

Методы диагностики малярии

И.Ю.Щит, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

В статье рассматривается и подчеркивается важность точных, чувствительных и доступных диагностических методов в борьбе с малярией. Используемые в настоящее время методы диагностики включают микроскопию, экспресс-тесты (быстрый диагностический тест) и полимеразную цепную реакцию. Обсуждаются развивающиеся перспективные методы на основе амплификации нуклеиновых кислот, такие как петлевая изотермическая амплификация (LAMP), амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), термофильная хеликаза-зависимая амплификация (tHDA), амплификация нуклеиновых кислот в слюне и моче. Несмотря на растущее число ложноотрицательных результатов, диагностические экспресс-тесты по-прежнему широко применяются, поскольку они просты в использовании, быстрые и не требуют дорогостоящего оборудования. Подчеркивается важность разработки простых высокоточных методов, особенно для стран с ограниченными ресурсами.

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация, LAMP, малярия, *Plasmodium*

Для цитирования: Щит И.Ю., Бикетов С.Ф. Методы диагностики малярии. Бактериология. 2022; 7(4): 79–84. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-79-84

Methods of malaria diagnostics

I.Yu.Shchit, S.F.Biketov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

This article addresses and emphasizes the importance of accurate, sensitive and immediately available diagnostic methods to fight malaria. Currently used diagnostics methods include microscope examination, rapid diagnostic test (RDT) and polymerase chain reaction (PCR). The article discusses new perspective methods under development, that are based on the amplification of nucleic acids such as Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), Thermophilic Helicase-Dependent Amplification (tHDA), amplification of nucleic acids in saliva and urine. Despite the growing number of false-negative results, rapid diagnostic tests are still used extensively because they are easy to use, fast and do not require expensive equipment. The article emphasizes the importance of development of easy-to-use and highly accurate methods especially for countries with limited resources.

Key words: loop mediated isothermal amplification, LAMP, malaria, *Plasmodium*

For citation: Shchit I.Yu., Biketov S.F. Methods of malaria diagnostics. Bacteriology. 2022; 7(4): 79–84. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-79-84

На протяжении веков люди страдали от малярии, болезни, которая, кажется, сильнее стратегий, применяемых для борьбы с ней. Возникающая устойчивость к противомалярийным препаратам и инсектицидам, используемым для борьбы с переносчиками, продолжает сдерживать прогресс в борьбе с малярией. Заражение происходит через укусы самки комара рода *Anopheles*, которая является компетентным переносчиком для передачи одноклеточного простейшего из рода *Plasmodium* человеку-хозяину. Паразит не причиняет вреда комару, а широкий ареал обитания насеко-

мого обеспечивает трансмиссивность болезни. Малярия относится к числу самых распространенных инфекций во всем мире и является одной из основных причин смертности. Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) о малярии за 2021 г., во всем мире было зарегистрировано 241 млн случаев и 627 тыс. смертельных исходов заболевания [1]. Вероятность заражения малярией и развития тяжелой формы болезни значительно выше среди некоторых групп населения: младенцев, детей в возрасте до пяти лет, беременных женщин и лиц с ВИЧ/СПИДом, а также

Для корреспонденции:

Щит Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0065
E-mail: irina_shchit@mail.ru

Статья поступила 22.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Irina Yu. Shchit, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0065
E-mail: irina_shchit@mail.ru

The article was received 22.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

лиц с низким уровнем иммунитета, прибывающих в районы с интенсивной передачей малярии, в частности трудящихся-мигрантов, мобильных групп населения и лиц, совершающих поездки.

Страны, где малярия распространена, называют «поясом малярии», в основном это страны с тропическим климатом, который способствует размножению комаров и, как следствие, передаче паразита человеку.

Малярию у людей вызывают 5 видов представителей рода *Plasmodium*. *P. falciparum* является причиной тропической малярии и самым смертоносным паразитом. На его долю приходится 99,7% заболеваний в странах Африки к югу от Сахары. Трехдневную малярию провоцирует *P. vivax*, он наиболее распространен в Америке. 75% случаев заражения обусловлены этим видом плазмодия [1]. *P. malariae* и *P. ovale* распространены повсеместно, однако обусловленные ими четырехдневная малярия и малярия овале соответственно не вызывают таких тяжелых состояний, как тропическая малярия [2]. *P. knowlesi* поражает обычно длиннохвостых и свинохвостых макаков. Тем не менее в Юго-Восточной Азии были зарегистрированы случаи заражения человека *P. knowlesi* [3].

Успех лечения малярии зависит от своевременной диагностики и выбора наиболее подходящей схемы терапии. Для лечения неосложненной формы малярии, вызванной *P. falciparum*, ВОЗ рекомендует комбинированную терапию на основе артемизинина (АКТ), а при малярии, вызванной *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* и *P. knowlesi* – лечение АКТ или хлорохином. Для предотвращения рецидивов *P. vivax* и *P. ovale* рекомендуется примахин [4].

Малярия – острое лихорадочное заболевание, клинические симптомы неосложненной формы малярии включают чувство общего недомогания, общую слабость, лихорадку, головные и мышечные боли, желудочно-кишечный дискомфорт, тошноту и рвоту [5]. Первые симптомы малярии – лихорадка, головная боль и озноб – обычно появляются через 10–15 дней после укуса инфицированного комара и могут быть слабо выраженными, что затрудняет выявление малярии. При отсутствии лечения малярия, вызванная *P. falciparum*, может в течение 24 ч развиться в тяжелую форму и привести к летальному исходу.

Чтобы дифференцировать малярию от других заболеваний, необходимы специальные методы диагностики. Ранняя диагностика может предотвратить дальнейшее развитие инфекции и снизить тяжесть заболевания, особенно в случае детей в возрасте до 5 лет, на долю которых в 2020 г. приходилось около 77% смертельных случаев от тяжелой малярии во всем мире. Эффективное лечение малярии зависит от вида плазмодия и паразитарной нагрузки. Точные и доступные диагностические инструменты жизненно важны для выявления бессимптомных инфекций, контроля и ликвидации малярии, а также для программ, направленных на глобальную ликвидацию малярии.

Методы диагностики малярии

Микроскопическое исследование толстой капли и мазков крови

Микроскопическое исследование толстых и тонких мазков крови является золотым стандартом для выявления па-

разита в крови и определения соответствующего лечения. Этот метод диагностики заболевания наиболее распространен. Кровь у пациента берут из пальца или из вены. Кровь от больных необходимо брать до начала лечения и несколько раз во время лечения. Для исследования крови от каждого больного готовят 4–8 препаратов (мазки и толстые капли), которые окрашивают по методу Романовского–Гимзы. Ядра паразитов окрашиваются в красный, а цитоплазма – в синеголубой цвет. В эритроцитах обнаруживают различные стадии возбудителя малярии: кольцевидные трофозоиты, амёбовидные трофозоиты (взрослые формы), зрелые трофозоиты (шизонты) и незрелые мужские и женские половые клетки – микро- и макрогаметоциты. Для определения вида малярийных плазмодиев необходимо уметь дифференцировать их морфологические особенности. Сначала просматривают толстые капли. Если в них плазмодиев не выявляют, тонкие мазки крови вообще не исследуют. И только при наличии паразитов в толстой капле особенности их строения изучают в тонких мазках. Чувствительность и специфичность этого метода составляют 95 и 98% соответственно. Предел обнаружения для микроскопического исследования составляет примерно 50–200 паразитов в 1 мкл крови [6]. Опытный лаборант может определить уровень паразитемии в мазке крови примерно в течение 1 ч.

Исследование мазка крови под микроскопом позволяет определить уровень паразитемии, морфологию и вид паразитов. Для проведения микроскопического анализа требуются микроскоп и квалифицированный персонал, а точность и быстрота анализа будут зависеть от квалификации медицинского работника. Метод не позволяет выявить возбудителя у бессимптомных пациентов с низкой паразитемией. Такие пациенты остаются невылеченными и способствуют дальнейшему распространению инфекции.

Экспресс-диагностический тест на антиген малярии

Быстрый диагностический тест (БДТ) предназначен для обнаружения антигенов малярийного плазмодия и представляет собой иммунохроматографическую полоску, на один конец которой капают кровь, а результат анализа проявляется в виде линий на поверхности полоски [7]. С помощью этого теста определяют три типа антигенов плазмодия: богатый гистицином белок 2 (pHRP-2), лактатдегидрогеназу (pLDH) и альдолазу. pHRP-2 специфичен для *P. falciparum*, а лактатдегидрогеназа и альдолаза обнаружены у всех видов *Plasmodium* [8]. Более 90% коммерчески доступных тестов определяют pHRP-2 [9]. Когда смесь крови и буфера мигрирует по диагностической полоске, антитела, иммобилизованные на поверхности тест-полоски, связываются с антигенами паразита, и в этой зоне появляется окрашенная линия. Каждый экспресс-тест имеет положительный контроль, указывающий на достоверность анализа. Имеющиеся в настоящее время видоспецифичные экспресс-тесты способны идентифицировать только 2 вида: *P. falciparum* и *P. vivax* [10]. В случае других представителей рода *Plasmodium* тесты показывают наличие паразита, но видовую принадлежность определить не способны.

ВОЗ в сотрудничестве с Фондом для инновационных и новых диагностических средств (FIND), центрами по контролю и профилактике заболеваний, а также другими организа-

циями провела проверку различных коммерчески доступных экспресс-тестов. Для закупки БДТ рекомендуется ориентироваться на рекомендации ВОЗ, по критериям которой эффективность тестов каждого производителя оценивается с помощью коэффициента детекции [11]. ВОЗ рекомендует проводить профилактическую и последующую послепродажную проверку, чтобы удостовериться, что каждая партия тестов соответствует стандарту [12]. Чувствительность БДТ колеблется от 85 до 94,8%, а специфичность – от 95,2 до 99% [13, 14]. Предел обнаружения сравним с микроскопией – 50–100 паразитов в 1 мкл крови, а обученный персонал может провести анализ и получить результат через 15–20 мин с момента забора крови [5]. БДТ привлекательны в плане невысокой стоимости. В настоящее время разрабатывается сверхчувствительный экспресс-тест, чувствительность которого может быть в 10 раз выше, чем у используемых в настоящее время БДТ; предполагается, что тест будет способен обнаруживать заболевание на более ранней стадии [8].

Экспресс-тесты представляют собой быстрый и доступный метод диагностики малярии [5]. Их легко можно использовать в труднодоступных районах и странах с ограниченными ресурсами. Выполнить тест способен средний медицинский персонал, медико-санитарные работники могут провести анализ в местных медпунктах, затем назначить лечение или направить пациентов в медицинские центры. К недостаткам метода можно отнести растущее число ложноотрицательных результатов, которые возникают из-за делеции в гене *pHRP-2* малярийного плазмодия, а также из-за феномена «прозоны» у пациентов с высоким уровнем паразитемии [7]. Разработка новых экспресс-тестов не поспевает за постоянно меняющейся природой малярийного паразита. Кроме того, метод не позволяет определить паразитарную нагрузку в крови больных и, следовательно, затрудняет контроль эффективности терапии. К существенным недостаткам относится низкая чувствительность тестов, не позволяющая выявить бессимптомных носителей. Ложноположительные результаты возникают из-за того, что *pHRP-2* может оставаться в крови до 30 дней от начала лечения [7].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Методы на основе ПЦР определяют наличие генов-мишеней малярии в образце крови. Существуют различные модификации этого метода, в том числе гнездовая ПЦР (nested ПЦР), мультиплексная ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [15]. В основном мишенью для детекции малярийного паразита служат гены 18S рРНК [16]. ПЦР позволяет выявить бессимптомных пациентов в случаях, когда с помощью микроскопии и экспресс-тестов найти возбудителя малярии не удалось. Чувствительность и специфичность различных модификаций ПЦР колеблется от 98 до 100% по сравнению с микроскопией [17], а предел обнаружения составляет 0,5–5 паразитов в 1 мкл крови [16].

С помощью гнездовой ПЦР удалось выявить генетические последовательности малярийного плазмодия в слюне. Мишенями послужили 18S рРНК *Plasmodium* или ген дигидрофолатредуктазы *P. falciparum*. Гнездовая ПЦР состоит из двух последовательных раундов ПЦР с использованием двух наборов праймеров. Продукт первого раунда ПЦР слу-

жит матрицей для второго [18]. Для проведения гнездовой ПЦР также требуется термоциклер, предварительно ДНК нужно выделить из образца слюны. Чувствительность и специфичность этого метода колеблется от 86,36 до 95%. Специфичность колеблется от 93 до 98,4% по сравнению с микроскопией [18, 19]. Предел обнаружения для этого метода составляет 1–10 паразитов/мкл крови [20].

Анализ с помощью ПЦР обычно выполняется за 2–3 ч, и, не считая первоначальной стоимости термоциклера и другого оборудования, стоимость одного ПЦР-анализа примерно в 10 раз превышает стоимость экспресс-теста [21]. Высокая стоимость анализа и оборудования, необходимость квалифицированного персонала делают метод ПЦР дорогим и труднодоступным для небольших больниц и медпунктов, а также практически неосуществимым в полевых условиях. Гнездовая ПЦР длится около 6 ч, т.к. включает 2 раунда. Стоимость теста будет примерно равна стоимости ПЦР-анализа крови.

Новые развивающиеся методы диагностики малярии

Метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)

NASBA – метод амплификации молекул рибосомальной РНК. В его основе лежит обнаружение специфического фрагмента РНК в присутствии ДНК с помощью двух специфических праймеров и трех ферментов: обратной транскриптазы (ревертазы), РНКазы H и T7 РНК-полимеразы [21]. С РНК-мишени с помощью обратной транскриптазы синтезируется комплементарная ДНК (кДНК), а затем с кДНК с помощью T7 РНК-полимеразы амплифицируется целевая мишень [16]. Для проведения NASBA не требуется термоциклер, реакция проводится при 41°C, при этом амплификация целевой последовательности РНК увеличивается в 108 раз. Чувствительность метода по сравнению с микроскопией колеблется от 97,40 до 100%, а специфичность – от 80,90 до 94% [18]. Предел обнаружения составляет 0,01–0,1 паразита/мкл крови. Процедура NASBA занимает около 1 ч, стоимость анализа в 3–4 раза выше стоимости ПЦР-исследования [16].

Отсутствие необходимости использовать термоциклер и высокая чувствительность – преимущества метода NASBA. Однако для его проведения нужен грамотный персонал, а стоимость одного теста выше, чем у других методов детекции возбудителя малярии.

Изотермическая термофильная хеликаза-зависимая амплификация (tHDA)

В случае tHDA двухцепочечная ДНК расплетается при помощи хеликазы, а белки, связывающие одноцепочечную ДНК, связывают разделенные цепи и предотвращают комплементарное спаривание. После отжига специфических праймеров на одиночных цепях ДНК-полимераза синтезирует новые цепи. Реакцию проводят при 65°C около 2 ч [21]. Рибосомальная РНК (18S рРНК) амплифицируется непосредственно из цельной крови без денатурации нуклеиновой кислоты. По завершении tHDA ампликоны гибридизуют с зондами, мечеными либо флуоресцеином (FAM), либо дигоксигенином (DIG), а продукт амплификации выявляют на иммунохроматографических полосках, которые содержат антитела против FAM или DIG. Чувствительность и специ-

фичность этого метода составляют 96,6 и 100% соответственно по сравнению с микроскопией [22]. Предел обнаружения составляет 200 паразитов/мкл крови, а результат анализа можно получить через 1–2 ч [21, 22].

Рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA)

RPA является одним из методов изотермической амплификации, которая протекает при фиксированной температуре от 37°C до 42°C, без пробоподготовки реакция осуществляется за 20 мин [23]. Продукт амплификации, как и в случае tHDA, можно выявить с использованием иммунохроматографических полосок. В перспективе RPA предполагается применять в качестве экспресс-анализа на месте, особенно в условиях малооснащенных лабораторий.

Описано применение метода RPA с обратной транскрипцией (RT-RPA) для выявления *P. falciparum* [24]. В качестве матрицы послужили обильно экспрессирующиеся на бесполой стадии гены 28S рРНК на хромосомах 5 и 7. Для детекции продукта амплификации использовали иммунохроматографические полоски. Диагностическую эффективность оценивали у добровольцев после контролируемого заражения человека малярией (CHMI) криоконсервированными спорозитами *P. falciparum* (Sanaria PfSPZ). Метод был также опробован в Ламбарене (Республика Габон) для оценки бессимптомных лиц из эндемичных районов по малярии. RT-RPA показал себя надежным диагностическим тестом при выявлении бессимптомной инфекции с низким уровнем паразитемии. Его можно использовать в тех местах, где сверхчувствительную количественную ОТ-ПЦР провести невозможно. Однако метод требует существенной оптимизации. Создатели теста отметили возможную контаминацию рабочей зоны ампликонами и уменьшение чувствительности при использовании иммунохроматографических полосок.

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP)

Петлевая изотермическая амплификация – это относительно новый метод амплификации нуклеиновых кислот, впервые описанный в 2000 г. [25]. LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) представляет собой самоповторяющийся синтез ДНК со смещением цепи, осуществляемый с помощью фермента Bst-полимеразы. Продуктами амплификации являются структуры ДНК типа «петля-на-стебле» с инвертированными повторами фрагмента гена-мишени, формирующими в пространстве структуры, похожие на цветную капусту. Особенность метода в том, что реакция амплификации протекает в изотермических условиях (60–65°C), этап денатурации ДНК отсутствует. В реакции используется от 4 до 6 праймеров, комплементарных 6–8 участкам на мишени, поэтому специфичность амплификации очень высокая. Амплифицированного продукта синтезируется так много, что его можно обнаружить визуально по появлению мутности вследствие образования побочного продукта реакции пирофосфата магния. В течение 15–60 мин амплификации количество фрагмента ДНК-мишени увеличивается в 10⁹ раз. Продукт реакции можно обнаружить с помощью электрофореза по появлению в геле характерной лестницы полос, т.к. в ходе LAMP образуются ДНК-конкатемеры кратной длины, или по флуоресценции при добавлении в реакционную смесь интеркалирующих красителей (кальцеин, SYBR Green, бро-

мистый этидий, пропидиум йодид, PicoGreen и др.). Следить за изменением флуоресценции окрашенной реакционной смеси можно прямо в ходе реакции с помощью реал-тайм-амплификатора или специального реал-тайм-флуориметра для LAMP [18, 22]. Для реал-тайм-LAMP можно использовать различные варианты флуоресцентных зондов на основе внутренних праймеров. В частности, для мультиплексной реал-тайм-LAMP были предложены DARQ-зонды [26].

LAMP обладает высокой чувствительностью с пределом обнаружения 0,2–5 паразитов/мкл образца, стоимость теста эквивалентна рыночной стоимости экспресс-тестов на антиген. Отсутствие этапа выделения нуклеиновых кислот и возможность синтеза 10⁹ копий ДНК делают этот метод более эффективным, чем NASBA, tHDA и RPA. LAMP можно легко адаптировать к полевым условиям без применения дорогостоящего оборудования, провести анализ способен обычный лаборант, он подходит для малооснащенных лабораторий. Необходимость в выделении ДНК отсутствует, реакция будет хорошо идти даже при использовании плохо очищенной ДНК или необработанного образца [27]. Есть сообщения, что в реакции использовали образцы спинномозговой жидкости, термически обработанной крови [28] и сыворотки.

LAMP-анализ был использован для обнаружения *Plasmodium* spp. в крови с высокой чувствительностью и специфичностью [29–34]. Сообщается, что метод LAMP применим для неинвазивного обнаружения *P. vivax* и *P. falciparum* в образцах слюны и мочи [35, 36]. В настоящее время на рынке доступны 2 коммерческих набора для детекции малярии: «LoopAmp malaria (Pan/Pf) detection kit» (Eiken Chemical Company, Япония) и «Illumigene malaria LAMP assay» (Meridian Biosciences, США). Результаты тестирования «LoopAmp malaria (Pan/Pf) detection kit» показали многообещающим. Данный тест в полевых условиях был способен выявить ДНК возбудителя малярии в образцах из фильтровальной бумаги при низком уровне паразитемии [37, 38].

Заключение

Основной проблемой в достижении ликвидации малярии в эндемичных районах является ограниченность ресурсов в этих областях. По критериям, установленным ВОЗ для идеального диагностического теста при использовании в странах с ограниченными ресурсами, тест должен быть: недорогим, чувствительным, специфичным, удобным для пользователя, надежным, экспрессным, не требующим оборудования и легко используемым в любых климатических условиях [16, 39].

Хотя многие методы диагностики малярии соответствуют одному или нескольким критериям идеального диагностического теста по рекомендациям ВОЗ, ни один из них не отвечает всем пунктам. Микроскопический метод зависит от электричества и требует опытного микроскописта. Экспресс-диагностические тесты на антиген малярии проводятся быстро, не зависят от электричества, имеют невысокую стоимость, но из-за низкой чувствительности не способны выявить бессимптомных носителей малярии, а также не выявляют мутантных паразитов с делецией гена *pHRP-2*. ПЦР обладает высокими чувствительностью и специфичностью, но требует надежного электроснабжения, хорошего прибороснащения, высококвалифицированного персонала, а стоимость ПЦР-анализа больше, чем у микроскопии и экспресс-

тестов. Зависимость ПЦР от термоциклера и выделения ДНК остается проблемой в условиях ограниченных ресурсов. Новые методы диагностики, некоторые из которых находятся в стадии разработки, также должны будут соответствовать всем критериям идеального теста ВОЗ, чтобы способствовать успеху в лечении и возможной ликвидации малярии. Этим требованиям удовлетворяют методы изотермической амплификации. И среди них LAMP заслуживает особенного внимания, так как является хорошим и эффективным диагностическим методом для развивающихся стран, поскольку не требует сложного оборудования и квалифицированного персонала и поэтому экономически более выгоден. В соответствии с Глобальной программой по борьбе с малярией ВОЗ рекомендует использовать в качестве диагностического средства именно тесты на основе петлевой изотермической амплификации [40], особенно для диагностики малярии в странах с ограниченными ресурсами.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

- World malaria report 2021. URL: <https://www.who.int/publications/item/9789240040496> (accessed 20.11.2022).
- Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. Malaria. *Lancet*. 2018 Apr 21;391(10130):1608-1621. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30324-6
- Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Apr;26(2):165-84. DOI: 10.1128/CMR.00079-12
- World Health Organization Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization, 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2015. 313 p.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet*. 2014 Feb 22;383(9918):723-35. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60024-0
- Kolluri N, Klapperich CM, Cabodi M. Towards lab-on-a-chip diagnostics for malaria elimination. *Lab on a Chip*. 2017 Dec;18(1):75-94. DOI: 10.1039/c7lc00758b.
- Wilson ML. Malaria rapid diagnostic tests. *Clin Infect Dis*. 2012 Jun;54(11):1637-41. DOI: 10.1093/cid/cis228
- Amir A, Cheong FW, De Silva JR, Lau YL. Diagnostic tools in childhood malaria. *Parasit Vectors*. 2018 Jan 23;11(1):53. DOI: 10.1186/s13071-018-2617-y
- Mouatcho JC, Goldring JPD. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. *J Med Microbiol*. 2013 Oct;62(Pt 10):1491-1505. DOI: 10.1099/jmm.0.052506-0.
- Mukkala AN, Kwan J, Lau R, Harris D, Kain D, Boggild AK. An Update on Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Curr Infect Dis Rep*. 2018 Oct 23;20(12):49. DOI: 10.1007/s11908-018-0655-4
- World Health Organization Malaria rapid diagnostic test performance: summary results of WHO product testing of malaria RDTs: round 1–7 (2008–2016) / World Health Organization. Geneva: World Health Organization, 2017, 33 p.
- Cunningham J, Jones S, Gatton ML, Barnwell JW, Cheng Q, Chiodini PL, et al. A review of the WHO malaria rapid diagnostic test product testing programme (2008–2018): Performance, procurement and policy. *Malar J* 18, 387 (2019). DOI: 10.1186/s12936-019-3028-z
- Pham NM, Karlen W, Beck HP, Delamarche E. Malaria and the 'last' parasite: How can technology help? *Malar J* 17, 260 (2018). DOI: 10.1186/s12936-018-2408-0
- Abba K, Deeks JJ, Olliaro P, Naing CM, Jackson SM, Takwoingi Y, Donegan S, Garner P. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Jul 6;2011(7):CD008122. DOI: 10.1002/14651858.CD008122.pub2
- Vasoo S, Pritt BS. Molecular diagnostics and parasitic disease. *Clin Lab Med*. 2013 Sep;33(3):461-503. DOI: 10.1016/j.cll.2013.03.008. PMID: 23931835
- Cordray MS, Richards-Kortum RR. Emerging nucleic acid-based tests for point-of-care detection of malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Aug;87(2):223-230. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0685
- Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MM, Mens PF. Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(2):87-105. DOI: 10.3109/10408363.2015.1084991
- Mfuh KO, Tassi Yunga S, Esemu LF, Bekindaka ON, Yonga J, Djontu JC, Mbakop CD, Taylor DW, Nerurkar VR, Leke RGF. Detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva samples stored at room temperature: potential for a non-invasive saliva-based diagnostic test for malaria. *Malar J*. 2017 Oct 27;16(1):434. DOI: 10.1186/s12936-017-2084-5
- Singh R, Singh DP, Gupta R, Savargaonkar D, Singh OP, Nanda N, et al. Comparison of three PCR-based assays for the non-invasive diagnosis of malaria: detection of *Plasmodium* parasites in blood and saliva. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Sep;33(9):1631-9. DOI: 10.1007/s10096-014-2121-z
- Ongagna-Yhombi SY, Corstjens P, Geva E, Abrams WR, Barber CA, Malamud D, Mharakurwa S. Improved assay to detect *Plasmodium falciparum* using an uninterrupted, semi-nested PCR and quantitative lateral flow analysis. *Malar J*. 2013 Feb 22;12:74. DOI: 10.1186/1475-2875-12-74
- Oriero EC, Jacobs J, Van Geertruyden JP, Nwakanma D, D'Alessandro U. Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jan;70(1):2-13. DOI: 10.1093/jac/dku343
- Li Y, Kumar N, Gopalakrishnan A, Ginocchio C, Manji R, Bythrow M, Lemieux B, Kong H. Detection and species identification of malaria parasites by isothermal tHDA amplification directly from human blood without sample preparation. *J Mol Diagn*. 2013 Sep;15(5):634-41. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2013.05.005
- Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*. 2006 Jul;4(7):e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204
- Lalremruata A, Nguyen TT, McCall MBB, Mombo-Ngoma G, Agnandji ST, Adegnika AA, et al. Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Assay for Ultrasensitive Detection of Low-Density *Plasmodium falciparum* Infection from Controlled Human Malaria Infection Studies and Naturally Acquired Infections. *J Clin Microbiol*. 2020 Apr 23;58(5):e01879-19. DOI: 10.1128/JCM.01879-19
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
- Tanner NA, Zhang Y, Evans TC Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques*. 2012 Aug;53(2):81-9. DOI: 10.2144/0000113902
- Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J*

- Biochem Biophys Methods. 2007 Apr 10;70(3):499-501. DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.08.008
28. Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson AR. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei* rhodesiense. PLoS Negl Trop Dis. 2008 Feb 6;2(1):e147. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000147
29. Poon LL, Wong BW, Ma EH, Chan KH, Chow LM, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. Clin Chem. 2006 Feb;52(2):303-6. DOI: 10.1373/clinchem.2005.057901
30. Chen JH, Lu F, Lim CS, Kim JY, Ahn HJ, Suh IB, et al. Detection of *Plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Acta Trop. 2010 Jan;113(1):61-5. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.09.007
31. Polley SD, Mori Y, Watson J, Perkins MD, González IJ, Notomi T, et al. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbi. 2010;48(8):2866-71. DOI: 10.1128/JCM.00355-10
32. Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. J Clin Microbi. 2007;45(8):2521-8. DOI: 10.1128/JCM.02117-06
33. Paris DH, Imwong M, Faiz AM, Hasan M, Yunus EB, Silamut K, et al. Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(5):972-6.
34. Poschl B, Waneesorn J, Thekisoe O, Chutipongvivate S, Karanis P. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand. Am J Trop Med Hyg 2010;83(1):56-60. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0630
35. Singh R, Savargaonkar D, Bhatt R, Valecha N. Rapid detection of *Plasmodium vivax* in saliva and blood using loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay. J Infect 2013;67(3):245-7. DOI: 10.1016/j.jinf.2013.04.016
36. Ghayour Najafabadi Z, Oormazdi H, Akhlaghi L, Meamar AR, Nateghpour M, Farivar L, Razmjou E. Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in human saliva and urine: loop-mediated isothermal amplification for malaria diagnosis. Acta Trop. 2014 Aug;136:44-9. DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.03.029
37. Hopkins H, Gonzalez IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C, et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: Performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. J Infect Dis 2013;208(4):645-52. DOI: 10.1093/infdis/jit184
38. Aydin-Schmidt B, Xu W, González IJ, Polley SD, Bell D, Shakely D, et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low density parasitaemias. PLoS One. 2014 Aug 8;9(8):e103905. DOI: 10.1371/journal.pone.0103905
39. Njiru ZK. Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(6):e1572. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001572
40. World Health Organization. (2014). WHO policy recommendation on malaria diagnostics in low transmission settings. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338357>

Информация о соавторе:

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-author:

Sergey F. Biketov, PhD (Biological Science), Leading Researcher of Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

НОВОСТИ НАУКИ**Оценка цитотоксичности *in vitro* вещества «ACVR-IN-01» на клеточной модели**

Цель. Оценить цитотоксичность нового химического соединения «ACVR-IN-01» (*in vitro*) на культуре мезенхимальных стромальных клеток (МСК).

Материалы и методы. Использовалась охарактеризованная культура МСК в 4 пассажах из биобанка клеточных культур. Тестируемые образцы «ACVR-IN-01» готовили в концентрациях 25, 200 и 400 мкг/мл. Для каждой исследуемой концентрации «ACVR-IN-01» проводили культивирование в трех повторах. Визуальную оценку состояния клеточной культуры проводили через 24, 48 ч и 7 суток. Оценку функционального состояния МСК осуществляли выявлением общего количества жизнеспособных клеток и иммунофенотипическим исследованием культуры клеток.

Результаты. Культивирование МСК в полной ростовой среде с веществом «ACVR-IN-01» в концентрации 25, 200 и 400 мкг/мл на протяжении 7 суток не влияет на экспрессию антигенов CD90 и CD105 во всех точках наблюдения *in vitro*. Культивирование МСК в полной ростовой среде с веществом «ACVR-IN-01» в концентрации 25, 200 и 400 мкг/мл на протяжении 7 суток не вызвало экспрессии антигенов CD34 и CD45 во всех точках наблюдения *in vitro*.

Заключение. Химическое соединение «ACVR-IN-01» не оказывает существенного влияния на линейную принадлежность МСК. Оценка цитотоксичности исследуемого вещества «ACVR-IN-01» (400 мкг/мл) на культуре клеток в полной ростовой среде показала выраженное снижение экспрессии CD73-антигена на 7-й день экспериментального исследования *in vitro*, сопровождающееся потерей дифференцировочного потенциала МСК в остеогенном и хондрогенном направлении.

Пустовойт В.И., Астрелина Т.А., Балакин Е.И., Кобзева И.В., Степанов А.А.,
Синицына А.А., Изотов А.А., Буткова Т.В., Белорусова А.Е., Самойлов А.С.
Инфекционные болезни. 2022; 20(3): 83–91. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-2-3-83-91
Источник: <https://www.phdynasty.ru>