*А.В. Кондрашин¹, Е.В. Степанова¹, М.С. Максимова¹, Н.А. Турбабина¹,
Л.Ф. Морозова¹, Е.Н. Морозов^{1,2}*
(*A.V. Kondrashin, E.V. Stepanova, M.S. Maksimova, N.A. Turbabina,
L.F. Morozova, E.N. Morozov*)

ДИАГНОСТИКА РАННИХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ЛИЧИНОЧНЫХ/ТКАНЕВЫХ ГЕЛЬМИНТОЗОВ DIAGNOSIS OF EARLY STAGE OF LARVAL/TISSUE HELMINTHIASES

ИФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский университет)

2 ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»
Минздрава России, Москва

1 Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical
University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)

2 Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow

Паразитозы в целом и гельминтозы (эхинококкозы и др.) в частности представляют серьёзную угрозу здоровью населения как в развивающихся, так и в индустриальных странах мира. Залогом успешной профилактики и борьбы с гельминтозами является постановка быстрого и надёжного диагноза заболевания. Эффективность диагноза зависит от чувствительности, специфичности и надёжности используемого метода. Наиболее широко используемым методом диагностики гельминтозов продолжает оставаться копрологическое исследование кала больного для обнаружения яиц гельминтов. Также широко используются серологические методы диагностики гельминтозов. В последнее время участилось использование методов основанных на амплификации ДНК (ПЦР и её модификации) обладающих высокой чувствительностью, надёжностью и специфичностью особенно в сочетании с молекулярно-генетическими маркерами. Эти методы могут использоваться для количественного определения интенсивности инвазии, а также для обнаружения сочетанных глистных инвазий. Указанные методы обладают универсальностью применения. Они могут быть использованы как в стационарных, так и в амбулаторных условиях, а также для проведения эпидемиологических исследований окружающей среды.

Ключевые слова: тканевые гельминтозы; методы диагностики

Parasitoses – helminthiases in general and helminthiases-zoonoses (*Echinococcus* and other) in particular, are a major threat not only to the health but sometime to the life of affected population both in the developing and industrial countries. The rapid and reliable diagnosis of helminth infections is central to their prevention and control. Effective diagnosis depends on the sensitivity, specificity and reliability of the tests deployed. The most commonly used diagnosis of helminth infection has been the microscopic detection of eggs in fecal samples. Serological methods are also widely used. DNA amplification tests (PCR and its modifications) can provide alternative approach for diagnosis and can be sensitive and specific, provided reliable molecular genetic markers are employed in the tests. Their use can be also useful for quantitative assessment of intensity of infection and in case of mixed helminthiases. These methods can be deployed under different clinic-epidemiological settings – various health treatment facilities and in the field, including epidemiological surveys.

Key words: tissue helminthiasis; diagnostic methods

В патологии человека по-прежнему значительное место занимают паразитарные болезни и среди них – гельминтозы. По оценочным данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), только одними геогельминтами поражено свыше 2 миллиардов человек в мире [49]. Наиболее широкое распространение в Российской Федерации приобрели гельминтозы-антропонозы (энтеробиоз, аскаридоз), однако, по тяжести течения с потенциальным смертельным исходом и причиняемому ущербу здоровью населения на первый план выходят гельминтозы-зоонозы

(эхинококкозы, трихинеллёз, цистицеркоз, и некоторые другие). Проведённое длительное эпидемиолого-эпизоотологическое исследование в Московской области выявило 349 случаев трихинеллёза и 5 случаев летального исхода вследствие этой инвазии [2]. Наибольшее число случаев инвазии отмечено в Краснодарском крае, республиках Северная Осетия-Алания и Адыгея, где показатель заболеваемости трихинеллёзом достигает 1.5-4.0 на 100 тыс. населения, превышая средне-федеральный в отдельные годы в 5-10 раз [16]. Нарастающая тенденция заболеваемости отмечена и в целом по России, например, в 2014 году заболеваемость составила 0.07 на 100 тыс. населения, что в 2.9 раз выше, чем в 2013 году. Случаи трихинеллёза были выявлены в 23 административных территориях страны [6].

Признаки ухудшения ситуации по эхинококкозу отмечены на территории южных областей России. Так, результаты серологических исследований среди группы риска в Ставропольском крае в 2001 году выявили 17.7% положительно реагирующих среди 429 обследованных лиц [5].

При гельминтозах-зоонозах человек поражается возбудителями, обитающими в дефинитивном хозяине-животном во время личиночной стадии развития. Принято считать такие гельминтозы-зоонозы имагинальными. В то же время имеется немало гельминтозов зоонозной природы, которые поражают человека личинками, проходящими личиночную стадию развития паразита и вызывая инвазии, обозначаемые как «ларвальные» или «личиночные» гельминтозы. Учитывая топографическую локализацию паразита в различных тканях организма человека, такие гельминтозы называют также и «тканевыми» гельминтозами [9,11].

На территории Российской Федерации эндемичное распространение имеют около 20 гельминтозов-зоонозов, из которых тканевые гельминтозы составляют около 50 %. При этом отмечается, что личиночные инвазии вызывают представители трёх классов: нематоды (*Toxocara* и др.), трематоды (*Schistosoma* и др.), цестоды (*Echinococcus* и др.) [12]. Источником инвазии являются почти во всех случаях дефинитивные хозяева.

Патология человека, вызываемая личинками гельминтов сходна с таковой при имагинальных гельминтозах: от бессимптомного носительства и самокупирующихся проявлений до тяжёлых органических поражений [7].

Распространённость тканевых гельминтозов на территории Российской Федерации варьирует от очаговой (парагонимоз) до практически повсеместной (эхинококкоз) [10,17]. Основными факторами, определяющими их территориальную приуроченность и поражённость населения, являются социально-экономические: гигиенический уровень и пищевые предпочтения населения, масштабная миграция, урбанизация и т.п. [18]. Важнейшим отличием тканевых гельминтозов является то обстоятельство, что человек, инвазированный личинками гельминтозов животных, не становится источником инвазии для своего окружения, так как человек является либо чуждым хозяином – «биологическим тупиком», либо потенциально промежуточным хозяином, оставаясь, однако эпидемиологически инертным вследствие своих особенностей как социально организованного существа – «экологический тупик» (например, при эхинококкозе) [18].

Диагностические методы при тканевых гельминтозах

Постановка точного диагноза при гельминтозах является крайне необходимой важной для выбора тактики лечения пациента, но и для мониторинга эффективности лечения, а также для определения комплекса необходимых мероприятий, направленных на предупреждение нежелательных эпидемических последствий в очаге инвазии.

В настоящее время всё ещё широко используются традиционные методы постановки первичного диагноза гельминтозов. Однако, большинство из них требуют больших затрат времени, не всегда обладают специфичностью и чувствительностью, и не всегда способны эффективно определять родовую и видовую принадлежность. Наиболее часто используемый метод диагностики гельминтозов – копрологический (обнаружение яиц при микроскопическом исследовании биоматериала). Однако, указанная методика не предназначена для диагностики большинства тканевых гельминтозов.

Результаты общего анализа крови могут служить косвенными признаками паразитарной инвазии. Наиболее важный признак – эозинофилия. Однако, этот признак характерен для большинства гельминтозов и не может служить диагностическим критерием, поскольку является признаком аллергической реакции макроорганизма.

Для подтверждения диагноза таких тканевых гельминтозов, как эхинококкоз и цистицеркоз, прибегают к инструментальным методам исследования: радиологическим, ультразвуковым и эндоскопическим. В ходе проведения последних, иногда проводят биопсию того или иного органа. При трихинеллёзе для подтверждения диагноза при необходимости делают биопсию дельтовидной или икроножной мышцы. Достаточно информативно рентгенологическое исследование, выявляющее кальцифицированные цистицерки в мышцах, а также офтальмоскопия при локализации личинки в глазу. КТ и МРТ помогают не только выявить наличие цистицерков, но и дифференцировать живых от кальцифицированных. В настоящее время основная масса больных с эхинококкозами выявляется благодаря широкому внедрению в практику УЗИ, КТ, МРТ [15].

Выбор серологических методов при постановке диагноза тканевого гельминтоза довольно широк. Например, при эхинококкозе используются РЛА, РНГА, РНИФ, ИФА [3, 13]. Ценность ИФА заключается не только в подтверждении диагноза при наличии выраженных клинических проявлений заболевания, но и в дифференциальной диагностике с заболеваниями иной этиологии. Обнаружение специфических антител не только позволяет заподозрить эхинококкоз, но и выявить патологию на ранних стадиях болезни [14]. Также ИФА используется для проведения серо-эпидемиологических исследований в группах риска [1].

При цистицеркозе немаловажное значение имеют иммунологические тесты – РЭМА, РНГА, за исключением внутримозговой локализации паразита. При трихинеллёзе широко используется иммуоферментный анализ (ИФА), который является наиболее чувствительным и специфичным методом. Следует иметь в виду, что специфические антитела появляются после заражения и достигают максимума на 4-12 неделе [12].

Эффективность иммунодиагностики зависит не только от чувствительности и специфичности используемых иммунодиагностических тестов, но и от иммунного статуса больного, а также степени развития патологического процесса. В ранний период развития инвазии титры антител бывают невысокими. Образование антител наиболее выражено у больных с жизнеспособными ларвоцистами при локализации процесса в печени, множественном поражении брюшной полости и сочетанных локализациях. Низкие титры могут быть при лёгочной локализации, обызвестлении оболочек ларвоцист и гибели паразита, а также в поздней терминальной стадии [8].

Паразитологическая диагностика при цистном эхинококкозе возможна лишь в случаях разрыва кисты и излияния её содержимого в полые органы с последующим выделением морфологических образований наружу. При этом легко определяются сколексы, отдельные крючья, «дочерние» пузырьки. Эти элементы появляются в мокроте, иногда в дуоденальном содержимом, моче. Микроскопия осадка жидкости из кисты может выявить фрагменты эхинококкового пузыря.

При альвеолярном эхинококкозе производится лапароскопия с прицельной биопсией с последующим окрашиванием срезов биоптата гематоксилин-эозином для выявления нежно-слоистой хитиновой оболочки.

Важная проблема с постановкой первичного диагноза при тканевых гельминтозах заключается в следующем. Результаты многих эпидемиологических исследований в мире показали, что большинство людей, заражённых, например, различными видами эхинококкозов, проявляют первоначальную устойчивость к болезни. Даже когда болезнь всё-таки развивается, она контролируется в какой-то степени иммунитетом хозяина. При наличии иммуно-компетентности у хозяина паразит развивается в организме довольно медленно и первые клинические проявления болезни могут появляться через несколько лет. В случае иммуно-компроментированности организма (ВИЧ-инфекции, или другие иммунодефициты), наблюдается неконтролируемая пролиферация паразита, приводящая к острой фазе болезни [27].

Совсем нередко случаи спонтанного излечения как при альвеококкозе, так и при цистном эхинококкозе, приводящие к формированию кальцифицированных рубцов. Однако, механизмы подобных исходов остаются неизвестными.

Результаты массовых обследований населения в эндемичных местах показали, что число аппаратных случаев альвеококкоза значительно ниже числа серопозитивных лиц, указывая, таким образом, на то, что последние были заражены яйцами паразитов, но оставались клинически здоровыми людьми. Полагают, что только у 1%-10% лиц, заражённых альвеококкозом, разовьётся полномасштабная болезнь. В случае цистного эхинококкоза могут наблюдаться спонтанные abortивные излечения уже прижившегося паразита в организме хозяина [25, 47].

Представляется очевидным, что в большинстве случаев альвеококкоза и эхинококкоза врождённый или приобретённый иммунитет способствует борьбе с этими заболеваниями как в ранней, так и в поздней стадии инвазии. С другой стороны, ослабление клеточного иммунитета, например в случае ВИЧ-инфекции, приводит к быстрому и неконтролируемому росту и диссеминации паразита при заражении альвеококкозом [22, 41].

Методы диагностики личиночных/тканевых гельминтозов с использованием ПЦР и её модификаций.

В настоящее время для диагностики гельминтозов широкое применение получило использование молекулярно-биологических методов, таких как ПЦР. Метод известен своей высокой специфичностью и чувствительностью.

Молекулярные методы могут быть использованы не только в целях диагностики гельминтозов, но и для экологического мониторинга внешней среды [26].

Метод классической ПЦР может быть успешно применён для определения географических границ ареала того или иного гельминтоза. Например, это было сделано в Юго-Восточной Азии в отношении *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis*. Яйца и метациркарии этих двух видов морфологически очень близки к представителям трематод рыб, неспособных инфицировать

человека. Правильная диагностика гельминтов этих видов очень важна с точки зрения выбора эффективных мероприятий, направленных как против резервуара инфекции, так и против промежуточного хозяина. В результате в Таиланде *C. sinensis* был обнаружен впервые на территории центральной части страны [43].

Другим примером успешного использования ПЦР для выявления источника инфекции при эхинококкозах является ситуация, описанная в Китае. Было установлено, что основным источником цистного эхинококкоза и альвеококкоза для людей здесь являются собаки. В тоже время лисицы (*Vulpes vulpes*) в ряде территорий страны являются дефинитивными хозяевами *E. multilocularis* [29, 54].

Использование ПЦР позволило установить видовое различие и наличие смешанных инфекций эхинококкозов у людей на территории Западного Китая, Индии, Турции, Западной Европы и ряде других стран [24, 38, 44].

Внедрённая в практику лабораторной диагностики при различных паразитозах в течение 1980х-1990х гг ПЦР была значительно модифицирована, в результате чего появились две эффективные модификации метода – Мультиплексная ПЦР – (mPCR - Multiplex PCR) и ПЦР в реальном времени (Real time PCR - qPCR).

Использование ПЦР выявило ее эффективность при очень низкой численности яиц при тениозе (5 яиц в одном грамме стула) [52, 53].

Использование мультиплексного метода ПЦР с использованием различающихся флуорофоров, позволило дифференцировать генотипы *E. granulosus* [33]. Метод также позволяет выявлять и количественно определять численность яиц *S. mansoni* и *S. haematobium* и ряда других гельминтов в стуле пациента [45].

Метод мультиплексной ПЦР позволяет дифференцировать больше, чем одну последовательность ДНК путём использования множественных пар праймеров и продуцируя ампликоны (продукт ПЦР) различных размеров [28]. Описанный впервые Chamberlain et al. в 1988 [21], метод был использован во многих исследованиях, включая обнаружение смешанных видов паразитов в различном биологическом материале [48,52]. Метод оказался очень эффективным для целей микросателлитного анализа и генотипирования вирусов, бактерий и паразитов.

Высокая эффективность теста была доказана при проведении дифференциального диагноза *Taenia asiatica*, *T. saginata* и *T. solium*, и для идентификации *E. multilocularis*, *T. saginata*, *T. solium* и других тениид [46, 50]. Тест был также успешно использован для обнаружения и количественного определения яиц *Schistosoma mansoni* и *S. haematobium* в стуле пациента а также для определения генотипов *E. granulosus* [34, 42]. Последнее обстоятельство исключительно важно, как с клинической, так и с эпидемиологической точки зрения [39]. До недавнего времени считалось, что род *Echinococcus* состоял из 10 видов (G1-G10), связанных с различными окончательными хозяевами. Основываясь на результатах секвенирования митохондриальной ДНК, было предложено считать род, как *Echinococcus sensu stricto* со следующими штаммами (G1 – овечий штамм, G2 – Тасманский овечий штамм, G3-буйволиный штамм, G4- лошадиный штамм, G5- штамм крупного рогатого скота, G6 - верблюжий штамм, G7 - свиной штамм, G8- олений штамм, G9 - штамм канадского оленя, G10 - штамм скандинавского оленя) [30, 35]. Правомерность подобной классификации рода была подтверждена результатами ряда исследований [40]. Используя тот же подход, на европейской территории России и Алтая выделили 3 генотипа (*E. granulosus s.s.*, *E. canadensis*, *E. multilocularis*). 3 генотипа были выделены на территории Якутии (G6, G8, G10), и 4 генотипа *E. multilocularis* на территории Западной Сибири и в Прибайкалье [30]. Важным отличием выделенных генотипов *E. granulosus* один от другого является их патогенность для человека. Например, выделенный генотип G4 – лошадиный штамм никогда не был найден у людей [39].

Относительно новый метод LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) использует изотермальные условия для амплификации ДНК [37, 51]. LAMP метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью вследствие необходимости использования 4-х специфических праймеров [20]. Результаты недавно проведённых исследований выявили значительное преимущество LAMP по сравнению с ПЦР в отношении не только чувствительности и специфичности, но и простоте применения и скорости получения результата [31]. Преимущество LAMP было убедительно продемонстрировано и в сравнении с мультиплексной ПЦР при исследовании кала в отношении *T. saginata*, *T. solium* и *T. asiatica* (чувствительность соответственно 88.4% и 37.2) [36].

В настоящее время LAMP широко используется для быстроты выявления и дифференцировки фасциолёзов, шистосомозов, тениид, парагонимоза, токсокароза и др. в кале, сыворотке крови, слюне и т.п. [19, 23]. Метод был также успешно применён для выявления и дифференциальной диагностики яиц *Toxocara canis* и *T. mystax* в образцах почвы/песка [32].

Заключение. Основной задачей клиницистов в диагностике и лечении тканевых гельминтозов является соблюдение протокола ведения больных и достижение конечной цели – полной и

безрецидивной гибели паразита. Одним из важнейших инструментов диагностики и оценки эффективности проведенного лечения является использование маркеров, выбор которых определяется клиническим состоянием пациента и стадией болезни. Достижению поставленных задач может способствовать дальнейшее улучшение знаний биологии гельминтов на молекулярном уровне, а также данных об особенностях иммунного ответа организма человека на внедрение паразита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баженов Л.Г., Турсунов Н.Т., Козлов С.С. Возможности диагностики эхинококкоза различной локализации с помощью иммуноферментного анализа. Мед.паразитол. - 2010 - 4:55-57.
2. Довгалёв А.С., Сергиев В.П., Коваленко Э.Б., Романенко Н.А., Полетаева О.Г., Успенский А.В., Шехотсов Н.В., Белиаров В.М., Сидоренко А.Г., Довгалёва Н.А., Пенькова Р.А., Полякова И.Е. Эпидемиолого-эпизоотологическое подразделение ареала трихинеллёза/Мед паразитол, 1997; 2: 10-15.
3. Зорихина В.И. Серорлогические методы диагностики эхинококкоза и альвеококкоза и их использование в изучении эпидемиологии этих заболеваний. Автореф.дис... д-ра мед.наук – М.,1978 .
4. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь-декабрь 2014 г. (по данным формы №1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях») [Электронный ресурс]/Роспотребнадзор. – 2015. – Режим доступа: http://rosпотреб-nadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=2938 – (Дата обращения:20.08.2015 13:04:15).
5. Ковалёв Н.Г., Назарова Е.О., Шамраева Г.В., Пугачёва О.Н., Вафин А.З., Слетков Н.А., Мнацаканян Э.Г., Парахин В.М., Сорокин В.В. Эхинококкоз людей и животных в Ставропольском крае/Мед.паразитол, 2003;3: 47-48.
6. Кухалёва И.В., Коваленко Ф.П., Школяр Н.А., Легоньков Ю.А., Мусаев Г.Х., Буланова Т.Е., Самочатова Е.И. Терапевтическая активность микронизированного мебендазола на мышечной фазе экспериментальной инвазии *Trichinella spiralis* белых мышей/Мед.паразитол, 2015; 4:36-39.
7. Лейкина Е.С. Важнейшие гельминтозы человека. - М.:Медицина,1967, 325-334.
8. Лысенко А.Я., Владимирова М.Г., Кондрашин А.В., Майори Дж. Клиническая паразитология. Всемирная Организация Здравоохранения, 2002, Женева:743 стр.
9. Лысенко А.Я. Общие и особенные черты ларвальных гельминтозов человека. Мед паразитол 1998; 2: 27-31.
10. Лысенко А.Я., Чебышев Н.В., Стреляева А.В., Коваленко Ф.П., Садыков В.М., Самылина И.А., Разаков Ш.А., Ганизода Х.Г., Сабиров Б.У. Экспериментальный эхинококкоз и альвеококкоз и испытание препарата СК-1. Мед паразитол, 1998;2: 38-40.
11. Озерецковская Н.Н. Подходы отечественной школы паразитологов к терапии паразитарных болезней. Мед. паразитол.1998;2: 12-15 .
12. Озерецковская Н.Н. Органная патология в хронической стадии тканевых гельминтозов: роль эозинофилии крови и тканей, иммуноглобулинемии Е, G4 и факторов, индуцирующих иммунный ответ. Мед.паразитол., 2000, 4:9-14.
13. Полетаева О.Г., Старкова Т.В., Коврова Е.А., Красовская Н.Н. Оптимизация серологической диагностики эхинококкоза цистного (однокамерного) Мед паразитол., 2010; 1:14-17.
14. Полетаева О.Г., Старкова Т.В., Коврова Е.А., Легоньков Ю.А., Тумольская Н.И., Красовская Н.Н. Степанова Е.В. Применение тест-системы ИФА с антигеном эхинококка цистного для диагностики эхинококкоза альвеолярного (многокамерного, альвеококкоза). Мед паразитол, 2011; 2:44-45.
15. Сергиев В.П., Лобзин Ю.В., Козлов С.С. Паразитарные болезни человека (протоzoозы и гельминтозы). СПб.: Фолиант, 2008. 592 с.
16. Твердохлебова Т.И., Васерин Ю.И., Мкртчян М.О., Балашова Н.В., Прокопова Л.В., Сапунов А.Я., Попов М.А., Нагорный С.А., Цыбина Т.Н., Яковлев Н.С. Эпидемиологические и клинико-эпидемиологические аспекты вспышки трихинеллёза в Крымском районе Краснодарского края. Мед паразитол, 2006;1:21-25.
17. Туйгунов М.М., Лукманов М.И., Фазлаев Р.Г., Лукманова Г.И. Проблема гельминтозов в Республике Башкортостане. Мед.паразитол 2012; 3: 8-11.
18. Тумольская Н.И., Завойкин В.Д., Мазманян М.В., Сергиев В.П. Альвеолярный эхинококкоз в Европейской части России/Мед паразитол, 2013; 2:36-37.
19. Abbasi I, King CH, Muchiri EM, Hamburger J. Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: identification of infected snails from early prepatency. Am J Trop Med Hyg, 2010; 83:427-432.
20. Ai L Li, Elsheika HM, Hong CJ, Chen JX, Chen CH. Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by loop-mediated isotherm amplification (LAMP) assay. Vet Parasitol, 2010;174:228-233.
21. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res., 1988; 16:1141-1156.

22. Chauchet A, Grenouillet F, Knapp J, Richou C, Delabrousse E, Dentan C, Capelle S, Di Martino V, Deconink E, Blagosklonov O, Vuitton DA, bresson-Handi S. Emergence of a new opportunistic infection in Europe: hepatic alveolar echinococcosis . Fifty case-report. Journal of Hepatology, 2013, 58 (Suppl (11)):S381.
23. Chen MX, Ai L, Zhang RL, Xia J, Wang K, Chen SH. Sensitive and rapid detection of *Paragonimus westermani* infection in humans and animals by loomediated isothermal amplification (LAMP). Parasitol. Res. 2011; 108:1193-1198
24. Dyachenko V, Patchev N, Gawlovska S, Vrhovec MG, Bauer C. Echinococcus multilocularis infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. Vet Parasitol, 2008; 157:244:e452
25. Frider B, Moguilensky J, Salvitti JC, Odriozola M, Cantoni G, Larrieu E. Epidemiological surveillance of human hydatidosis by means of ultrasonography: its contribution to the evaluation of control programs. Acta Tropica, 2001, 79,219-223.
26. Gordon CA, Gray DJ, Gobert GN, McManus DP. DNA amplification approaches for the diagnosis of key parasitic helminth infections in human. Molecular and Cellular Probes , 2011, 25:143-142.
27. Gottstein B, Wang J, Blagosklonov O, Grenouillet F, Millon L, Vuitton DA, Muller N. Echinococcus metacestode: in search of viability markers. Parasite 2014,21,63:1-9. Doi: 10.1051/parasite/2014063.
28. Henegariu O, Heerama NA, Sdlouhy SR, Vg H, Vogt PH. Multiplex PCR critical parameters and step-by-step protocol. Biotechniques, 1997; 23:504-511.
29. Knapp J, Bart J-M, Giradoux P, Glowatzki M, Breyer I, Raoul F. Genetic diversity of the cestode *Echinococcus multilocularis* in red foxes at a continental scale in Europe. PLoS Negl Trop Dis, 2009; 3:e452.
30. Konyaev SV, Yanaqida T, Nakao M, Ingovatova GM, Shoykhet YN, Bondarev AY, Odnokurtsev VA, Loskutova KS, Lukhmanova GI, Dokuchaev NE, Spiridonov S, Alchinecky MV, Sivkova TN, Andreyanov ON, Abramova SA, Krivolapov AV, Karpenko SV, Lopatina NV, Dupal TA, Sako Y, Ito A. Genetic diversity of *Echinococcus spp.* in Russia. Parasitology, 2013 Nov; 140(13):1637-47. Doi:10.1017/S0031182013001340.Epub 2013 Aug 28.
31. Kumagai T, Furushima-Shimogawara R, Ohmae H, Wang T, Lu S, Chen R. Detection of early and single infections of *Schistosoma japonicum* in the intermediate host snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay. Am J Trop Med Hyg, 2010, 83:542-548.
32. Macuhova K, Kumagai T, Akao N, Ohta N. Loop-mediated isothermal amplification assay for detection and discrimination of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs directly from sand samples. J Parasitol., 2010; 96:1224-1227.
33. Maurelli M, Rinaldi L, Capuano F, Perugini A., Cringoli G. Development of a real-time PCR for the differentiation of the G1 and G2/G3 genotypes of *E. granulosus*. Parasitol.Res, 2009; 105:255-259.
34. Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae), Int J Parasitol., 2013, 43:107-1029.
35. Nakao M, Yanagida T, Konyaev S, Lavikainen A, Odnokurtsev VA, Zaikov VA, Ito A. Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda:Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. Parasitology, 2013; 140:1625-1636.
36. Nkouawa A, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito I. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. J Clin Microbiol., 2009;47:168-183 .
37. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N. A loop –mediated isothermal amplification of DNK. Nucleic Acids Res,2000;28:E63.
38. Pednekar RP, Gatne ML, Thompson RCA, Traub RJ. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* from food producing animals in India. Vet Parasitol, 2009; 165:58e65 .
39. Roelfsema JH, Nozari N, Pinelli E, Kortbeek LM. Novel PCR for different diagnosis of cestodes. Experimental Parasitology, 2016, 161: 20-26.
40. Romig T, Ebi D, Wassermann M. Taxonomy and molecular epidemiology *Echinococcus granulosus sensu lato*. Vet Parasitol., 2015; 213:76-84.
41. Sailer M, Soelder B, Allerberger F, Zaknun D, Feichtinger H, Gottstein B. Alveolar echinococcosis of the liver in a six-year old girl with acquired immunodeficiency syndrome . Journal of Pediatrics ,1997,130:320-323.
42. Ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, van Lieshout L. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Shistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008; 102: 179 e 85.
43. Traub RJ, Macaranas J, Munthin M, Leclayova S, Cribb T, Murrel KD. A new PCR –based approach indicates the range of *Clonorchis sinensis* now extends to Central Thailand. PLoS Negl Trop Dis, 2009,3:367.
44. Utuk AE, Simsek S, Koroglu E, McManus DP. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southern regions of Turkey. Acta Trop 2008, 107:192 e4 .
45. Verweij JJ, Brien EAT, Ziem JB, Polderman AM, van Lieshout L. Simultaneous detection and quantification of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* and *Oesophagostomum bifurcum* in fecal samples using multiplex real-time PCR. Am J Trop Med Hyg, 2007; 77:685-690; ten Hove et al., 2008.
46. Viet P, Bilger B, Schad V, Schaffer J, Frank W, Lucius R. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. Parasitology, 1995; 110: 79e86.

47. Wang L, Wen H, Feng X, Jiang X, Duan X. Analysis of economic burden for patients with cystic echinococcosis in five hospitals in northwest China. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2012, 106:743-748
48. Webster BL, Rollinson D, Stothard JR, Huyse T. Rapid diagnostic multiplex PCR (RD-PCR) to discriminate *Schistosoma haematobium* and *S. bovis*. J Helminthol., 2010; 84:107-114.
49. WHO, UNICEF. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. 2004.
50. Wicht B, Yanagida T, Sholtz T, Ito A, Jimenez JA, Brabec J. Multiplex PCR for differential identification of broad tapeworms (Cestoda: Diphylobothrium) infecting humans. J Clin Microbiol 2010; 48:311e6.
51. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantification. Biotechniques, 2005; 19:75-83.
52. Yamasaki H, Allan JC, Sato Y, Nakaya K. Differential diagnosis of taeniasis and cystercercosis by multiplex PCR. J Clin Microbiol, 2004;42:548e53.
53. Yamasaki H, Nakao M, Sato MO, Ito A. Mitochondrial DNA diagnosis for taeniasis and cystercercosis. Parasitol Int 2006;55:S81e5.
54. Zhang Y, Bart J-M, Giradoux P, Craig P, Vuitton D, Wen H. Morphological and molecular characteristics of *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus* mixed infections in a dog from Xinjiang, China. Vet Parasitol, 2006 139:244e8.

Поступила 07.12.18