

ИНФОРМАТИВНОСТЬ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ ЛЕЙШМАНИОЗАХ

М. С. НОВРУЗОВА

INFORMATIVITY OF DIFFERENT METHODS OF LEISHMANIASIS LABORATORY DIAGNOSIS

M. S. NOVRUZOVA

*Азербайджанский медицинский университет, Баку,
Азербайджанская республика*

Проанализирована эффективность современных микроскопических, серологических, классических и новых культуральных методов, в том числе молекулярных, в диагностике кожных и висцеральных лейшманиозов.

Ключевые слова: лейшманиоз, диагностика.

Efficacy of modern microscopy, serology techniques, traditional and new culture studies, including molecular, in diagnosis of skin and visceral leishmaniasis was analyzed.

Key words: leishmaniasis, diagnosis.

Лейшманиоз является одной из основных проблем тропических и субтропических стран, занимая второе место после малярии [1]. Имеются данные о том, что от 12 до 40 млн людей в мире болеют лейшманиозом, а до 350 млн находятся под риском заражения этой болезнью. Установлено, что каждый год кожным лейшманиозом заражается 1–1,5 млн человек, а висцеральным лейшманиозом — 500 тыс. людей [2, 3]. Переносчиками болезни являются москиты рода *Phlebotomus* (лейшманиоз Старого Света) или *Lutzomyia* (лейшманиоз Нового Света).

Известно до 500 видов москитов, из них 30 являются переносчиками при лейшманиозах. Лейшманиоз (или лейшмания) относится к группе заболеваний, возбудителями которых выступают внутриклеточные простейшие рода *Leishmania*.

По особенностям морфологической структуры возбудители лейшманиоза подразделяются на амстиготные и промастиготные формы. Амстиготные проходят цикл развития в организме человека и других млекопитающих, а промастиготные — в организме москитов рода *Phlebotomus*.

Ареалы распространения двух основных форм болезни кожного и висцерального лейшманиозов в основном одинаковы. Возбудителями кожного лейшманиоза являются *L. tropica*, а висцерального — в основном *L. infantum*.

Диагностика лейшманиоза основана на обнаружении возбудителя в патологическом материале, взятом у больного, а в некоторых случаях — на применении кожно-аллергических реакций и иммунологических методов.

Вышеуказанные методы при диагностике лейшманиоза неодинаково эффективны и отличаются своей специфичностью и чувствительно-

стью. В настоящее время наряду с применением новых чувствительных и специфических тестов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), используют и классические методы. Продолжается сравнительное изучение эффективности методов диагностики как при кожном, так и при висцеральном лейшманиозах.

Микроскопический метод, применяемый при лейшманиозах, отличается своей простотой, дешевизной и быстротой получения результатов. Микроскопический метод при кожном лейшманиозе основан на обнаружении амстиготных форм в мазках, полученных с соскоба кожи больного или методом аспирации, а при висцеральном лейшманиозе — на обнаружении этих же форм в мазках, приготовленных из биоптатов селезенки, костного мозга, лимфатических узлов, в некоторых случаях — из венозной крови, окрашенных по Гимзе. Однако специфичность этого метода невысока.

Преимуществом обнаружения паразитов в мазке при микроскопическом методе является простота этого метода, экономичность, а также получение результатов за короткое время. Недостаток метода — в сложности обнаружения паразитов в исследуемом материале из-за малого их количества в поле зрения при хронических кожных изъязвлениях. Наряду с этим еще более усложняет диагностику атипичность морфологии паразитов. Чувствительность микроскопического метода при хронической форме кожного лейшманиоза составляет менее 13–30%, тогда как при острой ее форме — 67%. У больных висцеральным лейшманиозом в мазках, приготовленных из венозной крови, чувствительность метода не превышает 26,3% [4]. При кожно-слизистом лейшманиозе микроскопический метод дал положительный

результат в 16 случаях из 45 [5], при американском кожном лейшманиозе чувствительность этого метода составила только 34% [6]. При нодулярных и макулопапулезных формах поствисцерального кожного лейшманиоза микроскопический метод позволяет выявить амастиготные формы паразитов в 70% и 20% случаях соответственно [7]. При висцеральном лейшманиозе обнаружить паразиты в материале, полученном при биопсии печени, очень сложно [8], тогда как в мазках, приготовленных из материала, полученного при аспирации селезенки, паразиты обнаруживаются более часто [9].

Микроскопия мазков, приготовленных из костного мозга и окрашенных по Гимзе, дала положительный результат в 79,1% случаев [10]. В эндемичных для висцерального лейшманиоза районах микроскопическое исследование лимфатических узлов, костного мозга и селезенки домашних собак дало положительный результат в 75,6% случаев. Чувствительность этого теста в олигосимптоматической группе составила 32%, а в асимптоматической — 39,1% [11].

Золотым методом при диагностике лейшманиоза, как и при других инфекционных заболеваниях, остается культуральный (паразитологический) метод. Однако диагностическую значимость метода снижает зависимость его чувствительности от степени плотности паразитов в исследуемом материале. Так, очень сложно обнаружить промастиготы при культуральном исследовании образцов изъязвлений при кожном лейшманиозе и венозной крови — при висцеральном лейшманиозе. Обнаружение промастигот в культуре при асимптоматической форме висцерального лейшманиоза длится иногда до 6 мес, что осложняет своевременное лечение этой болезни, но имеет большое профилактическое значение [12, 13].

Для выделения чистой культуры возбудителя делают посеы на ряд питательных сред, в основном на среду NNN. Многие исследования показали, что по сравнению с микроскопическим этот метод является более эффективным. Так, у 13 больных кожным лейшманиозом при микроскопическом методе исследование дало 4 отрицательных результата, тогда как культуральный метод во всех случаях дал положительный результат [14]. При висцеральном лейшманиозе культуральное исследование костного мозга дало положительный результат в 59% случаях [10]. Недостатком классического культурального метода (ККМ) является сравнительно длительный срок исследования; в некоторых случаях слабая чувствительность метода объясняется изменением морфологических особенностей возбудителя. Поэтому в последнее время были предложены различные питательные среды и режимы культивации. В новопредложенных средах, например в бесывороточной простой среде, паразиты лейшмании развиваются так же, как и в стандартной сывороточной RPMI-1640. В этой питательной среде потенциал репликации

и инфективность не отличаются от традиционных питательных сред [15]. Было отмечено, что среда RPMI-1640 с добавлением телячьей сыворотки более эффективна, чем среда Tobie в модификации Evansa. Показано также, что в этой среде выделение *L. doovani* из кожных ран экономически более выгодно [16].

В последние годы для диагностики лейшманиоза были предложены новые методы микрокультуры (ММК) [1, 17]. В отличие от ККМ, специфичность ММК не зависит от степени плотности амастигот, обнаруженных в материале больных. ММК не только ускоряет переход амастигот в промастиготы, но и упрощает обнаружение паразитов под микроскопом и отличается своей специфичностью и чувствительностью. Кроме того, показано, что с экономической точки зрения ММК более чем в 100 раз дешевле ККМ. Для диагноза одного больного необходимо не более 40 мл питательной среды. При ККМ для выявления промастигот необходимо от 2 до 35 дней, а иногда и больше, тогда как при ММК это время составляет не более 2–7 дней. Степень обнаружения в культуре промастигот зависит и от типа ран. Установлено, что чувствительность ККМ при острой форме кожного лейшманиоза составляет 54,1%, при хронической форме — 40,0%, тогда как чувствительность ММК составляет 100% и 93% соответственно. Чувствительность ККМ зависит от степени плотности паразитов в материале, а также от используемой питательной среды (Schneider, NNN-aqar), тогда как ММК отличается высокой чувствительностью независимо от вышеуказанных факторов. Основные причины высокой чувствительности ММК — наименьшее разведение материала, полученного от больного, и создание оптимальных микроаэрофильных условий в микрокапиллярах. Высокая концентрация паразитов обеспечивает микроаэрофильные условия в капилляре и тем самым упрощает трансформацию амастигот в промастиготы. Наряду с этим в среде с высокой концентрацией паразитов продуцируется «autoin growth-regulating» и, таким образом, ускоряется размножение паразитов [18].

В настоящее время ММК применяют во многих эндемичных регионах мира [19, 20]. Исследования, проведенные в эндемической зоне Перу, показали, что ММК также применим и для других видов паразитов (*L. (v) braziliensis*). Высокая специфичность и чувствительность ММК указана и в исследованиях, проведенных в Шри-Ланке [16].

В диагностике лейшманиоза, особенно висцерального, широко применяют иммунологические методы, которые основаны на обнаружении в сыворотке крови антител, образовавшихся против возбудителя.

Различные методы отличаются своей чувствительностью. В эндемичных для висцерального лейшманиоза районах Бразилии серологические исследования домашних собак показали высоко-

чувствительность (93%) и специфичность (95%) реакции агглютинации. В то же время чувствительность непрямой реакции иммунофлюоресценции (РИФ) (72%) была более слабой, чем иммуноферментного анализа (ИФА) (95%) [21]. Исследование больных американским кожным лейшманиозом показало чувствительность ИФА, IgG — 85%, непрямой РИФ — 58,1%. Ввиду того что у 75% больных с отрицательным результатом кожного теста ИФА дал положительный результат, исследователи пришли к выводу о высокой чувствительности этого метода при американском кожном лейшманиозе [16]. При другом исследовании сыворотки крови больных висцеральным лейшманиозом были обнаружены антитела реакциями агглютинации, РИФ и ИФА — соответственно в 70,5%, 80,3% и 83,6% случаях.

Чувствительность реакции агглютинации составляет 70,5%, специфичность — 100%; чувствительность РИФ, ИФА составляет соответственно 80,3% и 83,6%, а специфичность — 90,5% [22].

Вышеуказанные методы не позволяют, однако, определить антигенное различие паразитов. Так как при лейшманиозе в сыворотке крови обнаруживаются антитела и против других паразитов (существуют перекрестные антигены). Дает положительную реакцию сыворотка крови больных Chagas с антигенами *L. braziliensis* и *L. Chagas* при ИФА. Сыворотка больных Кала-Азар дает положительный результат с антигенами *Trypanosoma cruzi* и *L. braziliensis* при ИФА, а сыворотка больных кожно-слизистым лейшманиозом положительна при РИФ с антигенами *T. cruzi* и *L. chagasi* [23].

В последнее время все чаще применяются молекулярные методы, такие как ПЦР, основанные на обнаружении возбудителя. Из 30 больных с диагнозом висцеральный лейшманиоз, поставленным паразитологическим, серологическим и молекулярными методами при исследовании

мочи, у 29 ПЦР дала положительный результат (чувствительность 96,8%) [24]. При исследовании клинического материала больных с лейшманиозоподобными приметами ПЦР дала 100%-ную чувствительность и специфичность. Диагноз, поставленный с помощью ПЦР, был положительно подтвержден тестом Монтенегро, а в некоторых случаях и гистопатологическими и культуральными исследованиями. При висцеральном лейшманиозе ПЦР показала высокую чувствительность (92,3%) и специфичность (97,5%). У 19 пациентов микроскопическое исследование мазков, приготовленных из костного мозга и окрашенных по Гимзе, дало отрицательный результат, тогда как у 16 из них при ПЦР был поставлен диагноз висцеральный лейшманиоз (84,2%) [10].

Исследование лимфатических узлов, селезенки и костного мозга домашних собак в эндемичных районах Бразилии дало 100%-ную чувствительность ПЦР. У олигосимптоматической группы чувствительность ПЦР составила 96%, а у асимптоматической — 95,65% [11]. При исследовании больных американским кожным лейшманиозом ПЦР была положительной в 81% случаев [6].

Итак, для диагностики лейшманиоза существует много методов. Но наиболее специфичными из них являются микроскопический, молекулярный и культуральный методы. Хотя чувствительность микроскопического метода по сравнению с другими более слаба, данный метод может быть применен во многих эндемичных районах. Метод ПЦР очень дорог, поэтому целесообразно применять его в целях типирования изолированных паразитов.

Большую роль в диагностике висцерального лейшманиоза играют иммунологические методы.

В последнее время во многих эндемичных районах мира успешно применяется новый метод микрокультуры, который отличается высокой чувствительностью, дешевизной и специфичностью.

Литература

1. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis / A. M. Allahverdiyev, S. Uzun, M. Bagirova et al. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.*— 2004.— Vol. 70.— P. 294–297.
2. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*— 2001.— Vol. 95.— P. 239–243.
3. Desjeux P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis // *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*— 2001.— Vol. 190, № 1–2.— P. 77–79.
4. Bağirova M. I. Leymaniozun diagnostikasında yeni mikrokultura metodu. Tibb elmləri namizədi avtoreferatı, Bakı, 2007.— 24 p.
5. Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina / A. RamosBarrio, M. C. F. Mora, S. Moreno et al. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.*— 2007.— Vol. 77 (4).—P. 636–639.
6. Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-*L. Brasiliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis / M. P. Ferreira, A. M. Roselino, M. M. Nascimento et al. // *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*— 2006.— Vol. 48 (4).— P. 215–217.
7. Use of rK39 for diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis in Nepal / M. L. Das, M. Deb, B. M. Karki et al. // *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.*— 2007.— Vol. 38 (4).— P. 619–625.
8. Studies on Mediterranean leishmaniasis. 2. Asymptomatic cases of visceral leishmaniasis / S. Pampiglione, P. E. Manson-Bahr, F. Giungi et al. // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*— 1974.— Vol. 68 (6).— P. 447–453.
9. WHO: Control of the Leishmaniases: Tech. Rep. Ser. № 793. Geneva: World Health Organization, 1990.— 81 p.
10. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral

- leishmaniasis in children / Y. M. Brustoloni, R. B. Lima, R. V. da Cunha et al. // Mem. Ins. Oswaldo Cruz.— 2007.— Vol. 102 (4).— P. 497–500.
11. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs / M. A. Moreira, M. C. Luvizotto, J. F. Garcia et al. // Vet. Parasitol.— 2007.— Vol. 145 (3–4).— P. 245–252.
 12. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France / Y. Le Fichoux, J. F. Quaranta, J. P. Aufeuvre et al. // J. Clin. Microbiol.— 1999.— Vol. 37 (6).— P. 1953–1957.
 13. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods / C. Riera, R. Fisa, M. Udina et al. // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.— 2004.— Vol. 98, № 2.— P. 102–110.
 14. *Rastogi V., Nirwan P. S.* Cutaneous leishmaniasis: an emerging infection in a non-endemic area and a brief update Indian // J. Med. Microbiol.— 2007.— Vol. 25 (3).— P. 2.
 15. Innovative serum-free medium for in vitro cultivation of promastigote forms of *Leishmania* species / A. H. Sharief, E. A. Khalil, S. A. Omer, H. S. Abdalla // Parasitol. Int.— 2008.— Vol. 57 (2).— P. 138–142.
 16. *Ihalamulla R. L., Rajapaksa U. S., Karunaweera N. D.* Microculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions — Sri Zankan experience // Ann. Trop. Med. Parasitol.— 2005.— Vol. 99 (6).— P. 571–575.
 17. The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood / A. M. Allahverdiyev, M. Bagirova, S. Uzun et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg.— 2005.— Vol. 73, № 2.— P. 276–280.
 18. Autoregulation de la croissance in vitro des Trypanosomatidae / J. L. Lemesre, F. R. F. Santoro, M. Loyens et al. // C R Acad. Sci.— 1988.— Vol. 307.— P. 283–288.
 19. *Boggild A. K., Miranda-Verastegui C.* Evaluation of a microculture method for isolation of leishmania parasites from cutaneous lesions of patients in peru // J. Clin. Microbiol.— 2007.— Vol. 45 (11).— P. 3680–3684.
 20. A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients / M. Hide, R. Singh, B. Kumar et al. // Acta Trop.— 2007.— Vol. 102 (3).— P. 197–200.
 21. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations / Ede C. Ferreira, M. de Lana, M. Carneiro et al. // Vet. Parasitol.— 2007.— Vol. 146 (3–4).— P. 235–241.
 22. Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain / F. Mikaeili, M. Fakhar, B. Sarkari et al. // Iran. J. Immunol.— 2007.— Vol. 4 (2).— P. 116–121.
 23. *Vexenat Ade C., Santana J. M., Teixeira A. R.* Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis* // Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.— 1996.— Vol. 38 (3).— P. 177–185.
 24. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients / M. Motazedian, M. Fakhar, M. H. Motazedian et al. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis.— 2008.— Vol. 60 (2).— P. 151–154.

Поступила 04.02.2009