

УДК 576.893.161.22:575]:616-092

<https://doi.org/10.51523/2708-6011.2024-21-4-01>

Патогенетические особенности *Giardia lamblia*, достижения и перспективы генотипирования простейшего

С. Ю. Шуманская, А. А. Жизневская, Е. Е. Григорьева,
А. М. Дроница, Е. Г. Фомина

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Беларусь

Резюме

Лямблиоз не теряет своей актуальности, несмотря на активное развитие таких направлений медицины, как диагностика, лечение и профилактика. Выделяют 8 генетических групп простейшего *Giardia lamblia* – от А до Н. Генетические комплексы А и В долгое время связывали с возникновением инвазии у человека, когда другие – от С до Н – выявлялись лишь у специфичных животных-хозяев. Последние данные исследования простейшего указывают на то, что это распределение условно и циркуляция генетических сборок *G. lamblia* является более сложным и многофакторным процессом. В свою очередь фенотипически неразличимые группы А и В также имеют значительные генетические отличия и делятся на подгруппы AI, AII и AIII, а также BIII и BIV. Во многих научных исследованиях основным методом, позволяющим установить принадлежность *G. lamblia* к определенной сборке, наряду с частичным или полногеномным секвенированием является мультилокусное определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с использованием «традиционных» генов, таких как бета-гардин (β -giardin (*bg*)), триозофосфатизомераза (triosephosphate isomerase (*tpi*)) и глутаматдегидрогеназа (glutamate dehydrogenase (*gdh*)). Активно ведутся поиски по выявлению новых мишеней, пригодных для определения принадлежности к генетическим группам.

В связи с отсутствием стандартизированных подходов к молекулярному генотипированию возбудителя лямблиоза продолжается этап накопления знаний о его генетическом разнообразии. Данные сведения важны для понимания связей между генетическими комплексами *G. lamblia* и клиническими проявлениями, а также отдаленными последствиями заболевания, патогенеза и взаимодействия между возбудителями при коинфицировании различными генетическими сборками, равно как оценки вклада каждой из них в инфекционный процесс, так и потенциала для накопления генетических рекомбинационных мутаций и уровнем их распространенности в возрастных группах или по территориям.

В обзоре представлены актуальные данные о современном уровне знаний о генетическом разнообразии возбудителя лямблиоза и его патогенетических особенностях, а также оценены перспективы усовершенствования генотипирования *G. lamblia*.

Ключевые слова: лямблиоз, инвазия, ПЦР, генотипирование, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочитали и одобрили финальную версию для публикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Для цитирования: Шуманская СЮ, Жизневская АА, Григорьева ЕЕ, Дроница АА, Фомина ЕГ. Патогенетические особенности *Giardia lamblia*, достижения и перспективы генотипирования простейшего. Проблемы здоровья и экологии. 2024;21(4):7–15. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2024-21-4-01>

Pathogenetic features of *Giardia lamblia*, achievements and prospects for genotyping the protozoan

Sviatlana Yu. Shumanskaya, Anastasiya A. Zhyzneyskaya, Elena E. Grigorieva,
Alina M. Dronina, Elena G. Fomina

Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

Abstract

Giardiasis does not lose its relevance, despite the active development of such areas of medicine as diagnosis, treatment and prevention. There are 8 genetic groups of the protozoan *Giardia lamblia* from A to H. Genetic complexes A

and B have long been associated with the occurrence of invasion in humans, when others - from C to H - were detected only in specific animal hosts. Recent data indicate that this distribution is conditional and the circulation of *G. lamblia* genetic assemblies is a more complex and multifactorial process. In turn, phenotypically indistinguishable groups A and B also have significant genetic differences and are divided into subgroups AI, AII and AIII, as well as BIII and BIV. In many scientific studies, the main method to establish the belonging of *G. lamblia* to a particular assembly, along with partial or full genome sequencing, is multilocus determination of restriction fragment length polymorphisms using «traditional» genes, such as beta-giardin (*bg*), triosephosphate isomerase (*tpi*) and glutamate dehydrogenase (*gdh*). Intensive searches are conducted to identify new targets suitable for identifying genetic groups.

Due to the lack of standardized approaches to molecular genotyping of the causative agent of giardiasis, the stage of accumulating knowledge about its genetic diversity continues. This information is important for understanding the relationships between genetic complexes of *G. lamblia* and clinical manifestations, as well as long-term consequences of the disease; pathogenesis and interaction between pathogens during co-infection with different genetic assemblies, and also assessment of the contribution of each of them to the infectious process, as well as the potential for the accumulation of genetic recombination mutations and their level of prevalence in age groups or territories. The review presents latest data on the current state of knowledge about the genetic diversity of the causative agent of giardiasis and its pathogenetic features, and also evaluates the prospects for improving genotyping of *G. lamblia*.

Keywords: *giardiasis, invasion, PCR, genotyping, restriction fragment length polymorphism*

Author contributions. All authors made significant contributions to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version for publication.

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

Funding. The study was conducted without sponsorship.

For citation: Shumanskaya SYu, Zhyzneyskaya AA, Grigorieva EE, Dronina AA, Fomina EG. Pathogenetic features of *Giardia lamblia*, achievements and prospects for genotyping the protozoan. *Health and Ecology Issues*. 2024;21(4):7–15. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2024-21-4-01>

Введение

Инфекционные заболевания сопровождают человечество на протяжении всего его существования и наносят ощутимый экономический и социальный ущерб. Несмотря на то, что бактерии или вирусы считаются основными возбудителями инфекционных заболеваний, немаловажную роль и вклад в заболеваемость населения Земли вносят паразитарные инвазии, которые «маскируют» свои клинические проявления под наиболее распространенные инфекционные патологии и продолжают успешно существовать. Распространению инвазий способствуют такие эпидемиологические риски, как глобализация, преодоление возбудителями межвидовых барьеров, развитие лекарственной устойчивости и, наконец, эволюция самих микроорганизмов. По данным ВОЗ (2017), более 4,5 млрд человек в мире инвазированы паразитами, из них 70 % составляют дети [1].

Одним из таких эпидемически значимых паразитов является простейшее *G. lamblia* – основная причина возникновения невирусных диарей во всем мире, которая вызывает широко известное заболевание – лямблиоз. По данным ВОЗ, ежегодно лямблиями инвазируется около 280 млн человек. Согласно официальным данным в 2020 г. в Польше было зарегистрировано 358 новых случаев лямблиоза, в Латвии ежегодно в среднем выявляется 34 случая, в Эстонии – 86, в Российской Федерации – более 130 000, а в

Республике Беларусь — более 500 случаев [2–4]. Существенные различия в количестве регистрируемых случаев заболевания могут быть связаны с особенностями систем здравоохранения этих стран, в частности с методами диагностики этиологического агента, а также статистического учета заболеваемости. Некоторые исследователи предполагают, что количество случаев в разы больше, что связано с существованием бессимптомных форм, которые поддерживают циркуляцию возбудителя в популяции [5].

G. lamblia является распространенным кишечным патогеном, который, несмотря на то, что поражает в основном желудочно-кишечный тракт, вызывает достаточно большое количество неспецифических симптомов, которые увеличивают длительность периода постановки диагноза и отдалают начало этиотропной терапии. Острые формы, как правило, связаны с появлением у заболевшего водянистой диареи, но наличие хронической инфекции может проявляться разнонаправленными симптомами: от классических проявлений со стороны желудочно-кишечного тракта (диарея) до нарушения всасывания питательных веществ, остановки развития у детей, аллергических проявлений, например, крапивницы и т. д. [4, 6, 7]. Существенной проблемой остается возникновение отдаленных последствий после перенесенного заболевания, таких как синдром раздраженного кишечника или хронической усталости [8].

В мировой практике для диагностики лямблиоза разработаны и внедрены тест-системы на основе иммунологических методов по определению антител к *G. lamblia* и выявлению антигена в фекальных образцах, методами ИФА и ПЦР в различных модификациях и др., тем не менее диагностика лямблиоза вызывает определенные трудности. До настоящего момента в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 15.12.2010 № 1334 «Об утверждении Инструкции о порядке применения методов обследования на паразитарные заболевания отдельных профессиональных, возрастных и других групп населения» в нашей стране основным методом диагностики паразитарных заболеваний является микроскопия, которая обладает низкой чувствительностью и специфичностью. В связи с наличием перекрестных иммунных реакций, а также сложности строения самого возбудителя иммунологические тесты также не дают реального представления о распространенности лямблиоза. Широкое внедрение молекулярных методов способствует эффективному и своевременному выявлению инвазии, что доказывает международный опыт. В Норвегии с 2020 г. в качестве диагностического теста определения наличия генетического материала простейшего используется метод ПЦР, что позволило увеличить выявляемость паразита более чем на 40 % и помогло не только установить распространенность инвазии внутри страны, но и охарактеризовать эпидемический процесс [9].

В настоящее время генетические особенности *G. lamblia* изучены недостаточно, тем не менее эти знания позволяют выработать универсальные молекулярные методы для формирования представления об эндемичности определенных территорий, выявлении новых групп риска и сравнения эпидемиологических данных. В то же время они помогут установить связь между генетическими особенностями патогена и тяжестью клинических проявлений, частотой возникновения отдаленных последствий у инвазированных лиц, позволят выявить факторы риска, которые имеют первостепенное значение для поддержания эпидемического процесса и способствуют возникновению микст-инфицирования.

Генетическое разнообразие *G. lamblia*

Разработка, использование и широкое внедрение молекулярных методов в исследование паразита привело к обнаружению различий у морфологически неотличимых друг от друга простейших и открытию различных генетических групп.

Изучение геномов изолятов *G. lamblia*, выделенных у инфицированных людей, показало, что их можно разделить на две главные генетические

группы или ассамблеи/сборки, названные А и В, с уровнем аминокислотной идентичности в кодирующих регионах около 78 %. Изоляты, относящиеся к ассамблее А, лучше изучены, однако современные эпидемиологические данные позволяют предположить, что изоляты генетической группы В более распространены в человеческой популяции. Представители сборки А и В найдены и у животных, таких как домашний скот, кошки, собаки и крысы, что свидетельствует о зооантропонозной природе возбудителя. Другие изоляты, генетически отличные от ассоциированных с человеком групп А и В, обнаружены у целого ряда животных и птиц и сгруппированы в ассамблеи от С до Н. Генотипы, принадлежащие к комплексам С и D, были выявлены у собак, волков, койотов и кошек; Е – у крупного рогатого скота, овец, свиней, коз и буйволов; F – у кошек; G – у крыс, H – у морских млекопитающих [10].

До недавнего времени предполагалось, что в человеческой популяции могут циркулировать представители только двух генетических комплексов возбудителя — А и В. Однако публикуется все больше научных исследований о том, что некоторые несвойственные для людей комплексы *G. lamblia* встречаются в человеческой популяции и, наоборот, генетические группы лямблий, характерные для человека, идентифицируют у животных. Встречаются спорадические сведения об идентификации ассамблей С, D и F у людей (некоторые территории Африки, включая Египет). Все чаще сообщается о выявлении случаев инвазирования человека генотипами, принадлежащими ассамблее Е (Новая Зеландия, Бразилия, Египет, Китай). Предполагается, что парнокопытные животные, такие как крупнорогатый скот, овцы и свиньи, являются основными хозяевами возбудителя генетического комплекса Е, однако в последнее время наблюдается растущая тенденция к выделению от скота изолятов генетической группы А. Следует отметить, что она чаще встречается у молодых животных, тогда как Е — у взрослых особей [11–15].

Показано, что внутри ассамблей простейшего *G. lamblia* также существует разнообразие. Среди генетической группы А определяется по меньшей мере 3 подгруппы: AI — рассматривается как зооноз и обнаруживается у крупнорогатого скота, буйволов, кошек, свиней, овец; AII — циркулирует в основном у человека; AIII — выявляется главным образом у диких жвачных животных. Внутри генетической группы В определяется две подгруппы — BIII и BIV, представители которых могут поражать как животных, так и людей и относятся к зооантропонозам [8].

Сведения о корреляции между клиническими проявлениями, ареалом распространения

и определенными генетическими комплексами противоречивы. Так, в исследованиях, проведенных в Нидерландах среди детей в организованных коллективах, изоляты *G. Lambliа*, относящиеся к сборке В, выявлялись чаще (70 %), чем изоляты, принадлежащие геногруппе А (30 %). Однако у детей, инвазированных изолятами комплекса А, вероятность развития диареи была в 26 раз выше, чем у детей с изолятами, относящимися к комплексу В, характеризующимся бессимптомным течением [16]. Схожие результаты выявили египетские исследователи в группе пациентов с диареей в возрасте от 2 до 55 лет. У пациентов с изолятами, принадлежащими к генетической группе А (36,66 %), заболевание протекало в более тяжелой форме, чем у инвазированных изолятами, относящимися к комплексу В (63,34 %) [18].

В других научных источниках зафиксирована большая частота встречаемости изолятов, свойственных для ассамблеи В с противоположной корреляцией, — симптомы у инвазированных проявлялись чаще, чем при инфицировании изолятами, принадлежащими сборке А. По данным английских ученых, среди пациентов с гастроэнтеритами о наличии симптомов кишечной инфекции (рвота, вздутие и боли в животе, потеря аппетита) чаще сообщали инвазированные изолятами комплекса В (67 %) [20]. По результатам исследований в группе детей начальной школы на Кубе также сообщалось о корреляции между симптомами заболевания и наличием изолятов сборки В (55 % детей) [19]. Наблюдения, проведенные в Испании среди пациентов стационаров в возрасте от 1 до 75 лет, где изоляты, принадлежащие сборке А, выявлялись в 29,3 % случаев, изоляты комплекса В — в 66,78 %, а в остальных — смешанные инвазии, свидетельствовали о наличии связи между генетической группой А и бессимптомным носительством, а также о большей частоте жалоб на наличие болей в животе от пациентов, инвазированных изолятами ассамблеи В [21].

Более того, в исследованиях, проведенных в Бразилии среди детей с симптомами кишечных инфекций (диарея), где в 74,1 % случаев выявлялись изоляты, относящиеся к генетической сборке В, в 15,5 % — к ассамблее А, а в оставшихся 10,3 % — микст-инфекции с изолятами комплексов А и В, никаких существенных различий между группами по симптомам не было установлено [17].

Такие противоречивые сведения указывают на необходимость разработки стандартных молекулярных методов для выявления особенностей и достоверного сравнения данных о распространенности генетических групп и вызываемых

ими симптомами между странами для внедрения противоэпидемических и профилактических мероприятий. Кроме того, для достижения этих целей необходимо обеспечить возможность проведения молекулярно-генетических исследований в клинических лабораториях, а не только использовать «классические» методы, такие как микроскопия.

Имеющиеся в настоящее время научные данные позволяют утверждать, что в большинстве случаев инвазирование людей происходит геновариантами, относящимися к генетическим группам А (подгруппа АII) и В. Следует отметить, что многочисленные исследования подтвердили значительные различия между представителями генетических сборок А и В, что даже послужило поводом в 1985 г. выдвинуть предположение (которое не было подтверждено), что это два разных микроорганизма. Наиболее изученным изолятом среди комплекса В является GS, среди изолятов подгруппы AI — WB.

При исследовании биологических различий между изолятами подгруппы AI и комплекса В (GS) у добровольцев было установлено, что изоляты, относящиеся к сборке В, вызывали заболевание, в то время как изоляты подгруппы AI (вариант ISR) — нет. При исследовании на биологических моделях (песчанки) было установлено, что изолят комплекса В (GS) оказался более патогенным, чем изолят сборки А (WB) [22].

Данные научные результаты были подтверждены в экспериментах на мышах, у которых при инвазировании изолятом, относящимся к комплексу В (GS), возникали симптомы заболевания, тогда как при заражении изолятом комплекса А (WB) развитие инфекции не происходило. В ходе эксперимента также было обнаружено, что при введении одинаковой инвазирующей дозы (10^6 трофозоитов) паразитарная нагрузка в кишечнике у мышей с изолятом WB была несколько ниже, чем у мышей с изолятом GS, но различия в количестве патогена не были статистически значимыми. При оценке возможности вызвать дефицит дисахаридов была выявлена связь между инвазированием изолятом GS и нарушением ферментативной активности, когда у зараженных изолятом WB такого не наблюдалось [23].

В более ранних экспериментах на культуре клеток было установлено, что различные изоляты генетических групп *G. Lambliа* отличаются по способности вызывать патологические изменения *in vitro*. Например, некоторые изоляты паразита (NF, S2) способны индуцировать апоптоз в нетрансформированной эпителиальной клеточной линии (SCBN), тогда как другие изоляты (WB, PB) подобный эффект не вызывали [23].

Ввиду противоречивости экспериментальных данных углубленное изучение генетических особенностей изолятов комплексов *G. lamblia* необходимо для понимания эпидемиологии и патогенеза лямблиоза, для установления факторов, на которые возможно оказывать влияние для предупреждения самого заболевания, а также его отдаленных последствий.

Проблема смешанных инвазий

В научной литературе встречаются сведения о наличии у пациентов с лямблиозом микст-инфицирования различными генетическими группами, что подчеркивает сложность взаимоотношений и динамику смены паразитов как между различными хозяевами, так и с окружающей средой, а также отражает наличие генетических различий. Примером могут служить исследования, подтверждающие инвазирование людей в Новой Зеландии, связанные с изолятами генетической сборки E и подгруппы AIII. Наиболее вероятно, что дополнительное заражение изолятами, относящимися к подгруппе AIII, произошло при контакте с дикими животными, зараженными домашними животными и/или через загрязненную воду.

Изоляты, принадлежащие генетическому комплексу E, выявлялись у людей, живущих в сельскохозяйственных районах с высокой плотностью жвачных животных, — в Австралии, Египте, Бразилии и др. Смешанное инвазирование изолятами комплекса E и подгруппы BIV, также выявленное в Новой Зеландии, могло быть связано с наличием других скрытых источников инфекции или неучтенных факторов передачи [14]. Сведения о смешанных инвазиях, наиболее часто свидетельствующие об одновременном инфицировании изолятами генетических групп A и B, встречаются и в других научных работах. Однако микст-инфекции редко идентифицируются точно, и в большинстве исследований сообщается об их распространенности в 3–10 % от общего количества случаев [22]. Существует предположение, что данные о микст-инвазиях занижены из-за преимущественной ПЦР-амплификации в процессе диагностического исследования геномов изолятов только одного комплекса в зависимости от используемых наборов праймеров.

Понимание механизмов возникновения и особенностей существования смешанных инфекций важно, поскольку они могут поддерживать и/или увеличивать генетическую изменчивость паразитов за счет рекомбинационной изменчивости. В настоящее время принято считать, что размножение *G. lamblia* бесполое, в то же время не исключается вероятность наличия механизма обмена генетической информацией в ходе полового процесса как редкого, но возможного при определенных условиях явления.

Молекулярно-генетические методы для выявления и генотипирования *G. lamblia*

В настоящее время генотипирование микроорганизмов широко используется при осуществлении эпидемиологического надзора за инфекциями и выявлении филогенетических связей возбудителя. Разработано множество молекулярно-генетических методов для изучения эпидемиологических характеристик микроорганизмов.

Методы на основе ПЦР для диагностики *G. lamblia*

Одной из первых и важнейших задач перед осуществлением генотипирования является необходимость подтверждения наличия определенного инфекционного агента в биологическом материале. В настоящее время «золотым стандартом» диагностики большинства инфекционных и неинфекционных патологий являются методы на основе ПЦР.

Разработано и применяется на практике множество коммерческих моно- и мультиплексных наборов для выявления генетического материала *G. lamblia*. Создан также отечественный набор для генодиагностики *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* «Прото-ПЦР/РВ» для ПЦР с гибридационной-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии».

Достоинством набора является наличие экзогенного внутреннего контрольного образца, который дает возможность оценки успешности экстракции генетического материала, а также эффекта ингибирования ПЦР, что является преимуществом при исследовании фекальных образцов, богатых ингибиторами ПЦР.

В ходе проведения собственных молекулярно-биологических исследований доказана эффективность и конкурентоспособность данного набора в сравнении с его коммерческими аналогами. Совпадение результатов ПЦР отмечалось в 100 % случаев, при более детальном сравнении было установлено, что флуоресцентный сигнал в положительных образцах при применении отечественного набора регистрировался на 3–5 циклов раньше [24].

Многолокусное генотипирование с применением метода определения полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Одним из первых в изучении генетических комплексов *G. lamblia* использовался метод ПЦР–ПДФ.

Локусы-маркеры, которые применяются в генотипировании *G. lamblia*, значительно различаются по генетической вариабельности, а также чувствительности и специфичности. Традиционными, или «классическими» целевыми для исследования генами *G. lamblia* являются ген рРНК малой субъединицы рибосом (small-subunit ribosomal RNA (SSU)), внутренние транскрибируемые спейсеры (internal transcribed spacers (ITS1, ITS2)) и специфичные для простейшего гены — бета-гардин (β -giardin (*bg*)), триозофосфатизомераза (triosephosphate isomerase (*tpi*)) и глутаматдегидрогеназа (glutamate dehydrogenase (*gdh*)) [25].

Ген рибосомной РНК малой субъединицы (SSU) долгое время оставался одним из наиболее часто используемых локусов для генотипирования из-за его высококонсервативной последовательности, мультикопийности и высокой скорости накопления продукта амплификации в ПЦР. В большинстве исследований по генотипированию с использованием фрагмента локуса SSU используется метод «гнездовой», или вложенной ПЦР для увеличения чувствительности реакции. Применение данного метода показало хорошие результаты при работе с небольшим количеством ДНК паразитов в пробе или же наличием ингибиторов ПЦР в образце, что характерно для генетического материала, выделенного из фекалий, которые являются основным материалом для исследования. Хотя локус SSU *G. lamblia* может широко использоваться для генотипирования, многие исследователи рекомендуют использовать его только для подтверждения наличия возбудителя в образце, а не для выявления генетического разнообразия. Это связано с тем, что данный локус характеризуется низкой генетической вариабельностью между генотипами паразита, что не дает возможности их точной дифференцировки.

Для выявления генетических групп и подгрупп *G. lamblia* используются специфические локусы — бета-гардин (*bg*), триозофосфатизомераза (*tpi*) и глутаматдегидрогеназа (*gdh*). В настоящее время разработано и используется множество пар праймеров для амплификации данных локусов. Для гена *tpi* созданы специфичные пары праймеров, которые позволяют выявить различные генетические сборки *G. lamblia* по длине фрагментов с помощью гель-электрофореза сразу после ПЦР без необходимости в рестрикционном анализе, что делает этот метод более выгодным по временным и финансовым затратам. Еще одним весомым аргументом в пользу данного метода является возможность более эффективного обнаружения смешанных инфекций, поскольку использование стандартных прайме-

ров не всегда позволяет определить смешанные инвазии из-за различных соотношений генетических комплексов *G. lamblia* в образцах [26].

Для успешности генотипирования и отнесения к тому или иному комплексу исследователи рекомендуют использовать метод многолокусного генотипирования, включающий параллельное одномоментное применение праймеров на различные локусы.

Так, при проведении многолокусного генотипирования с праймерами для *bg*, *gdh* и *tpi* китайскими исследователями было описано несколько новых подтипов генетических комплексов. В генетической группе А определили 6 подтипов: А1 и А5 относятся к подгруппе АI, подтипы А2, А3 и А4 — к АII, А6 — к АIII. Эти подтипы в основном различаются всего лишь одной точечной мутацией.

В научной литературе встречаются сведения об использовании рибосомного межгенного спейсера (IGS region of rDNA) как в одиночку, так и при многолокусном генотипировании. Локус IGS *G. lamblia* представляет собой высоковариабельную область, позволяющую дифференцировать основные генетические комплексы паразита. Однако в настоящее время данных о последовательностях эталонных изолятов, доступных для сравнения в GenBank, недостаточно, что затрудняет использование локуса IGS при проведении исследований [26].

Применение метода многолокусного генотипирования с использованием метода определения полиморфизма длин рестрикционных фрагментов позволяет с большей уверенностью говорить о достоверности. Во время оценки результатов генотипирования при использовании только одного локуса нельзя исключить влияние таких факторов, как качество полученного генетического материала, которое во многом зависит от способа экстракции, наличия ингибиторов и количества ДНК. Помимо этого отрицательный результат может быть связан с неполной комплементарностью нуклеотидов гена-мишени и используемых праймеров, что может приводить к отсутствию амплифицированного фрагмента и, как следствие, невозможности генотипирования изолятов.

Метод ПЦР с последующим рестрикционным анализом локусов *bg*, *tpi* и *gdh* продолжает оставаться классическим методом генотипирования *G. lamblia*, в то же время ведутся поиски новых локусов для проведения быстрой и малозатратной диагностики.

Секвенирование *G. lamblia*

Определение нуклеотидных последовательностей различных вариантов способствует пониманию особенностей паразита *G. lamblia* и

позволяет проводить сравнительные молекулярно-генетические исследования внутри отряда простейших — диплоноад [8]. По состоянию на июль 2024 г. в международной базе нуклеотидных последовательностей GenBank имеются референсные геномы для 6 изолятов.

Секвенирование по Сэнгеру продолжает оставаться эталонным в молекулярных исследованиях благодаря своей точности, сравнительной простоте [27]. Первая секвенированная по Сэнгеру последовательность генома *G. lamblia* опубликована в 2007 г. (комплекс А изолят WB). В последующие годы были опубликованы другие геномные последовательности *G. Lamblia*, выделенные от человека — комплекс В (GS, GS-B и BAN15c1) и А (DH, AS175 и AS98), от свиней — сборка Е (P15) и собак — С и D. В связи с совершенствованием методов секвенирования информация о геномах эталонных изолятов постоянно обновляется [8].

Многие геномные последовательности получены с помощью технологий секвенирования второго поколения (next generation sequencing (NGS)). Несмотря на высококачественное считывание с относительно низким уровнем ошибок, небольшая длина прочтений (~300 п. н.) усложняет процесс сборки, из-за чего полученные последовательности остаются фрагментированными [28]. Показано, что для генотипирования *G. lamblia* NGS эффективны в той же степени, как ПЦР и секвенирование по Сэнгеру, и обладают большей чувствительностью в отношении обнаружения смешанных инвазий [29].

Напротив, платформы секвенирования третьего поколения производят гораздо более длинные считывания (~10 000 п. н.), но имеют более высокий уровень ошибок (10–15 %). Текущий эталонный изолят (WB-C6, клон исходного изолята WB) был повторно проанализирован с использованием технологии одномолекулярного секвенирования третьего поколения (single molecule real time sequencing (SMRT)). Для получения качественных новых геномных последовательностей ученые предлагают использовать гибридный подход с применением технологий второго и третьего поколения, которые компенсируют недостатки друг друга. Данный метод позволяет проводить глубокий анализ основных источников генетической изменчивости между изолятами простейшего, которые могут влиять

как на патогенность, так и на взаимодействие с популяцией хозяев [28].

Накопление знаний о генетических последовательностях изолятов, принадлежащих к различным генетическим комплексам и полученных не только от человека, но и от животных, необходимо для понимания генетического разнообразия, патогенности *G. lamblia*, способности патогена избирательно инфицировать определенный вид хозяина. Данные сведения также будут способствовать выявлению новых генетических маркеров для диагностики, установления источников инвазии и определения генов резистентности к противопротозойным препаратам. Более того, полученные данные могут быть использованы для определения мишеней для эффективной этиотропной терапии и разработки иммунобиологических лекарственных средств.

Заключение

Простейшее *G. lamblia* вносит существенный вклад в заболеваемость невирусными диареями по всему миру и с течением времени не теряет своей актуальности. Разнообразие клинических проявлений, наличие и малая изученность отдаленных последствий, отсутствие достоверных данных о территориальной распространенности генетических комплексов и их связи с эпидемическими и патогенетическими проявлениями свидетельствуют об актуальности и необходимости проведения дальнейших молекулярно-биологических исследований с использованием большего количества маркеров и поиска новых подходов генотипирования. В настоящее время более очевидной становится необходимость оптимизации системы классификации *G. lamblia*, что позволит разделить генетические группы и их подгруппы, облегчит проведение молекулярно-эпидемиологических и сравнительных исследований, которые помогли бы выявить ранее не изученные факторы риска распространения инвазии. Многолокусное генотипирование является актуальным в проведении исследований, так как типирование только по одному локусу часто может привести к противоречивым выводам. Для выявления новых генетических маркеров, способствующих проведению генотипирования, требуется больше информации о результатах полногеномного анализа *G. lamblia*.

Список литературы / References

1. Файзуллина Р.М., Санникова А.В., Гафурова Р.Р. Паразитозы как коморбидное состояние у детей с аллергическими заболеваниями. *РМЖ*. 2020;(2):24-27.
Fayzullina RM, Sannikova AV, Gafurova RR. Parasitic diseases are comorbidities in children with allergic disorders. *RMJ*. 2020;(2):24-27. (In Russ.).
2. Kitowska W, Sadkowska-Todys M Giardiasis (lamblia) in Poland in 2020. *Przegl Epidemiol*. 2022;76(4):616-625. DOI: <https://doi.org/10.32394/pe.76.56>
3. Dekšne G, Kruminš A, Mateusa M, et al. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. Infection in Humans in Latvia: Evidence of Underdiagnosed and Underreported Cases.

- Medicina*. 2022;58(4):471.
DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina58040471>
4. Белова А.А., Шестакова М.Д., Хавкин А.И. Лямблиоз и постинфекционный СРК. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021;(4):178-187.
DOI: <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-188-4-178-187>
- Belova AA, Shestakova MD, Khavkin AI Giardiasis and post-infectious bowel syndrome. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;188(4):178-187. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-188-4-178-187>
5. Esch, KJ, Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol*. 2013;26(1) :58-85.
DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>
6. Мочалова А.А., Ершова И.Б., Карпенко И.Н., Черкасова С.Н. Лечение и диагностика лямблиоза в современных условиях. *Актуальная инфектология*. 2013;1(1):95-100.
Mochalova AA, Ershova IB, Karpenko IN, Cherkasova SN. Treatment and diagnosis of giardiasis in modern conditions. *Current infectology*. 2013;1(1):95-100. (In Russ.).
7. Бодня Е.И., Кадельник Л.А., Бодня И.П. Современное представление о патогенезе и клинике лямблиоза. *Педиатрия. Восточная Европа*. 2017;5(4):670-682.
Bodnya EI, Kadelnik LA, Bodnya IP. Modern understanding of the pathogenesis and clinic of giardiasis. *Pediatrics. Eastern Europe*. 2017;5(4):670-682. (In Russ.).
8. Adam RD. Giardia duodenalis: Biology and Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2021;34:1-35.
DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-19>
9. Campbell SM, Pettersen FO, Brekke H, Hanevik K, Robertson LJ. Transition to PCR diagnosis of cryptosporidiosis and giardiasis in the Norwegian healthcare system: could the increase in reported cases be due to higher sensitivity or a change in the testing algorithm? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2022;41:835-839.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-022-04426-3>
10. Ankarklev J, Jerlström Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svård SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(6):413-22.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2317>
11. Ryan U, Zahedi A. Molecular epidemiology of giardiasis from a veterinary perspective. *Advances in Parasitology*. 2019;106:209-254.
DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.07.002>
12. Fantinatti M., Bello AR, Fernandes O, Da-Cruz AM. Identification of Giardia Lamblia Assemblage E in Humans Points to a New Anthrozootic Cycle. *Journal of Infectious Diseases*. 2016;214(8):1256-1259.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw361>
13. Zahedi A, Field D, Ryan U. Molecular Typing of Giardia Duodenalis in Humans in Queensland – First Report of Assemblage E. *Parasitology*. 2017;114:1154-1164.
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182017000439>
14. Garcia-R JC, Ogbuigwe P, Pita AB, Velathanthiri N, Knox MA, Biggs PJ, et al. First report of novel assemblages and mixed infections of Giardia duodenalis in human isolates from New Zealand. *Acta Tropica*. 2021;220:105969.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105969>
15. Zhang XX, Tan QD, Zhao GH, Ma JG, Zheng WB, Ni XT, et al. Prevalence, risk factors and multilocus genotyping of Giardia intestinalis in dairy cattle, Northwest China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2016;63(4):498-504.
DOI: <https://doi.org/10.1111/jeu.12293>
16. Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC. Correlation between genotype of Giardia duodenalis and diarrhoea. *International Journal for Parasitology*. 2002;32(2):229-231.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00340-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00340-x)
17. El Basha NR, Zaki MM, Hassanin OM, Rehan MK, Omran D. Giardia assemblages A and B in diarrheic patients: A comparative study in Egyptian children and adults. *Journal of Parasitology*. 2016;102(1):69-74.
DOI: <https://doi.org/10.1645/14-676>
18. Minetti C, Lamden K, Durband, Cheesbrough J, Platt K, Charlett A, O'Brien SJ, et al. Case-control study of risk factors for sporadic giardiasis and parasite assemblages in North West England. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53:3133-3140.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00715-15>
19. Pelayo L, Nuñez FA, Rojas L, Furusetth Hansen E, Gjerde B, Wilke H, et al. Giardia infections in Cuban children: The genotypes circulating in a rural population. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2008;102:585-595.
DOI: <https://doi.org/10.1179/136485908X355247>
20. Wang Y, Gonzalez-Moreno O, Roellig DM, Oliver L, Huguet J, Guo Y, et al. Epidemiological distribution of genotypes of Giardia duodenalis in humans in Spain. *Parasites & Vectors*. 2019;12:432.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3692-4>
21. Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al. Giardia duodenalis assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*. 2008;102(7):718-725.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.002>
22. Adam RD, Dahlstrom EW, Martens CA, Bruno DP, Barbican KD, Ricklefs SM, et al. Genome Sequencing of Giardia lamblia Genotypes A2 and B Isolates (DH and GS) and Comparative Analysis with the Genomes of Genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome Biology & Evolution*. 2013;5(12):2498-2511.
DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evt197>
23. Solaymani-Mohammadi S, Singer SM. Host Immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. *The Journal of Immunology*. 2011;187(7):3769-3775.
DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100606>
24. Шуманская С.Ю., Григорьева Е.Е., Дронина А.М., Фомина Е.Г. Сравнительный анализ методов выделения генетического материала из фекальных образцов и пути оптимизации молекулярно-генетической диагностики лямблиоза. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2024;13(1):103-115.
DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.1.009>
- Shumanskaya SYu, Grigorieva EE, Dronina AM, Fomina EG. Comparative Analysis of Genetic Material Extraction Methods from Fecal Samples and Optimization Ways for Molecular Genetic Diagnosis of Giardiasis. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*. 2024;13(1):103-115. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.1.009>
25. Thompson RCA, Ash A. Molecular epidemiology of Giardia and Cryptosporidium infections. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016;40:315-323.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.028>
26. Zajaczkowski P, Lee R, Fletcher-Lartey SM, et al. The controversies surrounding Giardia intestinalis assemblages A and B. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*. 2021;1:100055.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crvpbd.2021.100055>
27. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437:376-380.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nature03959>
28. de Paula Baptista R, Tucker MS, Valente MJ, Srivastava SK, Chehab N, Li A, et al. Comparative genomics of Giardia duodenalis sub-assemblage AI beaver (Be-2) and human (WB-C6) strains show remarkable homozygosity, sequence similarity, and conservation of VSP genes. *Sci Rep*. 2024;14:13582.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63783-5>
29. Pollo SMJ, Reiling SJ, Wit J, Workentine ML, Guy RA, Batoff GW, et al. Benchmarking hybrid assemblies of Giardia and prediction of widespread intra-isolate structural variation. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):108.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3968-8>

Информация об авторах / Information about the authors

Шуманская Светлана Юрьевна, м.н.с. лаборатории иммунологии и клеточной биотехнологии, ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3540-3459>

e-mail: s.shumanskaia@mail.ru

Жизневская Анастасия Анатольевна, стажер м.н.с. лаборатории иммунологии и клеточной биотехнологии, ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-5625-9812>

e-mail: anastasia.zhyzneyskaya@gmail.com

Григорьева Елена Евгеньевна, к.б.н., доцент, в.н.с. лаборатории иммунологии и клеточной биотехнологии, ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3919-0625>

e-mail: grigus@mail.ru

Дронина Алина Михайловна, к.м.н., доцент, заместитель директора по научной работе ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7020-387X>

e-mail: alinadronina@mail.ru

Фомина Елена Георгиевна, д.б.н., заведующий лабораторией иммунологии и клеточной биотехнологии, ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3028-1176>

e-mail: feg1@tut.by

Sviatlana Yu. Shumanskaya, Junior Researcher at the Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3540-3459>

e-mail: s.shumanskaia@mail.ru

Anastasiya A. Zhyzneyskaya, Trainee Junior Researcher at the Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-5625-9812>

e-mail: anastasia.zhyzneyskaya@gmail.com

Elena E. Grigorieva, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Leading Researcher at the Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3919-0625>

e-mail: grigus@mail.ru

Alina M. Dronina, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Deputy Director for Research, Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7020-387X>

e-mail: alinadronina@mail.ru

Elena G. Fomina, Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3028-1176>

e-mail: feg1@tut.by

Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Шуманская Светлана Юрьевна

e-mail: s.shumanskaia@mail.ru

Sviatlana Yu. Shumanskaya

e-mail: s.shumanskaia@mail.ru

Поступила в редакцию / Received 18.04.2024

Поступила после рецензирования / Accepted 05.08.2024

Принята к публикации / Revised 20.11.2024