

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

УДК-616.993.162-616-07

Сувонкулов У.Т.¹, Ачилова О.Д.¹, Муратов Т.И.¹, Tai Soon Yong², Myun-hee Yi², Ju Yeong Kim², Турицин В.С.³**ЭТИОЛОГИЯ КОЖНЫХ ЛЕЙШМАНИОЗОВ В ЭНДЕМИЧНЫХ РЕГИОНАХ УЗБЕКИСТАНА НА ПРИМЕРЕ ДЖИЗАКСКОЙ ОБЛАСТИ**¹ Научно-исследовательский институт медицинской паразитологии имени Л.М. Исаева, Минздрава Республики Узбекистан, 140105, г. Самарканд, ул. Исаева, д. 38;² Университет Ёнсе, 50 Yonsei-ro, Sinchon-dong, Seodaemun-gu, 220003-220980 Сеул, Южная Корея;³ Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, Минсельхоза России, 196601, г. Санкт-Петербург, Россия, Петербургское шоссе, д. 2

Учитывая высокую распространенность кожных лейшманиозов на территории Узбекистана, а также тенденцию роста встречаемости данного заболевания за последние 5 лет, важным и необходимым является определение видового состава лейшманий, а также их переносчиков и природных резервуаров. Согласно результатам молекулярно-биологической диагностики, приведенным в данной работе, в препаратах взятых из язв больных Джизакской области, ранее считавшейся эндемичной по антропонозному кожному лейшманиозу, было обнаружено наличие *L. major*, возбудителя зоонозного кожного лейшманиоза.

Ключевые слова: кожный лейшманиоз; зоонозный лейшманиоз; эндемичный; Джизакская область; ПЦР; диагностика.

Для цитирования: Сувонкулов У.Т., Ачилова О.Д., Муратов Т.И., Tai Soon Yong, Myun-hee Yi, Ju Yeong Kim, Турицин В.С. Этиология кожных лейшманиозов в эндемичных регионах Узбекистана на примере Джизакской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2019; 24(3): 123-127. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9529-2019-24-3-123-127>.

Suvonkulov U.T.¹, Achilova O.D.¹, Muratov T.I.¹, Tai Soon Yong², Myun-hee Yi², Ju Yeong Kim², Turicin V.S.³

ETIOLOGY OF SKIN LEISHMANIOSIS IN OF ENDEMIC REGIONS OF UZBEKISTAN ON THE EXAMPLE OF DZHIZAK REGION

¹ L.M. Isaev Research Institute of Medical Parasitology, Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, Samarkand, 38 Isaev St., 140105;² Yonsei University, 50 Yonsei-ro, Sinchon-dong, Seodaemun-gu, South Korea, 220003-220980 Seoul;³ St. Petersburg State Agrarian University; Ministry of Agriculture of Russia, Petersburg highway 2, 196601 St. Petersburg, Russia

Taking into account the high prevalence of cutaneous leishmaniasis in Uzbekistan, as well as the tendency of increase in the incidence of this disease over the past 5 years, important and necessary is to determine the species composition of leishmania, as well as their vectors and natural reservoirs. According to the results of molecular-biological diagnostics, carried out in present study, in samples taken from ulcers of patients from Jizzakh region, which previously considered endemic for anthroponotic cutaneous leishmaniasis, was detected *L. major*; the causative agent of zoonotic cutaneous leishmaniasis.

Key words: cutaneous leishmaniasis; zoonotic leishmaniasis; endemic; Jizzakh region; PCR; diagnostics.

For citation: Suvonkulov U.T., Achilova O.D., Muratov T.I., Tai Soon Yong, Myun-hee Yi, Ju Yeong Kim, Turicin V.S. Etiology of skin leishmaniasis in endemic regions of uzbekistan on the example of Dzhizak region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni* (Epidemiology and Infectious Diseases, Russian journal). 2019; 24(3):123-127. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9529-2019-24-3-123-127>.

For correspondence: Achilova Olesya Djurabaevna scientific researcher of the Isaev Research Institute of Medical Parasitology, Samarkand, Uzbekistan, e-mail: aleska-9090@inbox.ru

Information about authors:

Achilova O.D., <https://orcid.org/0000-0001-6045-2445>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study was supported by Grant of the Uzbek Research Grand (ПЗ-2017092381).

Received 26.08.2019

Accepted 30.09.2019

Лейшманиозы — это группа паразитарных природно-очаговых, преимущественно зоонозных, трансмиссивных заболеваний, распространенных в тропических и субтропических странах [1, 2].

В силу своих климато-географических условий Узбекистан является эндемичной территорией по

кожным лейшманиозам (антропонозному и зоонозному), а также по висцеральному лейшманиозу [7].

Кожные лейшманиозы (КЛ) наиболее распространены и часто регистрируются лечебно-профилактическими учреждениями (ЛПУ). Клиническая диагностика КЛ из-за сходства с другими кожными заболеваниями требует паразитологического подтверждения [4, 11]. Это обуславливает гипо- и позднюю диагностику учреждениями практического здравоохранения, поэтому офици-

Для корреспонденции: Ачилова Олеся Джурбаевна мл. науч. сотр. НИИ мед. паразитологии им.Л.М. Исаева, E-mail: aleska-9090@inbox.ru

альные данные зачастую не отражают истинной картины заболеваемости, особенно в регионах, ранее не считавшихся эндемичными.

Джизакская область всегда считалась эндемичной по антропонозному кожному лейшманиозу, вызываемому *Leishmania tropica* [6, 7]. Учитывая природно-климатические условия, Джизакская область относится к зоне с резко континентальным климатом, который характеризуется жарким летом, сухой и сравнительно мягкой зимой. Средняя температура в январе $+1^{\circ}\text{C}$, $+4^{\circ}\text{C}$, в июле $+26-28^{\circ}\text{C}$. За год выпадает до 400-500 мм осадков, вегетационный период длится 240-260 сут, относительная влажность составляет 78-80%, летом – 20-40%. Данные условия являются оптимальными для развития москитов рода *Phlebotomus* – переносчиков возбудителей лейшманиозов [5, 7, 9, 10]. В ходе ежегодных энтомологических работ, проводимых сотрудниками НИИ медицинской паразитологии им. Л.М. Исаева, наряду с *P. sergenti*, считающимся основным переносчиком АКЛ, в данном регионе встречаются также *P. papatasi* и *P. caucasicus*, которые служат переносчиками зоонозного КЛ.

“Золотым стандартом” установления диагноза лейшманиозов считается паразитологическая диагностика [3]. Однако морфологическое изображение амастиготных форм паразита не дает возможности дифференцировать антропонозный и зоонозный КЛ [11].

Определение видового состава лейшманий, а также их переносчиков и природных резервуаров являются одним из важнейших моментов для разработки научно-обоснованных рекомендаций комплексной борьбы и профилактики кожного лейшманиоза [4].

В настоящее время для видовой идентификации возбудителей лейшманиозов широко используются методы PCR, PCR-RFL а так же REAL-Time PCR. Исследования, проведенные в Иране и Турции, показали, что чувствительность метода ПЦР-RFLP составила 96% и превосходит традиционное микроскопическое исследование мазков (64%) [12, 13].

Цель нашей работы – провести молекулярно-биологическое исследование материала, полученного от больных КЛ из Джизакской области и установить видовую принадлежность возбудителей.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили мазки из язв больных из Джизакской области с предварительным диагнозом КЛ.

Мазки, полученные из язв пациентов, фиксировались на предметном стекле этанолом, окрашивались азуром II – зохином по Романовскому-Гимзе и микроскопировались с использованием иммерсионной системы. Параллельно собирались анамнестические и эпидемиологические данные, соглас-

но которым все пациенты были в возрасте до 14 лет и в течение последних 1,5 лет не выезжали в другие регионы республики.

Для ПЦР отбирались лишь те образцы, в которых микроскопически обнаруживались амастиготы лейшманий. Исследования проводились на базе НИИ медицинской паразитологии им. Л.М. Исаева (Узбекистан) при методической помощи коллег из Института Тропической медицины университета YONSEI (Республика Корея). При этом использовались как классический метод ПЦР (гель-электрофорез), так и Real-Time PCR. Далее продукты ПЦР были секвенированы для определения видовой принадлежности возбудителей.

Классический гель-электрофорезный ПЦР проводился при помощи термоциклера российского производства «ТЕРЦИК», который имеет 4 блока, это дает возможность амплифицировать одновременно 40 образцов. Для визуализации результатов использовалась 1% агароза-гель и столик УФЛ VILBER LOURMAT.

Real-Time PCR в свою очередь проводился на аппарате StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts) производство США.

Для молекулярно-биологических исследований использовали смыв с препаратов, содержащих амастиготы лейшманий. Соскобы получали путем предварительного замачивания препаратов в буфере для экстракции ДНК (TL), с дальнейшим отскабливанием с помощью скарификатора.

Экстракцию ДНК проводили с использованием коммерческого набора GeneAll Exgene Tissue (GeneAll Biotechnology Co. LTD, Korea), следуя протоколу, описанному производителем. Для исследования одного ДНК образца готовился MasterMix объемом 24 мкл. С этой целью в предварительно автоклавированную 1.5 мл пробирку вливали по 1 мкл прямого праймера (R-5'CCA CCC GGC CCT ATT TTA CAA CAA -3') и 1 мкл обратного праймера (F-5'CTT TTC TGG TCC TCC GGG TAG G-3'), 2,5 мкл 10*Taq буфера, 2,5 мкл dNTP буфера, 0,1 мкл Taq буфера, и 16,9 мкл дистиллированной воды. После чего центрифугировали при помощи Mini Spin Eppendorf в течении 1 мин. Затем в стиральные 0,2-мл пробирки для ПЦР распределили по 23 мкл уже приготовленного MasterMix и по 2 мкл экстрагированного ДНК образца.

Готовые пробирки с образцами помещали в термоциклер, где проводилась амплификация по следующей заданной программе (рис. 1).

Время амплификации на термоциклере занимает 73,5 мин. Для электрофореза использовали агарозогель и аппарат для электрофореза Helicon (пр-во Россия). Далее в каждую лунку агарозагеля помещали 8 мкл полученного ПЦР-продукта от каждого образца, предварительно смешивая его с

Температура, С°	Время
95	2 минуты
95	20 секунд
53	30 секунд
72	1 минута
72	6 минут
6	

Цикл 2-4 повторяются 37 раз

Рис. 1. Программа амплификации ДНК в термоцикле.

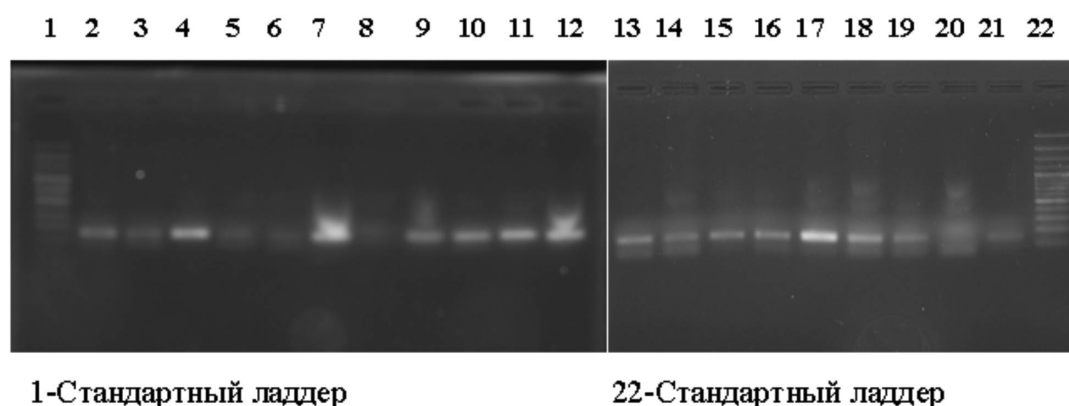


Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа материала от 20 пациентов с диагнозом «Кожный лейшманиоз».

2 мкл краски Loading dye. В первую лунку добавляли 3 мкл рUC 19 (стандартная краска). Разгонка осуществлялась в течение 25 мин при 150 V. По окончании электрофореза агарозагель помещали на источник УФ и фиксировали результаты.

Одновременно с классическим гель-электрофорезным методом ПЦР нами была проведена амплификация ДНК материала на аппарате StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) с использованием кит-наборов от компании Enzo Biochem Inc. (NY, USA) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификация производилась при 95 °C в течение 10 мин с последующими 40 циклами при 95 °C в течение 5 с, 53 °C в течение 8 с и 72 °C в течение 9 с с однократным получением флуоресценции в конце каждого этапа отжига. За усилением следовала программа плавления 95 °C в течение 20 с, 40 °C в течение 20 с, и окончательное повышение до 85 °C со скоростью 0,2 °C с непрерывным получением флуоресценции.

Результаты

В ходе микроскопического изучения мазков из язв 24 пациентов установлено, что амастиготные

формы лейшманий определялись в 20 препаратах. При этом отмечалась классическая картина – амастиготы находились как внутри макрофагов, так и внеклеточно. Число паразитов в препаратах было очень разным – от 5-6 пораженных клеток на весь препарат, до 1-2 клеток в 10 полях зрения.

Далее был проведен ПЦР-анализ положительных образцов по представленной выше методике. Результат исследования образцов представлен на рис. 2. В УФ диапазоне свечение фиксировалось в образцах № 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21, что доказывает наличие в них ДНК рода *Leishmania* (рис. 2).

В ходе анализа кривой плавления RT-PCR была выявлена закономерность, согласно которой результаты RT-PCR оказалось возможным сгруппировать в 3 группы (рис. 3, А). Первую группу составили 13 образцов (70%), в которых регистрировалась температура плавления $83,78 \pm 0,5$ °C (рис. 3, Б). Во вторую группу вошли 4 образца (20%) с температурой плавления $85,12 \pm 0,2$ °C (рис. 3, В). У третьей группы амплификация не выявила специфических маркеров к использованным праймерам.

В дальнейшем секвенировали 17 образцов. Данные секвенирования подтвердили выше при-

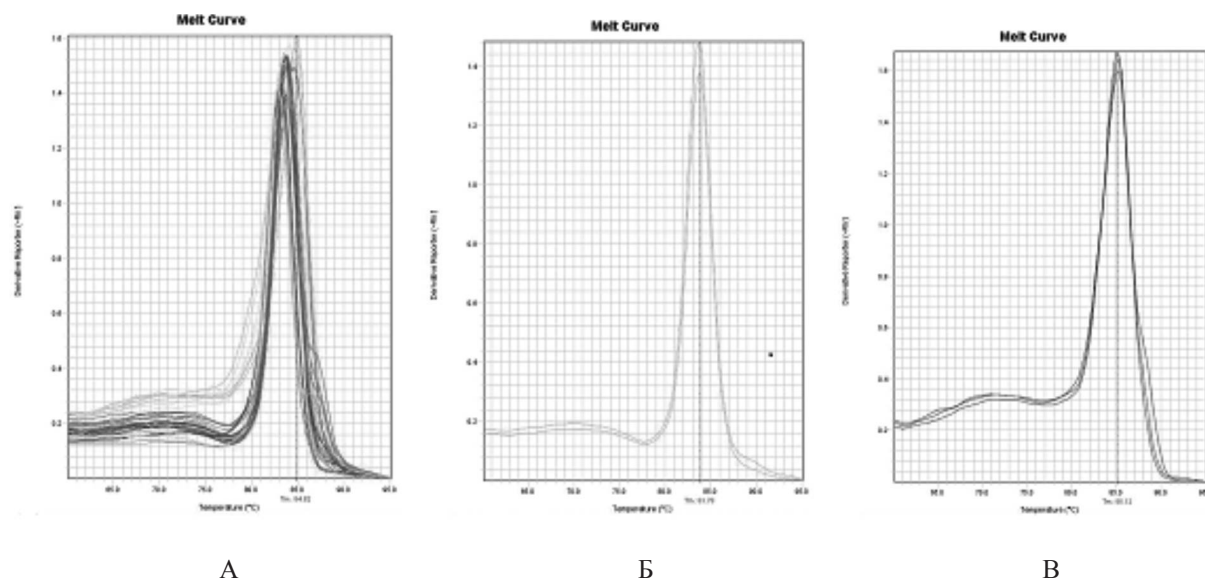


Рис. 3. Температурные кривые плавления ПЦР продуктов образцов ДНК лейшманий. А – температурные кривые всех исследованных образцов; Б – образцы с точкой плавления 83,78 °С, В- образцы с точкой плавления 85,12 °С.

веденные предположения. Так, нуклеотидные последовательности 13 образцов соответствовали *L. Major* (температура плавления – $83,78 \pm 0,5$ °С), а последовательности 4 образцов, в свою очередь – *L. Tropica* ($85,12 \pm 0,2$ °С).

Обсуждение

Таким образом молекулярно-биологический метод подтвердил наличие ДНК лейшманий в 17 образцах из 20. Разница в результатах может быть объяснена несколькими причинами. Наиболее вероятной из них является ошибка при микроскопической диагностике, когда за амастиготные формы лейшманий могли быть приняты грибки, артефакты и другие объекты, содержащиеся в отделяемом со дна язв нелейшманиозной этиологии. Так же не исключено, что содержание ДНК в исходном материале было недостаточным для проведения молекулярно-биологического анализа.

По результатам RT-PCR исследования можно предположить, что определенный вид лейшманий имеет специфичную видовую кривую плавления. Наличие данной закономерности позволит в будущем проводить диагностику видоспецифичности лейшманиозов при помощи RT-PCR без применения видоспецифичных праймеров, основываясь при этом только на показателях температуры плавления образцов.

Проведенные исследования, показали что, в Джизакской области, которая традиционно считалась эндемичной по антропонозному КЛ, также встречается возбудитель зоонозного КЛ- *L. tropica*.

При этом в исследованных нами образцах последний вид преобладает.

Учитывая отсутствие в данном регионе условий существования большой песчанки – основного резервуара зоонозного КЛ, необходимо установить роль других резервуарных хозяев в циркуляции возбудителя. Такими животными вполне могут оказаться суслики, которые в большом количестве встречаются в данном регионе не только в дикой природе, но и на территории населенных пунктов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Узбекского научно-исследовательского гранта (ПЗ-2017092381).

ЛИТЕРАТУРА

- Desjeux P. *Information on the epidemiology and control of the Leishmaniasis by country of territory*. WHO, 1991, Switerland, Geneva.
- Clem, Angela A: Current Perspective on Leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*. May2010, 2(2): 124-6.
- Chiodini P.L., Engback K., Hcuck C.C. Журнал «Медицина», «Основные методы лабораторной диагностики паразитарных болезней». Женева. ВОЗ. 1994.
- Дрынов И.Д., Сергиев В.П., Малышев Н.А. *Профилактика массовых инфекционных и паразитарных болезней человека медикаментозными средствами*. М., 1998.
- Артемьев М.М. *Классификация москитов (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae)*: Дис. д-ра биол. наук. М.; 1990.
- Понировский У.Н., Дарченкова Н.Н. *Аридные экосистемы*. 2005; 11(28): 39-50.
- Баранец М.С., Понировский Е.Н., Кадамов Д.С. Видовой состав и распространение москитов (*Diptera, Psychodidae, Phlebotominae*) Центральной Азии. *Мед. паразитол.* 2015; (4): 10-8.

8. Moncaz, Aviad. Breeding Sites of *Phlebotomus sergenti*, the Sand Fly Vector of Cutaneous Leishmaniasis in the Judean Desert. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Jul 2012; 6(7): e1725. doi: 10.1371/journal.pntd.0001725. Epub 2012 Jul 3.
9. Ajaoud, Malika, Es-Sette, Nargys *Phlebotomus sergenti* in a Cutaneous Leishmaniasis Focus in Azilal Province (High Atlas, Morocco): Molecular Detection and Genotyping of *Leishmania tropica*, and Feeding Behavior. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Mar 2015; 9(3): 1-17.
10. Долматова А.В. Об основных факторах, определяющих эпидемиологическое значение отдельных видов moskitov (*Phlebotominae*) в очагах лейшманиозов. *Мед. паразитол.* 1965; (3): 297-302.
11. Кишкун А.А. *Руководство по лабораторным методам исследования*. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2007.
12. Hajjarian H; Vasiqeh F, Mohebbi M., Rezaei S., Mamishi S., Charedar S. Direct diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. *Journal Of Clinical Laboratory Analysis*. 2011; 25(1): 20-4.
13. Akkafa F; Dilmec F., Alpua Z. Identification of *Leishmania* parasites in clinical samples obtained from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP technique in endemic region, Sanliurfa province, in Turkey. *Parasitology Research*. 2008 Aug; 103(3): 583-6.
14. Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 51: 229-42.
15. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 845-58.
16. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania* Mayor. *Ann Rev Immunol*. 1995; 13: 151-77.
17. Scott P, Artis D, Uzonna J, Zaph C. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunol Rev*. 2004; 201: 318-38.
18. Launois P, Louis JA, Milon G. The fate and persistence of *Leishmania major* in mice of different genetic backgrounds: an example of exploitation of the immune system by intracellular parasites. *Parasitology*. 1997; 115 Suppl: S25-S32.
19. Lazarski Ch.A., Ford J., Katzman Sh.D. et al. IL-4 attenuates Th1-associated chemokine expression and Th1 trafficking to inflamed tissues and limits pathogen clearance. *PloS One*. 2013; 8.
20. Schwarz T., Remet K., Nahrendorf W. et al. T-cell derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. *PLOS Pathog*. 2013; 9(56).
21. Neumayr A.L., Morizot G., Visser L.G. et al. Clinical aspects and management of cutaneous leishmaniasis in rheumatoid patients treated with TNF- α antagonists. *Travel Med. Infect. Dis*. 2013; 11(6): 412-20.

Поступила 26.08.2019

Принята в печать 30.09.2019