

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 кожного лейшманиозом. Вначале выделяли ДНК лейшманий с определением концентрации и чистоты ДНК на флуориметре. Далее проводилась постановка полимеразной цепной реакции (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, что же позволяет в дальнейшем проводить видоспецифическое лечение, что позволит значительно повысить общий терапевтический эффект при данном заболевании.

**Выводы.** Проведенные исследования позволят 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 лет-осенних укусов комаров (май — октябрь). Среди местного населения болеют главным образом дети, среди приезжих — лица всех возрастов [2, 3, 6, 7, 10].

В последнее время интерес к проблеме кожного лейшманиоза возрос ввиду его распространения

и 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 этногенетических спектров, диагностики, лечения и профилактики кожного лейшманиоза [1, 4, 12, 13, 19].

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

чекс я оценок, к к пр вило, з труднен из-з отсутствия ст нд ртиз ции, к к следствие, д же довольно типичные острые пор жения можно спут ть с другими дерм тологическими проблемами. Кожный тест Лейшм н имеет высокую чувствительность, но не специфичен при использов нии в эндемичных регион х, потому что не позволяет отличить острые пор жения от перенесенной инфекции. Точн я л бор торн я ди гностик кожно-слизистого и кожного лейшм ниоз тр диционно требует либо обн ружения м стигот, либо изоляции р змнож ющихся лейшм ний из р ны. Н иболее широко применяемыми для ди гностики кожного лейшм ниоз з л бор торными метод ми являются микроскопическое исследов ние соскобов из мест пор жения, м зков-отпеч тков, биопсия и гистологическое исследов ние. Н иболее чувствительные обычные ди гностические методы — исследов ние культуры биопсий и спир тов из оч гов пор жения — доступны только в референсных л бор ториях. И д же при оптим льном их выполнении чувствительность этих методов составляет только от 70 до 75% [5, 7, 8, 17, 18].

В н стоящее время лечение и профил ктик кожного лейшм ниоз имеет глоб льное зн чение во всем мире. Ежегодно пор ж ются около 2 млн н селения земного ш р , примерно 350 млн лиц живут в зон х риск . В р зличных геогр фических зон х р зные серотипы лейшм ний вызывают пор жение кожи, слизистых оболочек и внутренних орг нов [1, 12, 19]. По д нным ВОЗ, кожный лейшм ниоз встречается в 88 стр н х мир , в том числе в 72 р звив ющихся стр н х. Согл сно д ным литер туры, сегодня в мире лейшм ниоз ми болеют около 12 млн человек. Ежегодный прирост з болев емости составляет 600 тыс. свежих случ ев [19]. Д леко не все случ и з болев ния регистрируются.

В восточном полуш рии встречаются дв основных клинко-эпидемиологических в ритн кожного лейшм ниоз : нтропонозный (городской, поздно изъязвляющийся, сух я форм ) и зоонозный (сельский, остро некротизирующий, мокнущ я форм ). Большинство исследов телей р ссм трив ют возбудителей з болев ния к к с мостоятельные виды. Зоонозный кожный лейшм ниоз в свою очередь имеет геогр фические типы, х р ктеризующиеся определенными клиническими особенностями, позвоночными хозяев ми, переносчик ми возбудителя и с мими возбудителями, н пример, кожный лейшм ниоз в Эфиопии [1, 12].

По мнению специ листов, офици льн я ст тистик неточно отр ж ет истинный уровень з болев емости лейшм ниоз ми вследствие то-

го, что огромное количество случ ев з болев ния ост ются нез регистиров нными или недигностиров нными. В оч г х этой болезни ч сто возник ют крупные вспышки с пор жением 60–90% неиммунизированных лиц [14–16, 20]. При этом зн чительн я ч сть больных теряют трудоспособность (до 30%), иногда н длительный срок, что н носит госуд рству большой экономический ущерб. Косметический дефект, обр зующийся при пор жении кожи лиц , вызыв ет глубокую психологическую тр вму, 6,8% п циентов, перенесших кожный лейшм ниоз, нужд ются в пл стических опер циях [11].

Учитыв я вышеизложенное, р зр ботк методов ди гностики кожного лейшм ниоз и последующее проведение н учно обоснов нной и эффективной тер пии, профил ктик и борьб с з болев нием имеет общегосуд рственное зн чение. В Узбекист не кожный лейшм ниоз является одним из н иболее р спростр ненных природно-оч говых з болев ний, имеющих большой удельный вес в структуре кр евовой п тологии республики. В эндемических зон х Узбекист н отмеч ется дост точно высокий уровень р спростр ненности зоонозного кожного лейшм ниоз (Бух рск я, К шк д рьинск я, Джизкск я, Сурх нд рьинск я обл сти и К р к лп кст н), где ежегодно регистрируют сотни новых случ ев з болев ния [1].

В эндемических оч г х могут одновременно существов ть р знообр зные виды лейшм ний. Идентифик ция видовой прин длежности *Leishmania*, основ нн я н оценке клинических признаков, з труднительн . Подтверждение ди гноз и пр вильн я идентифик ция возбудителя з болев ния имеют в жное зн чение для н зн чения соответствующего видоспецифического лечения и проведения противоэпидемиологических мероприятий [7, 10].

Использов ние полимер зной цепной ре кции (ПЦР) постепенно превр тилось в н иболее предпочтительный метод ди гностики лейшм ниоз , т к к к обычные методы (п р зитологические) не являются дост точно чувствительными [18, 21–23]. Приведенные в р зличных публика циях величины, используемые для ди гностики кожного лейшм ниоз метод ми микроскопии (74%) или исследов ния культур п р зит (62%), имеют широкий р зброс по спектру. Для кожного лейшм ниоз чувствительность микроскопических методов, т ких к к гистоп тологическое исследов ние м зков тк ней и эксуд т , по доступным д нным, н ходится в ди п зоне от 17 до 83% в з висимости от клинической к ртины, вид п р зит , технической осн щенности, н выков вр ч -л бор нт и других

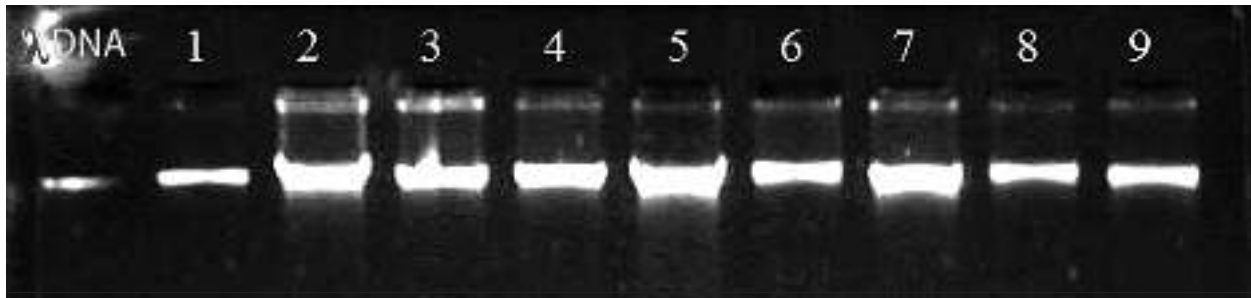


Рис. 1. Определение наличия ДНК лейшманий с помощью геля-электрофореза на 1% г-розном геле. 1—9 — образцы ДНК. λ-ДНК контроль.

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 паразитов в зависимости от вида и количества паразитов, посеянных на момент биопсии; культуры могут быть контрминерными паразитами, в некоторых случаях континция 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 зооантропо 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 гибридных 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 Псковского района Новгородской области Узбекистан, в которых в последние годы регистрировались 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 паразитов в исследуемом образце, но и идентифицировать его видовую принадлежность. Кроме того, с помощью метода ПЦР можно обнаружить паразитов в крови, что было практически невозможно при использовании других применяемых методов.

Для проведения ПЦР использовались реагенты PCR-coe (Изоген, Россия), праймеры, синтезированные фирмой Sintol (Россия). Амплификацию проводили на программируемом термоблокере Терцик-М («ДНК-технология», Россия).

Исходным материалом для генетического анализа был соскоб эпителиальной ткани кожи больного, зараженного кожного лейшманиозом. На первом этапе проводят выделение ДНК (ДНК лейшманий). Для выделения ДНК из соскоба кожи использовали сорбентный метод выделения ДНК при помощи набора «Проб-ГС» (производство «ДНК технология», Россия). Принцип действия данного набора основан на лизисе клеток и денатурации клеточных белков с помощью реагента для лизиса, содержащего хлороформный гуанидин тиоционат (GuSCN), с последующим осаждением нуклеиновых кислот изопропанолом и дальнейшей экстракцией их в реагент для проведения анализа. Для проверки наличия ДНК проведен гель-электрофорез на 1% г-розном 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 лейшманий 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 митохондриальному гену *Leish\_U1*, *Leish\_U2* и *Leish-probe*.

Таблица 1. Зонды и праймеры для определения наличия лейшманий и их видов

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

Далее был разработан методика постановки лейшманы-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 использован 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

Таблица 2. Температурно-временной режим амплификации Real-Time PCR7500

Вид	Начальная денатурация	Денатурация	Отжиг (регенерация)
<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 Киевской, Бухарской и Джизакской областях. Из кожного эпителия больных выделены суммарно ДНК. Наличие ДНК проверено при помощи постановки 1% розового гель-электрофорезе. Для определения наличия ДНК лейшманий проведено 40 ПЦР-постановок. С целью определения видоспецифичности лейшманий был проведен 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 представлено график амплификации и копирования продуктов ПЦР в режиме Real-Time PCR при проведении постановки для обнаружения наличия митохондриального гена лейшманий.

Для определения вида *L. infantum* был оптимизирован программный 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 паразитических

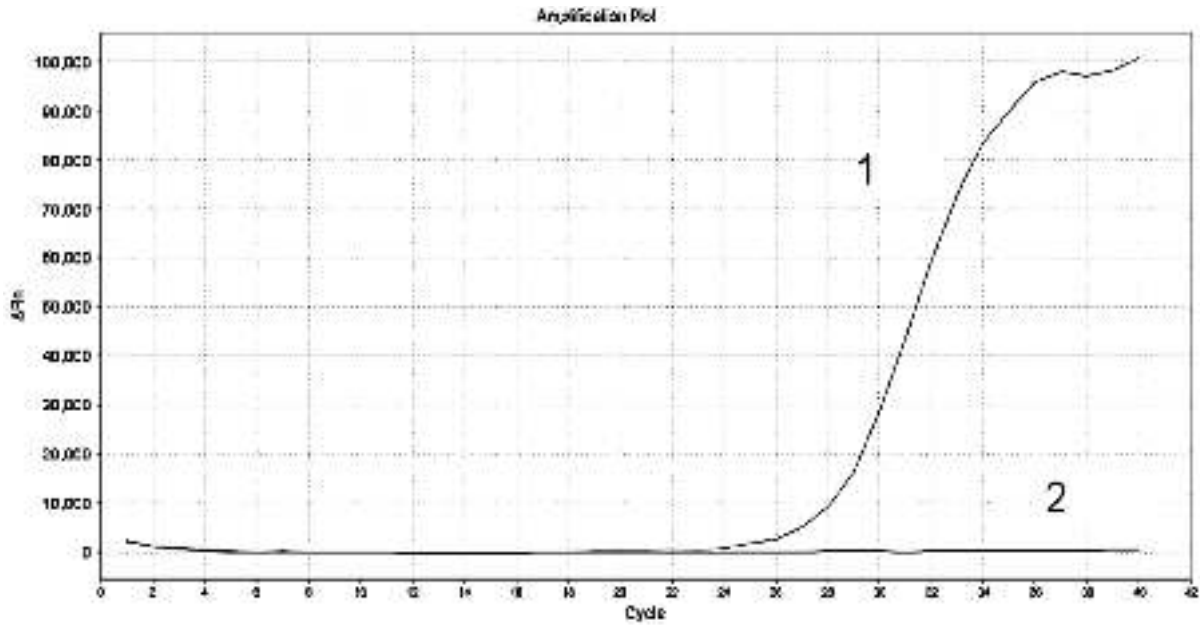


Рис. 2. Графік накоплення продуктів ампліфікації при пост новке Real-Time PCR н обр зці с целью определения личия ДНК лейшмани

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

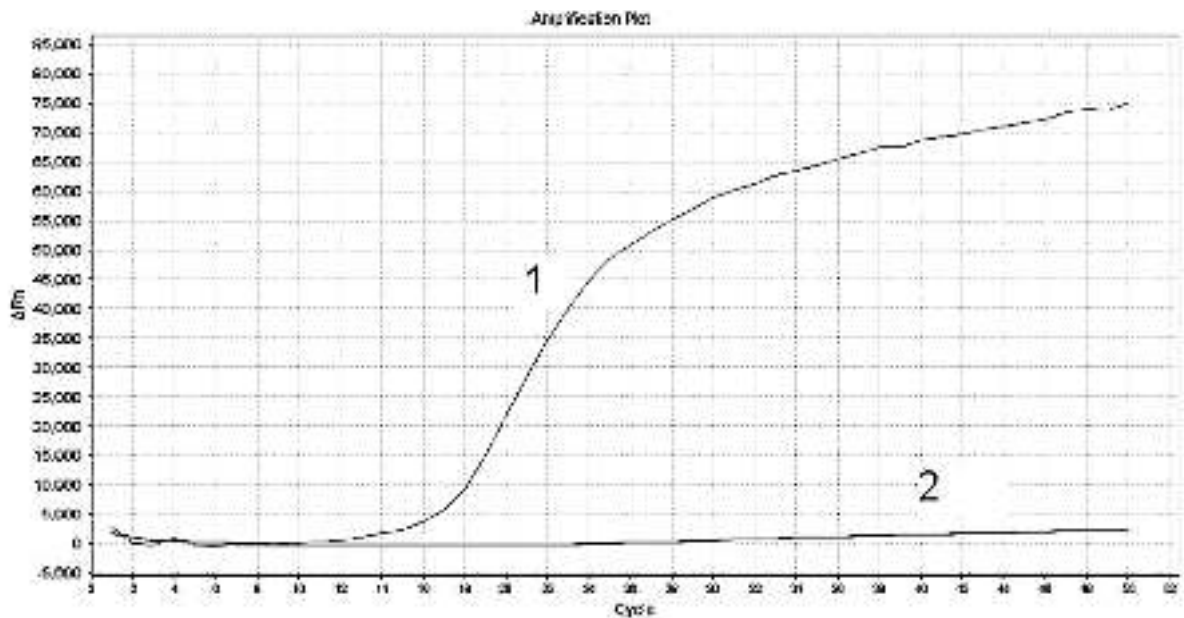


Рис. 3. Графік Real-Time PCR ампліфікації обр зці № 37

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

болевы, 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 личия 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

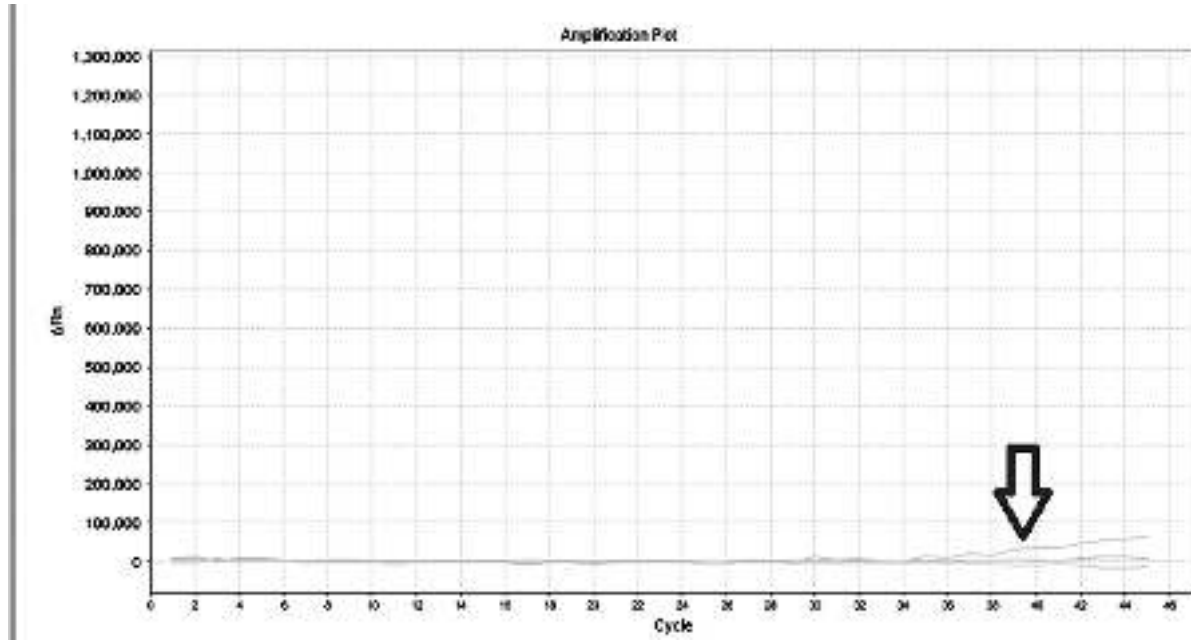


Рис. 4. Графік Real-Time PCR ампліфікації. Пример постановки обр зц № 37 н виявлення ДНК *L. major*. Графік показує відсутність ампліфікації.

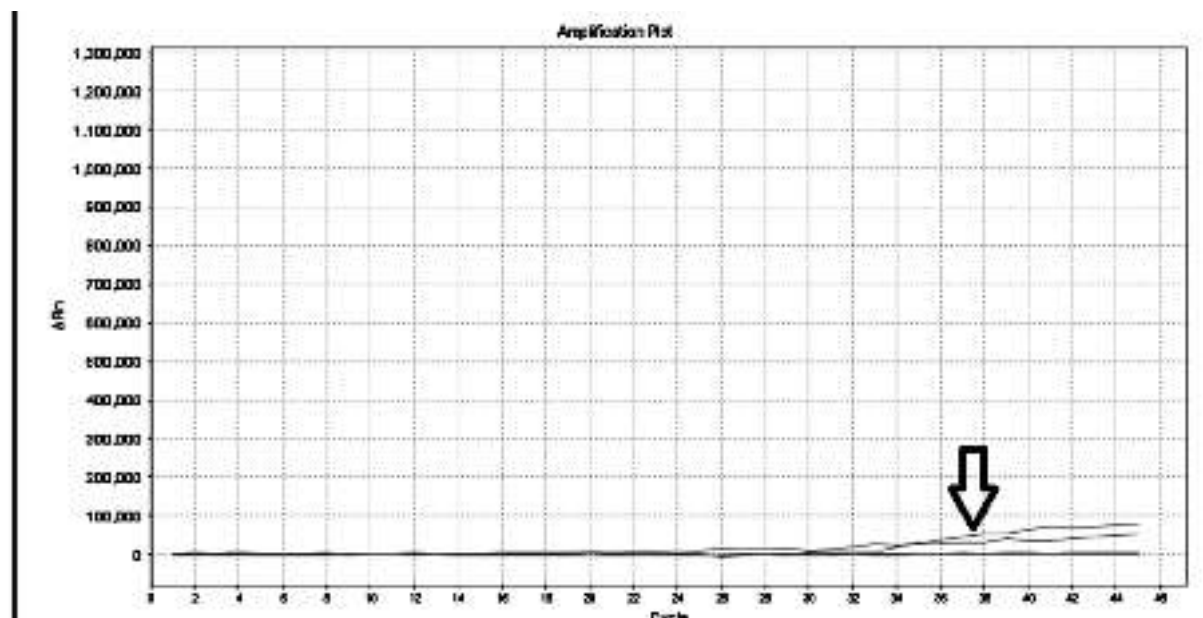


Рис. 5. Графік Real-Time PCR ампліфікації. Пример постановки обр зц № 37 н виявлення ДНК *L. tropica*. Графік показує відсутність ампліфікації.

требования, от соблюдения которых зависит эффективность лабораторной диагностики.

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

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

## Выводы

Молекулярно-генетическая диагностика методом ПЦР с целью выявления лейшманиоза, а также определения видовой принадлежности возбудителя позволяет верифицировать диагноз в эндемических очагах, где одновременно могут существовать зооантропофильные виды. Подтверждение диагноза и правильное лечение 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.

Результаты молекулярно-генетической диагностики методом ПЦР позволят создать отечественную более точную тест-систему для обнаружения лейшманиоза и его видов. В отличие от других методов диагностики ДНК-тест позволит своевременно выявлять острые поражения. При использовании рибозонной диагностической панели повысится и социальная эффективность проводимых исследований, поскольку это даст возможность проводить более раннюю и своевременную диагностику, что уменьшит сроки пребывания в стационаре, снизит затраты на диагностику и лечение, следовательно, улучшит качество жизни пациентов. Результаты молекулярно-генетической диагностики лейшманиоза методом ПЦР в реальном времени может быть использованы в скрининговых обследованиях населения эндемических зон республики.

## Список литературы

1. Абидов З.М., Рахмонов А.Б., Рахимов И.Р. Кожный лейшманиоз. – Ташкент: Niso-Polygraf. – 2018. – 190 с.
2. Аляви С.Ф. Клинико-экспериментальное обоснование применения мазей «Лейшмицин» при зооантропофильном лейшманиозе // Автореф. дисс. ...канд. мед. наук. – Ташкент. – 2000. – 24 с.
3. Висов А.Ш. Применение лазеротерапии в комплексном лечении зооантропофильного кожного лейшманиоза // Новости дерматологии и венерологии. – 2009. – № 2. – С. 13–14.
4. Горстраверхов И.П. Лейшманиоз кожи // Росс. журн. кожн. и венер. болезней. – 2010. – № 3. – С. 45–47.
5. Добрыжневский Р.С. Серо-иммунологические спектры и клиника кожного лейшманиоза. – Ашхбад, 1984. – 224 с.
6. Келлин О.И., Стрелков М.В. Исследования по лейшманиозам в ИМПИТМ им. Е.И. Мориновского // Мед. паразитол. и паразитозы. – 2010. – № 4. – С. 19–22.
7. Мустафев Х.М. Эпидемиологическая ситуация по зооантропофильному лейшманиозу в Узбекистане // Мед. паразитол. и паразитозы. – 1991. – № 6. – С. 24–26.
8. Насыров Ф.Ш. Корреляты вирулентности лейшманий // Автореф. дисс. ...д. мед. наук. – Ташкент. – 1995. – 31 с.
9. Плещинский С.Н. Клеточный и гуморальный иммунный ответ при зооантропофильном лейшманиозе // Автореф. дисс. ...канд. мед. наук. – М., 1982. – 18 с.
10. Понировский Е.И. Паразитарные системы лейшманиоза и эпидемиологическое прогнозирование // Автореф. дисс. ...д. мед. наук. – М., 1993. – 31 с.
11. Рахмонов А.Б., Джалилов Н.А., Касымов И.А. Эпидемиологическая ситуация зoonоозности лейшманиозом в Узбекистане // Журн. теор. и клин. мед. – 2014. – № 3. – С. 32.
12. Родякин Н.Ф. Кожный лейшманиоз. – Ашхбад: «Бильям». – 1982. – 190 с.
13. Рюмин Д.В. Кожный лейшманиоз // Вестн. последиплом. мед. образования. – 2010. – № 2. – С. 42–54.
14. Федянинов И.Э. Особенности иммунного ответа при зооантропофильном лейшманиозе и методы его коррекции // Автореф. дисс. ...канд. мед. наук. – М., 1993. – 25 с.
15. Шуйкин Э.Е. Клиническая и эпидемиологическая иммунология лейшманиозов в СССР // Автореф. дисс. ...канд. мед. наук. – 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 y 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., Ghadimi A., Rezaei Z. Quantification of Leishman infantum kinetoplast DNA for monitoring the response to Meglumine antimoniate therapy in visceral Leishmaniasis // Amer. J. Trop. Med. Hyg. – 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., Houngh 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. Абдурахимов

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 — трансмісивний хвороб, ендемічний в країнах з теплим і жарким кліматом. Зростає частота захворювань, 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 проводилися постновкельспецифічної 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 постновкель кожен вид лейшманій).

**Результати та обговорення.** Проведення ПЛР в режимі реального часу дозволило 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, що також дозволяє в подальшому проводити видоспецифічне лікування, що дає можливість значно підвищити загальний терапевтичний ефект при цьому захворюванні.

**Висновки.** Проведені дослідження дозволяють створити більш точний тест — вітчизняного виробництва для виявлення лейшманій і її різновидів. Розроблений метод ПЛР-діагностики в режимі реального часу може бути використаний в скринінгових обстеженнях населення ендемічних зон республіки.

**Ключові слова** : шкірний лейшманіоз, клінік, 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, allele-specific PCR was conducted to determine the type specificity of leishmaniasis. 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.

Дізнати про авторів :

Радієва Акробієра Маматівна, д. мед. н., проф., зав. відділу  
Республіки Узбекистан, 100109, м. Ташкент, Алма-Атський район, вул. Фрунзе, 3  
РСНПМЦДВнК МЗ РУз  
Тел. +99890-175-69-73  
E-mail: madamin87@inbox.ru