

УДК 576.893.19.083.18

Идентификация и типирование криптоспоридий: молекулярно-биологические подходы

Д. МакЛаклин

Центральная лаборатория общественного здравоохранения, Лондон, Великобритания

Криптоспоридии являются одним из важнейших возбудителей диарей во всем мире. Однако точные механизмы передачи инфекции до конца не изучены. Дальнейшее усовершенствование таксономии необходимо в целях улучшения идентификации и установления потенциальной опасности для здоровья человека в случае обнаружения криптоспоридий в окружающей среде. Потенциально патогенным для человека видом

является *Cryptosporidium parvum*. Данные изoenzymного анализа, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ДНК-секвенирования свидетельствуют о наличии как минимум двух генотипов *C. parvum*, по-видимому, представляющих два различных вида.

Ключевые слова: криптоспоридии, идентификация, типирование.

Identification and Typing of Cryptosporidium: Molecular Biological Approaches

J. McLauchlin

PHLS Central Public Health Laboratory, London, UK

The coccidian protozoan parasite *Cryptosporidium* is increasingly recognised as a major cause of diarrhoeal disease worldwide. However, the exact modes of transmission are often unclear. The further understanding of the taxonomy of this group of organisms will be essential to an understanding of both their identification and to ascertain their potential significance to human health when recovered from environmental samples. In human the principal infectious agent is *Cryptosporidium*

parvum. Evidence initially from isoenzyme analysis together with PCR and DNA sequenced-based analyses have all identified at least two "types" of *C. parvum*, that may represent two different species. Since the host range of these two genotypes differs, the epidemiology of the disease in human may also differ, although this has, to date, been incompletely investigated.

Key words: *Cryptosporidium*, identification, typing.

Введение

Представители рода *Cryptosporidium* (подцарство простейшие, подкласс кокцидии) все чаще рас-

цениваются как одни из важнейших возбудителей диарей.

Основной и фактически единственный механизм заражения человека криптоспориозом – фекально-оральный. Считается, что эпидемиологическое значение имеет употребление воды, контаминированной криптоспоридиями. Однако точные механизмы и факторы передачи инфекции во многих случаях до конца не изучены, в частности эпи-

Контактный адрес:

Jim McLauchlin

Food Safety Microbiology Laboratory,

PHLS Central Public Health Laboratory,

61 Colindale Ave, London, NW9 5HT, UK

Эл. почта: jmclauchlin@phls.nhs.uk

демиологическая значимость миграции людей из страны в страну, потребление различных видов пищи, воды и напитков, передача криптоспоридий от человека к человеку, роль инфицированных животных в передаче заболевания.

Последние данные молекулярного анализа показали, что род *Cryptosporidium* состоит как минимум из 20 видов [1]. Некоторые виды криптоспоридий могут быть идентифицированы и/или дифференцированы только при использовании молекулярно-биологических методов исследования, поскольку их ооцисты фенотипически не имеют специфических признаков и не отличаются при световой микроскопии.

В связи с большим разнообразием возможных хозяев и высокой специфичностью (тропностью) некоторых видов криптоспоридий к определенным животным и человеку усовершенствование таксономии этой группы простейших необходимо в целях улучшения их идентификации и установления потенциальной опасности для здоровья людей в случае обнаружения этих возбудителей диарей в окружающей среде, в первую очередь в воде.

Разработка и внедрение в практику лабораторий молекулярно-биологических подходов при исследовании объектов окружающей среды позволит изучить распределение различных видов рода *Cryptosporidium* [2].

Среди криптоспоридий потенциально патогенным для человека видом является *Cryptosporidium parvum*. Однако недавно в США описаны случаи заражения ВИЧ-инфицированных пациентов, вызванные *Cryptosporidium felis* и третьим, пока еще не получившим названия видом [3].

Данные изоферментного анализа, ПЦР и ДНК-секвенирования говорят о наличии как минимум двух типов *C. parvum*: один тип характерен только для человека и некоторых приматов (генотип 1, или человеческий тип), второй – для крупного рогатого скота и человека (генотип 2, или коровий тип).

В эксперименте показана возможность заражения как телят, так и мышей генотипом 2, но не генотипом 1 [4]. Считается, что данный факт подтверждает необходимость разделения вида *C. parvum* на два генотипа, отражающих особенности эпидемиологии и трансмиссивного цикла данного паразита [1]. Скорее всего данные генотипы действительно представляют собой два различных вида [5]. В связи с различием тропизма указанных генотипов эпидемиология криптоспоридиоза у человека, возможно, также неодинакова и, как следствие, требует дополнительного изучения.

Результаты исследований в Центральной лаборатории общественного здравоохранения Великобритании

В Центральной лаборатории общественного здравоохранения Великобритании длительное время проводился генетический анализ рода *Cryptosporidium* [3, 6, 7], в основном методом ПЦР – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДФ) гена белка наружной клеточной стенки криптоспоридий. Проанализировано более 1800 случаев криптоспоридиоза у людей и животных. При этом 37,7% случаев криптоспоридиоза у людей вызывалось генотипом 1 (эксклюзивно человеческим типом), 60,7% – генотипом 2, 1,3% – генотипами 1 и 2 и 0,5% – генотипом 3.

Дальнейший анализ генотипа 3 показал, что он, по существу, представляет отдельный от *C. parvum* вид. Все случаи криптоспоридиоза у крупного рогатого скота были вызваны генотипом 2.

Часть штаммов в дальнейшем исследовали с помощью других полиморфных маркеров, включая ДНК-секвенирование. Во всех случаях показана совместная сегрегация различных аллелей, что подтверждает необходимость разделения генотипов 1 и 2 на отдельные виды.

Во время 8 водных вспышек криптоспоридиоза (490 пациентов) было установлено, что 5 из них были вызваны преимущественно генотипом 1, а 3 – генотипом 2. Эти факты в совокупности с другими эпидемиологическими данными показывают, что фекальное загрязнение воды как человеком, так и животными является важным звеном в распространении криптоспоридиоза.

При исследовании 53 образцов фекалий пациентов, заболевших во время 5 вспышек криптоспоридиоза, обусловленных посещением плавательных бассейнов, были получены следующие результаты: 2 вспышки вызваны генотипом 1, 2 вспышки – как генотипом 1, так и генотипом 2, одна вспышка – генотипом 2.

При анализе материала, поступившего из 26 очагов инфекции и одной контактной группы лиц, возбудителем заболевания оказался один и тот же генотип: в 13 очагах – генотип 1, в 14 – генотип 2. По два последовательных положительных образца получено от 5 пациентов. При этом один и тот же генотип *C. parvum* обнаружен в обоих образцах у 4 пациентов: генотип 1 – у 3, генотип 2 – у 1. У одного пациента в первом образце был обнаружен генотип 1, во втором, полученном через 6 дней после первого, генотипы 1 и 2 одновременно.

В ходе анализа криптоспоридий, выделенных при спорадических случаях в Великобритании, вы-

явлено неравномерное географическое распределение различных генотипов. Так, в Шотландии и Северной Ирландии доминировал генотип 2, в то время как генотип 1 чаще выделялся в Уэльсе (Англия). В 1998–1999 гг. проанализировано более 20% спорадических случаев криптоспориоза в Анг-

лии. Установлено, что генотип 1 значительно чаще выделялся у больных в летне-осенний период. У пациентов, выезжавших за пределы Англии, значительно варьировало географическое распределение генотипов.

Литература

1. Morgan U.M., Xiao L., Fayer R., Lal A.A., Thompson R.C. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *Int J Parasitol* 1999; 29:1733-51.
2. Fayer R., Lewis E.J., Trout J.M., Graczyk M.C., Higgins J., Xiao L., Lal A.A. *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:706-10.
3. Pieniazek N.J., Bornay-Llinares F.J., Slemenda S.B., da Silva A.J., Moura I.N.S., Arrowood M.J., Ditrich D., Addiss D.G. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:444-9.
4. Peng M.M., Xiao L. Genetic polymorphisms among *Cryptosporidium parvum* isolates: Evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg Infect Dis* 1997; 3:567-73.
5. McLauchlin J., Pedraza-Diaz S., Amar-Haetzeneder C., Nichols G.L. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhoea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3153-8.
6. Patel S., Pedraza-Diaz S., McLauchlin J. The molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks. *Commun Dis Public Health* 1998; 1:231-3.
7. Patel S., Pedraza-Diaz S., McLauchlin J. The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RELP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene. *Int J Parasitol* 1999; 29:1241-7.