

А.Б. Рахматов, Ш.Ш. Ташпулатов, М.Д. Якубов, А.А. Абдурахимов
Республиканский специализированный научно-практический
медицинский центр дерматовенерологии и косметологии
Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, Ташкент

Клиническая ценность видовой идентификации лейшманий методом полимеразной цепной реакции

Кожный лейшманиоз — трансмиссивная болезнь, эндемичная в странах с теплым и жарким климатом. Рост заболеваемости, увеличение частоты осложнений, отсутствие современной диагностики обуславливают актуальность проблемы терапии данного заболевания. Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) — наиболее предпочтительный метод диагностики лейшманиоза, так как обычные методы (паразитологические) не являются достаточно чувствительными.

Цель работы — оценить использование ПЦР для диагностики видовой идентификации возбудителей кожного лейшманиоза.

Материалы и методы. Исходным материалом для генетического анализа служили соскобы из эпителиальной ткани кожи больного кожным лейшманиозом. Вначале выделяли ДНК лейшманий с определением концентрации и чистоты ДНК на флуорометре. Далее проводилась постановка аллельспецифической ПЦР для определения видовой специфичности лейшманий. Было проведено обследование 40 образцов биологического материала у больных кожным лейшманиозом, причем ПЦР проводилась в режиме реального времени (по 40 постановок на каждый вид лейшманий).

Результаты и обсуждение. Проведение ПЦР в режиме реального времени позволило во всех 40 образцах выделить *L. infantum*, в то время как *L. major* и *L. tropica* не регистрировались. Выделение *L. infantum* указывает на некоторые эпидемиологические особенности, связанные с данными клиническими формами кожного лейшманиоза, а также позволяет в дальнейшем проводить видоспецифическое лечение, что позволит значительно повысить общий терапевтический эффект при данном заболевании.

Выводы. Проведенные исследования позволяют создать более точный тест — отечественную панель диагностикумов для обнаружения лейшманий и ее разновидностей. Разработанный метод ПЦР-диагностики в реальном времени может быть использован в скрининговых обследованиях населения эндемических зон республики.

Ключевые слова

Кожный лейшманиоз, клиника, диагностика, ПЦР.

Лейшманиозы — группа протозойных заболеваний, характеризующихся интоксикацией, поражением кожи, слизистых оболочек и внутренних органов, склонных к хроническому течению [1, 11, 12, 19].

Кожный лейшманиоз — трансмиссивная болезнь, эндемичная в странах с теплым и жарким климатом. Сезон заражения связан с периодом лета москитов (май — октябрь). Среди местного населения болеют главным образом дети, а среди приезжих — лица всех возрастов [2, 3, 6, 7, 10].

В последнее время интерес к проблеме кожного лейшманиоза возрос ввиду его распростра-

ненности, повышения частоты встречаемости и сложности терапии данного дерматоза. Рост заболеваемости, увеличение частоты осложнений, отсутствие современной диагностики обуславливают актуальность данной проблемы. Существует много нерешенных вопросов, касающихся патогенетических аспектов, диагностики, лечения и профилактики кожного лейшманиоза [1, 4, 12, 13, 19].

Отсутствие единой патогенетической концепции заболевания влечет за собой многообразие используемых методов лечения, ни один из которых не является радикальным. Клини-

ческая оценка, как правило, затруднена из-за отсутствия стандартизации, как следствие, даже довольно типичные острые поражения можно спутать с другими дерматологическими проблемами. Кожный тест Лейшмана имеет высокую чувствительность, но не специфичен при использовании в эндемичных регионах, потому что не позволяет отличить острые поражения от перенесенной инфекции. Точная лабораторная диагностика кожно-слизистого и кожного лейшманиоза традиционно требует либо обнаружения амастигот, либо изоляции размножающихся лейшманий из раны. Наиболее широко применяемыми для диагностики кожного лейшманиоза лабораторными методами являются микроскопическое исследование соскобов из мест поражения, мазков-отпечатков, биопсия и гистологическое исследование. Наиболее чувствительные обычные диагностические методы — исследование культуры биопсий и аспиратов из очагов поражения — доступны только в референсных лабораториях. И даже при оптимальном их выполнении чувствительность этих методов составляет только от 70 до 75% [5, 7, 8, 17, 18].

В настоящее время лечение и профилактика кожного лейшманиоза имеет глобальное значение во всем мире. Ежегодно поражаются около 2 млн населения земного шара, а примерно 350 млн лиц живут в зонах риска. В различных географических зонах разные серотипы лейшманий вызывают поражение кожи, слизистых оболочек и внутренних органов [1, 12, 19]. По данным ВОЗ, кожный лейшманиоз встречается в 88 странах мира, в том числе в 72 развивающихся странах. Согласно данным литературы, сегодня в мире лейшманиозами болеют около 12 млн человек. Ежегодный прирост заболеваемости составляет 600 тыс. свежих случаев [19]. Далеко не все случаи заболевания регистрируются.

В восточном полушарии встречаются два основных клинико-эпидемиологических варианта кожного лейшманиоза: антропонозный (городской, поздно изъязвляющийся, сухая форма) и зоонозный (сельский, остро некротизирующий, мокнущая форма). Большинство исследователей рассматривают возбудителей заболевания как самостоятельные виды. Зоонозный кожный лейшманиоз в свою очередь имеет географические типы, характеризующиеся определенными клиническими особенностями, позвоночными хозяевами, переносчиками возбудителя и самими возбудителями, например, кожный лейшманиоз в Эфиопии [1, 12].

По мнению специалистов, официальная статистика неточно отражает истинный уровень заболеваемости лейшманиозами вследствие то-

го, что огромное количество случаев заболевания остаются незарегистрированными или недиагностированными. В очагах этой болезни часто возникают крупные вспышки с поражением 60–90% неиммунизированных лиц [14–16, 20]. При этом значительная часть больных теряют трудоспособность (до 30%), иногда на длительный срок, что наносит государству большой экономический ущерб. Косметический дефект, образующийся при поражении кожи лица, вызывает глубокую психологическую травму, 6,8% пациентов, перенесших кожный лейшманиоз, нуждаются в пластических операциях [11].

Учитывая вышеизложенное, разработка методов диагностики кожного лейшманиоза и последующее проведение научно обоснованной и эффективной терапии, профилактика и борьба с заболеванием имеет общегосударственное значение. В Узбекистане кожный лейшманиоз является одним из наиболее распространенных природно-очаговых заболеваний, имеющих большой удельный вес в структуре краевой патологии республики. В эндемических зонах Узбекистана отмечается достаточно высокий уровень распространенности зоонозного кожного лейшманиоза (Бухарская, Кашкадарьинская, Джизакская, Сурхандарьинская области и Каракалпакстан), где ежегодно регистрируют сотни новых случаев заболевания [1].

В эндемических очагах могут одновременно существовать разнообразные виды лейшманий. Идентификация видовой принадлежности *Leishmania*, основанная на оценке клинических признаков, затруднительна. Подтверждение диагноза и правильная идентификация возбудителя заболевания имеют важное значение для назначения соответствующего видоспецифического лечения и проведения противоэпидемиологических мероприятий [7, 10].

Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) постепенно превратилось в наиболее предпочтительный метод диагностики лейшманиоза, так как обычные методы (паразитологические) не являются достаточно чувствительными [18, 21–23]. Приведенные в различных публикациях величины, используемые для диагностики кожного лейшманиоза методами микроскопии (74%) или исследования культур паразита (62%), имеют широкий разброс по спектру. Для кожного лейшманиоза чувствительность микроскопических методов, таких как гистопатологическое исследование мазков тканей и эксудата, по доступным данным, находится в диапазоне от 17 до 83% в зависимости от клинической картины, вида паразита, технической оснащенности, навыков врача-лаборанта и других

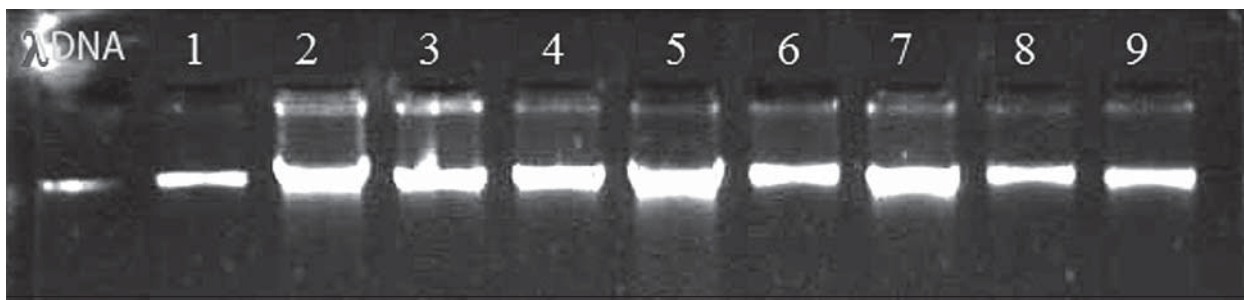


Рис. 1. Определение наличия ДНК лейшманий с помощью геля-электрофореза на 1 % агарозном геле
1—9 — образцы ДНК. λ -ДНК контроль.

факторов. Чувствительность метода культивирования паразитов, по данным литературы, варьирует от 27 до 85%. Кроме того, это может занять несколько дней или недель до момента обнаружения паразита в зависимости от вида и количества паразитов, посеянных на момент биопсии; культуры могут быть контаминированными паразитами, в некоторых случаях контаминация достигает 30% образцов. Метод ПЦР позволяет повысить точность диагностики лейшманиоза до 98%, при этом существенно сокращается время и количество обнаруживаемых паразитов [21–23].

В литературе имеются единичные публикации, посвященные использованию ПЦР для диагностики кожного лейшманиоза. Так, сообщалось об исследованиях с использованием ПЦР для диагностики зоонозного кожного лейшманиоза, проведенных в Иране [18]. Популяционные генетические исследования с использованием метода мультилокусного типирования микросателлитов позволили установить географическую структуру в комплексе *L. tropica*, *L. donovani*, *L. major*. На основании наличия гибридов и генного потока между популяциями лейшманий авторы сформулировали предположение о том, что половые рекомбинации возникают чаще, чем считалось ранее [18].

Цель работы — оценить использование ПЦР для диагностики видовой идентификации возбудителей кожного лейшманиоза.

Материалы и методы

В 2007–2008 гг. в пяти населенных пунктах Папского района Наманганской области Узбекистана, в которых в последние годы регистрировали случаи висцерального лейшманиоза, было проведено массовое обследование детей. Одной из основных задач исследования была оценка возможности использования ПЦР в скрининговых обследованиях. Авторы пришли к выводу, что в этом случае метод ПЦР имеет ряд преимуществ. Во-первых, его использование позволяет

сократить сроки сбора материала, во-вторых, дает возможность постановки до 40 и больше реакций одновременно, в-третьих, позволяет определить не только наличие паразита в исследуемом образце, но и идентифицировать его видовую принадлежность. Кроме того, с помощью метода ПЦР можно обнаруживать паразитов в крови, что было практически невозможно при использовании других применяемых методов.

Для проведения ПЦР использовались наборы РСР-core (Изоген, Россия), праймеры, синтезированные фирмой Sintol (Россия). Амплификацию проводили на программируемом термодиспетчере Терцик-М («ДНК-технология», Россия).

Исходным материалом для генетического анализа был соскоб эпителиальной ткани кожи больного, зараженного кожным лейшманиозом. На первом этапе проводят выделение ДНК (ДНК лейшмании). Для выделения ДНК из соскоба кожи использовали сорбентный метод выделения ДНК при помощи набора «Проба-ГС» (производство «ДНК технология», Россия). Принцип действия данного набора основан на лизисе клеток и денатурации клеточных белков с помощью раствора для лизиса, содержащего хаотропный агент гуанидин тиоционата (GuSCN), с последующим осаждением нуклеиновых кислот изопропанолом и дальнейшей экстракцией их в раствор для проведения анализа. Для проверки наличия ДНК проведен гель-электрофорез на 1% агарозном геле. Для постановки гель-электрофореза использовали 0,5 × TBE-буфер и проводили в течение 30–60 мин при 120В (рис. 1). Определение концентрации и чистоты ДНК измеряли при помощи флуорометра Qubit.

Для идентификации наличия лейшмании в исследуемых образцах на первом этапе проведен ПЦР-анализ для выявления консервативных и видоспецифических участков ДНК *Leishmania*. С этой целью был проведен дизайн и синтез олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов к специфичному маркерному гену *Leish_U1*, *Leish_U2* и *Leish-probe*.

Таблиця 1. Зонди и праймеры для определения наличия лейшманий и их видов

№	Название праймеров	Последовательность праймеров (5'–3')	Специфика
1	Leish_U1	AAGTGCTTTCCCATCGCAACT	Определяет наличие лейшманий
2	Leish_U2	GACGCACTAAACCCCTCCAA	
3	Leish-probe	FAM–CGGTTCGGTGTGTGGCGCC-RTQ1	
4	L_inf_F	CTTTTCTGGTCCCTCCGGGTAGG	Свойственно для <i>L. infantum</i>
5	L_inf_R	CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA	
6	L_inf-probe	FAM-TTTTTCGCAGAACGCCCTACCCGC-RTQ1	
7	Lmaj-F	TTCTGCTCCGTCGGTGTAGA	Свойственно для <i>L. major</i>
8	Lmaj-R	GCTTTCGATTGGCTACGACAA	
9	Lmaj-probe	FAM–CCTGTCAGGAATCCACAAA-RTQ1	
10	Ltrop_SY-F	CAGGTTGCTTACTACGTGTTTATGGTG	Свойственно для <i>L. tropica</i>
11	Ltrop-SY-R Sybergreen	TCGTATTACAAAACCCATAAATCAAATCTCA	

Далее была разработана методика постановки аллель-специфической ПЦР для определения видовой принадлежности *Leshmania*. Произведен дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов для выявления следующих видов лейшманий: *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica* (табл. 1).

Для проведения ПЦР амплификации в реальном режиме использовали набор GenPak® PCR Core. В состав реакционной смеси входит:

Diluent	10 мкл
Primer forward	1 мкл
Primer reverse	1 мкл
Probe (Зонд)	1 мкл
ДНК	5 мкл

Таблиця 2. Температурно-временной режим амплификатора Real-Time PCR7500

Вид	Начальная денатурация	Денатурация	Отжиг (ренатурация)
<i>L. infantum</i>	95 °C 5 мин	94 °C 15 с	55 °C 30 с
		50 циклов	
<i>L. major</i>	95 °C 5 мин	94 °C 15 с	68 °C 20 с
		50 циклов	
<i>L. tropica</i>	95 °C 5 мин	94 °C 15 с	62 °C 1 мин
		45 циклов	

Постановка (Real-Time PCR) проводится при помощи амплификатора Real-Time PCR7500 (Applied Biosystems, USA).

Температурно-временной режим: Real-Time PCR приведен в табл. 2.

Результаты и обсуждение

Было проведено исследование 40 образцов биологического материала (соскоб кожного эпителия) у больных кожным лейшманиозом, которые проживают в Кашкадарьинской, Бухарской и Джизакской областях. Из кожного эпителия больных выделена суммарная ДНК. Наличие ДНК проверено при помощи постановки на 1% агарозном геле-электрофорезе. Для определения наличия ДНК лейшманий проведено 40 ПЦР постановок. С целью определения видоспецифичности лейшмании была проведена ПЦР в режиме реального времени — по 40 постановок на каждый вид (*L. infantum*, *L. major* и *L. tropica*). В общей сложности было проведено 160 постановок. На рис. 2 представлен график амплификации накопления продуктов ПЦР в режиме Real-Time PCR при проведении постановки для обнаружения наличия маркерного гена лейшмании.

Для определения вида *L. infantum* была оптимизирована программа амплификации для Real-Time PCR.

При исследовании 40 образцов во всех было выявлено наличие ДНК *L. infantum*. Ни в одном из образцов ДНК *L. major* (рис. 3) и *L. tropica* (рис. 4) не выявлены.

Таким образом, лейшманиозы представляют собой многообразную группу паразитарных за-

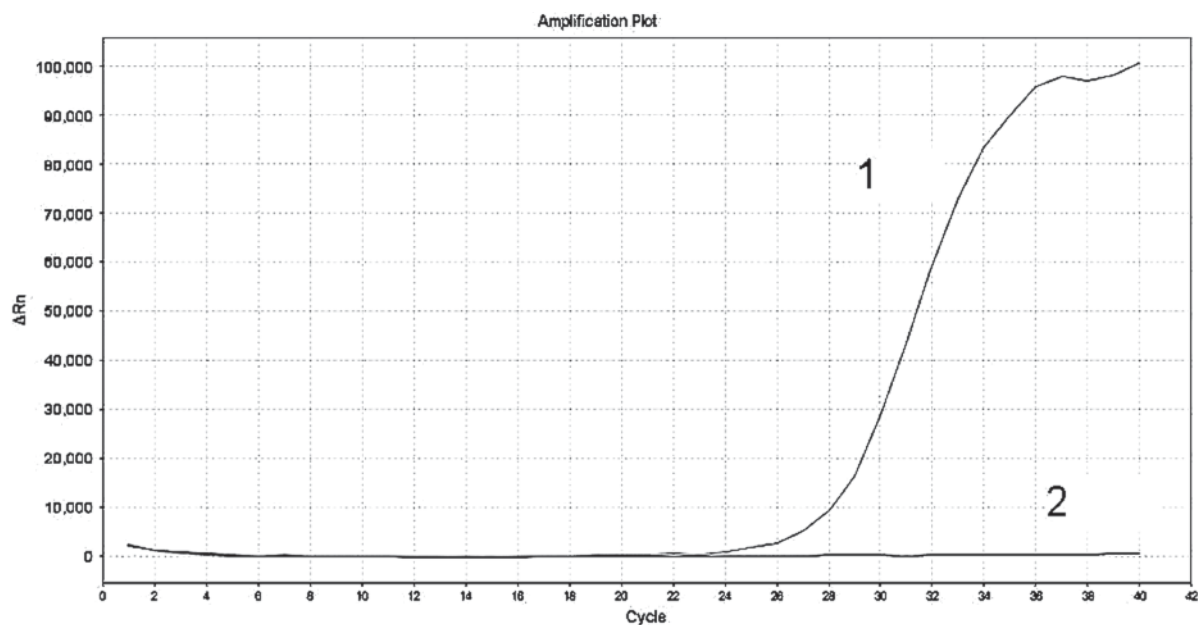


Рис. 2. **График накопления продуктов амплификации при постановке Real-Time PCR на образцы с целью определения наличия ДНК лейшмании**

Примечание. 1 — Кривая амплификации образца (с 24-го цикла обнаруживается наличие ДНК лейшмании); 2 — контрольный образец (амплификации не наблюдается).

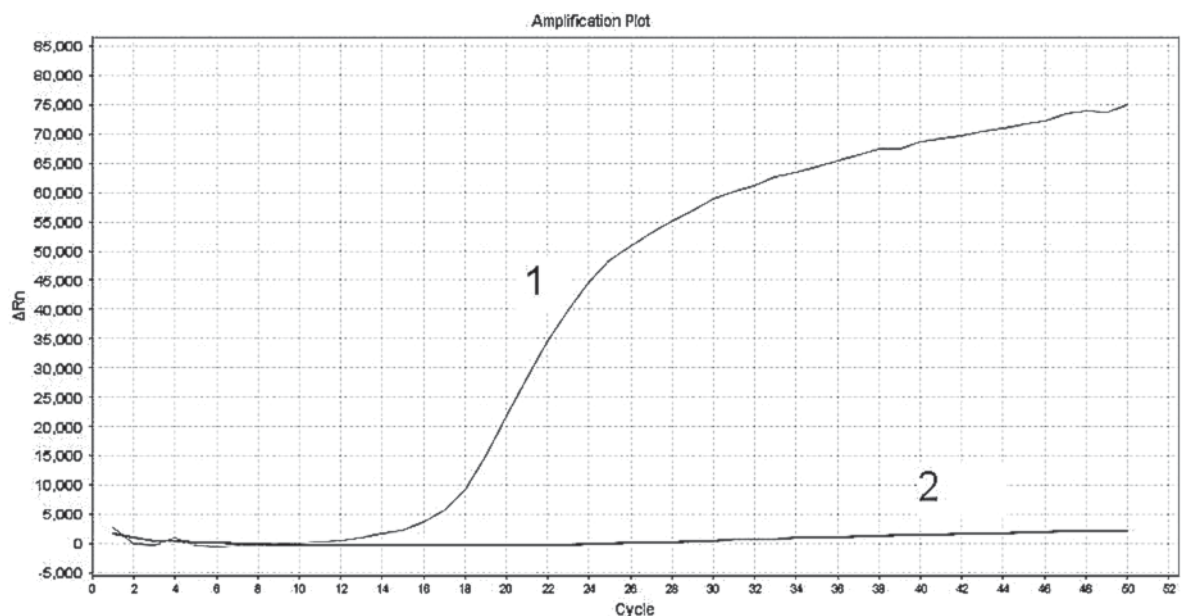


Рис. 3. **График Real-Time PCR амплификации образца № 37**

Примечание. 1 — Образец № 37 (начиная с 13-го цикла идет подъем кривой, что означает наличие ДНК *L. infantum*); 2 — контрольный образец (амплификации не наблюдается).

болеваний, которые являются достаточно широко распространенными на территориях тропического и субтропического поясов земного шара.

Лабораторные исследования играют важную роль в установлении диагноза инфекционных болезней, назначении этиотропной терапии, проведении контроля эффективности лечения.

Процесс специфической лабораторной диагностики основан на выявлении возбудителя заболевания и наличия ответной реакции организма человека в ходе инфекционного процесса. Он состоит из трех этапов: сбора материала, его транспортировки и исследования в лаборатории. К проведению каждого этапа предъявляются определенные

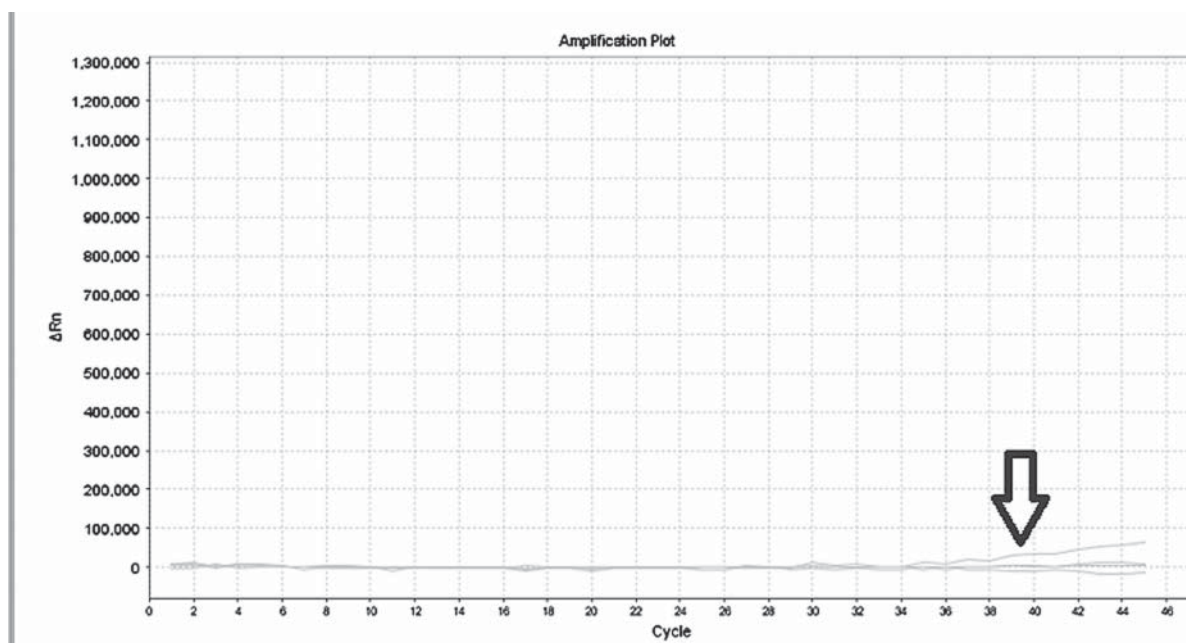


Рис. 4. **График Real-Time PCR амплификации. Пример постановки образца № 37 на выявление ДНК *L. major***
График показывает отсутствие амплификации.

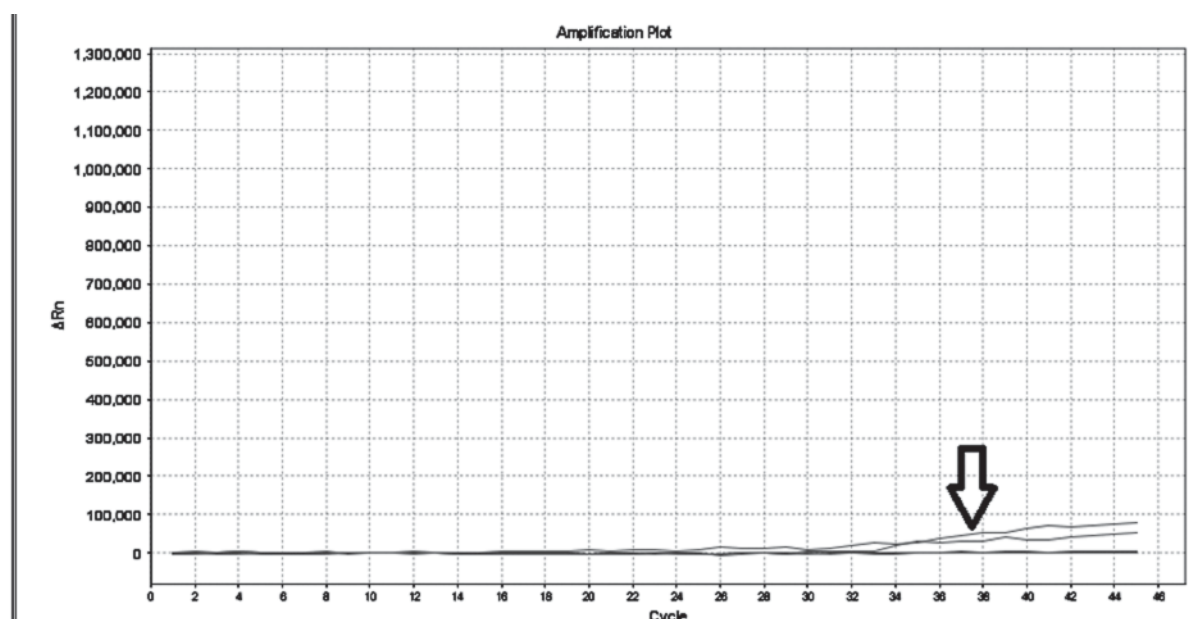


Рис. 5. **График Real-Time PCR амплификации. Пример постановки образца № 37 на выявление ДНК *L. tropica***
График показывает отсутствие амплификации.

требования, от соблюдения которых зависит эффективность лабораторной диагностики.

Лабораторные методы диагностики имеют разную чувствительность и специфичность. Чувствительность метода отражает вероятность того, что результат теста будет положительным у инфицированного пациента, определяется как соотношение общего числа положительных результатов к общему числу инфицированных пациентов. Чем выше чувствительность теста,

тем меньше вероятность получения ложноотрицательных результатов. Критерий специфичности отражает вероятность того, что результат теста будет положительным у неинфицированного пациента, его вычисляют как соотношение общего числа отрицательных результатов к общему числу неинфицированных пациентов. Чем меньше специфичность, тем больше вероятность получения ложноположительных результатов. Оба показателя выражают в процентах.

Выводы

Молекулярно-генетическая диагностика методом ПЦР с целью выявления лейшмании, а также определения видовой принадлежности возбудителя позволяет верифицировать диагноз в эндемических очагах, где одновременно могут существовать разнообразные ее виды. Подтверждение диагноза и правильная идентификация возбудителя имеют важное значение для назначения соответствующего видоспецифического лечения, а также для эпидемиологических исследований.

К преимуществам метода ПЦР следует отнести:

- высокую чувствительность, позволяющую определять 10–1000 клеток в пробе;
- высокую специфичность, поскольку в исследуемом материале можно выявить уникальный для данного возбудителя фрагмент ДНК;
- универсальность процедуры обнаружения различных возбудителей из одной биопробы;
- высокую скорость анализа (4–4,5 ч);

– возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.

Разработанная молекулярно-генетическая диагностика методом ПЦР позволит создать отечественную более точную тест-панель диагностикомов для обнаружения лейшмании и ее видов. В отличие от других методов диагностики ДНК-тест позволит своевременно выявлять острые поражения. При использовании разработанной диагностической панели повысится и социальная эффективность проводимых исследований, поскольку это даст возможность проводить более раннюю и своевременную диагностику, рано начинать терапию, уменьшить сроки пребывания в стационаре, снизить затраты на диагностику и лечение и, следовательно, улучшить качество жизни пациентов. Разработанная молекулярно-генетическая диагностика лейшмании методом ПЦР в реальном времени может быть использована в скрининговых обследованиях населения эндемических зон республики.

Список литературы

1. Абидова З.М., Рахматов А.Б., Рахимов И.Р. Кожный лейшманиоз.— Ташкент: Niso-Polygraf.— 2018.— 190 с.
2. Аляви С.Ф. Клинико-экспериментальное обоснование применения мази «Лейшмицин» при зоонозном кожном лейшманиозе // Автореф. дисс. ...канд. мед. наук.— Ташкент.— 2000.— 24 с.
3. Ваисов А.Ш. Применение лазеротерапии в комплексном лечении зоонозного кожного лейшманиоза // Новости дерматол. и венерол.— 2009.— № 2.— С. 13–14.
4. Горстроверхова И.П. Лейшманиоз кожи // Росс. журн. кожн. и венер. болезней.— 2010.— № 3.— С. 45–47.
5. Добржанская Р.С. Серо-иммунологические аспекты и клиника кожного лейшманиоза.— Ашхабад, 1984.— 224 с.
6. Келлина О.И., Стрелкова М.В. Исследования по лейшманиозам в ИМПИТМ им. Е.И. Марциновского // Мед. паразитол. и паразитар. болезней.— 2010.— № 4.— С. 19–22.
7. Мустафаев Х.М. Эпидемиологическая ситуация по зоонозному кожному лейшманиозу в Узбекистане // Мед. паразитол. и паразитарн. болезней.— 1991.— № 6.— С. 24–26.
8. Насыров Ф.Ш. Корреляты вирулентности лейшманий // Автореф. дисс. ...д. мед. н.— Ташкент.— 1995.— 31 с.
9. Плескановская С.Н. Клеточный и гуморальный иммунный ответ при кожном лейшманиозе // Автореф. дисс. ...к. мед. н.— М., 1982.— 18 с.
10. Понировский Е.И. Паразитарные системы лейшманиоза и эпидемиологическое районирование // Автореф. дисс. ...д. мед. н.— М., 1993.— 31 с.
11. Рахматов А.Б., Джалалова Н.А., Касымов И.А. Эпидемиологическая ситуация заболеваемости лейшманиозом в Узбекистане // Журн. теор. и клин. мед.— 2014.— № 3.— С. 32.
12. Родякин Н.Ф. Кожный лейшманиоз.— Ашхабад: «Бълым».— 1982.— 190 с.
13. Рюмин Д.В. Кожный лейшманиоз // Вестн. последипл. мед. образ.— 2010.— № 2.— С. 42–54.
14. Федянинова И.Э. Особенности иммунного ответа при зоонозном кожном лейшманиозе и методы его коррекции // Автореф. дисс. ...к. мед. н.— М., 1993.— 25 с.
15. Шуйкина Э.Е. Клиническая и эпидемиологическая иммунология лейшманиозов в СССР // Автореф. дисс. ...к. мед. н.— М., 1984.— 45 с.
16. Arraes R.X., Marini M.T., Martello D. Serological investigation of subclinical cutaneous leishmaniasis cases following an outbreak in an endemic area // Rev. Soc. Bras. Med. Trop.— 2008.— Vol. 41.— P. 205–208.
17. Carrado Bravo T. La inmunidad celular la vacunación contra la Leishmaniasis cutanea // Revista Alergia.— 1993.— Vol. 40.— P. 98–105.
18. Deborggraeve S., Laurent T., Espinosa D. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of Leishmaniasis. // J. Infect. Dis.— 2008.— Vol. 24.— P. 122–125.
19. Grevilink S.A., Lerner E.A. Leishmaniasis // J. Amer. Acad. Dermatol.— 1996.— Vol. 34.— P. 257–272.
20. Moll H., Ritter V., Floche S. Cutaneous leishmaniasis: a model for analysis of the immunoregulation by accessory cells // Med. Microbiol. Immunol.— 1996.— Vol. 184.— P. 163–168.
21. Pourabbas B., Ghadimini A., Rezae Z. Quantification of Leishman infantum kinetoplast DNA for monitoring the response to Meglumine antimoniate therapy in visceral Leishmaniasis // Amer. J. Trop. Med. Nyg.— 2013.— Vol. 88.— P. 868–871.
22. Shahbasi F., Shabadi S., Kasemi B. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods // Parasitol. Res.— 2008.— Vol. 103.— P. 1159–1162.
23. Wortmann G., Hounng H., Sweeney Y. Rapid identification of Leishmania complex by a real-time PCR assay // Amer. J. Trop. Med.— 2005.— Vol. 73.— P. 999–1004.

А.Б. Рахматов, Ш.Ш. Ташпулатов, М.Д. Якубов, А.А. Абдурахімов

Республіканський спеціалізований науково-практичний медичний центр дерматовенерології і косметології
Міністерства охорони здоров'я Республіки Узбекистан, Ташкент

Клінічна цінність видової ідентифікації лейшманій методом полімеразної ланцюгової реакції

Шкірний лейшманіоз — трансмісивна хвороба, ендемічна в країнах з теплим і жарким кліматом. Зростання захворюваності, збільшення частоти ускладнень, відсутність сучасної діагностики зумовлюють актуальність проблеми терапії цього захворювання. Використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) — найкращий метод діагностики лейшманіозу, оскільки звичайні методи (паразитологічні) не є достатньо чутливими.

Мета роботи — оцінити використання ПЛР для діагностики видової ідентифікації збудників шкірного лейшманіозу.

Матеріали та методи. Вихідним матеріалом для генетичного аналізу слугували зіскрібки з епітеліальної тканини шкіри хворого на шкірний лейшманіоз. Спочатку виділяли ДНК лейшманій з визначенням концентрації і чистоти ДНК на флуорометрі. Далі проводилася постановка алельспецифічної ПЛР для визначення видової специфічності лейшманій. Було проведено обстеження 40 зразків біологічного матеріалу у хворих на шкірний лейшманіоз, причому ПЛР проводилася в режимі реального часу (по 40 постановок на кожен вид лейшманій).

Результати та обговорення. Проведення ПЛР в режимі реального часу дало змогу в усіх 40 зразках виділити *L. infantum*, у той час як *L. major* і *L. tropica* не реєструвалися. Виділення *L. infantum* вказує на деякі епідеміологічні особливості, пов'язані з цими клінічними формами шкірного лейшманіозу, а також дозволяє в подальшому проводити видоспецифічне лікування, що дасть можливість значно підвищити загальний терапевтичний ефект при цьому захворюванні.

Висновки. Проведені дослідження дають змогу створити більш точний тест — вітчизняну панель діагностиків для виявлення лейшманій і її різновидів. Розроблений метод ПЛР-діагностики в реальному часі може бути використаний в скринінгових обстеженнях населення ендемічних зон республіки.

Ключові слова: шкірний лейшманіоз, клініка, діагностика, ПЛР.

A.B. Rakhmatov, Sh.Sh. Tashpulatov, M.D. Yakubov, A.A. Abdurakhimov

Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Dermatology and Venerology
of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, Tashkent

Clinical value of leishmania type identification by method of polymerase chain reaction

Skin leishmaniasis is a transmissible disease, endemic in countries with warm and hot climates. The increase in the incidence and the frequency of complications, the lack of modern diagnostics determine the relevance of the problem of therapy of the disease. The use of polymerase chain reaction (PCR) is the best method of diagnosing leishmaniasis, since conventional methods (parasitological) are not sensitive enough.

Objective — to evaluate the use of polymerase chain reaction for the diagnosis of type identification of pathogens of skin leishmaniasis.

Materials and methods. The initial material for genetic analysis were swabs from epithelial tissues of the skin of the patient with skin leishmaniasis. The first step was identification of DNA of leishmania with determination of the DNA concentration and clearness of DNA on the flowmeter. Next, allelespecific PCR was conducted to determine the type specificity of leishmanias. Examination of 40 samples of the biological material with skin leishmaniasis was performed. PCR was performed in regimen of real time (40 performances per every type of leishmania).

Results and discussion. The performance of PCR in the regimen of real time provided identification of *L. infantum* in all 40 samples, while *L. major* and *L. tropica* were not registered. The isolation of *L. infantum* showed some epidemiological features connected to these clinical forms of the skin leishmaniasis, as well as allowed performing further type specific treatment, which will promote considerable increase of the general therapeutic effect in this disease.

Conclusions. The investigations performed will allow the development of a more precise test, that is, a native panel of diagnosticums for identification of leishmania and its various types. The developed method of PCR-diagnosis in the real time may be used in the screening investigations of the population of the endemic zones of the republic.

Key words: skin leishmaniasis, clinical picture, diagnosis, PCR.

Дані про автора:

Рахматов Акрам Баратович, д. мед. н., проф., зав. відділу
Республіка Узбекистан, 100109, м. Ташкент, Алмазарський район, вул. Фаробі, 3
РСНПМЦДВиК МЗ РУз
Тел. +99890-175-69-73
E-mail: madamin87@inbox.ru