GEORGIAN MEDICAL NEWS

ISSN 1512-0112

No 1 (310) Январь 2021

ТБИЛИСИ - NEW YORK

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Медицинские новости Грузии

საქართველოს სამედიცინო სიახლენი

GEORGIAN MEDICAL NEWS

No 1 (310) 2021

Published in cooperation with and under the patronage
of the Tbilisi State Medical University

Издается в сотрудничестве и под патронажем
Тбилисского государственного медицинского университета

გამოიცემა თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტთან
თანამშრომლობითა და მისი პატრონაჟით

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ТБИЛИСИ - НЬЮ-ЙОРК

GMN: Georgian Medical News is peer-reviewed, published monthly journal committed to promoting the science and art of medicine and the betterment of public health, published by the GMN Editorial Board and The International Academy of Sciences, Education, Industry and Arts (U.S.A.) since 1994. **GMN** carries original scientific articles on medicine, biology and pharmacy, which are of experimental, theoretical and practical character; publishes original research, reviews, commentaries, editorials, essays, medical news, and correspondence in English and Russian.

GMN is indexed in MEDLINE, SCOPUS, PubMed and VINITI Russian Academy of Sciences. The full text content is available through EBSCO databases.

GMN: Медицинские новости Грузии - ежемесячный рецензируемый научный журнал, издаётся Редакционной коллегией и Международной академией наук, образования, искусств и естествознания (IASEIA) США с 1994 года на русском и английском языках в целях поддержки медицинской науки и улучшения здравоохранения. В журнале публикуются оригинальные научные статьи в области медицины, биологии и фармации, статьи обзорного характера, научные сообщения, новости медицины и здравоохранения.

Журнал индексируется в MEDLINE, отражён в базе данных SCOPUS, PubMed и ВИНИТИ РАН. Полнотекстовые статьи журнала доступны через БД EBSCO.

GMN: Georgian Medical News – საქართველოს სამედიცინო სიახლენი – არის ყოველთვიური სამეცნიერო სამედიცინო რეცენზირებადი ჟურნალი, გამოიცემა 1994 წლიდან, წარმოადგენს სარედაქციო კოლეგიისა და აშშ-ის მეცნიერების, განათლების, ინდუსტრიის, ხელოვნებისა და ბუნებისმეტყველების საერთაშორისო აკადემიის ერთობლივ გამოცემას. GMN-ში რუსულ და ინგლისურ ენებზე ქვეყნდება ექსპერიმენტული, თეორიული და პრაქტიკული ხასიათის ორიგინალური სამეცნიერო სტატიები მედიცინის, ბიოლოგიისა და ფარმაციის სფეროში, მიმოხილვითი ხასიათის სტატიები.

ჟურნალი ინდექსირებულია MEDLINE-ის საერთაშორისო სისტემაში, ასახულია SCOPUS-ის, PubMed-ის და ВИНИТИ РАН-ის მონაცემთა ბაზებში. სტატიების სრული ტექსტი ხელმისაწვდომია EBSCO-ს მონაცემთა ბაზებიდან.

МЕДИЦИНСКИЕ НОВОСТИ ГРУЗИИ

Ежемесячный совместный грузино-американский научный электронно-печатный журнал
Агентства медицинской информации Ассоциации деловой прессы Грузии,
Международной академии наук, индустрии, образования и искусств США.
Издается с 1994 г., распространяется в СНГ, ЕС и США

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Николай Пирцхалаишвили

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

Елене Гиоргадзе

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА
Нино Микаберидзе

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ
Зураб Вадачкориа - председатель Научно-редакционного совета
Михаил Бахмутский (США), Александр Геннинг (Германия), Амиран Гамкрелидзе (Грузия),
Константин Кипиани (Грузия), Георгий Камкамидзе (Грузия),
Паата Куртанидзе (Грузия), Вахтанг Масхулия (Грузия),
Тенгиз Ризнис (США), Реваз Сепиашвили (Грузия), Дэвид Элуа (США)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ
Константин Кипиани - председатель Научно-редакционной коллегии
Архимандрит Адам - Вахтанг Ахаладзе, Амиран Антадзе, Нелли Антелава, Тенгиз Асатиани,
Гия Берадзе, Рима Бериашвили, Лео Бокерия, Отар Герзмава, Лиана Гогиашвили, Нодар Гогебашвили,
Николай Гонгадзе, Лия Дваладзе, Тамар Долиашвили, Манана Жвания, Тамар Зерекидзе,
Ирина Квачадзе, Нана Квирквелия, Зураб Кеванишвили, Гурам Кикнадзе, Димитрий
Кордзаиа,Теймураз Лежава, Нодар Ломидзе, Джанлуиджи Мелотти, Марина Мамаладзе,
Караман Пагава, Мамука Пирцхалаишвили, Анна Рехвиашвили, Мака Сологашвили, Рамаз Хецуриани,
Рудольф Хохенфеллнер, Кахабер Челидзе, Тинатин Чиковани, Арчил Чхотуа,
Рамаз Шенгелия, Кетеван Эбралидзе

Website:
www.geomednews.org

The International Academy of Sciences, Education, Industry & Arts. P.O.Box 390177,
Mountain View, CA, 94039-0177, USA. Tel/Fax: (650) 967-4733

Версия: печатная. **Цена:** свободная.
Условия подписки: подписка принимается на 6 и 12 месяцев.
По вопросам подписки обращаться по тел.: 293 66 78.
Контактный адрес: Грузия, 0177, Тбилиси, ул. Асатиани 7, IV этаж, комната 408
тел.: 995(32) 254 24 91, 5(55) 75 65 99
Fax: +995(32) 253 70 58, e-mail: ninomikaber@geomednews.com; nikopir@geomednews.com

По вопросам размещения рекламы обращаться по тел.: 5(99) 97 95 93
© 2001. Ассоциация деловой прессы Грузии
© 2001. The International Academy of Sciences,
Education, Industry & Arts (USA)

GEORGIAN MEDICAL NEWS
Monthly Georgia-US joint scientific journal published both in electronic and paper formats of the Agency of Medical Information of the Georgian Association of Business Press; International Academy of Sciences, Education, Industry and Arts (USA). Published since 1994. Distributed in NIS, EU and USA.

EDITOR IN CHIEF
Nicholas Pirtskhalaishvili

SCIENTIFIC EDITOR
Elene Giorgadze

DEPUTY CHIEF EDITOR
Nino Mikaberidze

SCIENTIFIC EDITORIAL COUNCIL
Zurab Vadachkoria - Head of Editorial council
Michael Bakhmutsky (USA), Alexander Gënning (Germany),
Amiran Gamkrelidze (Georgia), David Elua (USA),
Konstantin Kipiani (Georgia), Giorgi Kamkamidze (Georgia), Paata Kurtanidze (Georgia),
Vakhtang Maskhulia (Georgia), Tengiz Riznis (USA), Revaz Sepiashvili (Georgia)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD
Konstantin Kipiani - Head of Editorial board
Archimandrite Adam - Vakhtang Akhaladze, Amiran Antadze, Nelly Antelava,
Tengiz Asatiani, Gia Beradze, Rima Beriashvili, Leo Bokeria, Kakhaber Chelidze,
Tinatin Chikovani, Archil Chkhotua, Lia Dvaladze, Tamar Doliashvili, Ketevan Ebralidze,
Otar Gerzmava, Liana Gogiashvili, Nodar Gogebashvili, Nicholas Gongadze,
Rudolf Hohenfellner, Zurab Kevanishvili, Ramaz Khetsuriani, Guram Kiknadze,
Dimitri Kordzaia, Irina Kvachadze, Nana Kvirkvelia, Teymuraz Lezhava, Nodar Lomidze, Marina Mamaladze, Gianluigi Melotti, Kharaman Pagava, Mamuka Pirtskhalaishvili,
Anna Rekhviashvili, Maka Sologhashvili, Ramaz Shengelia, Tamar Zerekidze, Manana Zhvania

CONTACT ADDRESS IN TBILISI

GMN Editorial Board
7 Asatiani Street, 4th Floor
Tbilisi, Georgia 0177

Phone: 995 (32) 254-24-91
995 (32) 253-70-58
Fax: 995 (32) 253-70-58

CONTACT ADDRESS IN NEW YORK

NINITEX INTERNATIONAL, INC.
3 PINE DRIVE SOUTH
ROSLYN, NY 11576 U.S.A.

Phone: +1 (917) 327-7732

WEBSITE
www.geomednews.org

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ!

При направлении статьи в редакцию необходимо соблюдать следующие правила:

1. Статья должна быть представлена в двух экземплярах, на русском или английском языках, напечатанная через **полтора интервала на одной стороне стандартного листа с шириной левого поля в три сантиметра**. Используемый компьютерный шрифт для текста на русском и английском языках - **Times New Roman** (**Кириллица**), для текста на грузинском языке следует использовать **AcadNusx.** Размер шрифта - **12**. К рукописи, напечатанной на компьютере, должен быть приложен CD со статьей.

2. Размер статьи должен быть не менее десяти и не более двадцати страниц машинописи, включая указатель литературы и резюме на английском, русском и грузинском языках.

3. В статье должны быть освещены актуальность данного материала, методы и результаты исследования и их обсуждение.

При представлении в печать научных экспериментальных работ авторы должны указывать вид и количество экспериментальных животных, применявшиеся методы обезболивания и усыпления (в ходе острых опытов).

4. К статье должны быть приложены краткое (на полстраницы) резюме на английском, русском и грузинском языках (включающее следующие разделы: цель исследования, материал и методы, результаты и заключение) и список ключевых слов (key words).

5. Таблицы необходимо представлять в печатной форме. Фотокопии не принимаются. **Все цифровые, итоговые и процентные данные в таблицах должны соответствовать таковым в тексте статьи**. Таблицы и графики должны быть озаглавлены.

6. Фотографии должны быть контрастными, фотокопии с рентгенограмм - в позитивном изображении. Рисунки, чертежи и диаграммы следует озаглавить, пронумеровать и вставить в соответствующее место текста **в tiff формате**.

В подписях к микрофотографиям следует указывать степень увеличения через окуляр или объектив и метод окраски или импрегнации срезов.

7. Фамилии отечественных авторов приводятся в оригинальной транскрипции.

8. При оформлении и направлении статей в журнал МНГ просим авторов соблюдать правила, изложенные в «Единых требованиях к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», принятых Международным комитетом редакторов медицинских журналов - http://www.spinesurgery.ru/files/publish.pdf и http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
В конце каждой оригинальной статьи приводится библиографический список. В список литературы включаются все материалы, на которые имеются ссылки в тексте. Список составляется в алфавитном порядке и нумеруется. Литературный источник приводится на языке оригинала. В списке литературы сначала приводятся работы, написанные знаками грузинского алфавита, затем кириллицей и латиницей. Ссылки на цитируемые работы в тексте статьи даются в квадратных скобках в виде номера, соответствующего номеру данной работы в списке литературы. Большинство цитированных источников должны быть за последние 5-7 лет.

9. Для получения права на публикацию статья должна иметь от руководителя работы или учреждения визу и сопроводительное отношение, написанные или напечатанные на бланке и заверенные подписью и печатью.

10. В конце статьи должны быть подписи всех авторов, полностью приведены их фамилии, имена и отчества, указаны служебный и домашний номера телефонов и адреса или иные координаты. Количество авторов (соавторов) не должно превышать пяти человек.

11. Редакция оставляет за собой право сокращать и исправлять статьи. Корректура авторам не высылается, вся работа и сверка проводится по авторскому оригиналу.

12. Недопустимо направление в редакцию работ, представленных к печати в иных издательствах или опубликованных в других изданиях.

При нарушении указанных правил статьи не рассматриваются.

REQUIREMENTS

Please note, materials submitted to the Editorial Office Staff are supposed to meet the following requirements:

1. Articles must be provided with a double copy, in English or Russian languages and typed or compu-ter-printed on a single side of standard typing paper, with the left margin of **3** centimeters width, and **1.5** spacing between the lines, typeface - **Times New Roman** (**Cyrillic**), print size - **12** (referring to Georgian and Russian materials). With computer-printed texts please enclose a CD carrying the same file titled with Latin symbols.

2. Size of the article, including index and resume in English, Russian and Georgian languages must be at least 10 pages and not exceed the limit of 20 pages of typed or computer-printed text.

3. Submitted material must include a coverage of a topical subject, research methods, results, and review.

Authors of the scientific-research works must indicate the number of experimental biological species drawn in, list the employed methods of anesthetization and soporific means used during acute tests.

4. Articles must have a short (half page) abstract in English, Russian and Georgian (including the following sections: aim of study, material and methods, results and conclusions) and a list of key words.

5. Tables must be presented in an original typed or computer-printed form, instead of a photocopied version. **Numbers, totals, percentile data on the tables must coincide with those in the texts of the articles.** Tables and graphs must be headed.

6. Photographs are required to be contrasted and must be submitted with doubles. Please number each photograph with a pencil on its back, indicate author's name, title of the article (short version), and mark out its top and bottom parts. Drawings must be accurate, drafts and diagrams drawn in Indian ink (or black ink). Photocopies of the X-ray photographs must be presented in a positive image in **tiff format**.

Accurately numbered subtitles for each illustration must be listed on a separate sheet of paper. In the subtitles for the microphotographs please indicate the ocular and objective lens magnification power, method of coloring or impregnation of the microscopic sections (preparations).

7. Please indicate last names, first and middle initials of the native authors, present names and initials of the foreign authors in the transcription of the original language, enclose in parenthesis corresponding number under which the author is listed in the reference materials.

8. Please follow guidance offered to authors by The International Committee of Medical Journal Editors guidance in its Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals publication available online at: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
http://www.icmje.org/urm_full.pdf
In GMN style for each work cited in the text, a bibliographic reference is given, and this is located at the end of the article under the title "References". All references cited in the text must be listed. The list of references should be arranged alphabetically and then numbered. References are numbered in the text [numbers in square brackets] and in the reference list and numbers are repeated throughout the text as needed. The bibliographic description is given in the language of publication (citations in Georgian script are followed by Cyrillic and Latin).

9. To obtain the rights of publication articles must be accompanied by a visa from the project instructor or the establishment, where the work has been performed, and a reference letter, both written or typed on a special signed form, certified by a stamp or a seal.

10. Articles must be signed by all of the authors at the end, and they must be provided with a list of full names, office and home phone numbers and addresses or other non-office locations where the authors could be reached. The number of the authors (co-authors) must not exceed the limit of 5 people.

11. Editorial Staff reserves the rights to cut down in size and correct the articles. Proof-sheets are not sent out to the authors. The entire editorial and collation work is performed according to the author's original text.

12. Sending in the works that have already been assigned to the press by other Editorial Staffs or have been printed by other publishers is not permissible.

Articles that Fail to Meet the Aforementioned Requirements are not Assigned to be Reviewed.

ავტორთა საყურადღებოდ!

რედაქციაში სტატიის წარმოდგენისას საჭიროა დავიცვათ შემდეგი წესები:

1. სტატია უნდა წარმოადგინოთ 2 ცალად, რუსულ ან ინგლისურ ენებზე,დაბეჭდილი სტანდარტული ფურცლის 1 გვერდზე, 3 სმ სიგანის მარცხენა ველისა და სტრიქონებს შორის 1,5 ინტერვალის დაცვით. გამოყენებული კომპიუტერული შრიფტი რუსულ და ინგლისურენოვან ტექსტებში - **Times New Roman (Кириллица)**, ხოლო ქართულენოვან ტექსტში საჭიროა გამოვიყენოთ **AcadNusx.** შრიფტის ზომა – 12. სტატიას თან უნდა ახლდეს CD სტატიით.

2. სტატიის მოცულობა არ უნდა შეადგენდეს 10 გვერდზე ნაკლებს და 20 გვერდზე მეტს ლიტერატურის სიის და რეზიუმეების (ინგლისურ, რუსულ და ქართულ ენებზე) ჩათვლით.

3. სტატიაში საჭიროა გაშუქდეს: საკითხის აქტუალობა; კვლევის მიზანი; საკვლევი მასალა და გამოყენებული მეთოდები; მიღებული შედეგები და მათი განსჯა. ექსპერიმენტული ხასიათის სტატიების წარმოდგენისას ავტორებმა უნდა მიუთითონ საექსპერიმენტო ცხოველების სახეობა და რაოდენობა; გაუტკივარებისა და დაძინების მეთოდები (მწვავე ცდების პირობებში).

4. სტატიას თან უნდა ახლდეს რეზიუმე ინგლისურ, რუსულ და ქართულ ენებზე არანაკლებ ნახევარი გვერდის მოცულობისა (სათაურის, ავტორების, დაწესებულების მითითებით და უნდა შეიცავდეს შემდეგ განყოფილებებს: მიზანი, მასალა და მეთოდები, შედეგები და დასკვნები; ტექსტუალური ნაწილი არ უნდა იყოს 15 სტრიქონზე ნაკლები) და საკვანძო სიტყვების ჩამონათვალი (key words).

5. ცხრილები საჭიროა წარმოადგინოთ ნაბეჭდი სახით. ყველა ციფრული, შემაჯამებელი და პროცენტული მონაცემები უნდა შეესაბამებოდეს ტექსტში მოყვანილს.

6. ფოტოსურათები უნდა იყოს კონტრასტული; სურათები, ნახაზები, დიაგრამები - დასათაურებული, დანომრილი და სათანადო ადგილას ჩასმული. რენტგენოგრამების ფოტოასლები წარმოადგინეთ პოზიტიური გამოსახულებით **tiff** ფორმატში. მიკროფოტოსურათების წარწერებში საჭიროა მიუთითოთ ოკულარის ან ობიექტივის საშუალებით გადიდების ხარისხი, ანათალების შეღებვის ან იმპრეგნაციის მეთოდი და აღნიშნოთ სურათის ზედა და ქვედა ნაწილები.

7. სამამულო ავტორების გვარები სტატიაში აღინიშნება ინიციალების თანდართვით, უცხოურისა – უცხოური ტრანსკრიპციით.

8. სტატიას თან უნდა ახლდეს ავტორის მიერ გამოყენებული სამამულო და უცხოური შრომების ბიბლიოგრაფიული სია (ბოლო 5-8 წლის სიღრმით). ანბანური წყობით წარმოდგენილ ბიბლიოგრაფიულ სიაში მიუთითეთ ჯერ სამამულო, შემდეგ უცხოელი ავტორები (გვარი, ინიციალები, სტატიის სათაური, ჟურნალის დასახელება, გამოცემის ადგილი, წელი, ჟურნალის №, პირველი და ბოლო გვერდები). მონოგრაფიის შემთხვევაში მიუთითეთ გამოცემის წელი, ადგილი და გვერდების საერთო რაოდენობა. ტექსტში კვადრატულ ფჩხილებში უნდა მიუთითოთ ავტორის შესაბამისი N ლიტერატურის სიის მიხედვით. მიზანშეწონილია, რომ ციტირებული წყაროების უმეტესი ნაწილი იყოს 5-6 წლის სიღრმის.

9. სტატიას თან უნდა ახლდეს: ა) დაწესებულების ან სამეცნიერო ხელმძღვანელის წარდგინება, დამოწმებული ხელმოწერითა და ბეჭდით; ბ) დარგის სპეციალისტის დამოწმებული რეცენზია, რომელშიც მითითებული იქნება საკითხის აქტუალობა, მასალის საკმაობა, მეთოდის სანდოობა, შედეგების სამეცნიერო-პრაქტიკული მნიშვნელობა.

10. სტატიის ბოლოს საჭიროა ყველა ავტორის ხელმოწერა, რომელთა რაოდენობა არ უნდა აღემატებოდეს 5-ს.

11. რედაქცია იტოვებს უფლებას შეასწოროს სტატია. ტექსტზე მუშაობა და შეჯერება ხდება საავტორო ორიგინალის მიხედვით.

12. დაუშვებელია რედაქციაში ისეთი სტატიის წარდგენა, რომელიც დასაბეჭდად წარდგენილი იყო სხვა რედაქციაში ან გამოქვეყნებული იყო სხვა გამოცემებში.

აღნიშნული წესების დარღვევის შემთხვევაში სტატიები არ განიხილება.

Содержание:

Taner Demirci, Hasret Cengiz, Sedat Cetin, Ceyhun Varim, Gizem Karatas Kılıçcıoğlu
MYELOLIPOMA COEXISTENCE WITH GLUCOCORTICOID AND ANDROGEN SECRETING
ADRENOCORTICAL CARCINOMA: SLOW AND BENIGN CLINICAL COURSE.....7

Русин В.И., Русин В.В., Горленко Ф.В., Добош В.М., Лопит М.М.
ИЗОЛИРОВАННАЯ ПРОФУНДОПЛАСТИКА (ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ ВЫБОР).....11

Зубач О.Б., Григорьева Н.В., Поворознюк В.В.
10-ЛЕТНЯЯ ЛЕТАЛЬНОСТЬ У ПАЦИЕНТОВ
ПОСЛЕ ПЕРЕЛОМОВ ПРОКСИМАЛЬНОГО ОТДЕЛА БЕДРЕННОЙ КОСТИ.....19

Zenaishvili M., Japaridze Sh., Tushishvili A., Davitashvili O., Kevanishvili Z.
STUTTERING: INITIATING FACTORS, EVOLUTION, HEALING PERSPECTIVES.....23

Hirna H., Kostyshyn I., Rozhko M., Levandovskyi R., Nakashidze G.
ANALYSIS OF IMMUNE CHANGES AND THEIR ROLE
IN THE DEVELOPMENT OF ORAL AND OROPHARYNGEAL CANCER 29

Tsitadze T., Puturidze S., Lomidze T., Margvelashvili V., Kalandadze M.
PREVALENCE AND RISK-FACTORS OF BRUXISM IN CHILDREN
AND ADOLESCENT POPULATION AND ITS IMPACT ON QUALITY OF LIFE (REVIEW).....36

Solovyeva Z., Zaporozhskaya-Abramova E., Adamchik A., Gushchin A., Risovanniy S., Manukyan I.
COMPARATIVE EVALUATION OF THE CLINICAL EFFICACY OF MODERN REMINERALIZING DRUGS
IN THE TREATMENT OF ENAMEL CARIES (FOCAL DEMINERALIZATION) 39

Bakradze A., Vadachkoria Z., Kvachadze I.
ELECTROPHYSIOLOGICAL CORRELATES OF MASTICATORY MUSCLES
IN NASAL AND ORONASAL BREATHING MODES 45

Borysenko A., Timokhina T., Kononova O.
INDICATORS OF LOCAL IMMUNITY IN THE COMORBID COURSE
OF CARIES AND GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE.....48

Dolidze K., Margvelashvili V., Nikolaishvili M., Suladze T., Pkhaladze M.
STUDY OF THE HYGIENIC CHARACTERISTICS OF THE ORAL CAVITY UNDER
THE COMPLEX EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY
AND TSKALTUBO SPRING WATER RADON HORMESIS.....54

Танская О.А., Островский Ю.П., Курлянская Е.К., Валентюкевич А.В., Колядко М.Г.
ОСНОВНЫЕ КРИТЕРИИ ОТБОРА ПАЦИЕНТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ
ЛИСТА ОЖИДАНИЯ НА ТРАНСПЛАНТАЦИЮ СЕРДЦА 60

Yelshibayeva E., Dautov T., Rakhimzhanova R., Gutberlet M., Mardenkyzy D., Kozhakhmetova Zh., Saduakasova A.
COMPUTED TOMOGRAPHY IN DETECTING FEATURES OF CORONARY ATHEROSCLEROSIS
IN DIFFERENT ETHNIC GROUPS OF KAZAKHSTAN POPULATION.....68

Podzolkov V., Safronova T., Nebieridze N., Loriya I., Cherepanov A.
TRANSFORMING GROWTH FACTOR AND ARTERIAL STIFFNESS
IN PATIENTS WITH UNCONTROLLED ARTERIAL HYPERTENSION 77

Gvasalia T., Kvachadze I., Giorgobiani T.
SENSITIVITY TO MECHANICAL PAIN BASED ON SATIETY LEVELS IN WOMEN.....83

Povoroznyuk V., Nishkumay O., Lazarieva K., Lazariev P.
FEATURES OF BONE METABOLISM AND THEIR INFLUENCE ON ARTERIAL WALL STIFFNESS
IN POSTMENOPAUSAL WOMEN WITH CONTROLLED UNCOMPLICATED HYPERTENSION 87

Solomonia N., Vacharadze K., Mgvdeladze G.
CHARACTERISTICS OF DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS IN GEORGIA (2015-2020).....93

Abramidze T., Gotua M., Bochorishvili E., Melikidze N., Gamkrelidze A.
CYPRESS POLLEN SESITIZATION IN GEORGIA: CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS 101

Притыко Н.Г., Коваленко О.Е.
ОСОБЕННОСТИ МОЗГОВОЙ ГЕМОДИНАМИКИ У ПАЦИЕНТОВ
С СИНДРОМОМ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ВЕНОЗНОЙ ДИСФУНКЦИИ
И РАЗНЫМ УРОВНЕМ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ 107

Chorna V., Makhniuk V., Pshuk N., Gumeniuk N., Shevchuk Yu., Khliestova S.
BURNOUT IN MENTAL HEALTH PROFESSIONALS AND THE MEASURES TO PREVENT IT 113

Ratiani L., Gegechkory S., Machavariani K., Shotadze T., Sanikidze T., Intskirveli N.
THE PECULIARITY OF COVID-19 GENOME AND THE CORONAVIRUS RNA TRANSLATION
PROCESS AS A POTENTIAL TARGET FOR ETIOTROPIC MEDICATIONS WITH ADENINE
AND OTHER NUCLEOTIDE ANALOGUES (REVIEW) 119

**Patarashvili L., Azmaipharashvili E., Jandieri K., Gvidiani S., Tsomaia K.,
Kikalishvili L., Sareli M., Chanukvadze I., Kordzaia D.**
LIVER EXTRACELLULAR MATRIX PECULIARITIES IN MAMMALS AND AVIANS 124

Tsomaia K., Azmaipharashvili E., Gvidiani S., Bebiashvili I., Gusev S., Kordzaia D.
STRUCTURAL CHANGES IN RATS' LIVER DURING
THE FIRST 2 WEEKS FOLLOWING 2/3 PARTIAL HEPATECTOMY 134

Gvianishvili T., Kakauridze N., Gogiashvili L., Tsagareli Z., Kurtanidze T.
CORRELATION OF THYROID AUTOIMMUNITY WITH ATHEROSCLEROSIS EVALUATION
IN HASHIMOTO'S THYROIDITIS 142

Kiknadze T., Tevdorashvili G., Muzashvili T., Gachechiladze M., Burkadze G.
PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF RELAPSED LEIOMYOMA AND SMOOTH MUSCLE TUMORS
OF UNCERTAIN MALIGNANCY POTENTIAL IN REPRODUCTIVE WOMEN 150

Pkhakadze G., Bokhua Z., Asatiani T., Muzashvili T., Burkadze G.
STEM CELL INDEX IN THE PROGRESSION
OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA 157

Pidlisetskyy A., Savosko S., Dolhopolov O., Makarenko O.
PERIPHERAL NERVE LESIONS AFTER A MECHANICALLY INDUCED LIMB ISCHEMIA 165

Kolisnyk I., Voloshin O., Savchenko I., Yanchevskyi O., Rashidi B.
ENZYMATIC ACTIVITY IN MICROSOMES, LIPID PEROXIDATION
OF MICE HEPATOCYTES UNDER THE SODIUM FLUORIDE 169

Smagulova A., Katokhin A., Mambetpayeva B., Kulmaganbetova N., Kiyan V.
A MULTIPLEX PCR ASSAY FOR THE DIFFERENTIAL DETECTION
OF OPISTHORCHIS FELINEUS AND METORCHIS BILIS 176

Rigvava S., Karumidze N., Kusradze I., Dvalidze T., Tatrishvili N., Goderdzishvili M.
BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES
AGAINST STREPTOCOCCUS AGALACTIAE 182

Deshko L., Udovenko Zh., Bulycheva N., Galagan V., Bulychev A.
PROVISION OF THE RIGHT TO NON-INTERFERENCE WITH PRIVACY DURING MUSTER PROCESS
WITH THE PARTICIPATION OF DOCTOR (FORENSIC EXPERT) 186

Теремецкий В.И., Николаенко Т.Н., Дидковская Г.В., Гмырин А.А., Шаповал Т.Б.
КОНТРОЛЬ И НАДЗОР КАК СРЕДСТВА ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ
И ВЫЯВЛЕНИЯ ПРАВОНАРУШЕНИЙ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ 192

ერთხელ 60 დღის განმავლობაში დოზებით 1/10, 1/100 და 1/1000 $ დლ_{50}$, რაც შეადგენდა 20 მგ/კგ, 2 მგ/კგ და 0,2 მგ/კგ მასაზე. საკონტროლო ჯგუფის ვირთაგვები (n=10) იღებდნენ სასმელ წყალს. ვირთაგვები, ნატრიუმის ფთორიდის დოზის მიხედვით, დაიყო ჯგუფებად, თითოეულში – 10 ცხოველი; მაჩვენებლების შეფასება ხორციელდებოდა მე-10, მე-20, 30-ე, 50-ე და მე-60 დღეს. თავისუფალრადიკალური პროცესების ინდუცირება ნატრიუმის ფთორიდით დასტურდებოდა სისხლის შრატის ქემილუმინესცენტური რეაქციით, დიენური კონიუგატების რაოდენობა ღვიძლის ქსოვილის ჰომოგენატებში შეფასდა სპექტროფოტომეტრულად, ხოლო თიობარბიტურატმჟავას რეაქტანტებისა - მალონური დიალდეჰიდის და თიობარბიტურატმჟავას რეაქციით. დადგენილია მაჩვენებლის მომატება დოზის 1/10 და 1/100 $ დლ_{50}$ შემთხვევაში ლუმინესცენციის ინტენსივობის 30-ე დღეს და მისი შემცირება მე-60 დღეს, NAD(P)-ის H-ცოტოქრომის და რედუქტაზას მომატება ღვიძლის მიკროსომულ ფრაქციაში კვლევის დასაწყისში და თანდათანობთი შემცირება 50-ე და მე-60 დღეს ორივე დოზის გამოყენების შემთხვევაში. თიობარბიტურატმჟავას რეაქტანტების დიენური კონიუგატების შემთხვევაში ექსპერიმენტის ყველა ვადაზე აღინიშნა მატების ტენდენცია. ციტოქრომ-P-450 და ციტოქრომ-b5 მომატებული იყო 30-ე დღემდე და შემდეგ თანდათანობით მცირდებოდა 60-ე დღემდე. ნატრიუმის ფთორიდის ხანგრძლივმა შეყვანამ შესაძლოა გამოიწვიოს ტოქსიკური პროდუქტების წარმოქმნა და ჰეპატოციტების მიკროსომული მემბრანის ფერმენტული აქტივობის შემცირება.

A MULTIPLEX PCR ASSAY FOR THE DIFFERENTIAL DETECTION OF *OPISTHORCHIS FELINEUS* AND *METORCHIS BILIS*

[1]Smagulova A., [2]Katokhin A., [3]Mambetpayeva B., [3]Kulmaganbetova N., [1]Kiyan V.

[1]Research Platform of Agricultural Biotechnology, S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Nur-Sultan, Kazakhstan;
[2]Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;
[3]Astana Medical University, Nur-Sultan, Kazakhstan

Trematodes are parasites that have caused severe damage to human health since antiquity [1]. There are more than 91 species that infect humans and belong to 46 genera all over the world. According to their habitat in definitive hosts, they are classified as blood flukes, liver flukes, lung flukes, throat fluke, pancreatic fluke, and intestinal flukes [2]. Liver flukes belong to the family of *Opisthorchiidae* include 33 genera cause opisthorchiasisin piscivorous mammals, birds, and humans [3]. Human populations show high levels of infection with the main three liver fluke species within each of their distributional ranges [2]. Up to 680 million people worldwide are at risk of infection [4]. Recent estimates indicate that 45 million people living in Asia and Europe are infected, with approximately 35 million *C. sinensis* cases, 10 million *O. viverrini* cases, and 1.2 million cases of *O. felineus* [5-7]. The pathogen *M. bilis*, which occurs in the same territory as *O. felineus*, has attracted particular attention. It is widely registered in Russia and Kazakhstan, and there are several cases of mixed infections in humans and animals [8-13].

A variety of methods have been established for the effective diagnosis of opisthorchiasis infection, which include antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [14-16] and various other polymerase chain reaction (PCR) technologies [17-19]. ELISA kits available on the market are not capable of the failure of *O. felineus* and *M. bilis* species detection in opisthorchiasis infection what is one of the major deficiencies. There are no commercially available molecular diagnostic kits for the simultaneous detection of mixed infections by *O. felineus* and *M. bilis*. Therefore, there is no clear understanding of the distribution of each of these species, their localization in the definitive host and approaches to treatment. The aim of this study was, therefore, to establish a multiplex PCR assay for the differential detection of *O. felineus* and *M. bilis* in clinical specimens, which will be necessary for the epidemiology, diagnoses, and control of trematodes infections.The advantage of this method of molecular diagnostics is the high specificity of the reaction, the speed of the results obtained, and the possibility of differential diagnosis of two types of pathogens.

Material and methods. *Samples collection and DNA extraction*

Samples of adult worms of *O. felineus* and *M. bilis* were collected from the artificially infected Syrian hamsters (Akmola region) and infected foxes (Karaganda region) in the territory of Kazakhstan. Genomic DNAs were extracted from adult parasites using the BioSilica DNA extraction kit (Novosibirsk, Russia), according to the manufacturer's instructions. Duodenal bile and feces samples of humans suspected of contracting infectious diseases were kindly provided by Astana Infectious Diseases Hospital, Kazakhstan, in compliance with patient confidentiality, and stored at −80°C until DNA extraction. Sample preparation was carried out according to the method of Duenngai K. et al.: a sample (feces - 500 mg, bile - 0.5 ml) is mixed with 4 ml of physiological saline and 0.4 ml of ethyl acetate, centrifuged at 4000 rpm for 10 min, followed by removal of the supernatant [20]. Genomic DNA was extracted from bile and feces samples using a method recommended by Duenngai K. et al. with some modification. The amount and purity of the extracted DNA could be determined by measuring absorption at 260 nm and 280 nm in the NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). DNA was dissolved in ddH_2O and stored at – 70°C.

Standard PCR. Fragments of co1 gene were amplified using primer pair (*OpiOpe2-co1F* 5'-TGGGGAGTTGATTTTTT-GATGTT-3' / *COI-uniRv* 5'-AGCAATAACAAATCAAGTAT-CATG-3') for both opisthorchiids in order to reveal species-specific nucleotide substitutions. The PCR product was sequenced and deposited in GenBank (MT325502 - MT325505).

Species-specific primer design. Based on the *COX1* sequences, genome DNA from *O. felineus* and *M. bilis* were designed the multiplex PCR primers by targeting conserved sequences flanking variable regions with online free available primer programs PerlPrimer v1.1.21 (http://perlprimer.sourceforge.net) and Oligo Analyzer 1.2 software (http://www.genelink.com). Details of primer pairs are presented in Table 1.

Table 1.Forward and reverse primers used in the multiplex PCR for O. felineus and M. bilis

Species	Primers	Sequences 5′-3′	Products (bp)
O. felineus	*CO1nOf-F*: *CO1nOf-R*:	5′-TTGGAATGATTAGTCATGTTTGTACG-3′ 5′-CCCCACCTATAGTAAAAAGCACTAT-3′	307
M. bilis	*COInMb-F*:*COInMb-R*:	5′-TGTTAATATTGCCGGGGTTTG-3′ 5′-TTTATCCCAGTAGGAACACCTATAAC-3′	252

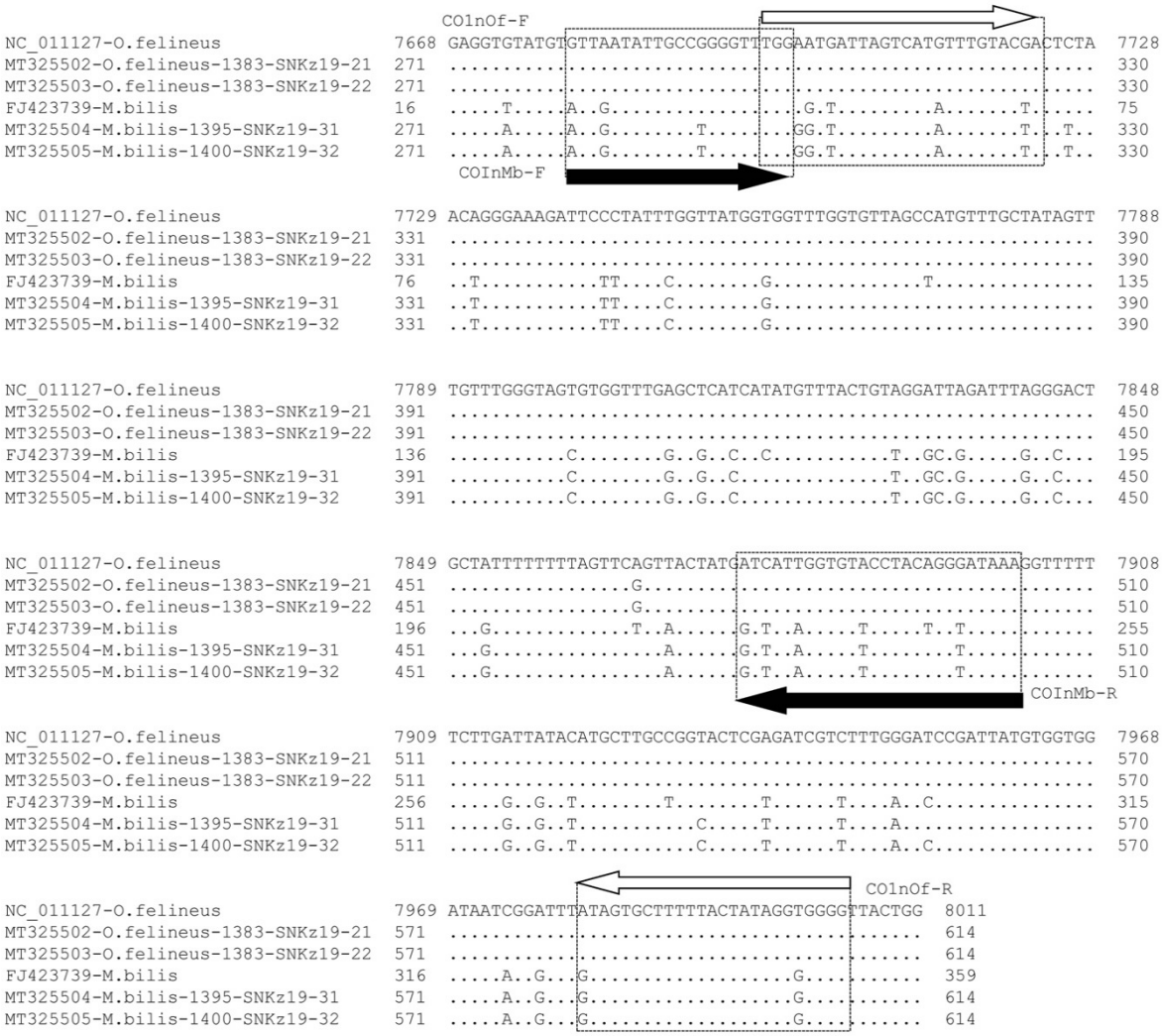

Fig. 1. COX1 fragments alignment used for primers design

Separated PCR and the standard conditions. The PCR parameters were optimized, and the reaction was carried out in a final reaction volume of 25µl containing 1× Hot Start PCR Buffer (20 mM KCl, 5 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM Tris-HCl, pH 8.3), 2.5 mM $MgCl_2$ and 1 U Maxima Hot Start Taq polymerase (Thermo Scientific, USA), 2 mM of dNTP, 100 pmol of each *COX1* primer (*CO1nOf-F/R* or *COInMb-F/R*) and 30 ng extracted trematode DNA. In order to detect potential contamination, a PCR mixture with RNA/DNA-free water was regularly used as a negative control. PCR was performed as follows: denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles with 30 s denaturation at 95°C,primer annealing at 59°C for 40 s, and extension at 72°C for 50 s with a final extension during 5 min at 72°C; and amplification products were stored at 4°C until they were visualized. PCR products (7µl) were visualized by electrophoresis in 1.5% agarose gels that were pre-stained with ethidium bromide (EB) and viewed under UV light (VilberLourmat UV-Transilluminator + with Bio-Capt software). The electrophoretic buffer solution was 1×TAE buffer.

Optimization of multiplex PCR primers. Optimization of the primer combinations was based on the specificity of the work of primers with DNA pathogens. The amplification of the conserved region of the partial *COX1* gene of *O. felineus* and *M. bilis* using 100 pmol of each specific primer pair (*CO1nOf-F/R* and *COInMb-F/R* primers) was carried out in a 25 µl reaction volume as described above. To examine specificity, the primers were tested together and separately with both DNA from *O. felineus* and *M. bilis*.

Optimization of multiplex PCR conditions. The multiplex PCR reaction is affected by many factors. In order to obtain the best reaction parameters, the multiplex PCR was optimized by varying single parameters while other parameters were maintained. Therefore, the parameters of the PCR assay were optimized by the varying temperature of primers annealing (56, 58, 60, 62, 64, 66°C), the concentration of dNTPs (0.05-0.5 mM) and Taq DNA polymerase

(1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 5.0 U) in a 25-µl reaction volume. A mixture of the genomic DNA, which contained the same amount of genomic DNA of the two types of parasites, was used as a template to amplify the corresponding target genes. The total volume of each reaction system was 25 µl, which included 1 µl of template DNA (about 15 ng of genomic DNA). PCR was performed as follows: denaturation at 95°C for 5 min, followed by 25-40 cycles with 15 s denaturation at 95°C, primer annealing at 62°C for 25 s, and extension at 72°C for 30 s with a final extension during 5 min at 72°C. After the reaction, 7 µl of the reaction solution was mixed with 7 µl of loading buffer for 1.5% agarose gel electrophoresis.

The sensitivity of the multiplex PCR assay. The sensitivity of the multiplex PCR assay was evaluated using a tenfold serial dilution method. The limit of the multiplex PCR assay detected DNA was verified using serial dilutions of mix genomic DNA of each parasite in nuclease-free water, and the final DNA concentration for each parasite in a 25µl reaction system was 10 ng/µl, 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, respectively.

The specificity of the multiplex PCR assay. The specificity of the multiplex PCR was verified using genomic DNAs of other common worms (*Taenia spp.*, *Toxocara spp.* and *Trichinella spp.*) inhabiting the intestine of human and genomic DNAs of main bacteria (*E. coli*, *Pseudomonas spp.* and *Bacillus spp.*) found in the contents of the gallbladder.

Multiplex PCR for the detection of parasites from naturally infected samples. The Multiplex PCR was verified using genomic DNAs from human feces and bile as templates. Clinical samples were collected from the humans suspected of contracting infectious diseases that were kindly provided by Astana Infectious Diseases Hospital, Kazakhstan. The multiplex PCR assay was carried out in a final reaction mixture of 25µl, containing 2µl templates, 4µl optimal primers with 0.5µl from each forward and reverse primer (*CO1nOf-F/R* or *COInMb-F/R*), and 1 µl Maxima Hot Start Taq polymerase (Thermo Scientific, USA), followed by thermal cycling conditions and visualization process mentioned above.

The biosafety ethics for this research was approved by the Animal Ethics Committee of Veterinary Medicine Faculty of KATU (Ethical approval letter, No. 1, 09.11.2017), before commencing the project.

Results and discussion. The amplification of the genome DNA from *O. felineus* and *M. bilis* produced products of 709 bp length. The fragments ~ 345 bp were subjected to sequence analysis to design species-specific primers (Fig. 1).

Four species-specific primers produced the DNA fragments of 307 bp *(O. felineus*) or 252 bp *(M. bilis*) in PCR analysis as expected (Fig. 2).

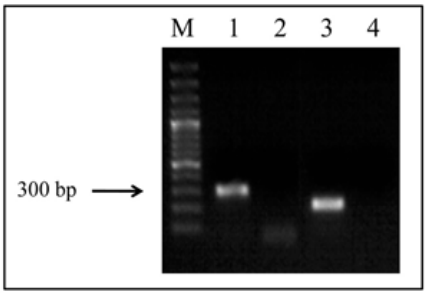

Fig. 2. Electrophoregram of a single PCR under standard conditions: Lane M, DNA ladder (bp); lane 1, O. felineus; lane 3, M. bilis; lane 2, 4, negative control

The multiplex PCR products of mixed templates of the two parasites are shown in Fig. 3. The product containing two DNA bands (307 and 252 bp) was amplified with mixed DNA templates of *O. felineus*/*M. bilis* and each specific primer pair (*CO1nOf-F/R* and *COInMb-F/R*). The results showed that the optimal annealing temperature of the multiplex PCR reaction was 60 to 62°C (Fig. 4), while the optimal dNTP and Taq Polymerase concentrations were 0.3 mM (Fig. 5) and 1.5 U (data not shown), respectively. The number of cycles largely determines the required total duration of the multiplex PCR assay. The optimal number of multiplex PCR cycles was 35, which is the standard number in this reaction (Fig. 6). In addition, the concentrations of each pair of primers were optimized, and the results showed that the optimal concentration of each pair of oligonucleotide primers was 0.1 µM (data not shown).

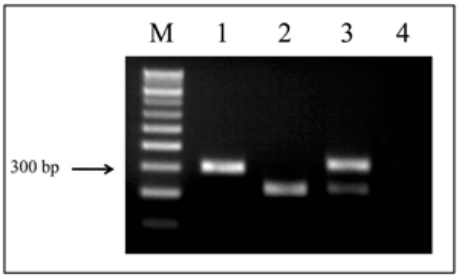

Fig. 3.Electrophoregram of multiplex PCR with both DNA from O. felineus and M. bilis: Lane M, DNA ladder (bp); lane 1, CO1nOf-F/R primers; lane 2, COInMb-F/R primers; lane 3, CO1nOf-F/R and COInMb-F/R primers; lane 4, negative control

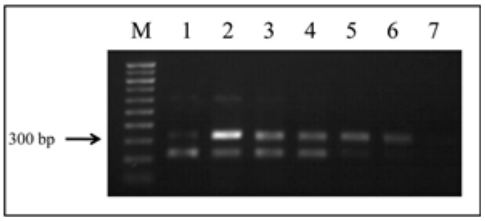

Fig. 4. Electrophoregram of multiplex PCR products in optimization of varying temperature of primers annealing conditions: Lane M, DNA ladder (bp); lane 1, 56°C; lane 2, 58°C; lane 3, 60°C; lane 4, 62°C; lane 5, 64°C; lane 6, 66°C; lane 7, negative control

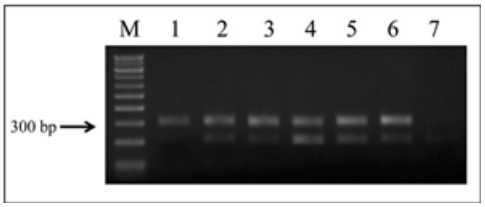

Fig. 5. Electrophoregram of multiplex PCR products in optimization concentration of dNTPs conditions: Lane M, DNA ladder (bp); lane 1, 0.05 mM; lane 2, 0.1 mM; lane 3, 0.2 mM; lane 4, 0.3 mM; lane 5, 0.4 mM; lane 6, 0.5 mM; lane 7, negative control

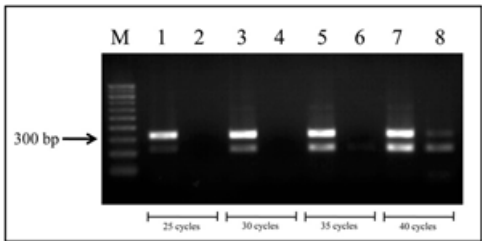

Fig. 6. Electrophoregram of multiplex PCR products in cycles optimization conditions: Lane M, DNA ladder (bp); lane 1, 3, 5, 7, positive control; lane 2, 4, 6, 8, negative control

The sensitivity of the proposed multiplex PCR assay was defined as the minimum DNA molecule concentration, which could be detected. DNA standards, which were diluted from 10 ng to 1 pg, were used for the multiplex PCR. As shown in Fig. 7, the detection limit of the multiplex PCR for *O. felineus* and *M. bilis* was 100 pg, respectively.

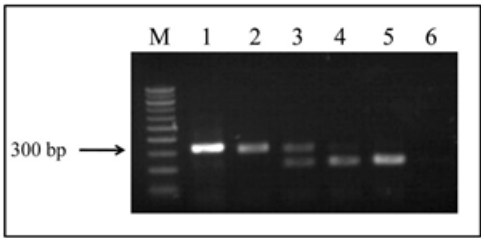

Fig. 7. Determination of the sensitivity of the multiplex PCR. Lane M, DNA ladder (bp); lanes 1-5, the concentration of each O. felineus/M. bilisDNA were 10 ng/1 pg, 1 ng/10 pg, 100 pg/100 pg, 10 pg/1 ng, 1 pg/10 ng, respectively; lane 6, negative control

In order to confirm the specificity of the multiplex PCR developed in this study, the genomes of three species of parasites (including *Taenia spp.*, *Toxocara spp.* and *Trichinella spp.*) and three bacteria (*E. coli*, *Pseudomonas spp.* and *Bacillus spp.*) were selected as the DNA template for reaction under optimized conditions (Fig. 8). The multiplex PCR test was performed with the genomes of *O. felineus* and *M. bilis* as the template DNA, which served as a positive control.

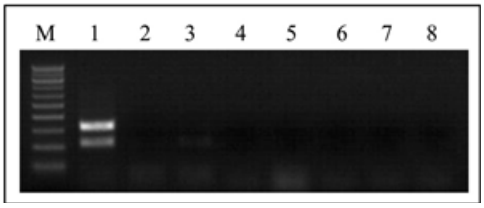

Fig. 8. Test for specificity of the multiplex PCR assay: Lane M, DNA ladder (bp); lane 1, positive control; lane 2, negative control; lane 3, Taenia spp.; lane 4, Toxocara spp.; lane 5, Trichinella spp.; lane 6, E. coli; lane 7, Pseudomonas spp.; lane 8, Bacillus spp

By developed multiplex PCR assay, a total of 9 feces and 2 human bile samples were tested. Four feces samples tested positive with a fragment size of about 252 bp identified as *M. bilis* infection (Fig. 9). One feces sample showed a double band with a fragment size of about 252 and 307 bp featuring a mix of *O. felineus* and *M. bilis* infection. Four feces samples showed a negative result. Two bile samples showed also showed a double band pointing to a mixed of *O. felineus* and *M. bilis* infection.

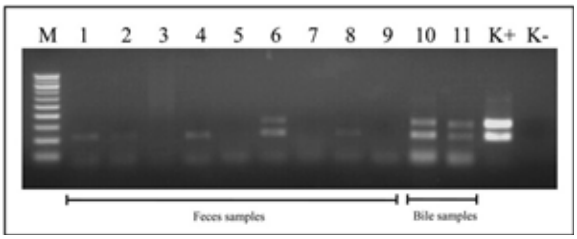

Fig. 9. The PCR results of DNA sample from human feces and bile: Lane M, DNA ladder (bp); lane 1-9, feces samples; lane 9, 10, bile samples; lane K+, positive control; lane K-, negative control

Currently, fecal examination for the detection of parasite eggs and serological studies by ELISA are the main methods for the detection of opisthorchiasis infection. However, these methods of diagnosing have some drawbacks. There are very laborious and fail to accurately distinguish the species of the pathogen [14,21-24].

Molecular methods can be an alternative to the existing methods because they have a high sensitivity and specificity, cheapness during mass screening, as well as the ability to determine the species affiliation at any life stage of the parasite. It is crucial for the sanitary-epidemiological and environmental monitoring. Primer specificity is a critical determinant of the success of a multiplex PCR assay. Pauly A. et al. reported the use of the part of the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene for specific detection of adult specimens of the opisthorchiid liver fluke species *O. felineus* and *M. bilis* [17]. Kang S. et al. developed a fast and accurate molecular identification system for human-associated liver fluke species (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felineus*, and *Clonorchis sinensis*) using the PCR-RFLP analysis of the *18S-ITS1-5.8S* nuclear ribosomal DNA region [19]. Brusentsov I. et al. developed multiplex polymerase chain analysis for identification of the ribosomal RNA gene cluster fragment incorporating internal transcribed spacer 2 (*ITS2*) of differentiates parasitic diseases induced by *O. felineus* and *M. bills* [18]. These are all examples of the possible use of PCR methods for the precise identification of parasites, but the methods have not been further developed, have not been commercialized, and have not yet found their practical application.

Mitochondrial genes are amongst the most popular molecular markers that have been widely used in molecular diagnoses of parasitic organisms [17,25,26]. Therefore, we explored the *COX1* genes as molecular markers to develop a multiplex PCR assay for the differential detection of *O. felineus* and *M. bilis* in clinical specimens (Fig. 1). In this study, we developed a multiplex assay that is sensitive to discriminate and diagnose two trematode parasites (*O. felineus* and *M. bilis*) simultaneously in a single reaction compare to the conventional PCR method. The specificity analysis showed that no cross-reactivity was observed between each other (Fig. 3), as well as with other worms inhabiting the small intestine [27] and main bacterial strains found in various pathologies in the bile [28] (Fig. 8).

In most cases, the sensitivity of a multiplex PCR assay will be reduced with increased numbers of target genes in the system. However, the minimum detected DNA of the proposed multiplex PCR assay was 100 pg, low enough to produce results in case of low DNA yield, which is in agreement with the results of previous studies.

For optimization of the multiplex PCR assay, varying temperature of primers annealing, the concentrations of dNTPs and Taq DNA polymerase, and, as well as the optimal number of multiplex PCR cycles, were optimized in this study. The concentrations of the primer pairs for *O. felineus* and *M. bilis* were set at 0.1 μM, and the specificity was judged as appropriate. Experimentally established that the optimal annealing temperature of the multiplex PCR reaction was 60 to 62°C, so in further experiments, we used a temperature of 62°C. dNTPs are raw materials for the synthesis of target fragments. In this study, the target fragments were all 559 bp, but two were synthesized. Therefore, under consideration of obtained results, we recommend a dNTP concentration of 0.3 mM to amplify the corresponding target fragments. Based

on experimental results and cost, the optimal concentration of Taq DNA polymerase was recommending 1.5 U per reaction. The optimal number of multiplex PCR cycles was 35, which allowed producing the required number of amplicons for good visualization of the result in the agarose gel and to avoid a false-positive result.

In addition, to determine whether the multiplex PCR assay was appropriate for the detection of pathogens in clinical samples, 9 feces and 2 human bile samples were tested. The results showed that two pathogens (*O. felineus* and *M. bilis*) were detected in the 1 stool sample and 2 bile samples with the proposed multiplex PCR assay. 4 stool samples showed the presence of the *M. bilis* pathogen. 4 stool samples showed a negative result. Accordingly, the present results indicated that the assay could be used in clinical investigation.

Conclusion. In conclusion, the multiplex PCR assay is an efficient tool for the detection, and simultaneous diagnosis of *O. felineus* and *M. bilis* trematodes from clinical specimens, the lowest limit of detectable DNA was 100 pg for two parasites. The developed method of molecular diagnostics will be used to study the spread of the O. felineus and M. bilis pathogens in humans and animals on the territory of the Republic of Kazakhstan and their role in the etiology of opisthorchiasis infection. Consequently, this essay will be potentially useful in epidemiological studies, diagnosis, and treatment of opisthorchiasis infections.

Acknowledgements. The authors are grateful to Igor Golubyatnikov (Nur-Sultan, Kazakhstan) for his technical support and software for molecular-genetic equipment and MadinaAitmagambetova (S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Nur-Sultan, Kazakhstan) for her technical support in DNA isolation. This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, grant numbers AP05131132, 2018–2020.

REFERENCES

1. Yeh HY, Mitchell PD. Ancient Human Parasites in Ethnic Chinese Populations. Korean J Parasitol.2016;54(5):565-72. https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.5.565
2. Chai JY, Jung BK. Epidemiology of Trematode Infections: An Update. Adv Exp Med Biol.2019;1154: 359-409. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18616-6_12
3. Kaewkes S. Taxonomy and biology of liver flukes. Acta Trop.2003;88(3):177-86. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.05.001
4. Keiser J, Utzinger J. Emerging foodborne trematodiasis. Emerg Infect Dis.2005;11(10): 1507-14. https://doi.org/10.3201/eid1110.050614
5. WHO. Control of food borne trematode infections. Report of a WHO study group. World Health OrganTech Rep Ser.1995;849:92-3.
6. Chai JY. Chapter 8. Epidemiology of trematode infections. In: R. Toledo, B. Fried (Eds.).Digenetic Trematodes. Adv Exp Med Biol.2014;766: 241-92.
7. Fedorova OS, Fedotova MM, Sokolova TS, Golovach EA, Kovshirina YV, Ageeva TS, Kovshirina AE, Kobyakova OS, Ogorodova LM, Odermatt P. Opisthorchis felineus infection prevalence in Western Siberia: A review of Russian literature. Acta Trop.2018;178:196-204. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.018
8. Mordvinov VA, Yurlova NI, Ogorodova LM, Katokhin AV. Opisthorchis felineus and Metorchisbilis are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia. ParasitolInt.2012;61(1):25-31.https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.07.021
9. Ushakov AV, Fattakhov RG, Stepanova TF. Infestation of fishes of the family Cyprinidae in the foci of trematodes of the ecosystem of the Belaya River (the Republic of Bashkortostan). Med Parazitol (Mosk).2017;1(1):20-4.
10. Kuznetsova VG, NaumovVA, Belov GF. Methorchiasis in the residents of Novosibirsk area, Russia. Cytobios.2000;102:33-4.
11. Fedorov KP, Naumov VA, Kuznetsova VG, Belov GF.Some real problems of human opisthorchiasis. MedParazitol (Mosk).2002;3:7-9.
12. Sultanov A, Abdybekova A, Abdibaeva A, Shapiyeva Z, Yeshmuratov T, Torgerson PR. Epidemiology of fish-borne trematodiasis in Kazakhstan. Acta Trop.2014;138:60-6. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.030
13. Kiyan VS, Bulashev AK, Katokhin AV. Opisthorchis felineus and MetorchisbilisMetacercariae in Cyprinid Fish Leuciscusidus in Nura-Sarysu River, Kazakhstan. Korean J Parasitol.2018;56(3):267-74. https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.3.267
14. Nöckler K, Dell K, Schuster R, VoigtWP. Indirect ELISA for the detection of antibodies against Opisthorchis felineus (Rivolta, 1884) and Metorchisbilis (Braun, 1790) in foxes. Vet Parasitol.2003;110(3-4): 207-15. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00324-2
15. Amornpunt S, Sarasombath, S, Sirisinha S. Production and characterization of monoclonal antibodies against the excretory-secretory antigen of the liver fluke (Opisthorchis viverrini). Int J Parasitol.1991;21(4):421-8. https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90099-s
16. Wongratanacheewin S, Sermswan RW, Sirisinha S. Immunology and molecular biology of Opisthorchis viverrini infection. Acta Trop.2003;88(3):195-207. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.02.002
17. Pauly A, Schuster R, Steuber S. Molecular characterization and differentiation of opisthorchiid trematodes of the species Opisthorchis felineus (Rivolta, 1884) and Metorchisbilis (Braun, 1790) using polymerase chain reaction. Parasitol Res.2003;90(5):409-14.
18. Brusentsov II, Katokhin AV, Sakharovskaia ZV., Sazonov AE, Ogorodova LM, Fedorova OS, Kolchanov NA,Mordvinov VA. DNA diagnosis of mixed invasions of Opisthorchis felineus and Metorchisbilis by polymerase chain reaction. MedParazitol(Mosk).2010;2:10-3.
19. Kang S, Sultana T, Loktev VB, Wongratanacheewin S, SohnWM, Eom KS, Park JK. Molecular identification and phylogenetic analysis of nuclear rDNA sequences among three opisthorchid liver fluke species (Opisthorchiidae: Trematoda). ParasitolInt.2008;57(2):191-7.
20. Duenngai K, Sithithaworn P, Rudrappa UK, IddyaK, Laha T, Stensvold CR, Strandgaard H, Johansen MV. Improvement of PCR for Detection of Opisthorchis viverrini DNA in Human Stool Samples. Jclinic microbiol.2008;46(1):366-8. https://doi.org/10.1128/JCM.01323-07
21. Teimoori S, Arimatsu Y, Laha T, Kaewkes S, Sereerak P, Sripa M, Tangkawattana S, Brindley PJ, Sripa B. Chicken IgY-based coproantigen capture ELISA for diagnosis of human opisthorchiasis. Parasitol Int.2017;66:443-7. https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.10.011
22. Bulashev AK, BorovikovSN, Serikova SS, Suranshiev ZA, Kiyan VS, Eskendirova SZ. Development of an ELISA using anti-idiotypic antibody for diagnosis of opisthorchiasis. Fo-

lia Parasitol. (Praha) 2016;63:e025. https://doi.org/10.14411/fp.2016.025
23. Waikagul J, Dekumyoy P, Chaichana K, Thairungroje AM, Komalamisra C, Kitikoon V. Serodiagnosis of human opisthorchiasis using cocktail and electroeluted Bithynia snail antigens. Parasitol Int. 2002;51:237-47. https://doi.org/10.1016/s1383-5769(02)00013-2
24. Starkova TV, Poletaeva OG, Kovrova EA, Krasovskaia NN, Tkachenko TN, Masiago AV, Ofitserov VI, Tereshchenko AIu. The efficiency of the enzyme immunoassay test system opisthorchiasis-CIC-EIA-best to detect circulating immune complexes containing opisthorchis antigens in the serum of patients with opisthorchiasis. Med Parazitol (Mosk).2011;3:44-5.
25. Henegariu O,Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH,Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. Biotechniques 1997;23(3):504-11. https://doi.org/10.2144/97233rr01
26. Zhu GQ, LiL, Ohiolei JA, Wu YT, Li WH, Zhang NZ, Fu BQ, Yan HB, Jia WZ. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of Taenia hydatigena, T. multiceps, T. pisiformis, and Dipylidium caninum infections. BMC Infect Dis. 2019;19(1):854. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4512-3
27. Zolfaghari ER, Purmonen S, Sukura A, Parkkila S. Surveillance and diagnosis of zoonotic foodborne parasites. Food Sci Nutr. 2017;6(1):3-17. https://doi.org/10.1002/fsn3.530
28. Klabukov ID, LyundupAV, Dyuzheva TG, Tyakht AV. Biliary Microbiota and Bile Duct Diseases. Annals RusAcademy Medic Sci.2017;72(3):172-9.

SUMMARY

A MULTIPLEX PCR ASSAY FOR THE DIFFERENTIAL DETECTION OF *OPISTHORCHIS FELINEUS* AND *METORCHIS BILIS*

[1]Smagulova A., [2]Katokhin A., [3]Mambetpayeva B., [3]Kulmaganbetova N., [1]Kiyan V.

[1]Research Platform of Agricultural Biotechnology, S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Nur-Sultan, Kazakhstan; [2]Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia; [3]Astana Medical University, Nur-Sultan, Kazakhstan

Opisthorchis felineus and *Metorchis bilis* are two common small worms that parasitize in the gallbladder and bile ducts of the liver of humans and carnivores. These parasites have a severe impact on health and are considered pathogens of serious diseases worldwide, such as cholangiocarcinoma. However, there are still no commercially available molecular diagnostic kits capable of simultaneously detecting these parasites in humans. Therefore, the study aimed to develop a multiplex PCR analysis that will differentially determine these two opisthorchiasis infections in one reaction. Two specific primer pairs for a multiplex polymerase chain reaction (PCR) were designed based on corresponding mitochondrial genome sequences. The multiplex assay detection limit was assessed by serial dilutions of the genomic DNAs of trematode worms examined. Naturally, infected samples of human bile and feces were tested using the developed assay. A multiplex PCR assay was developed based on mitochondrial DNA that accurately and simultaneously identifies two trematode species in one reaction using specific fragment sizes of 307 and 252 bp for *O. felineus* and *M. bilis*, respectively. The optimal reaction conditions, specificity, and sensitivity of the multiplex PCR assay were investigated. The lowest DNA concentration detected was 100 pg for *M. bilis* and *O. felineus* in a 25µl reaction system. This study provides an efficient tool for the simultaneous detection of *O. felineus* and *M. bilis*. The proposed multiplex PCR assay will be potentially useful in epidemiological studies, diagnosis, and treatment of this mixed opisthorchiasis infection.

Keywords: *COX1*, *Metorchis bilis*, *Opisthorchis felineus*, multiplex PCR.

РЕЗЮМЕ

МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ ПЦР-АНАЛИЗ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ *OPISTHORCHIS FELINEUS* И *METORCHIS BILIS*

[1]Смагулова А.М., [2]Катохин А.В., [3]Мамбетпаева Б.С., [3]Кульмаганбетова Н.М., [1]Киян В.С.

[1]Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Исследовательская платформа сельскохозяйственной биотехнологии, Нур-Султан; [2]Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия; [3]Астанинский медицинский университет, Нур-Султан, Казахстан

Opisthorchis felineus и *Metorchis bilis* - два распространенных небольших червя, которые паразитируют в желчном пузыре и желчных протоках печени человека и плотоядных животных. Эти паразиты считаются возбудителями серьезных заболеваний, таких как холангиокарцинома. Однако по сей день не имеется коммерчески доступных наборов для молекулярной диагностики, способных одновременно обнаруживать этих паразитов у человека.

Целью исследования является разработка мультиплексного ПЦР-анализа, который позволит дифференцировать эти две описторхозные инфекции в одной реакции.

Разработаны две специфические пары праймеров для мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) на основе соответствующих последовательностей митохондриального генома. Предел обнаружения мультиплексного анализа оценивался путем серийных разведений геномной ДНК исследуемых трематод. Инфицированные образцы желчи и кала человека протестированы с помощью разработанного метода анализа. Мультиплексный ПЦР-анализ разработан на основе митохондриальной ДНК, которая точно и одновременно идентифицирует два вида трематод в одной реакции с использованием конкретных размеров фрагментов 307 и 252 п.н. для *O. felineus* и *M. bilis*, соответственно. Исследованы оптимальные условия реакции, специфичность и чувствительность мультиплексного ПЦР-анализа. Самая низкая обнаруженная концентрация ДНК составила 100 пг для *M. bilis* и *O. felineus* в 25 мкл реакционной системы. Проведенное исследование представляет собой эффективный инструмент для одновременного обнаружения *O. felineus* и *M. bilis*. Предлагаемый анализ мультиплексной ПЦР потенциально полезен в эпидемиологических исследованиях, диагностике и лечении смешанной описторхозной инфекции.

რეზიუმე

მულტიპლექსური პჯრ-ანალიზი *OPISTHORCHIS FELINEUS*-ის და *METORCHIS BILIS*-ის დიფერენციული აღმოჩენისათვის

[1]ა.სმაგულოვა, [2]ა.კატოხინი, [4]ბ.მამბეტპაევა, [4]ნ.კულმაგანბეტოვა, [1]ვ. კიანი

[1]ყაზახეთის ს.სეიფულინის სახ. აგროტექნიკური უნივერსიტეტი, სოფლის მეურნეობის ბიოტექნოლოგიის კვლევითი პლატფორმა, ნურ-სულტანი; [2]რუსეთის მეცნიერებათა აკადემიის ციმბირის განყოფილების ციტოლოგიისა და გენეტიკის ინსტიტუტი, ნოვოსიბირსკი, რუსეთის ფედერაცია; [3]ასტანას სამედიცინო უნივერსიტეტი, ნურ-სულტანი, ყაზახეთი

Opisthorchis felineus და *Metorchis bilis* – გავრცელებული მცირე ზომის ჭიებია, რომელიც პარაზიტობს ადამიანის და ძუძუმწოვარი ცხოველების ნაღვლის ბუშტში და ღვიძლის ნაღვლის სადინარებში. ეს პარაზიტები ითვლება სერიოზული დაავადებების გამომწვევებად, კერძოდ, ქოლანგიოკარცინომის. თუმცა, დღემდე არ მოიპოვება მოლეკულური დიაგნოსტიკის კომერციულად ხელმისაწვდომი ნაკრებები, რომელიც შესაძლებელს გახდიდა ამ პარაზიტების ერთდროულად აღმოჩენას ადამიანის ორგანიზმში.

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა მულტიპლექსური პჯრ-ანალიზის შემუშავება, რომელიც შესაძლებელს გახდის ამ ორი ოპისტორქოზული ინფექციის დიფერენცირებას ერთი რეაქციის ფარგლებში.

შესაბამისი მიტოქონდრიული გენომის თანმიმდევრობათა საფუძველზე შემუშავებულია პრაიმერების ორი სპეციფიკური წყვილი მულტიპლექსური პჯრ-სთის. მულტიპლექსური ანალიზის აღმოჩენის ზღვარი ფასდებოდა საკვლევი ტრემატოდების გენომური რნმ-ის სერიული განზავებით. ადამიანის ნაღვლის და განავალის იდენტიფიცირებული ნიმუშების ტესტირება განხორციელდა ანალიზის შემუშავებული მეთოდის გამოყენებით. მულტიპლექსური პჯრ-ანალიზი შემუშავებულია მიტოქონდრიული დნმ-ის საფუძველზე, რომელიც ზუსტად და ერთდროულად ახდენს ორივე სახის ტრემატოდის იდენტიფიცირებას ერთი რეაქციის ფარგლებში *O. feline*-ისა და *M. bili*-სთვის კონკრეტული ზომის ფრაგმენტების გამოყენებით, შესაბამისად, 307 და 252 პგ. შესწავლილია მულტიპლექსური პჯრ-ანალიზის რეაქციის ოპტიმალური პირობები, სპეციფიკურობა და მგრძნობელობა. დნმ-ის ყველაზე დაბალმა აღმოჩენილმა კონცენტრაციამ რეაქციული სისტემისათვის შეადგინა 100 პგ *M. bili*-სთვის და 25 მკლ *O. feline*-სათვის. აღწერილი კვლევა წარმოადგენს ეფექტურ ინსტრუმენტს *O. feline*-ის და *M. bili*-ის ერთდროული აღმოჩენისათვის. შემოთავაზებული მულტიპლექსური პჯრ-ანალიზი პოტენციურად სასარგებლოა შერეული ოპისტორქოზული ინფექციის ეპიდემიოლოგიური კვლევის, დიაგნოსტიკისა და მკურნალობისათვის.

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES AGAINST STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

[1,2]Rigvava S., [1,3]Karumidze N., [1,3]Kusradze I., [1]Dvalidze T., [1]Tatrishvili N., [1]Goderdzishvili M.

[1]G. Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology;
[2]Caucasus International University; [3]European University; Tbilisi, Georgia

Group B Streptococcus (GBS) or *Streptococcus agalactiae* is a Gram-positive, beta-hemolytic, catalase-negative, and facultative anaerobe coccus, which colonize the gastrointestinal and genitourinary tract [1]. GBS species are sub-classified into ten serotypes depending on the immunologic reactivity of their polysaccharide capsule [2]. *Streptococcus agalactiae* causes serious infection diseases and mostly affects immunocompromised patients with chronic diseases and newborns. Infants can be infected during birth from GBS carrier mother, either intra utero or during birth rupture of membranes, also through the inhalation or swallow of bacteria during the delivery [3]. Currently, available GBS prevention strategies which are given by CDC and its mandatory in Georgia as well will not prevent all cases of early-onset disease. *Streptococcus agalactiae* neonatal sepsis risk factors are bacterial colonization; premature birth, low weight, membrane rapture; high temperature during labor, long dry period, Urinary tract infection, etc. GBS can cause infections such as sepsis, pneumonia, and meningitis. A small number of newborns recovered from GBS infection have a long-term disability [3,4].

Antibiotics and especially Penicillin played important role in GBS prevention and treatment. But for treatment dramatically increase number of penicillin-allergic patients' antibiotic prophylaxis should be done very carefully and determine the penicillin-allergy status of all patients. Erythromycin, Vancomycin, and Clindamycin are recommended for penicillin-allergic individuals [5,6].

Uncontrolled use of antibiotics and increase number of antibiotic resistance strain renewed the interest of the modern world to the alternative antimicrobial agents as are Bacteriophages.