

Е.Н. Жиренкина,
младший научный сотрудник лаборатории
эпиднадзора за протозоозами отдела медицинской
протозоологии Института медицинской
протозоологии и тропической медицины
им. Е.И. Марциновского Первого Московского
государственного медицинского университета
им. И.М. Сеченова

E.N. Zhirenkina,
minor research fellow of the laboratory
of protozoiasis surveillance of the Department
of medical protozoology of the Institute of medical
protozoology and tropical medicine
named after E.I. Martsinovsky
(the First Sechenov MSU)

ИЗУЧЕНИЕ ЛЕЙШМАНИОЗОВ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

ИЗУЧЕНИЕ ЛЕЙШМАНИОЗОВ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Екатерина Николаевна Жиренкина, младший научный сотрудник лаборатории эпиднадзора за протозоозами отдела медицинской протозоологии

Адрес: 119830, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 20.

Телефон: +7(903)787-76-88

E-mail: snumb@mail.ru

Аннотация. Метод полимеразной цепной реакции широко применяется в изучении различных аспектов лейшманиозов. Для диагностики заболевания, скрининговых исследований и идентификации возбудителя возможно использовать различные биологические материалы. Видовая идентификация лейшманий важна не только для выбора препаратов для лечения, но и для эпидемиологических исследований, чтобы определить меры профилактики.

Annotation. The method of polymerase chain reaction is widely used in studying of various aspects of leishmaniasis. For the diagnosis of disease, screening research and identification of the causative agent a variety of biological materials may be used. The species identification of *Leishmania* is important not only for a choice of drugs for the treatment of disease, but for epidemiological studies, for identification of different ways of preventing it.

Ключевые слова. ПЦР, лейшманиоз, *Leishmania*, паразитарные заболевания.

Key words. PCR, leishmaniasis, *Leishmania*, parasitic diseases.

Лейшманиозы — трансмиссивные паразитарные болезни человека и животных, вызываемые простейшими рода *Leishmania*, которые передаются кровососущими двукрылыми насекомыми — москитами рода *Phlebotomus* в Старом Свете и москитами рода *Lutzomyia* в Новом Свете. Лейшманиозы широко распространены в тропическом, субтропическом и частично в умеренном поясах всех континентов, за исключением Австралии.

Риску заражения ежегодно подвергается около 350 млн человек. Лейшманиозы зарегистрированы в 88 странах, регулярные сообщения о случаях заболевания людей лейшманиозами поступают из 33 стран. Потенциально опасной по лейшманиозам территорией России является Северный Кавказ. В

настоящее время в России регистрируются только завозные случаи.

Лейшмании вызывают широкий спектр болезней, которые определяются видом паразита и статусом организма хозяина. Признаки лейшманиозов могут быть переменчивы, поэтому обнаружение и видовое определение паразита крайне важны для выбора лечения и для эпидемиологических исследований, чтобы определить меры профилактики, а также для установления сроков исчезновения паразитов при лечении [21]. Все виды *Leishmania*, патогенные для человека, морфологически практически не различимы и идентификация традиционным прямым обнаружением паразитов при микроскопировании или культивировании невозможна. Ча-

сто виды *Leishmania* идентифицируют на основании их географического распределения и клинических проявлений болезни. Однако географическое происхождение — неадекватный критерий в эндемичных областях, так же как в эндемичных областях, где циркулирует несколько видов *Leishmania*. Идентификация видов, основанная только на клинических симптомах, может быть проблематичной, так как несколько видов вызывают и кожную и кожно-слизистую болезнь (*L. braziliensis*, *L. aethiopica*), в то время как другие вызывают и висцеральную, и кожную болезнь (например, *L. donovani* комплекс), а также могут иметь сходные клинические проявления с другими заболеваниями.

Метод ПЦР применим для прямой диагностики и идентификации паразита различных клинических проявлений лейшманиоза. С 1989 г. опубликовано более 400 статей, посвященных диагностике лейшманиозов, в которых описаны протоколы исследований, строение генома лейшманий, результаты обследований [28].

Несмотря на многообещающие достоинства, применение ПЦР лимитировано укомплектованностью лаборатории, требуется специализированное оборудование на всех этапах — выделения ДНК, амплификации и обнаружения продукта реакции.

ПЦР диагностика может быть низкотехнологичной (минимум оборудования), средней (обычная ПЦР лаборатория — с большим набором лабораторного оборудования) и высокотехнологичной (ПЦР в реальном времени — продукты ПЦР анализируются во время их амплификации в закрытых пробирках, исключая контаминацию). Высокотехнологичные методики требуют одной единственной установки. Преимущество ПЦР «в реальном времени» — это быстрота и высокая пропускная способность, но такое оборудование сравнительно дорого и рабочие затраты остаются высокими [10].

Первоначально система видоидентификации с помощью ПЦР разрабатывалась на основе выявления видоспецифичной ДНК с праймерами, комплементарными этой ДНК, что предполагало предварительное клонирование и секвенирование ДНК. У разных праймеров разная специфичность, так как каждая пара праймеров направлена на разные последовательности, которых от 200–300 до 10^4 копий на клетку [21]. В очагах удобно собрать клинические образцы (красный костный мозг, лимфатические узлы, кровь и кожные соскобы на предметных стеклах, фильтровальной бумаге), они хорошо сохраняются и могут быть доставлены в диагностическую лабораторию [9, 33, 34].

Идентификация возбудителей лейшманиозов становится все более актуальной в связи с новыми аспектами их эпидемиологии и изменениями в паразитарных системах в результате антропогенной трансформации естественных биоценозов [2].

Развитие метода ПЦР идентификации привело к использованию универсальных праймеров, позволяющих без знания ДНК-последовательности амплифицировать повторяющиеся видоспецифичные последовательности ДНК [29]. Каждый вид лейшманий — *L. major*, *L. gerbilli*, *L. turanica* — характеризуется своим, качественно различным ПЦР-паттерном [1].

В настоящее время изоэнзимный анализ — «золотой стандарт» для дифференцирования видов *Leishmania*. Однако эта техника сложна, трудоемка, требует предшествующего культивирования в пробирке, и только некоторые лаборатории мира могут выполнить этот анализ. Широко используется система Монпелье (MON), которая основана на анализе 15 ферментов [31]. Система Лондонской школы гигиены и тропической медицины (LON) основана на анализе электрофоретической подвижности 13 ферментов [20]. Альтернативно используют метод мультилокусного микросателлитного типирования [16]. Используя панель из 14 микросателлитных маркеров, был проанализирован 141 штамм *L. infantum* из Испании, Португалии и Греции, из них 107 штаммов были определены как MON-1 [19]. В 2009 г. идентифицировали возбудителя от больных ВЛ из Узбекистана и Таджикистана как самостоятельный кластер MON-1 [5]. Восемь штаммов лейшманий, выделенных от собак в Узбекистане, были идентичны идентифицированным от людей в изучаемой области [18].

Непосредственно из клинических образцов возможно изолировать ДНК и идентифицировать, а также обнаружить популяционные отличия [12]. Положение на генетическом дереве 21 штамма *L. donovani* показало корреляцию между генотипами и географическим происхождением штаммов [34].

Метод ПЦР-RFLP внутренней транскрибируемой области (ITS) может обнаружить штаммовые специфичные вариации. У разных видов лейшманий наблюдаются различные уровни генетических вариаций (*L. tropica* > *L. aethiopica* > *L. major* > *L. donovani*) [37]. Лейшманий стремительно эволюционировали в ITS рибосомальных оперонах, которые разделялись генами, кодирующими ssu (малую субъединицу) рРНК и 5.8S рРНК (ITS1), 5.8S РНК и lsu (большую субъединицу) рРНК (ITS2). Размер полиморфных амплифицируемых ITS областей был определен у нескольких видов лейшманий. Наибольший продукт ≈ 1150 п.н. обнаружен у *L. major*, в то время как у комплексов *L. braziliensis* и *L. mexicana* наименьший ≈ 960 п.н. [23]. Последующий рестрикционный анализ амплифицируемых областей позволяет идентифицировать даже неизвестный изолят на уровне вида, обнаружить межвидовые различия. Таким способом обнаружили различия в ITS1 у 64 изолятов *L. donovani* из эндемичных очагов Судана [12]. Идентифицировали 29 штаммов «ком-

плекса *L. tropica*» из различных географических областей Старого Света [36].

Идентифицировали все виды *Leishmania* рестрикцией (с энзимом Hae III) продуктов амплификации ITS1, используя клинические образцы, а также коллекционные неокрашенные и окрашенные по Романовскому—Гимзе мазки [9, 33, 34, 35]. После этих публикаций провели подобные исследования с рядом модификаций [12].

В сложных, нетипичных случаях диагноз можно поставить только по данным ПЦР [8, 24]. ПЦР показала хорошие результаты диагностики лейшманиозов и у ВИЧ+-пациентов [13].

Применение ПЦР эффективно для выделенной ДНК из гистологических и постоянных препаратов на предметном стекле. Достоверность анализов не изменялась даже после нескольких лет коллекционирования, что имеет большое значение для ретроспективного изучения статистически значимых образцов [4].

Метод ПЦР показал хорошие результаты при сравнении разных методов диагностики: чувствительность микроскопии — от 55 до 90%; культурального метода — от 55 до 76%, серологических методов — от 63 до 85%, специфичность — 82,5–100%; чувствительность ПЦР — от 85,2 до 98,5%, специфичность — 100% [6, 11, 22, 26]. Разная чувствительность ПЦР объясняется несколькими факторами: применением разных праймеров, разными способами выделения ДНК (применение разнообразных коммерческих наборов разных производителей), материалом исследования.

Сбор периферической крови менее травматичен, чем получение пунктата костного мозга, селезенки или лимфатического узла, но паразиты в таком образце ниже, и кровь может содержать ингибиторы ПЦР [29]. Кровь, собранная из пальца, может использоваться для скрининговых исследований людей [23]. В Узбекистане подобное скрининговое исследование показало высокий процент (43,6%) ПЦР-положительных детей без клинических симптомов ВЛ [3].

Предел обнаружения ДНК *L. infantum* составляет 200 пг на реакцию. В образцах крови возможно обнаружить минимум 0,5 паразитов на реакцию [12]. В лаборатории ИМП и ТМ им. Е.И. Марциновского адаптирован режим реакции, позволяющий обнаружить ДНК одной клетки паразита в препарате [3].

В отношении бессимптомного лейшманиоза собак ПЦР является также перспективным методом [14]. При диагностике ВЛ у собак наблюдалась разная чувствительность образцов, собранных от одного животного [32]. Для скрининговых исследований собак более показательна ПЦР с пунктатом лимфатических узлов, чем с периферической кровью [27].

У собак ПЦР конъюнктивальной жидкости глаз показывает хорошую чувствительность (92%) и

специфичность (100%) в обнаружении ВЛ. Эти образцы легко собрать [26]. Паразиты могут достигнуть глаз только с кровеносным током — удивительно то, что только 17% образцов сыворотки крови в то же самое время были положительны [30].

Уровни зараженности москитов лейшманиями в очагах ВЛ очень низки (0,01–1%) даже в эндемичных областях. Методом ПЦР в москитах были идентифицированы следующие ДНК *Leishmania*: *L. major* в *P. papatasi* [25], *L. infantum* в *P. major* [7], *Ph. perfliewi* и *Ph. syriacus* [15] и *L. donovani* в *P. argenteipes* в Старом Свете; *L. mexicana* в *Lu. ayacuchensis* и *Lu. ovallesi*, *L. amazonensis* в *Lu. longipalpis*, *L. infantum chagasi* в *Lu. longipalpis* и *Lu. almerioi*, *L. peruviana* в *Lu. peruensis*, *L. (V). naiffi* в *Lu. tortura* и *L. (V). braziliensis* в *Lu. ovallesi*, *Lu. gomezi* и *Lu. neivai* в Новом Свете [17].

Дальнейшее развитие ПЦР должно быть направлено на упрощение в использовании и повышении рентабельности, особенно в отдаленных бедных районах, где лейшманиоз является эндемичным [28]. Главная проблема — стандартизация и оптимизация реакции [11]. Рекомендовано использовать контроль выделения, стандартный положительный контроль, внутренние лабораторные контроли, дублирование реакций и участие в программе внешнего контроля качества [28].

Наиболее перспективными направлениями в изучении лейшманиозов методом ПЦР являются следующие: совершенствование диагностики заболеваний, определение видовой принадлежности возбудителей, особенности эпидемиологии и эпизоотологии очагов, выявление возбудителей лейшманиозов в организме переносчиков — москитов, выявление механизмов устойчивости к лекарственным препаратам, разработка новых менее токсичных лекарственных препаратов для лечения и, возможно, химиопрофилактики.

Список литературы

1. Булат С.А., Стрелкова М.В., Сысоев В.В. Идентификация маркерных штаммов *Leishmania major*, *L. turanica*, *L. gerbilli* методом полимеразной цепной реакции с универсальным праймером // Мед. паразитол. и паразитар. болезни. — 1992. — № 1. — С. 21–22.
2. Гончаров Д.Б., Сафьянова В.М., Гибода М. и др. Анализ антигенной структуры мембранного комплекса лейшманий // Мед. паразитология и паразитар. болезни. — 1994. № 1. — С. 3–8.
3. Жиренкина Е.Н., Понировский Е.Н., Стрелкова М.В. и др. Особенности эпидемиологии висцерального лейшманиоза в Папском районе Наманганской области Узбекистана, выявленные при обследовании детей методом ПЦР // Мед. паразитология и паразитар. болезни. — 2011. — № 3. — С. 37–41.

4. Иванова Н.В., Морозов Е.Н., Кукина И.В. и др. Последовательность ITS1, 5.8S и ITS2 рДНК А-типа *Plasmodium vivax* и разработка метода ретроспективной ПЦР-диагностики малярии по окрашенным препаратам крови «Толстая капля» // Мол. биология. — 2001. — № 35. С. 515–525.
5. Alam V.Z., Kovalenko D.A., Kuhls K. et al. Identification of the agent causing visceral leishmaniasis in Uzbeki and Tajiki foci by analysing parasite DNA extracted from patients' Giemsa-stained tissue preparations // Parasitology. — 2009. — Vol. 136. — P. 981–986.
6. Antinori S., Calattini S., Longhi E. et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral Leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: A single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature // Clinical Infectious Diseases. — 2007. — Vol. 44. — P. 1602–1610.
7. Azizi K., Rassi Y., Javadian E. et al. First detection of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus* (Larroussius) major (Diptera: Psychodidae) from Iran // J. Med. Entomol. — 2008. — Vol. 45. — P. 726–731.
8. Casolari C., Guaraldi G., Pecorari M. et al. A rare case of localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in an immunocompetent Italian host // Eur. J. Epidemiol. — 2005. — Vol. 6. — P. 559–561.
9. Davila A.M., Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania* // Ann. Trop. Med. Parasitol. — 2002. — Vol. 94. — P. 651–654.
10. Deborggraeve S., Claes F., Laurent T. et al. Molecular dipstick test for diagnosis of sleeping sickness // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44. — P. 2884–2889.
11. Deborggraeve S., Laurent T., Espinosa D. et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of Leishmaniasis // The Journal of Infectious Diseases. — 2008. — Vol. 198. — P. 1565–1572.
12. El Tai N.O., Osman O.F., el Fari M. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. — 2000. — Vol. 94. — P. 575–579.
13. Gatti S., Gramegna M., Klersy C. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: The sensitivities and specificities of traditional methods and a nested PCR assay // Ann. Trop. Med. and Parasitol. — 2004. — Vol. 98(7). — P. 667–676.
14. Iniesta L., Fernandez-Barredo S., Bulle B. et al. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs // Clin. and Diagn. Lab. Immunol. — 2002. — Vol. 9(5). P. 1137–1141.
15. Jaffe C.L., Baneth G., Abdeen Z.A. et al. Leishmaniasis in Israel and the Palestinian Authority // Trends in Parasitology. — 2004. — Vol. 20(7). — P. 328–332.
16. Jamjoom M.B., Ashford R.W., Bates P.A. et al. Towards a standart battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex // Ann. Trop. Med. and Parasitol. — 2002. — Vol. 96(3). — P. 265–270.
17. Kato H., Gomez E.A., Cáceres A.G. et al. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis // Int. J. Environ. Res. Public Health. — 2010. — Vol. 7. — P. 814–826.
18. Kovalenko D., Razakov Sh., Ponirovsky E. et al. Canine leishmaniosis and its relationship to human visceral leishmaniasis in Eastern Uzbekistan // Parasites & Vectors. — 2011. — Vol. 4. — P. 58–63.
19. Kuhls K., Chicharro C., Cañavate C. et al. Differentiation and gene flow among european populations of *Leishmania infantum* MON-1 // PLoS. Negl. Trop. Dis. — Vol. 2(7).
20. Le Blancq S.M., Peters W. *Leishmania* in the Old World: 4. The distribution of *L. donovani* sensu lato zymodemes // Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. — 1986. — Vol. 80. — P. 367–377.
21. Marfurt J., Nasereddin A., Niederwieser I. et al. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis // Journal of clinical microbiology. — 2003. — Vol. 41(7). — P. 3147–3153.
22. Moaddeb A., Alborzi A., Behzad-Behbahani A. et al. Early diagnosis of visceral leishmaniasis by using polymerase chain reaction method on whole blood. Third World Congress on Leishmaniosis. Palermo-Terrasini Sicily, 2005.
23. Osman O.F., Oakam L., Zijlstra E.E. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis // J. Clin. Microbiol. — 1997. — Vol. 35. — P. 2454–2457.
24. Paradisi M., Grosso M.G., Angelo C. et al. Un caso di leishmaniosi lupoide in eta pediatrica diagnosticata mediante PCR // Minerva pediat. — 2001. — Vol. 53(1). — P. 33–37.
25. Parvizi P., Mauricio I., Aransay A.M. et al. First detection of *Leishmania major* in peridomestic *Phlebotomus papatasi* from Isfahan province, Iran: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA // Acta Trop. — 2005. Vol. 93. — P. 75–83.
26. Piarroux R., Gambarelli F., Dumon H. et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients // Journal of Clinical Microbiology. — 1994. — Vol. 32(3). — P. 746–749.
27. Reale S., Maxia L., Vitale F. et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37. P. 2931–2935.
28. Reithinger R. and Dujardin J.-C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications // Journal of Clinical Microbiology. — 2007. — Vol. 45(1). — P. 21–25.
29. Reithinger R., Quinnell R.J., Alexander B. and Davies C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR // Journal of Clinical Microbiology. — 2002. — Vol. 40(7). — P. 2352–2356.

30. *Reithinger R., Lambson B.E., Barker D.C. et al.* Leishmania (Viannia) spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*) // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* — 2002. Vol. 96. P. 76–78.
31. *Rioux J.A., Lanotte G., Serres E. et al.* Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification // *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* — 1990. — Vol. 65. — P. 111–125.
32. *Rodgers M.R., Stephen J. and Wirth D.F.* Amplification and diagnosis of leishmania // *Exp. Parasitol.* — 1990. — Vol. 71. — P. 267–275.
33. *Schonian G., Akuffo H., Lewin S. et al.* Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis // *Molecular and Biochemical Parasitology.* — 2000. — Vol. 106. — P. 239–248.
34. *Schonian G., El Fari M., Lewin S. et al.* Molecular epidemiology and population genetic in *Leishmania* // *Med. Microbiol. Immunol.* — 2001. — Vol. 190. — P. 61–63.
35. *Schönian G., Nasereddin A., Dinse N. et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* — 2003. — Vol. 47(1). — P. 349–358.
36. *Schonian G., Schnur L., El Fari M. et al.* Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* — 2001. — Vol. 195. — P. 217–224.
37. *Schonian G., Schweynoch C., Zlateva K. et al.* Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction // *Mol. Biochem. Parasitol.* — 1996. — Vol. 77. — P. 19–29.