество исследований	% нестандартных проб	Число обнаруженных цист патогенных кишечных простейших
Метод Романенко	120	<i>L.intestinalis</i> – 7,5 <i>C.parvum</i> – 0	<i>L.intestinalis</i> – 9 <i>C.parvum</i> – 0
метод ИМС-ИМФ	40	<i>L.intestinalis</i> – 27,5 <i>C.parvum</i> – 15	<i>L.intestinalis</i> – 11 <i>C.parvum</i> – 6

Биологический материал (кал). Пробы кала поступали из лечебно-профилактических учреждений г. Москвы и от населения. Всего было исследовано 1000 проб методом ЭФС и адаптированным методом ИМС-ИФМ (таблица 8). Методом ЭФС обнаружены цисты *L.intestinalis* в 3,3% проб, ооцисты *C.parvum* не обнаружены. Методом ИМС-ИФМ обнаружены цисты *L.intestinalis* в 84% проб, ооцисты *C.parvum* – в 27% проб.

Таблица 8 – Сравнительная оценка результатов исследования проб кала на наличие цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* с применением двух методов

Показатель	Всего исследований/ в т.ч. дети	Число нестандартных проб, абс. (%)			
		всего		в т.ч. дети	
		ЭФС	ИМС-ИФМ	ЭФС	ИМС-ИФМ
<i>L.intestinalis</i>	1000/454	33 (3,3)	103 (84)	22 (4,6)	88 (79,9)
<i>C.parvum</i>		0	29 (27)	0	21 (20)

В эпидемиологическом аспекте важно отметить степень выявляемости в группе наиболее социально значимых контингентов – детей. Методом ЭФС обнаружены цисты *L.intestinalis* лишь в 4,6% проб, ооцисты *C.parvum* не обнаружены, тогда как методом ИМС-ИФМ обнаружены цисты *L.intestinalis* в 79,9% проб, ооцисты *C.parvum* – в 20% проб кала детей с ОКИ.

Таким образом, сравнительный анализ данных литературы, статистической отчетности и результатов натуральных исследований воды, почвы, смывов с поверхностей и биологического материала (кала) показал, что метод ИМС-ИФА обладает большей чувствительностью и специфичностью для целевого определения цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* и может являться референтным для применения в практической работе паразитологических лабораторий.

Сравнительная оценка чувствительности и специфичности метода ИМС-ИФМ и альтернативных методов исследования

В работе сравнивали чувствительность и специфичности методов ИМС-ИФМ и альтернативных методов определения простейших: приготовления постоянно окрашенных препаратов по Цилю-Нильсену, а также количественного учета цист и ооцист, рекомендованного ВОЗ (1991).

Проведены попарные сравнения результатов обнаружения цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* в 5 сериях натуральных исследований смывов с поверхностей, с плодоовощной продукцией, их почвенного осадка, почвы и кала (таблица 9). В каждой серии исследовали по 20 проб.

Таблица 9 – Результаты попарного сравнения методов ВОЗ – ИМС-ИФА и методов Цилю-Нильсена – ИМС-ИФА определения цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* в натуральных исследованиях проб различного природного происхождения (n=20).

Показатели	Количество обнаруженных цист (M±m), ед.		
	ВОЗ	Цилю-Нильсон	ИМС-ИФА
Смывы с поверхностями			
<i>L. intestinalis</i>	15,3±0,31	14,1±0,72	17,6±0,51
<i>C. parvum</i>	14,6±0,6	13,2±0,41	16,5±0,76
Смывы с плодоовощной продукцией			
<i>L. intestinalis</i>	14,6±0,5	4,0±0,8	16,45±0,5
<i>C. parvum</i>	13±0	3,6±0,5	13,6±0,5
Почвенный осадок смывов с плодоовощной продукцией			
<i>L. intestinalis</i>	3,6±0,5	2,6±1,2	4,8±0,5
<i>C. parvum</i>	2,4±0,4	0±0	3,8±0,5
Почва			
<i>L. intestinalis</i>	6,8±0,4	6±0,6	12,1±0,4
<i>C. parvum</i>	4,2±0,7	0±0	8,7±0,7
Биологический материал (кал)			
<i>L. intestinalis</i>	2,9±0,64	2,1±0,64	4,3±0,73
<i>C. parvum</i>	3,1±0,22	0±0	5,1±1,02

С применением различных статистических методов показана высокая достоверность различий результатов, полученных методом ИМС-ИФМ и двумя другими методами. В частности, о статистической значимости различий результатов сравниваемых методов свидетельствуют значения t-критерия Стьюдента для множественных сравнений с поправкой Бонферрони при его трехкратном применении (от 2,05 до 8,25 при $p < 0,05$ ($0,0001 \leq p \leq 0,05$)).

При определении достоверности различий чувствительности методов определения *L.intestinalis* в почве и почвенном осадке установлено, что метод ИМС-ИФА позволяет получать более точные результаты о содержании паразитарного патогена в исследуемом объекте, чем метод окраски по Цилю-Нильсону, в то время как метод ВОЗ, разработанный для исследования почвы на наличие паразитарных патогенов, имеет меньшие различия с методом ИМС-ИФА.

В отношении *S.parvum* метод ИМС-ИФА имеет значительное достоверное преимущество перед методом Циля-Нильсона и незначительное преимущество метода ИМС-ИФА перед методом ВОЗ. Методы ВОЗ и ИМС-ИФМ близки по степени своей чувствительности и специфичности в отношении ооцист *S.parvum* и являются «методами выбора» при проведении санитарно-паразитологических исследований.

Таким образом, статистически подтверждена высокая специфичность и чувствительность метода ИМС-ИФМ по сравнению с методами паразитологического анализа, рекомендуемого ВОЗ, и по Цилю-Нильсону в отношении цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum* в объектах окружающей среды и биологическом материале, что позволит применять адаптированный метод ИМС-ИФМ в очагах ОКИ для установления причинно-следственных связей заболеваемости с показателями загрязненности окружающей среды.

Сравнительная оценка адаптированного метода ИМС-ИФМ в экспериментальных исследованиях

С целью сравнительной оценки валидности и информативности нового метода по сравнению с утвержденными методами проведены попарные сравнения результатов 5 серий экспериментальных сличительных исследований объектов различного природного происхождения и биологического материала (кала) с искусственным заражением натуральных образцов, ранее проверенных на отсутствие паразитарных патогенов. Использовали метод ИМС-ИФМ и утвержденные методы паразитологического анализа по Падченко, по Романенко, ЭФС. В каждую пробу вносили по 20 ед. цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum*. Результаты исследований представлены в таблице 10.

Степень выявляемости цист *L.intestinalis* утвержденными методами паразитологического анализа в почве, смывах с поверхностей и с плодоовощной продукции, а также в почвенном осадке смывов с плодоовощной продукции составила лишь 25-60%. В кале метод ЭФС позволил обнаружить 19 из 20 внесенных цист. Однако ни одним из методов ооцисты *S.parvum* не выделены.

В отличие от утвержденных методов ИМС-ИФМ позволил выявить в 90-100% исследований цисты *L.intestinalis* и в 70-100% – ооцисты *S.parvum*. Относительно низкие показатели выявляемости цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum* объясняется частичным их удерживанием в почве и почвенных осадках смывов.

Таблица 10 – Результаты сравнительной оценки степени выявляемости цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum* утвержденными методами и методом ИМС-ИФМ в серии экспериментальных исследований проб с искусственным заражением

Метод	Количество исследований	<i>L.intestinalis</i>		<i>S.parvum</i>	
		М _± m	% проб	М _± m	% проб
Почва					
Падченко	900	11 _± 0,7	55	0	0
ИМС-ИФМ		18 _± 0,6	90	14 _± 0,4	70
Смывы с поверхностей					
Романенко	1200	12 _± 1,7	60	0	0
ИМС-ИФМ		20	100	14 _± 0,4	70
Смывы с плодоовощной продукции					
Романенко	100	12 _± 0,9	60	0	0
ИМС-ИФМ		20	100	20	100
Почвенный осадок смывов с плодоовощной продукции					
Фильтрации через АТМ	100	5 _± 1,2	25	0	0
ИМС-ИФМ		18 _± 0,7	90	17 _± 0,6	85
Биологический материал (кал)					
ЭФС	30	19 _± 0,1	95	0	0
ИМС-ИФМ		20	100	20	100

Однако, учитывая относительно низкую инфицирующую дозу цист простейших – от 1 до 10 ед. (*Chappell C.L, 2006*), вызывающую ОКИ, эпидемиологическая значимость метода ИМС-ИФМ определяется возможностью комплексного выявления цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum* в одной пробе различного природного происхождения.

Таким образом, в ряде серий экспериментальных исследований с искусственным заражением проб естественного происхождения доказано преимущество метода ИМС-ИФМ как метода комплексной оценки наличия цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum* в объектах окружающей среды по сравнению с утвержденными методами паразитологических исследований.

Разработка практических рекомендаций по применению метода ИМС-ИФМ

С целью оптимизации и стандартизации методов лабораторного контроля за паразитарной заболеваемостью населения и создания методического единообразия санитарных и клинических паразитологических исследований на наличие цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum*, разработаны практические рекомендации по применению метода ИМС-ИФМ.

Сравнительная оценка утвержденных (*МУК 4.2.2661-10, МУК 4.2.3145-13*) и предлагаемого методов паразитологических исследований объектов окружающей среды и биологического материала (кал) показала (таблица 11), что метод ИМС-ИФМ позволяет:

- определять возбудителей разных таксономических групп в одной пробе;
- снизить время пробоподготовки (например, проб смывов с поверхностей с 12-16 ч до 15 минут, почвы – с 3 суток до 35 минут);

Таблица 11 – Сравнительная оценка технологических параметров утвержденных методов и метода ИМС-ИФМ

Методы	Смывы с поверхностей	Почва	Биологический материал (кал)			
Время пробоподготовки						
Утвержденные	12-16 ч	до 3 суток	15 мин			
ИМС-ИФМ	15 мин	35 мин	10 мин			
Число подготовительных и стандартизированных процедур						
Утвержденные	5	7	5			
ИМС-ИФМ	4	3	4			
Применяемые химические реактивы						
Утвержденные	Глицерин, тиосульфат натрия, 1% р-р Люголя	Формалин, 1% р-р Люголя	Диэтиловый эфир, формалин, 1% р-р Люголя			
ИМС-ИФМ	Диагностикум 100FLK Agua-Glo G/C Direct					
Учет результатов исследований						
Утвержденные	качественный	качественный	полуколичественный число «+»			
ИМС-ИФМ	количественный					
Чувствительность методов						
	<i>L. intestinalis</i>	<i>S. parvum</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>S. parvum</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>S. parvum</i>
Утвержденные	60%	0%	55%	0%	95%	0%
ИМС-ИФМ	100%	100%	90%	70%	100%	100%

– уменьшить число подготовительных и стандартизированных процедур (например, для почвы – с 7 до 3);

– исключить применение высокотоксичных химических реактивов (вместо формалина и диэтилового эфира применяется принципиально отличный от них класс диагностикумов, основанный на использовании моноклональных антител), что позволяет улучшить качество определения паразитологических параметров и гигиенические условия труда;

– проводить количественную оценку полученных результатов исследования с возможностью их последующей проверки и подтверждения;

– увеличить выявляемость цист *L.intestinalis* с 55-95% до 90-100% (в зависимости от исследуемого объекта), а ооцист *S.parvum* – с 0% до 70% в почве и до 100% в остальных объектах.

Внедрение в практику санитарно-паразитологических исследований разработанных методических приемов позволит вывести на уровень мировых стандартов технологии паразитологических исследований, обеспечить их высокую специфичность и чувствительность, оперативность выполнения исследований в день доставки образцов в лабораторию, а также своевременно принимать управленческие решения, направленные на оценку и снижение риска для здоровья населения.

Экономическая выгода при применении метода ИМС-ИФМ для проведения одного анализа составляет от 623,14 до 1311,35 рублей в зависимости от вида исследуемого объекта. При массовых обследованиях населения и объектов окружающей среды рентабельность метода ИМС-ИФМ за счет оптимизации использования расходных материалов.

Полученные результаты исследований позволили разработать следующие **рекомендации для специалистов** паразитологических лабораторий испытательных лабораторных центров:

– при проведении плановых лабораторных исследований в рамках социально-гигиенического мониторинга, внеплановых мероприятий (по обращению граждан и по эпидемиологическим показаниям) необходимо применять метод ИМС-ИФМ для обнаружения цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* в различных видах вод, почве смывах, с поверхностей и плодовоовощной продукции с целью комплексной оценки санитарно-паразитологического состояния объектов на территориях надзора;

– при проведении санитарно-эпидемиологических обследований очагов ОКИ рекомендуется проводить единовременный отбор объектов окружающей среды различного природного происхождения (воды, почвы, смывов с поверхностей и с плодовоовощной продукции), биологического материала от больных (кала) для паразитологических исследований методом ИМС-ИФМ с целью установления единого этиотропного фактора и причинно-следственных связей между загрязненностью объектов окружающей среды цистами *L.intestinalis* и ооцистами *C.parvum* и заболеваемостью населения;

– результаты количественного учета загрязненности объектов окружающей среды цистами *L.intestinalis* и ооцистами *C.parvum* с применением метода ИМС-ИФМ рекомендуется использовать для оценки риска возникновения лямблиоза и криптоспоридиоза среди населения.

ВЫВОДЫ

1. Официальные данные статистической отчетности о заражении объектов окружающей среды субъектов РФ цистами *L.intestinalis* и ооцистами *C.parvum* не соответствуют регистрируемому уровню паразитологической заболеваемости населения и не позволяют проводить релевантную оценку риска возникновения паразитарных заболеваний.

2. Разработанные методики пробоподготовки позволяют проводить паразитологические исследования содержания цист *L.intestinalis* и ооцист *C.parvum* в объектах окружающей среды (почва, смывы с поверхностей и с плодовоовощной продукции) и биологическом материале (кал) специфичным методом ИМС-ИФМ, учитывающим особенности физико-химических и структурных различий исследуемых образцов.

3. Метод ИМС-ИФМ, предусматривающий использование дифференцированных методик пробоподготовки, позволяет одновременно обнаруживать комплекс паразитарных возбудителей в исследуемых образцах объектов окружающей среды и биологического материала с высокой степенью выявляемости: для цист *L.intestinalis* – 90-100%, ооцист *C.parvum* – 100% при точности утвержденных методов 55-85% и 0%, соответственно, что свидетельствует о высокой чувствительности разработанных методических подходов.

4. Преимуществами усовершенствованного метода ИМС-ИФМ по сравнению с утвержденными является не только возможность определять возбудителей

разных таксономических групп в одной пробе, но и снижение времени пробоподготовки (например, проб смывов с поверхностей – с 12-16 ч до 15 минут, почвы – с 3 суток до 35 минут); уменьшение числа подготовительных и стандартизированных процедур (например, для почвы – с 7 до 3) и возможность проведения исследования в день доставки проб в лабораторию; исключение применения высокотоксичных химических реактивов; улучшение качества определения паразитологических параметров и гигиенических условий труда. Экономическая выгода при применении метода ИМС-ИФМ для проведения одного анализа составляет от 623,14 до 1311,35 рублей в зависимости от вида исследуемого объекта.

5. Разработанные практические рекомендации по применению метода ИМС-ИФМ направлены на оптимизацию мониторинга за циркулирующей цист *L.intestinalis* и ооцист *S.parvum* в окружающей среде и организме человека, а также позволяют стандартизировать методы лабораторного контроля с целью количественного учета загрязненности объектов окружающей паразитарными патогенами для оценки риска возникновения лямблиоза и криптоспоридиоза среди населения.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Опубликованные в журналах, рекомендуемых ВАК:

1. **Асланова М.М., Черникова Е.А.** Эпидемиологический мониторинг за паразитами. // **Здоровье населения и среда обитания.** – 2013. - № 7(244). – С.22-24.

2. **Асланова М.М., Сыскова Т.Г., Черникова Е.А.** Паразитологический мониторинг как составная часть эпидемиологического надзора за гельминтозами в Российской Федерации. // **Медицинская паразитология и паразитарные болезни.** – 2014. - № 1. – С.13-16.

3. **Асланова М.М., Зароченцев М.В., Черникова Е.А.** Опыт участия паразитологических лабораторий в межлабораторных сравнительных испытаниях. // **Здоровье населения и среда обитания.** – 2014. - № 7(256). – С.52-54.

4. **Асланова М.М.** Сравнительный анализ методов лабораторной диагностики криптоспоридиоза. // **Здоровье населения и среда обитания.** – 2015. - №7 (268). – С.49-50.

5. **Асланова М.М., Кузнецова К.Ю., Е.Н. Морозов Е.Н.** Эффективная лабораторная диагностика – основа мониторинга паразитарных болезней. // **Здоровье населения и среда обитания.** – 2016. - №1(274). – С.34-37.

6. **Кузнецова К.Ю., Асланова М.М., Шихбабаева Ф.М.** Система цифровой микроскопии – информационный источник мониторинга за биогельминтозами на территории Российской Федерации. // **Здоровье населения и среда обитания.** – 2016. - №5 (278). – С.51-53.

7. **Кузнецова К.Ю., Жнакина Ж.Ж., Кузнецова М.А., Асланова М.М., Грицюк О.В., Загайнова А.В., Сергиев В.П., Рахманин Ю.А.** Актуализация правоприменительной практики в области обеспечения паразитарной безопасности объектов окружающей среды. Правовые и методические коллизии: пути их решения// **Медицинская паразитология и паразитарные болезни.** - 2017. - №2. – С.14-16.

8. **Рахманин Ю.А., Иванова Л.В., Артемова Т.З., Гипп Е.К., Загайнова А.В., Максимкина Т.Н., Красняк А.В., Шустова С.А., Кузнецова К.Ю., Асланова М.М.,**

Малышева А.Г., Абрамов Е.Г., Водянова М.А., Каменецкая Д.Б., Алешня В.В. Значение санитарно-микробиологических показателей при оценке эпидемической безопасности водопользования в условиях химического загрязнения водоемов. // **Гигиена и санитария.** – 2016. – Т. 95. - № 10. – С. 934-938.

9. Кузнецова К.Ю., **Асланова М.М.** О достаточности и информативности существующих критериев оценки биологической безопасности воды водоисточников по паразитологическим показателям. // **Здоровье населения и среда обитания.** - 2016. - № 12(285). – С. 52-56.

В других изданиях:

10. Медовый В.С., Панов С.А., Кузнецова К.Ю., **Асланова М.М.**, Шихбабаева Ф.М. Технологии цифровой и сканирующей микроскопии для анализов паразитологической экспертизы. // **Медицина и высокие технологии.** – 2016. - №1. – С.71-76.

11. **Асланова М.М.**, Кузнецова К.Ю. Актуальность применения метода иммуномагнитного разделения и мечения флюоресцирующими антителами (IMS) при паразитологическом исследовании воды. // **Материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием. «Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных и паразитарных заболеваний на юге России»**, г. Ростов-на-Дону, 13-14 октября 2016 г. – Ростов-на-Дону, 2016. – С.32-35.

12. Кузнецова К.Ю., **Асланова М.М.** Эффективность санитарно-паразитологического исследования почвы и научно обоснованные предложения по модификации метода исследования. // **Материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных и паразитарных заболеваний на юге России»**. г. Ростов-на-Дону, 13-14 октября 2016 г. – Ростов-на-Дону, 2016. – С.108-112.

13. **Асланова М.М.**, Кузнецова К.Ю., Морозов Е.Н. Эффективность диагностической тест-системы CRYPT-a-Glo A 400 ВІОТ при диагностике криптоспориоза. // **Материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием. «Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных и паразитарных заболеваний на юге России»**. г. Ростов-на-Дону, 13-14 октября 2016 г. – Ростов-на-Дону, 2016. – С.179-181.

14. Иванова Л.В., Гипп Е.К, Артемова Т.З., Кузнецова К.Ю., **Асланова М.М.**, Максимкина Т.Н., Красняк А.В., Шустова С.А. Актуальность раннего предупреждения микробного загрязнения питьевой воды. // **Сборник материалов тезисов X Международного симпозиума 24 октября – 1 ноября 2015 г. «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения»** под ред. Ю.А. Рахманина. – Ялта, 2015. – С. 62-67.

15. **Асланова М.М.**, Сеницына О.О., Кузнецова К.Ю., Загайнова А.В. Актуальность внедрения эффективных методов обнаружения возбудителей паразитарных патогенов в окружающей среде и водных объектах. // **Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Гигиена и экология урбанизированных территорий»**, посвященной 85-летию ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» Минздрава России, г.Москва, 13-14 сентября 2016 г. – М., 2016. –

С.33-38.

16. **Асланова М.М.**, Жнакина Ж.В., Мания Т.Р., Кузнецова К.Ю. Об информативности метода санитарно-паразитологических исследований почвы и способах его модификации. // Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Гигиена и экология урбанизированных территорий», посвященной 85-летию ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» Минздрава России, г. Москва, 13-14 сентября 2016 г. – М., 2016. – С.38-44.

17. Красняк А.В., Чернышева Л.М., **Асланова М.М.**, Водянова М.А., Иванова Л.В., Артемова Т.З., Гипп Е.К., Загайнова А.В., Максимкина Т.Н., Шустова С.А., Кузнецова К.Ю., Малышева А.Г., Абрамов Е.Г., Каменецкая Д.Б. Значение санитарно-микробиологических показателей при оценке эпидемической безопасности водопользования в условиях химического загрязнения водоемов. // Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Гигиена и экология урбанизированных территорий», посвященной 85-летию ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» Минздрава России, г. Москва, 13-14 сентября 2016 г. – М., 2016. – С.270-275.

18. **Асланова М.М.**, Кузнецова К.Ю., Синицына О.О. Эпидемиологические и экологические предпосылки развития паразитарных и инфекционных болезней в современных условиях развития мирового сообщества. // Материалы Международного форума Научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды, посвященного 85-летию ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» Минздрава России «Современные методологические проблемы изучения, оценки и регламентирования факторов окружающей среды, влияющих на здоровье человека», г. Москва, 15-16 декабря 2016 г. – М., 2016. – Том 1. – С.60-63.

19. Методические указания МУК 4.2.3016-12 «Санитарно-паразитологические исследования плодоовощной, плодово-ягодной и растительной продукции» (Утверждены и введены в действие руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г.Г.Онищенко 12 мая 2012 года).

Список сокращений

АТМ – аналитические трековые мембраны

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ИМС-ИФМ – иммуномагнитная сепарация с последующим иммунофлюоресцирующим мечением

МП – метод Падченко

МР – метод Романенко

МУК – методические указания

МФ с АТМ – метод микрофльтрации через аналитические трековые мембраны

ОКИ – острые кишечные инфекции

СанПиН – Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы

ЭФС – метод эфир-формалиновой седиментации

СГМ – социально-гигиенический мониторинг