



Наблюдение, превенция и контрол на *Leishmania* spp. в Европейски съюз и съседни държави. Методи за диагностика и контрол на заболяването

Leishmania spp. са протозойни паразити (*Kinetoplastida*, *Trypanosomatidae*) при хора и животни, предавани чрез флеботоми (пясъчни мухи) (*Diptera*, *Psychodidae*). Насекомите преобладават в по-топли географски ширини, включително част от Европейския съюз (ЕС) и съседните страни. В тази област са признати четири вида: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. donovani s.s.*, *L. tropica* и *L. major*, като лайшманиозата се проявява в две основни клинични форми: висцерална лайшманиоза (VL), тежко състояние, причинено главно от комплексните видове *L. donovani*, които се характеризират с висока смъртност, ако не са открити или лекувани на време, и кожна лайшманиоза (CL), по-често срещана, но протичаща с по-лека симптоматика, причинена от който и да е от четирите вида. Счита се, че лайшманиозите са пренебрегнати зоонози, недостатъчно докладвани инфекции, а броят случаи при хора с VL и CL в ЕС, подадени от Световната здравна организация (СЗО) е съответно 1100 - 1900 и 10000 - 17000 случая на 100 000 души население.

Пространственото разпределение на *Leishmania* spp. варира значително. *Leishmania infantum* се среща в южноевропейските страни; кучетата са силно възприемчиви на инфекцията, което ги прави най-важният резервоар на инфекцията. За разлика от това *L. major* и *L. tropica* са ограничени до Северна Африка и в някои части на Кавказ; техните първични резервоарни гостоприемници включват няколко вида диви гризачи и видове от род *Hyracoidea*. Хората също са естествени резервоари на *L. tropica* и този вид има антропогенни цикли на предаване без намесата на животни като междинен гостоприемник. Антропогенният *L. tropica* цикъл се наблюдава на остров Крит до средата на XX век и някои случаи са докладвани през първото десетилетие на XXI век, което предполага, че болестта се е появила отново на острова. Хората също са основният резервоар на *L. donovani s.s.* Това е най-рядко срещаният вид, описан досега само в Турция и Кипър.

Чувствителността и възприемчивостта към лайшмания силно зависи от имунния отговор на гостоприемника, а клетъчно-медирираният имунитет е от съществено значение за предотвратяване развитието на болестта. Паразитологичното лечение е рядко и разпространението на субклинични инфекции в ендемичните райони, особено в селските и крайградските среди, обикновено е високо. Недохранването при деца и имунодефицитни пациенти (HIV), имunosупресивното лечение на автоимунни състояния и трансплантацията на органи са основни рискови фактори за развитие на VL, причинена от *L. infantum*. Въпреки това, понякога VL може да достигне епидемични нива

при имунокомпетентни възрастни без придобит имунитет към паразита. Северна Африка, Близкия изток и Централна Азия са засегнати от лайшманиоза в европейския регион, по данни на СЗО, и десетки хиляди деца и възрастни са засегнати от CL, причинена от *L. major* и *L. tropica*. Контролът на лайшманиозите при хората е възпрепятстван от липсата на ефективни ваксини, въпреки че интрадермалната инокулация на живи паразити за предизвикване на активен имунитет е била обичайна практика в някои силно ендемични области на CL доскоро. За разлика от тях, няколко ваксини са били пуснати на пазара с цел предотвратяване на CanL (*Canine leishmaniasis*), причинени от *L. infantum*, включително две в ЕС, но тяхната ефикасност е само частична и те не предотвратяват инфекцията. Всъщност, една от тях наскоро е изтеглена от пазара.

Видовете *Leishmania* могат да бъдат разделени въз основа на техните изоензимни профили и висцеротропните и дермотропните *L. infantum* варианти обикновено се групират като отделни класове/зимодеси. Докато кучетата са домашен резервоар за *L. infantum*, някои дермотропни зимодеси не са често срещани при кучетата, което предполага, че *L. infantum* може да има и антропогенен цикъл, който не зависи от кучетата.

Диагностиката на лайшманиозите при хора и животни зависи най-вече от откриването на характерни клинични признаци и паразитологично потвърждение на инфекцията чрез микроскопия в кожни проби от пациенти с CL и проби от лимфоидна тъкан (костен мозък, лимфен възел, далак) на пациенти с VL. Полимеразна верижна реакция (PCR) и серологични техники, включително имунофлуоресцентен тест за антитела (IFAT), ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), бързи имунохроматографски тестове (RICT), директен аглутинационен тест и *western blot*, вече са на разположение и в университетите и лабораториите за обществено здраве. PCR е много чувствителна техника както за CL, така и за VL диагностика. За разлика от тях, серологичните тестове рядко се използват за откриване на инфекции с CL, тъй като тези инфекции не стимулират силен антителен отговор.

Поради сериозността си, човешките VL случаи обикновено се лекуват в болнична среда и като цяло, по-голяма част от случаите са нотифицирани, за разлика от случаите на CL, тъй като случаите на CL често се изразяват в няколко малки, безболезнени и самоограничаващи се лезии и не се стига до болнично лечение. *Alvar et al.* счита, че недостатъчното докладване е приемливо, когато е 1,2 - 1,8 пъти за VL и 2.8 - 4.6 за CL, и умерено, когато е 2 - 4 пъти за VL и 5 - 10 пъти за CL. Повече информация за проучванията на *Alvar et al.* могат да бъдат намерени в следните публикации: *Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693548>* ; *Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania /HIV co-infections in the second decade. Indian J Med Res. 2006 Mar;123(3):357-88. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778317>* ; *Babuadze G, Alvar J, Argaw D, de Koning HP, Iosava M, Kekelidze M, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Georgia. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Mar;8(3):e2725. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24603768>.*

Технически доклад на ЕОБХ на тема: „*Surveillance, prevention and control of leishmaniases in the European Union and its neighbouring countries*” представя епидемиологията на лайшманиозите при хората и животните в Европейския съюз (ЕС) и съседните държави и описва приложените мерки за наблюдение, превенция и контрол. В този доклад са включени 40 държави в Европа, Северна Африка, Близкия изток, Турция и Кавказ; всички страни, в които лайшманиозите са ендемични, както и периферните неендемични страни, в които се съобщава за вектори на лейшманиозите. Информацията в доклада обхваща периода между 2009 г. и 2020 г. Резултатите включват i) описание и анализ на пространствената и времевата динамика, включително карти на присъствие и доказателства за появата, ii) описание на законоустановените мерки за уведомяване, наблюдение и контрол и iii) описание на нивата на достъп до диагностични техники и лекарства. Тази информация е събрана, за да се осигури основа за препоръки за потенциални бъдещи действия за засилване на наблюдението, профилактиката и контрола на лайшманиозите с цел намаляване на разпространението на болестта в Европа и съседните държави. Последни данни за автохтонна ендемичност на *Leishmania* spp. са налични за Албания, Алжир, Армения, Азербайджан, Босна и Херцеговина, **България**, Хърватия, Кипър, Египет, Франция, Грузия, Гърция, Израел, Италия, Йордания, Косово, Ливан, Либия, Малта, Черна гора, Мароко, Северна Македония, Палестина, Португалия, Румъния, Сърбия, Словения, Тунис, Украйна и Турция.

Leishmania infantum, причиняващ висцерална лайшманиоза (VL) и кожна лайшманиоза (CL), присъства във всички тези страни, докато *Leishmania major* и *Leishmania tropica*, причиняващи CL, се срещат само в страните от Северна Африка и в Азербайджан. Същевременно *L. donovani sensu stricto* (s.s.) е описан само в определени райони на Кипър и Турция. Общото за всички региони е значителното увеличение на заболяемостта през 80-те и 90-те години на миналия век, което се дължи на демографските и обществените промени. В Северна Африка и Близкия изток причина за географската експанзия на този паразит е усиленото селскостопанско развитие и изграждането на транспортна инфраструктура.

Въз основа на данни на Световната здравна организация (СЗО) за периода 2005 - 2008 г. средната годишна заболяемост на 100 000 CL от *L. major* и *L. Tropica* е: 65 случая в Либия, 58 - в Тунис и 34 - в Алжир и между 3 и 11 - в Мароко, Израел, Палестина, Йордания и Турция. В следващия 15-годишен период докладваните случаи на CL намаляват в Израел и се колебаят значително в други северноафрикански и блискоизточни страни, както и в Турция, във връзка с големия поток от военни бежанци от Афганистан, Ирак и Сирия. До 2017- 2020 г. най-високата честота на CL в района, докладвана на СЗО, е 52 - в Тунис, 51 - в Либия, 26 - в Алжир и 17 - в Мароко. В засегнатите държави от ЕС честотата на CL се е увеличила значително между периода 2005 - 2008 г. и 2017 - 2020 г. (например от 0,01 на 0,27 във Франция и от 0,03 на 0,40 в Испания).

Средната годишна заболяемост на 100 000 VL от *L. infantum* през 2005 - 2008 г. е: 4,5 - в Грузия, 3,8 - в Албания, 1,1 - в Тунис, 0,99 - в Малта, 0,52 - в Мароко, 0,51 - в Испания и между 0,33 и 0,41 - в Черна гора, Гърция, Северна Македония, Алжир и

Азербайджан и между 0,12 и 0,24 - в Италия, Армения, Португалия и Хърватия. Според СЗО до периода 2017 - 2020 г. средната годишна заболеваемост от VL е намаляла значително в Грузия (1,20), Албания (0,77), Мароко (0,27), Тунис (0,22), Алжир (0,09) и Хърватия (0,91). Междувременно средната годишна заболеваемост се е увеличила значително или незначително в Армения (0,58), Азербайджан (0,52), Либия (0,38) и Франция (0,05). Сравнението между 2009- 2012 г. и 2013 - 2019 г. на средната годишна честота на случаите на VL за Гърция, Франция и **България** (данни от националните органи в областта на общественото здравеопазване) показва **значително увеличение на заболеваемостта в Гърция през по-късен период** ($p=0,01$) и **няма промени в България и Франция**. Според регистрите на болничните заведения в Португалия и Испания подобно сравнение на средната годишна честота на хоспитализираните случаи поради лайшманиоза между тези два периода показва намаление в Португалия от 0,50 на 0,37 ($p=0,05$) и незначително увеличение в Испания от 0,61 на 0,65 ($p=0,40$). Аналогично, данните за VL от Италия показват намаляване на заболеваемостта от 1,2 през 2011 г. на 0,5 през 2016 г. Въпреки това анализът на времевата тенденция на заболеваемостта от VL в Испания и Италия разкри значителни различия между регионите. Несъответствията в докладваните случаи в някои държави подчертават **недостатъчното докладване на данни и спешната необходимост от подобряване на системите за наблюдение и уведомяване**.

Страните се **различават по отношение на възрастовото разпределение** на човешкия VL. Страните с по-нисък брутен вътрешен продукт, разположени в Кавказ, Източна Европа и Северна Африка, имат по-висока честота на педиатрични лайшманиози в сравнение със западноевропейските страни, където възрастните съставляват по-голямата част от случаите. Повечето от тези случаи са пациенти, подложени на имunosупресивни терапии за трансплантация на органи, автоимунни заболявания и рак. В допълнение, случаите на възрастни в западноевропейските страни включват имунокомпетентни хора, които нямат придобит имунитет към паразита. Един пример за това е огнище, засегнало около 1000 имунокомпетентни хора в жилищен комплекс в покрайнините на Мадрид, Испания, където огнището е включвало диви и домашни зайци, необичаен резервоарен гостоприемник на *L. infantum*. Докладвани са и по-малки локализирани епидемии сред населението в Италия и Испания.

Селските райони са районите, в които VL традиционно е с висока честота. Въпреки това, крайградските жилищни среди в Южна Европа също са се превърнали в горещи точки за лайшманиози. В Албания, Грузия и Северна Африка има градски цикли на предаване на VL, свързани с кучета, основно бездомни животни. В Северна Африка и Близкия изток CL от *L. major* се среща предимно в селските райони и е свързан с автохтонни резервоари - гризачи. Междувременно *L. tropica* е както със селски, така и с антропогенни градски цикли.

Ветеринарните и здравните органи в Албания, Алжир, Армения, Австрия, Азербайджан, Кипър, Франция, Грузия, Италия, Малта, Черна гора, Северна Македония, Румъния, Испания и Турция посочват в отговор на въпросника, изготвен от ЕОБХ, че лейшманиозата е нововъзникваща болест в тяхната държава или в някои региони.

Съобщава се, че появата се дължи на недостатъчно наблюдение и контрол, климатични и други промени в околната среда и движение на заразени кучета и хора. **Движението на заразени кучета и хора се счита за основен риск** за въвеждането и установяването на лайшмания в периферни неендемични области, където циркулират възприемчиви вектори. Лейшманиозата при кучета е недостатъчно докладвана зооноза и има доказателства, че се е разпространила на север и сега присъства в по-високи надморски височини в Италия и Испания. Болестта е описана и в страни, които преди това са били свободни от лайшмания, като Румъния. Освен това **навлизането на *L. tropica* в Южна Европа, където векторите естествено присъстват в много области, буди сериозна загриженост.**

Уведомяването за човешки лайшманиози е задължително във всички ендемични страни, с изключение на Франция, Египет и Сърбия. Животинските лайшманиози не подлежат на уведомяване във Франция, Турция, Румъния, Сърбия и Палестина, докато информацията за Мароко, Тунис, Египет и Ливан не е налична. В повечето страни, които не са ендемични, включително Германия, Австрия, Белгия и Унгария, лайшманиозите при хора и/или животни не подлежат на уведомяване. Въпреки това е необходимо всички страни да докладват на Световната организация за здравеопазване на животните (WOAH) случаи на лайшманиоза при животните и случаи на лайшманиоза при хора - на Световната здравна организация (СЗО).

С изключение на Румъния и Сърбия, където няма наблюдение на HumL (*Human leishmaniasis*), всички ендемични държави са въвели пасивно наблюдение за HumL и това наблюдение е всеобхватно, с изключение на Либия и Малта, където се изпълняват схеми за наблюдение. Въпреки че наблюдението на AniL (*Animal leishmaniasis*) не се извършва в толкова много страни (тези страни включват Алжир, Армения, Кипър, Италия, Северна Македония и Испания), всички те имат всеобхватни схеми за контрол и мониторинг, с изключение на Армения. В Армения, Кипър, Италия, Испания и Украйна целевата животинска популация за наблюдение включва симптоматични и асимптоматични кучета (домашни, от приют, развъдник и бездомни). Испания също така извършва наблюдение на диви животни с огнища на лайшманиоза. Няма налична информация за целевата популация в Алжир и Северна Македония.

Въз основа на отговорите на въпросника в 20 от 26 ендемични държави са **създадени национални програми за контрол на HumL**. Албания, Кипър, Йордания, Ливан, Черна гора и Украйна нямат национална програма за контрол на HumL. Наличието на национални насоки за контрол е потвърдено за седем държави. По-малко държави имат специфична национална програма за контрол на AniL, но **повечето от тях са възприели подхода „Едно здраве“ към превенцията на лайшманиозите**. Контролът на HumL обикновено включва ограничаване на инфекцията в животински резервоари, включително кучета за *L. infantum*, диви гризачи за *L. major* и диви гризачи и видове от род *Hyracoidea* за *L. tropica*. Общите практики за превенция и контрол при кучета включват прилагането на превантивни локални инсектициди и лечения и евтаназия при болни животни, които не могат да бъдат лекувани. Дивите резервоари на AniL се контролират чрез унищожаване на гнездящите местообитания, унищожаване на

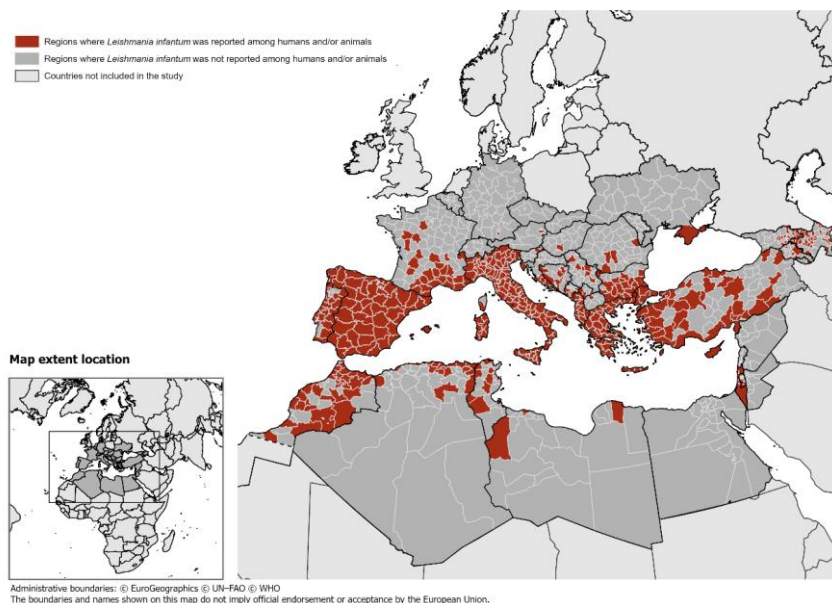
растителните хранителни източници и отравяне. *L. major* и *L. tropica* също се контролират чрез пръскане на инсектицид в домашна среда. Въпреки това само малка част от държавите прилагат всички тези действия за контрол и мащабът често се ограничава до зоните на епидемии, а действията - предприемани само за кратки периоди от време.

Според ветеринарните и здравните органи основните предизвикателства пред контрола на болестите са липсата на средства и ограничения капацитет и в по-малка степен - липсата на регулиране и наличност на родентициди и инсектициди.

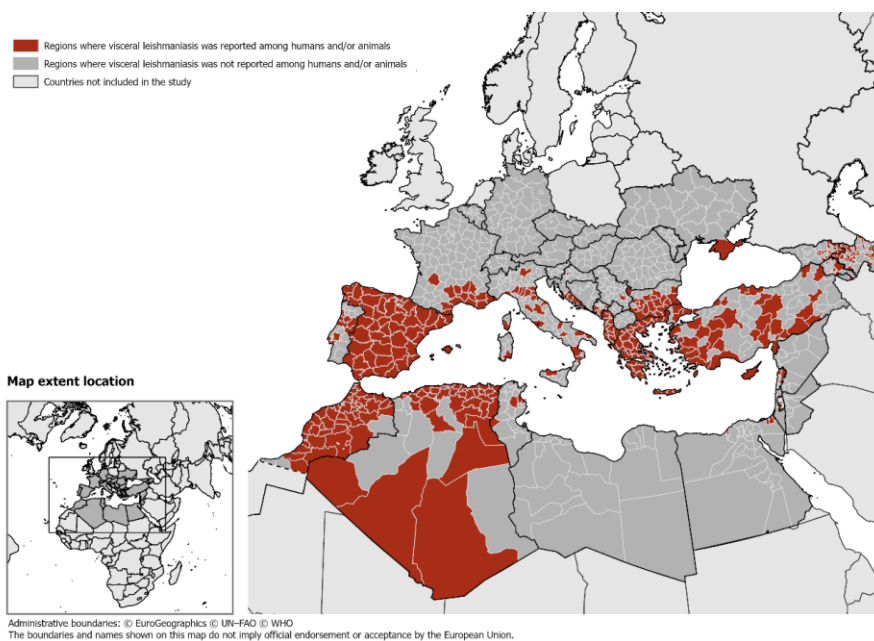
Статус на лайшманиите в Европа

Общи епидемиологични характеристики

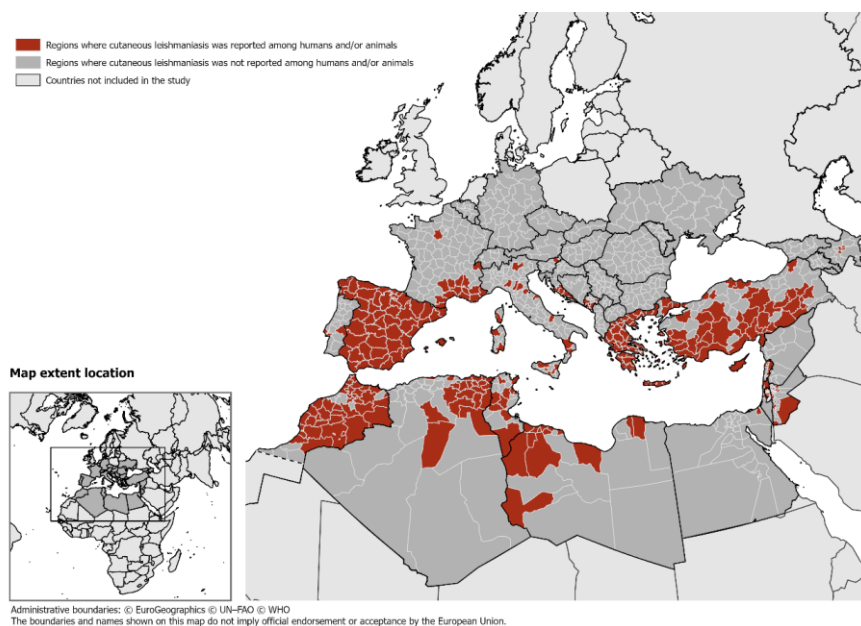
Leishmania infantum е единственият автохтонен вид *Leishmania* в Европа, причиняващ както VL, така и CL при хора и животни. Кожната лайшманиоза, причинена от *L. tropica* е била често срещана в Крит през първата половина на XX век и няколко спорадични случая са открити в началото на 2000 г., което предполага рецидив на стари инфекции при засегнатите страни или риск от повторно активиране на стари огнища. Други случаи са докладвани от Йонийските острови. Наскоро ДНК на *L. Tropica* е открита в една пясъчна муха *P.neneus* от Косово.



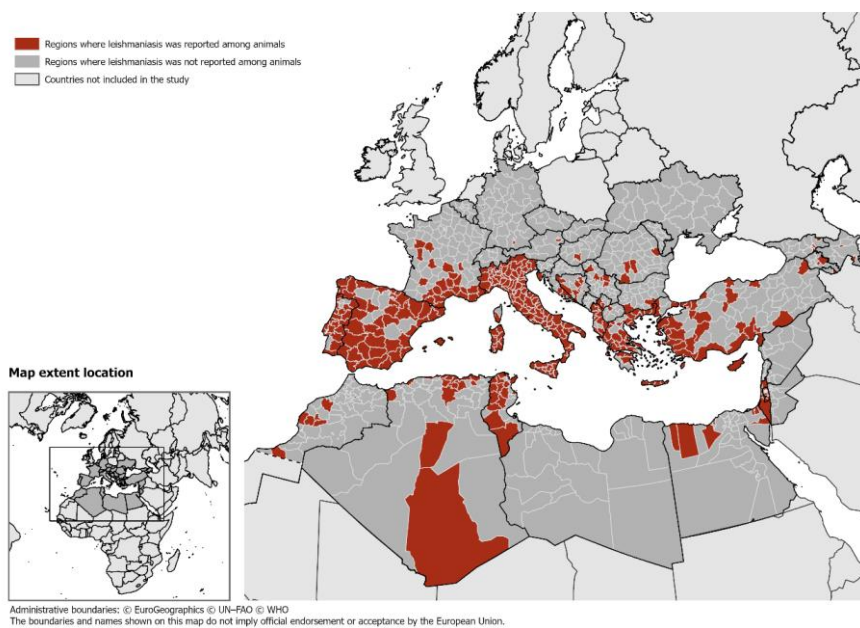
Географско разпределение на докладваните случаи на лейшманиоза при хора и/или животни, дължащи се на *Leishmania infantum*, Европейски съюз и съседни държави, 2009—2020 г.



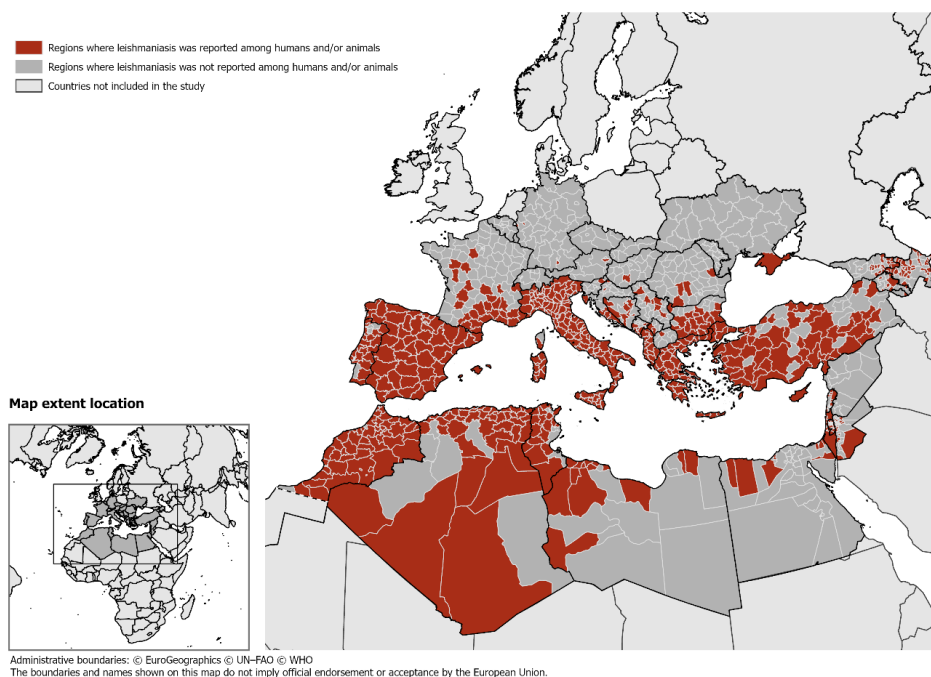
Географско разпределение на докладваните случаи на висцерална лейшманиоза при хора и/или животни, Европейски съюз и съседни държави, 2009—2020 г.



Географско разпределение на докладваните случаи на кожна лейшманиоза при хора и/или животни, Европейски съюз и съседни държави, 2009—2020 г.



Географско разпределение на докладваните случаи на лайманиоза при животните, Европейски съюз и съседни държави, 2009—2020 г.



Географско разпределение на докладваните случаи на лайманиоза при хора и животни, Европейски съюз и съседни държави, 2009—2020 г.

Повечето ендемични области *L. infantum* в Европа са разположени на юг от 45 географска ширина, в региони, където векторът присъства. Не са докладвани пясъчни мухи от Скандинавия, Балтийските страни, Холандия или Британските острови. **Умерено и силно ендемични страни:** са Албания, **България**, Хърватия, Кипър, Франция, Гърция, Италия, Малта, Северна Македония, Португалия и Испания. Държави с ниска ендемичност, в които е докладвано за инфекции при хора и/или животни в малък брой, са: Босна и Херцеговина, Косово, Черна гора, Румъния и Сърбия. Държавите, в

които не е докладвано за продължителна автохтонна трансмисия, но в които са установени вектори и/или спорадични инфекции с *Leishmania* при животни и/или хора, включват Австрия, Белгия, Чехия, Германия, Унгария, Словения, Словакия и Швейцария.

Европа има широк спектър от потвърдени и предполагаеми вектори - пясъчна муха на *L. infantum*. Най-общо казано, *Phlebotomus perniciosus* (*P. perniciosus*) и *P. ariasi* са най-разпространени в Западна Европа. *Phlebotomus perniciosus* е основният *L. infantum* вектор в Италия, Малта и много области на Балканите. Неговите източни и северни граници са Кримския полуостров, Западна Германия и Южна Швейцария. Югоизточна Франция и Италия представляват западната граница за *P. perfiliewi* и *P. neglectus*, съответно. Разпространението им достига до Унгария на север (*P. neneus* се среща и в районите на Южна Германия и Швейцария) и те са широко разпространени в страните от Източното Средиземноморие. *Phlebotomus tobbi* присъства и на **Балканския полуостров**. *Phlebotomus mascittii* е видът, който показва най-голямата надлъжна дисперсия в Европа. *Phlebotomus alexandrii* се съобщава с ниска плътност на Иберийския полуостров и в Гърция, а *P. langeroni* и *P. longicuspis* спорадично са докладвани в Испания. В допълнение, *P. papatasi* и *P. sergenti* вектори на *L. major* и *L. tropica* се срещат във всички европейски средиземноморски страни, а *P. similis*, сестрински вид на *P. sergenti*, е потенциален вектор на *L. tropica* на остров Крит.

Европейските страни се различават по отношение на рисковите фактори за лайшманиозите. В източните региони на Европа лайшманиозите засягат предимно децата и са особено свързани с по-лошите условия на живот. Лайшмания-ХИВ коинфекциите са по-често срещани в Западна Европа, отколкото в Източна Европа. Сред хоспитализираните пациенти с лайшманиоза като първа диагноза между 1997 г. и 2011 г. в Испания ХИВ положителните пациенти представляват 36% от пациентите, а децата от 0 до 15 години представляват 24% от пациентите. Въпреки това, по време на епидемия в наскоро развит жилищен район в Мадрид през периода 2009 - 2012 г. имунокомпетентните възрастни представляват 96% от случаите на VL и CL. **Епидемията в Мадрид илюстрира промяната в чувствителността на *L. infantum* в Западна Европа**, като понастоящем имунокомпетентните възрастни представляват по-голямата част от случаите. Това е и пример за неотдавнашната политика за градоустройствено планиране в южноевропейските страни, която поражда потенциални рискове, свързани с намесата на човека във векторната среда на пясъчните мухи. Крайградските жилищни райони са станали векторни и *L. infantum* горещи точки в южноевропейските страни.

Движенията на хора и кучета са важни фактори за разпространението на паразити в Европа. Такива движения са причината на клинични случаи при хора и кучета в страни, които не са ендемични. Въз основа на резултатите от стохастичните математически модели, средната вероятност за:

- куче от неендемичен район, което придобива инфекция по време на пътуване до ендемичен район, когато не се прилагат мерки за смекчаване на последиците, се оценява на 8 %;

- внесено куче от заражена ендемична област варира от 7 % до 18 %;
- инфекцията, която се установява в популация от кучета в неендемичен район, където съществуват компетентни пясъчни мухи след въвеждането на едно заразено куче, варира между 47% и 72%, в зависимост от плътността на векторите, и се счита за много висока.

Прилагането на локални инсектициди върху неинфектираното пътуващо куче намалява риска от инфекция с 99,6 %.

Осъзнаването на необходимостта от оценка на инфекцията с *L. tropica* сред бежанците и мигрантите от Близкия изток и Северна Африка е важно, за да се намали рискът от установяване на този вид в райони на Южна Европа, където *P. sergenti* е широко разпространен.

Според въпросника, изготвен от ЕОБХ, повечето държави считат лайшманиозите за **нововъзникващо заболяване в Европа, което се дължи на горепосочените рискови фактори, изменението на климата и недостатъчния надзор и контрол.** Липсата на специални ресурси се счита за най-важното предизвикателство за контрола.

Европа разполага с обширни съоръжения за диагностициране и лечение на човешки и животински лайшманиози. Въз основа на прегледа на литературата и отговорите на въпросника **всички държави използват различни серологични тестове (по-специално ELISA, IFAT и RICT) и PCR методи за откриване на инфекция,** както и традиционни методи, основани на микроскопия. PCR замества микроскопията при рутинна диагностика на лайшманиоза в страни с по-високи доходи. Въпреки това, **само малка част от страните имат диагностични насоки за животински лайшманиози и не много други имат диагностични насоки за хората.** Наличните лечения за хора, предоставяни безплатно в публичния сектор, включват липозомен амфотерицин Б (наскоро и като втори вариант в страни с по-малко ресурси) и меглумин антимоноат. Две трети от страните също използват милтефозин и малко над половината от страните имат насоки за лечение. Други лечения, използвани за VL, включват флуконазол и пентамидин.

Смъртните случаи варират между **1 - 8 %**. Лечението с CL при хора включва локално парамомидин, интралезийно приложение на натриев стибоглюконат, криотерапия, термотерапия, фотодинамично лечение и хирургична ексцизия. Меглумин антимоноат, комбиниран с лайшманиозен алопуринол, е стандартното лечение на висцералния CanL. Лечението не е насочено към паразита и може да се наложи приложението на алопуринолът да продължи до живот, за да се предотвратят рецидиви. Домперидон, имуномодулаторно лекарство обикновено се използва, въпреки че са повдигнати въпроси за ползите от него спрямо потенциалните му странични ефекти.

България е страна, попадаща сред страни с умерена до висока ендемичност.

Статус на лайшманиозите в България

Лайшманиите подлежат на задължително уведомяване в България, а системата за наблюдение е всеобхватна. Съществува национална програма за контрол, която включва диагностициране на инфекции при хора, включително пътници и мигранти с клинични признаци. Тя също така включва акцент върху диагностиката при бездомни кучета. Лайшманиозата е исторически ендемична в южната част на страната и от 1988 г. до 2008 г. **17 (16 %) пациенти с VL са починали поради късно диагностициране и лечение и липса на осведоменост за заболяването.**

Човешки лайшманиози

Между 1988 и 2008 г. са докладвани **110 случая с върхови стойности от 10 - 14 случая** през 2001 г., 2002 г. и 2005 г., като повечето случаи са от тракийските низини, Стара Загора и долината на река Струма.

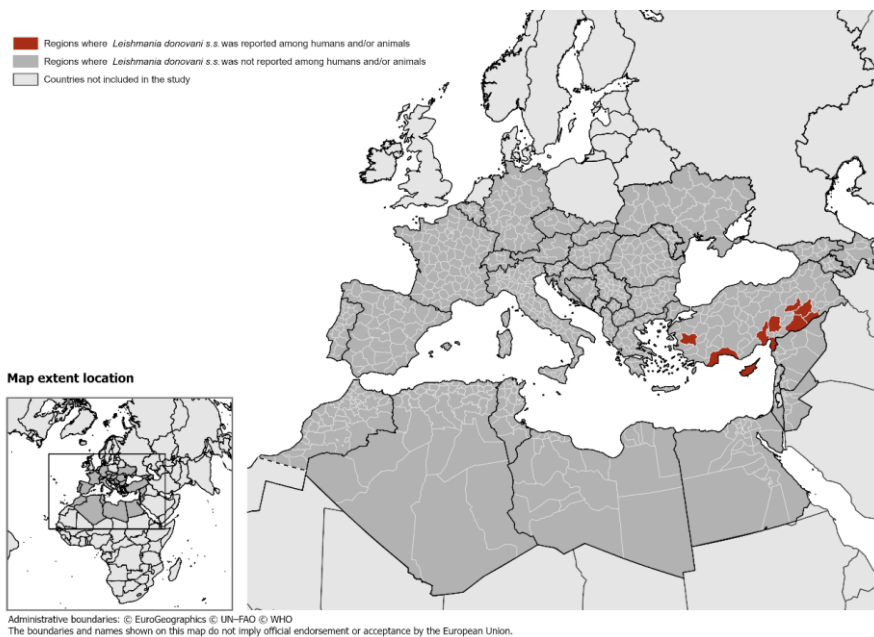
Alvar et al. докладва за среден годишен брой от **7 случая на VL през 2004 - 2008 г.**, като се наблюдава недостатъчно докладване, а изчислената честота е **0,09**. Според набора от данни на СЗО-GHDR средната годишна честота на VL, докладвана между 2005 г. и 2020 г., варира между 0,01 (2017—2020 г.) и 0,13 (2013—2016 г.) и е 0,028 и 0,014 за CL съответно през 2013—2016 г. и 2017—2020 г., като повечето случаи са внесени.

Процентът на случаите на **VL по възрастови групи е 23 % при тези на възраст над 5 години, 3% за лицата на възраст 5 - 15 години и 74% за тези на възраст над 15 години.** Случаите са от 12 от 28 подразделени по NUTS3 и кумулативната честота на 100 000 население е **най-висока - 9,5 (30 случая) — в Благоевград (община Петрич) и София - 0,2.**

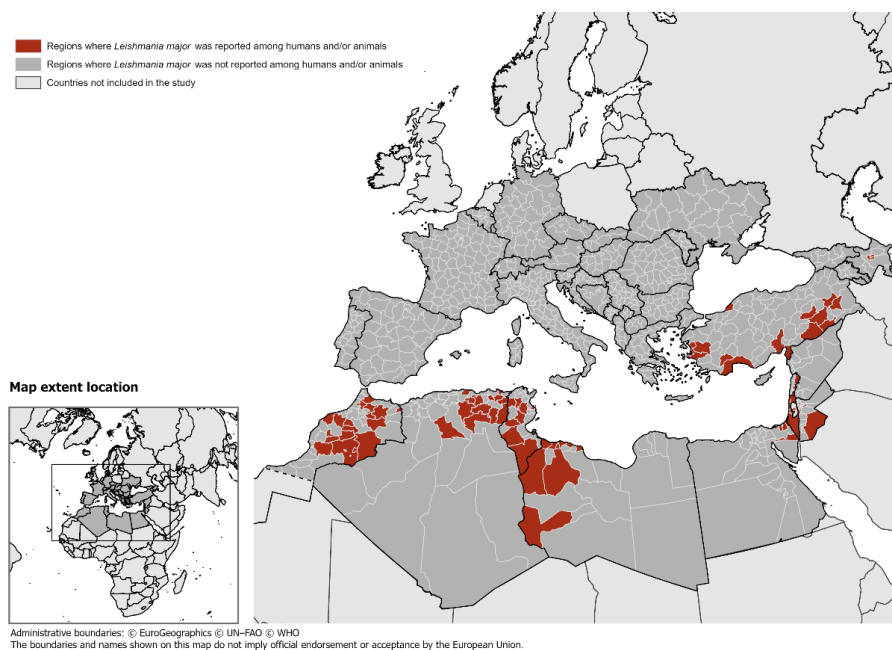
Животински лайшманиози и инфекции при пясъчните мухи

Кучешките лайшманиози се съобщават спорадично в България, с два клинични случая през 2006 г. в Петрич и 10 други случая през 2006 г. и 2007 г. в Благоевград и Хасково. В две епидемиологични проучвания, проведени в цялата страна с използване на RICT, ELISA и IFAT, **не е установено, че кучетата са категорично серопозитивни.** Според уебсайта на WOAH наличието на инфекции както при домашните, така и при дивите животни през периода **2009 - 2018 г. е неизвестно,** въпреки че се посочва, че лайшманиозата при домашните животни е болест, за която се съобщава за случаи между 2014 г. и 2019 г.

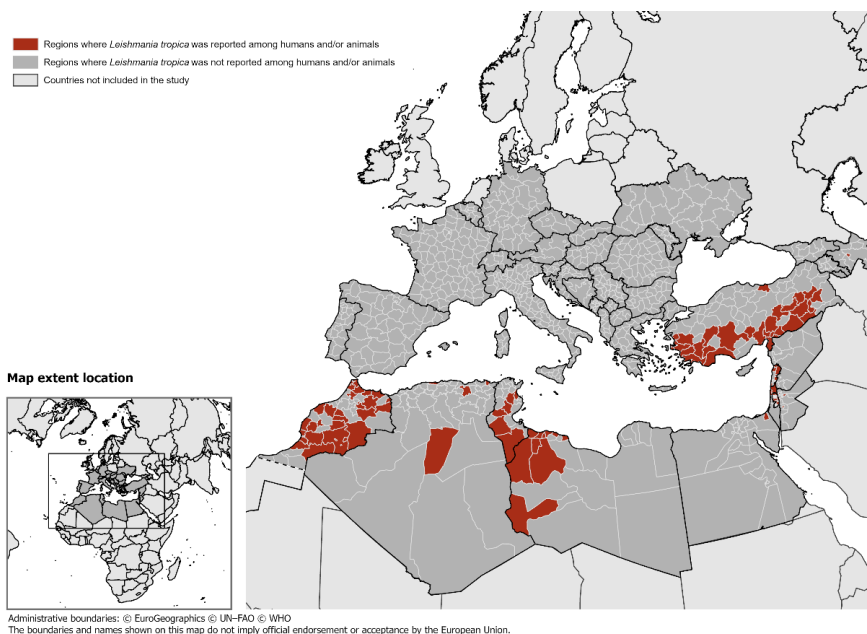
Няма проучвания за инфекция при пясъчна муха.



*Географско разпределение на докладваните случаи на лайшиманиоза при хора и/или животни, дължащи се на *Leishmania donovani* s.s., Европейски съюз и съседни държави, 2009 г.—2020 г.*



*Географско разпределение на докладваните случаи на лайшиманиоза при хора и/или животни, дължащи се на *Leishmania major*, Европейския съюз и съседните държави, 2009—2020 г.*



*Географско разпределение на докладваните случаи на лайшманиоза при хора и/или животни, дължащи се на *Leishmania tropica*, Европейски съюз и съседни държави, 2009—2020 г.*

Въз основа на броя на случаите, докладвани в набора от данни на WHO-GHDR за всички страни, Националните мрежи за епидемиологичен надзор на България, Франция и Гърция и централизираните бази данни от болнични заведения на Италия, Малта, Португалия и Испания, се стига до заключението, че през последните 10–15 години **честотата на CL е намаляла значително в Грузия и Израел, нараства в Испания и Франция и се колебае силно в Близкия изток и Турция**, като последната е резултат от масивен приток на бежанци от Сирия, Ирак и Афганистан. Честотата на VL се е увеличила значително или незначително в Армения, Азербайджан, Франция, Гърция и Либия и е намаляла значително в Албания, Алжир, Хърватия, Грузия, Мароко и Тунис. Освен това има доказателства за появата на лайшманиози в определени региони на ендемични страни като Испания, Италия и Гърция и в преди това неендемични страни като Румъния. Освен това, въз основа на анкетното проучване, адресирано до обществените здравни и ветеринарни органи на Албания, Алжир, Армения, Австрия, Азербайджан, Кипър, Франция, Грузия, Италия, Малта, Черна гора, Северна Македония, Румъния, Испания и Турция, лайшманиозите са нововъзникващи заболявания в цялата или части от всички тези страни.

Следните **фактори** са идентифицирани като причина за **възможно отклонение** в честотата на лайшманиозите във времето: разлики между и в рамките на страните във времето по отношение на **чувствителността на техните системи за наблюдение; статусът на уведомяване за лайшманиози** (задължителен спрямо доброволен); **качеството на данните от различни източници; разлики в капацитета за диагностика и осведомеността на клиницистите** (между страните и в рамките на една страна в различни периоди от време).

Оценката на появата на това заболяване се основава на данни от посочените по-горе източници и на подадените доклади от институции, отговорни за общественото здравеопазване и ветеринарните органи. Тъй като появата може да се наблюдава на регионално и местно ниво, за по-точна оценка са **необходими количествени данни за честотата на автохтонни лайшманиози**. Такива данни също така биха позволили да се съпостави и подобри прецизността на географските карти, които са създадени на база докладвани в научната литература случаи, като не всички статии разграничават автохтонни и внесени случаи.

Малко страни прилагат специфични програми за наблюдение и контрол, насочени както към животински, така и към човешки лайшманиози, което предполага, че **това не е приоритет за здравните власти**. Много **малко информация е налична** на уебсайтовете на националните органи; не е открита информация за създаване на програми за контрол или координиране на дейностите по надзора. Това предполага, че **ЕС и съседните страни трябва да обмислят засилване на комуникацията си относно наблюдението и контрола на болестта**.

Бързата намеса за премахване на излагането на заразени животни в домашна среда е от съществено значение за намаляване на риска от предаване на зоонозни *Leishmania* spp. на други животни и хора. Задължителното докладване на кучешката лайшманиоза би позволило също така да се събере по-точна информация за разпространението на болестта и да се оцени нейното действително въздействие. **Лайшманиозите в ЕС и съседните му страни са транснационален проблем, засягащ не само ендемични страни, но и неендемични страни от Централна и Северна Европа**, където се наблюдава голям брой внесени случаи. В неендемичните страни, където има компетентни вектори, **наблюдението, бързото лечение на случаите и прилагането на други мерки за контрол биха намалили вероятността от циркулиране на този паразит**.

Има някои пропуски в отчитането на лайшманиозите, свързани с голяма вариабилност в броя на докладваните случаи, докладваните данни от болничните звена към СЗО (WHO-CR и WHO-GHDR) е до голяма степен подценен. **Висок процент недокладвани случаи на CL** е особен проблем, дължащ се на факта, че не се изисква хоспитализация. По същия начин, **броят на случаите на лайшманиоза сред животните е недостатъчно докладван**. Публикувано проучване сред испански и френски ветеринарни клиницисти подчертава, че **голяма част от ветеринарите не съобщават за CanL**. В допълнение, **недостатъчното отчитане е илюстрирано от пропуските в данните, наблюдавани на уебсайта на WOAH**, въпреки че заболяването се уведомява задължително пред WOAH. Лайшманиозата не е в настоящия списък на ЕС на болести, за които трябва да бъдат уведомявани при хора и животни, оттук произлиза и липсата на данни, налични от институциите на ЕС (т.е. ECDC и EFSA).

Като цяло, **интегрираните мерки за контрол** на лайшманиозите, включващи хора, домашни животни, диви животни и преносители като пясъчната муха, **са редки и са ограничени до контрола на огнища**. Може да се обмисли **разширяването на този подход за контрол** на лайшманиозите като цяло, чрез координиране на институциите

по общественото здраве, ветеринарномедицинските звена, ентомологията и институциите, занимаващи се с околна среда и води за **проектиране, разработване и прилагане на интегрирани стратегии за контрол на лайшманиозите**, които включват активно участие на общността.

Този преглед също така подчертава използването на много **широк спектър от серологични и молекулярни тестове и протоколи за диагностициране на лайшманиози**, което прави предизвикателство да се сравняват данни от публикувани проучвания. Описание на диагностичните техники е предоставено в Наръчника на WOAH за диагностични тестове и ваксини за сухоземни животни. Съгласуването и приемането на диагностични методи, които да бъдат заложили като златен стандарт би улеснило сравнението на резултатите и следователно подобър надзор, превенция и контрол на лайшманиозите в Европейския съюз и съседните му страни и оценка на епидемиологичната ситуация. Освен това, въз основа на отговорите на въпросника ЕОБХ, **само малка част от страните имат насоки за диагностика и лечение**. СЗО публикува наръчник за управление на случаи и наблюдение на лайшманиозата в Европейския регион, който може да послужи като основа за разработването на национални насоки в общественото здравеопазване. Предвид взаимосвързания характер на епидемиологията на болестта при животни, хора и вектори, **може да се обмисли разработването на междусекторни насоки за превенция и контрол на лайшманиозите в ЕС и съседните му страни**.

Чувствителните молекулярни диагностични методи (т.е. PCR анализи и ДНК секвениране) и лечението с липозомен амфотерицин Б и милтефозин са скъпи и не са широко достъпни в страните с по-ниски доходи. **Молекулярните диагностични тестове са необходими за по-добро разбиране на епидемиологията на лайшманиозата**. По-широко използване на липозомен амфотерицин Б и милтефозин за лечение на HumL е необходимо за намаляване на неуспехите на лечението и страничните ефекти, причинени от по-токсични антимонони съединения, както и за избягване на риска от развиване на резистентност на *Leishmania* spp. **За да се намали рискът от резистентност към лечението, трябва да се изберат различни лечения от първа линия за HumL и AniL.**

Диагностика и лечение

Във всички страни диагностиката на клиничните лайшманиози зависи от клиничния преглед, епидемиологичната информация и паразитната идентификация чрез микроскопия, като се използват проби от кожата и лимфоидната тъкан за CL и VL, съответно. Паразитологично потвърждение с помощта на по-чувствителния тест полимеразно верижна реакция (PCR) е често срещано в Западна Европа, Израел и Турция и напоследък е въведено в някои от страните с по-ниски доходи. Въпреки че PCR се използва широко и за наблюдение на HumL, той се използва по-рядко за наблюдение на AniL. Серологичните тестове са евтини и имат висока чувствителност към VL диагностика, но рядко се използват за диагностициране на CL. Сред държавите, са докладвани указания за диагностика в 11 от 21 държави за HumL и три от 26 държави за AniL. Всички страни използват серологични методи за

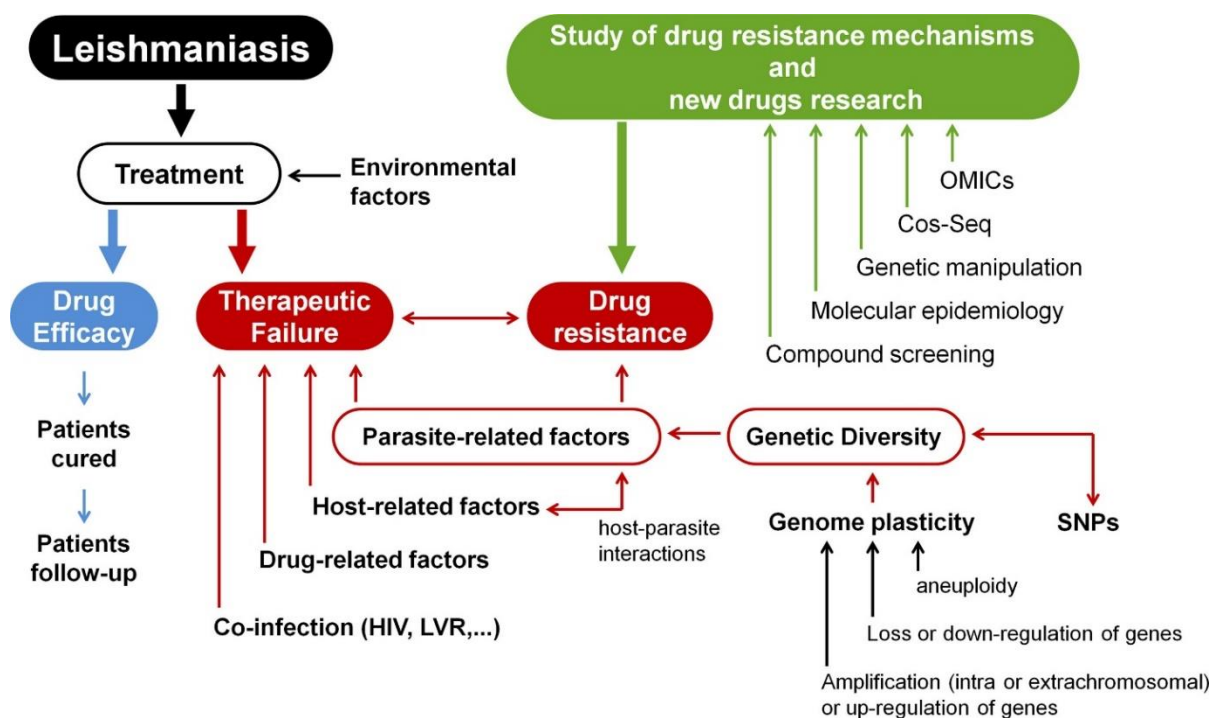
диагностициране на VL, като само Алжир, Армения, Грузия и Украйна не използват редовно PCR тестове.

Серологичните тестове за антитела включват **имунофлуоресцентен тест за антитела (IFAT), ензим-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) и бързи имунохроматографски тестове (RICT).**

Серологичните и PCR методите се използват широко от изследователските групи за откриване и оценка на разпространението на инфекцията с *Leishmania* при произволно подбрани животни и уловени вектори. Инфекцията е потвърдена от PCR при много домашни и диви гостоприемници и при видове пясъчни мухи. **Способността на видовете гостоприемници да предават инфекция на вектора в повечето случаи не е изследвана и епидемиологичното им значение не е известно.** Провеждането на PCR често е > 50% при гостоприемници - кучета и гризачи и 0 - 10% в по-голямата част от проучванията с пясъчни мухи. **Серопревалентността обикновено варира между 5% и 30% при кучета, но обикновено е по-ниска при котките. Рядкото серологично изследване на диви животни се дължи на липсата на специфични тестове.** Разпространението обаче често варира значително в рамките на дадена човешка или животинска популация, в зависимост от чувствителността на изпитването и специфичността и използваната биологична проба. **Необходимо е да се стандартизират PCR и серологичните тестове за диагностика на лайшманиоза.**

Лайшманицидните **антимикробни лекарства**, като **меглумин антимонат (P01CB01) и натриев стибоглюконат (P01CB02)**, са стандартно лечение за човешки VL и дисеминирани CL в продължение на десетилетия и това все още е така и при кучешките лайшманиози. По-малко токсичен и по-скъп липозомен амфотерицин Б, милтефозин (L01XX09) и инжекционен паромомицин (A07AA06) са заменили антимикробните лекарства за лечение на хора преди повече от десетилетие в Западна Европа и Израел, но само преди няколко години в повечето други страни, където те често се използват като втори вариант, ако антимоНИЕвите продукти се провалят в резултат на резистентност на паразитите. Сред 23-те страни, които са предоставили информация за наличието на лечение на VL при хора, липозомен амфотерицин Б се използва в 19, меглумин антимонат в 18 и милтефозин в 11 страни. Четири държави не са подали данни за използваното лечение. **Лечението на хора за локализиран CL включва интралезийно приложение на меглумин антимонат, паромомицин мехлеми, криотерапия, термотерапия и хирургична ексцизия.** Лечението на кучешка лайшманиоза включва меглумин антимонат, алопуринол, милтефозин и натриев стибоглюконат съответно в 16/17, 10/11, 13/15 и 3/9 страни.

Геномът на *Leishmania* е нетипичен



Схематично представен процеса на избор на метод и стратегия за диагностициране на лайшманиози, съобразно различните рискови фактори

Различните видове *Leishmania* имат различен брой хромозоми, както и различни набори от гени (Ivens et al., 2005; Peacock et al., 2007). Скорошно сглобяване на генома на *L. major* разкри геном от 32,8 Мб, включващ 11 238 гена, разпределени в 36 хромозоми (Camacho et al., 2021). Преди се смяташе, че *Leishmania* имат среден диплоиден геном, но сега се смята, че **мозаечната анеуплоидия е норма в геномите на тези паразити, като степента на анеуплоидия варира в зависимост от вида или щама** (Sterkers et al., 2012; Lachaud et al., 2014).

Почти всички протеин-кодиращи гени в трипанозоматидите **не съдържат интрони** и са **организирани в еднопосочни полицистронни транскрипционни единици без функционално свързани гени**. Пре-мРНК, генерирани чрез полицистронна транскрипция, се обработват за производство на зрели иРНК (Bartholomeu et al., 2021). Всички гени са конститутивно експресирани, главно от РНК полимеразата II; но началото на транскрипцията не е добре разбрано, тъй като каноничните промоторни последователности все още не са открити в тези паразити (Martínez-Calvillo et al., 2003; Martínez-Calvillo et al., 2004; Thomas et al., 2009; Iantorno et al., 2017). Изглежда, че **епигенетичните механизми играят роля в иницирането на транскрипция на *Leishmania***, като влияят върху достъпността на ДНК (Thomas et al., 2009; Chandra et al., 2017; Saha, 2020; Grünebast et al., 2021). Терминирането на транскрипцията настъпва в края на всяка полицистронна транскрипционна единица и се определя от наличието на основата J (van Luenen et al., 2012; Reynolds et al., 2016; Kieft et al., 2020). Въпреки това, често се твърди в литературата, че при липса на транскрипционна регулация, регулирането на експресията на протеин в тези паразити се медира от посттранскрипционни събития, като разграждане на РНК, контрол на

транслацията и разграждане на протеини (Clayton and Shapira, 2007 ; Grünebast u Clos, 2020; Karamysheva et al., 2020). Няколко проучвания показват, че **броят на хромозомните копия може да бъде свързан с нивата на транскрипция**, подкрепяйки схващането, че контролът на експресията настъпва след транскрипция (Dumetz et al., 2017; Iantorno et al., 2017; Patino et al., 2019). За разлика от тях, нивата на транскрипт и протеин не са непременно свързани (Alcolea et al., 2019).

Значение на генетичното разнообразие и пластичността на генома на *Leishmania*

Вариациите в генома на паразита могат да бъдат свързани с неговото **географско разпространение и клинични прояви**, които могат да повлияят на управлението на лайшманиозата. Интересно е, че широкомащабните изследвания, включващи голям брой проби и широк географски обхват, разкриват, че **генетичното разнообразие е значително по-високо от докладваното по-рано** (Bussotti et al., 2018; Zackay et al., 2018; Franssen et al., 2020; Salloum et al., 2020; Zheng et al., 2020; Schwabl et al., 2021). Наскоро секвенирането на генома демонстрира наличието на **няколко различни кариотипа в рамките на един и същ клон на *Leishmania*** (Imamura et al., 2020; Negreira et al., 2020) и е доказано, че **инфекциите с множество генотипи се появяват дори в рамките на един и същ гостоприемник и тъкан** (Cupolillo et al., 2020).

В допълнение към ролята на мутациите в разнообразието от паразити (Downing et al., 2011; Domagalska et al., 2019; Franssen et al., 2020), **геномът на *Leishmania* е силно пластичен и постоянно се пренарежда, което води до вариации в броя на генните копия, генни клъстери или дори цели хромозоми** (Ubeda et al., 2008; Leprohon et al., 2009; Mannaert et al., 2012; Laffitte et al., 2016b; Iantorno et al., 2017). В резултат на това **мозаечната анеуплоидия е не само широко разпространена в *Leishmania***, но е и **основен адаптивен механизъм**, който позволява бързо да бъде избрана определена структура на генома при неблагоприятни условия (Sterkers et al., 2012; Dujardin et al., 2014; Lachaud et al., 2014; Sterkers et al., 2014; Reis-Cunha et al., 2018). **Промените в пloidността не са случайни, а изглежда следват един и същ модел в проби, подложени на различни стресори, и всеки щам има тенденция да следва същия модел, което показва появата на селективни процеси** (Dumetz et al., 2017; Bussotti et al., 2018; Restrepo et al., 2019).

Броят на генните копия може да бъде променен чрез добавяне или изтриване на гени в тандем или чрез създаване на екстрахромозомни копия на гени, които могат да бъдат линейни или кръгови. Тези екстрахромозомни генни копия обикновено се срещат в *Leishmania* под стрес, но се срещат и в популации от див тип (Ouellette and Borst, 1991; Grondin et al., 1993; Leprohon et al., 2009). Докладвано е, че има двойки повтарящи се последователности, обграждащи набори от гени в *Leishmania* (Leprohon et al., 2009; Ubeda et al., 2014; Bussotti et al., 2018; Carnielli et al., 2018) и **ДНК двойноверижни скъсвания близо до или в рамките на тези повтарящи се последователности могат да предизвикат хомоложна рекомбинация, която е свързана с увеличаване на генните пренареждания** (Genois et al., 2014;).

Субтеломерната ДНК е по-чувствителна към репликативен стрес (*Damasceno et al., 2013; Damasceno et al., 2016; Damasceno et al., 2018*), а теломерната амплификация също е идентифицирана като механизъм за генетична адаптация при *Leishmania* (*Bussotti et al., 2018*). Интересно е, че анеуплоидията може да възникне от дублирането на субтеломери извън S фазата (*Damasceno et al., 2020*).

Leishmania се възпроизвежда чрез клонова експанзия; въпреки това няколко проучвания съобщават за генетичен обмен между паразити, което предполага, че *Leishmania* може да се възпроизвежда „сексуално“ по време на жизнения цикъл (*Gutiérrez-Corbo et al., 2021*). Предполага се, че този обмен може да бъде важен за дългосрочното оцеляване на тези паразити (*Van den Broeck et al., 2020; Kato et al., 2021*).

Геномно разнообразие сред устойчиви на лекарства паразити

Резистентността към лекарства не е неочаквана находка при тези паразити и се предполага, че генетичната вариация е основната движеща сила при появата на различни резистентни към лекарства фенотипове (*Decuypere et al., 2012; Reis-Cunha et al., 2018*). Тъй като различни промени могат да доведат до резистентност към наличните в момента лечения, няма уникален маркер за оценка на резистентността в клиничните изолати.

- **Антимонни съединения**

Антимонните вещества включват меглумин антимионат (**Glucantime®**) и натриев стибоглюконат (**Pentostam®**). Няколко проучвания показват, че клиничните изолати имат повишена резистентност към петвалентен антимион (*Peters, 1981; Sundar, 1994; Romero et al., 2001; Sundar, 2001; Croft et al., 2006; Azeredo-Coutinho et al., 2007; Perry et al., 2015; Mohebbali et al., 2019*). Тези клинични изолати имат голяма вариабилност по отношение на механизмите на антимионна резистентност и една и съща проба може да представи няколко различни промени. Например, демонстрирано е, че *L. braziliensis* и *L. panamensis*, устойчиви на тривалентен антимион (SbIII), показват разлики в хромозомната структура и броя на генните копия в сравнение със съответните им чувствителни линии; но, тези промени са по-забележими при *L. braziliensis* (*Patino et al., 2019*). Докладвани са различни механизми на резистентност към антимион, включително намалено навлизане на клетъчния антимион, намалена активност на лекарството, повишено екскретиране на антимион и секвестрация на конюгата във вътреклетъчните везикули на *Leishmania* (*Croft et al., 2006*).

Интригуващ пример за това как генетичното разнообразие може да помогне за развитието на резистентни паразитни изолати е високите нива на As (III) във води може да са спомогнали при селекцията на устойчиви на антимион паразити (*Perry et al., 2015*). Няколко различни механизма могат да бъдат включени във фенотипа, устойчив на SbIII в Индия, тъй като е показано например, че *L. donovani* от Индия има преадаптивни анеуплоидии, включващи различни хромозоми (*Dumetz et al., 2018*). Тъй като MRPA (известен преди като PGPA) е АТФ-свързващ касетен ген, замесен в

секвестрацията на SbIII във вътреклетъчните везикули (*Leprohon et al., 2009*), се предполага, че увеличаването на броя на копията на MRPA гена може да генерира резистентност към SbIII или AsIII фенотип, тъй като и двете имат един и същ механизъм на секвестрация (*Maciaszczyk-Dziubinska et al., 2012; Dumetz et al., 2018*). По подобен начин други проучвания показват, че анеуплоидията е свързана с придобиването на резистентност към антимоно в *Leishmania* чрез промяна на броя на копията на MRPA (*Haimour et al., 2000; Légaré et al., 2001; Anacleto et al., 2003; Mukherjee et al., 2007; Leprohon et al., 2009; Moreira et al., 2013*).

Въпреки това, други механизми също могат да участват в резистентността на паразити към SbIII, като промени в кодиращата последователност на акваглицеропорин (AQP1) или понижаване на експресията на този ген в клинични проби (*Mandal et al., 2010; Dumetz et al., 2018; Potvin et al., 2021*), тъй като е известно, че разликите в нивата на AQP1 транспортер могат да повлияят както на поглъщането на SbIII, така и на AsIII (*Gourbal et al., 2004; Marquis et al., 2005; Mandal et al., 2010*). От друга страна, амплификацията на трипанотион синтетазата (TryS) също може да играе роля в резистентността, тъй като повишаването на нивата на трипанотион благоприятства образуването на конюгати със SbIII или AsIII, което увеличава секвестрацията му във вътреклетъчните везикули (*Mukhopadhyay et al., 1996; Frézard et al., 2014; Dumetz et al., 2018*).

Мутациите могат също да генерират резистентност срещу SbIII; например, мутации в гена за мултирезистентност 1 (MDR1) са свързани с лекарствена резистентност в проби от индивиди, които не отговарят на лечението (*Abadi et al., 2021*), докато мутациите на калциево-зависима протеин киназа (CDPK1) са свързани към резистентност както към паромоцилин, така и към антимоно (*Bhattacharya et al., 2019*).

Друга полезна техника за оценка на потенциалните пътища на резистентност е получаването на резистентни паразити *in vitro*. Струва си да се отбележи, че откритите гени често са подобни на тези, открити в клиничните проби. *In vitro* селекцията на резистентност към SbIII води до паразитна амплификация на много гени, включително MRPA, аскорбат-зависима пероксидаза и предполагаема глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа (G6PDH) (*Leprohon et al., 2009; Mukherjee et al., 2013*). Получаването на SbIII-резистентни паразити *in vitro* може също да доведе до делеции или точкови мутации в регион, съдържащ AQP1 (*Mukherjee et al., 2013; Monte-Neto et al., 2015*).

Освен това, свръхекспресията на ензими за антиоксидантна защита, като желязна супероксид дисмутаза-A (*Tessarollo et al., 2015*), трипаредоксин пероксидаза (*Andrade and Murta, 2014*) или APX (*Moreira et al., 2018*) участват в SbIII- резистентен фенотип в *L. braziliensis*.

- Милтефозин

Милтефозин е единственото перорално лекарство, налично за лечение на лайшманиоза и за първи път е използвано в Индия за замяна на антимононите съединения (*Sundar et al., 2000; Sundar et al., 2002*). Въпреки полезността на това лекарство за лечение на заболявания, причинени от някои видове *Leishmania*, **ограничената ефикасност на милтефозина при лечение на висцерална лайшманиоза в Бразилия е свързана със загубата на *Miltefosine Sensitivity Locus* (MSL) (*De Morais-Teixeira and Damasceno, 2011; Carnielli et al., 2018; Carnielli et al., 2019*). Мутациите в транспортера на милтефозин придават устойчивост както на милтефозин, така и на амфотерицин Б (*Coelho et al., 2012; Fernandez-Prada et al., 2016; Laffitte et al., 2016*). За разлика от това, наскоро е доказано, че увеличаването на броя на копията на гена **Ros3 (Lem3p/CDC50)** в клиничните изолати на *L. braziliensis* увеличава усвояването на милтефозин, което прави тези паразити по-чувствителни към лечение (*Espada et al., 2021*).**

- **Амфотерицин Б**

Анализът на клинични изолати на *L. donovani*, резистентни към амфотерицин Б, разкрива по-висока скорост на екскреция на амфотерицин Б поради повишена експресия на гена за мултирезистентност **MDR1** (*Purkait et al., 2012*). Проучванията показват също, че амфотерицин Б-резистентните паразити могат лесно да придобият ко-резистентност за *in vitro* (*Mbongo et al., 1998; Al-Mohammed et al., 2005*). **Загубата на гена, кодиращ 24-стерол метилтрансфераза (SMT), също е свързана с *L. donovani in vitro* резистентност към амфотерицин Б (*Rastrojo et al., 2018*). По подобен начин, друго проучване изследва четири линии на *L. mexicana* с резистентност към амфотерицин Б, индуцирана *in vitro*, една от които показва свързана с резистентност мутация в гена за биосинтеза на стерол - стерол C5-десатураза (SC5D), а три линии разкриват загуба на експресия на SMT поради варианти на броя на геномните копия (*Pountain et al., 2019*). Резистентност към амфотерицин Б също е докладвана при *L. mexicana* поради мутации в последователността на стерол 14-деметилаза (CYP51) (*Mwenechanya et al., 2017*).**

- **Комбинации от лекарства**

Комбинации от лекарства за лечение на лайшманиоза, при които различни лекарства инхибират различни метаболитни пътища, изглежда **представяват обещаващ вариант за преодоляване на резистентността при паразити, които са толкова адаптивни, колкото и лайшманията.** Комбинациите от лекарства могат да намалят общата необходима доза на лекарствата и продължителността на лечението и могат да доведат до по-ниска токсичност и подобряване на статуса на пациентите (*Uliana et al., 2018*). Въпреки това, комбинациите от лекарства за лечение на лайшманиоза трябва да се използват с повишено внимание, тъй като може да възникне резистентност към множество лекарства и кръстосана резистентност (*García-Hernández et al., 2012; Berg et al., 2015; Fernandez-Prada et al., 2016*).

Влияние на генетичното разнообразие върху изследванията на новите лекарства

Търсенето на нови молекулярни мишени за лечение на лайшманиоза е спешна задача. Съставният скрининг е важен подход за идентифициране на нови лекарства. Въпреки това, поради огромното разнообразие на тези паразити, е изключително трудно да се идентифицират лекарства, които са ефективни при лечението на инфекции, причинени от различни видове или щамове. В този смисъл много „омикс“ технологии (като геномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика) демонстрират разнообразно охарактеризиране на *Leishmania* и как различните пътища играят важна роля в резистентния фенотип. В допълнение, използването на "omics" за изследване на взаимодействията гостоприемник - *Leishmania* spp. не трябва да се подценява, тъй като такива взаимодействия също са важни по отношение на резултатите от лечението. Въпреки това, тъй като *Leishmania* проявява пост-транскрипционен контрол, съществува риск от екстраполиране на геномни или транскриптомни последователности в контекста на лекарствената резистентност. **Подготовката на пробата е ключов елемент в протеомния и метаболомния анализ.** Освен това, данните от промастиготи трябва да се тълкуват с повишено внимание, тъй като формите на амастигота имат различни транскриптомни и протеомни профили (*De Pablos et al., 2016*). Други пречки за „omics“ технологиите са оперативни разходи, сложност и широк спектър от проби (*Dos Santos et al., 2016*).

В допълнение към „omics“ технологиите, **генната манипулация при паразити е интересен вариант за по-добро разбиране на пътищата, свързани с метаболизма на лекарствата.** Понастоящем няколко инструмента могат да се използват за генетична манипулация на *Leishmania*, като например **класическият метод на делеция чрез алелно заместване** (*Cruz et al., 1991*), **свърхекспресия и хетероложна експресия** (*Kapler et al., 1990*), **вкарване на плазмиди** (*Murta et al., 1991*). *al., 2009*), **RNAi** (*Lye et al., 2010*), **DiCRE** (*Duncan et al., 2016*), **DD домейн** (*Madeira et al., 2009*) и **CRISPR/Cas9** (*Sollelis et al., 2015; Zhang et al., 2015*). По-специално, **инструментариумът LeishGEdit** позволи на изследователите да **изследват функцията на стотици гени бързо и ефективно, задвижвайки изследванията на генната функция и регулирането на метаболитните пътища на *Leishmania* до безпрецедентни нива** (*Beneke et al., 2017; Beneke and Gluenz, 2019, 2020*). Друг нов подход е **високопроизводителният метод Cos-Seq**, който може да се използва за **идентифициране на механизми за резистентност към усилване на функцията и целеви лекарства** (*Gazanion et al., 2016; Fernandez-Prada et al., 2018*). В допълнение към тези инструменти, **секвенирането на генома на паразита също е фундаментално** (*Ivens et al., 2005*), а **наличието на паразитни геноми в базата данни TritrypDB** осигурява изключително лесен достъп до всички релевантни данни и секвенции, изключително голям набор от информация и сравнимост между данните (*Aslett et al., 2010*).

Въпреки всички налични инструменти, провеждането на изследвания, включващи генна манипулация при тези паразити, не винаги е лесно, главно поради забележителната пластичност на техните геноми и високата им чувствителност към промените в околната среда. Паразитите могат да претърпят няколко адаптации за оцеляване *in vitro* и се препоръчва генетичните манипулации да се провеждат директно в клинични проби, за да се избегнат експериментални артефакти (*Dumetz et al.,*

2017). По същия начин, делецията на ген може да доведе до селекция на паразити, които показват анеуплоидии и променени фенотипове, които може да не съвпадат с наблюдаваните в природата (Santi et al., 2021). За съжаление, индуцируемите системи за включване и изключване на генната експресия в *Leishmania* не са проучени и има ограничена литература относно използването на тези системи (Yan et al., 2001; Kushnir et al., 2005; Yao et al., 2007 ; Краева и съпр., 2014). Въпреки че внедряването на системата DiCRE предлага значителен напредък в това отношение, все още има определени ограничения, тъй като тя не е нито обратима, нито регулируема (Duncan et al., 2016; Santos et al., 2017; Damasceno et al., 2020b; Damianou et al. др., 2020).

В проучване на тема: „Application of next generation sequencing (NGS) for descriptive analysis of 30 genomes of *Leishmania infantum* isolates in Middle-North Brazil“ на авторски колектив *Kátia Silene Sousa Carvalho, Wilson José da Silva Júnior, Marcos da Silveira Regueira Neto, Vladimir Costa Silva, Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior, Valdir Queiroz Balbino, Dorcas Lamounier Costa & Carlos Henrique Nery Costa*, **геномните данни за *Leishmania* spp.** предоставят **множество данни и подробна информация**, която революционизира изследванията на лайшманиозата, тъй като **може да идентифицира влиянието на паразитите върху клиничното представяне и епидемиологичното разнообразие на инфекциозните заболявания**. Пълните геноми на *Leishmania* subgenus (*L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) donovani* и *L. (L.) infantum*), подрод *Viannia* (*L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni*), както и подрод *Sauroleishmania* (*L. (S.) tarentolae*, *L. (S.) adleri*) и подрод *Mundinia* понастоящем са секвенирани и налични, както и секвенирани *L. (M.) enriettii*, *L. (M.) macropodum*, *L. (M.) martiniquensis*. Геномът на *L. infantum* е напълно повторно секвениран и сглобен, показвайки 36 хромозоми с общ размер от 32 134 935 базови двойки. Въпреки това, **с един секвениран геном не може да се оцени генетичното разнообразие на видовете**. Поради това е от голямо значение и полза да се изследва геномната архитектура на специфични паразитни популации.

Сравнителният геномен анализ е мощен инструмент за откриване на присъщи генетични характеристики на редица индивиди, принадлежащи или не към един и същи вид. Такива характеристики могат да бъдат свързани с екология, епидемиология, патогенност или механизми на вирулентност на *Leishmania* spp.. Геномно сравнение между изолати на *L. donovani* и *L. major* показва **идентифицирани гени, участващи във вирулентността и тъканния тропизъм след инфекция в животински модел и при хора**. Геномното секвениране също позволява идентифицирането на различни подвидове на *L. infantum*. В допълнение, **геномни вариации като анеуплоидии, единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) и структурни варианти (SVs), като вариация на броя на копията (CNV), могат да повлияят на присъствието, нивата, и следователно експресията на генни локуси, свързани с вирулентността**. Предполага се, че SNP, CNV и анеуплоидиите са отговорни за промените в нивата на вирулентността.

В проучване на тема “*Genome Assembly and Genome Annotation of Leishmania martiniquensis Isolated from a Leishmaniasis Patient in Thailand*“ на авторски колектив *Songtham Anuntakarun, Atchara Phumee, Vorthon Sawaswong, Kesmanee Praianantathavorn, Witthaya Poomipak, Rungrat Jitvaropas, Padet Siriyasatien, and Sunchai Payungporn* са извършени сглобяване на генома и генно прогнозиране на *Leishmania martiniquensis*. Резултатите показват, че функционалната категория COG на *L. martiniquensis* е подобна на други видове *Leishmania*. Има обаче лека разлика, както бе споменато в предходни проучвания в броя на гените във всяка функционална група. **Значението на факторите на паразитна вирулентност е очевидно през последните години. Променливостта на гените на фактора на вирулентност в рамките на вида *Leishmania* е до голяма степен неизвестна.** В предоставената в това проучване генна прогноза за фактор на вирулентност на *L. martiniquensis*, резултатът показва, че 359 гени за фактори на вирулентност са открити в *L. martiniquensis*. Топлинно-шоковите протеини са вътреклетъчни молекули с различно молекулно тегло. Те са голямо семейство от молекулярни шаперони. Ролята на тези протеини е узряване, разграждане и повторно нагъване. Те също играят важна роля в имунните биологични функции, особено в hsp70. Има доклад, който показва, че **hsp70 активира провъзпалителни цитокини и е свързан с повишаване на адаптивния имунитет.** В тези резултати hsp70 протеин кодиращия ген сред 359 генните групи, кодиращи кандидат факторите за вирулентност, са **открити гени, които може да са свързани с инфекция на клетките гостоприемници.** Протеиназите са ензими, които хидролизират пептидните връзки в протеините и участват в широк спектър от биологични функции, включително в процеса на инфекция. Има много класове протеинази. Има само три класа, включително аспартил-, метало- и цистеин-протеиназа, които са подробно изследвани в *Leishmania*. В предишен преглед се счита, че **цистеиновите протеинази играят решаваща роля в патогенезата на други паразитни протозойни инфекции.** CPA, CPB и CPC гени, кодиращи група цистеинови протеинази са широко изследвани при видовете *Leishmania*. Резултатите посочват, че **CPC гени са открити в *L. martiniquensis*.** CPC играе потенциална роля в неутрализирането на паразитите от макрофагите.

В допълнение, **генът за супероксид дисмутаза (SODB1) е открит в секвенирания в това проучване геном на *L. Martiniquensis*, като SODB1 е необходим за основната патогенност на *Leishmania* при мишки и персистиране в макрофагите.** Супероксид дисмутазите (SODs) са металоензими, които превръщат супероксида в кислород и водороден пероксид и в антиоксидантна „отбранителна“ система. Никел (Ni), манган (Mn), желязо (Fe), или мед и цинк (Cu/Zn) са кофактори на супероксид дисмутазите. Филогенетичният анализ показва, че *L. martiniquensis* е тясно свързан с по-рано съобщения референтен геном на *L. martiniquensis* (LU_Lmar_1.0) в NCBI базата данни. Референтния геном на *L. (Mundinia) martiniquensis* е докладван през 2019 г.

В това проучване геномната ДНК на *L. martiniquensis* е успешно секвенирана и е сглобена в 6939 клъстера. Анализирани са общо 30 784 469 bp в 36 хромозоми от генома на *L. martiniquensis*. Резултатите от анализа показват, че **общите характеристики на *L. martiniquensis* са подобни на други видове *Leishmania*, включително размери на хромозомите, броя на протеин кодиращите гени и съдържанието на GC.** В

допълнение, резултатите от функционалната анотация на COG са показали, че са подобни на други видове *Leishmania*.

В проучване на тема „*Global genome diversity of the Leishmania donovani complex*“ - *Susanne U Franssen, Caroline Durrant, Olivia Stark, Bettina Moser, Tim Downing, Hideo Imamura, Jean-Claude Dujardin, Mandy J Sanders, Isabel Mauricio, Michael A Miles, Lionel F Schnur, Charles L Jaffe, Abdelmajeed Nasereddin, Henk Schallig, Matthew Yeo, Tapan Bhattacharyya, Mohammad Z Alam, Matthew Berriman, Thierry Wirth, Gabriele Schoenian, James A Cotton* са представени данни от целогеномно секвениране на лайшмании, които представляват **голяма част от глобалното разпространение на комплекса от видове *L. Donovanii***, като е показано много по-голямо генетично разнообразие. Идентифицирани са пет основни клейда от *L. donovani*, които до голяма степен **отразяват географското разпространение на паразитите и свързаните с тях векторни видове** (*Akhoundi et al., 2016*). В основните класове *L. infantum* се **наблюдава широко разпространение и е показано малко разнообразие**. Наблюдавана е **хибридизация, която до някъде обяснява генетичното разнообразие**. Въпреки че са идентифицирани много нови линии, които са хибриди между основните групи, присъстващи в това проучване, е вероятно дори с данни за вариациите на целия геном да се пропускат други събития на хибридизация особено в рамките на отделните групи. **Всички известни хибридни популации са имали повишени нива на хетерозиготност**. Ясните геномни модели на хибридизация могат да бъдат неоткриваеми, когато хибридизация се среща между тясно свързани изолати.

В това проучване е **демонстрирана много ясно мозаечната анеуплоидия**, присъстваща в популациите на *Leishmania* (*Prieto Barja et al., 2017; Lachaud et al., 2014; Sterkers et al., 2011*), като има вариации на анеуплоидията между изолатите на паразитите.

По подобен начин тези данни отразяват генетичната вариабилност на набор от изолати, отглеждани като промастиготи в *in vitro* култура. Това означава, че може да бъдат пропуснати вариациите, присъстващи в популациите от паразити - гостоприемници, които се губят по време на изолиране на паразити или последващ растеж. Подходът за директно секвениране на геномите на *Leishmania* в клинични проби е дало някои първи прозрения в ефектите от културата на паразити *in vitro* и ще позволи бъдещи изследвания на вариациите на генома на *Leishmania*, за да се избегне това потенциално отклонение (*Domagalska et al., 2019*). В това проучване са идентифицирани обширни вариации в броя на копията, включително както много големи структурни дубликации и делеции, така и по-малки варианти, засягащи единични гени. **Големите структурни варианти са особено чести на хромозома 35**. Анализът показва най-малко 9 дубликации с различни дължини, съдържащи CD1/LD1 локус. Също така е известно, че CD1/LD1 локусът възниква спонтанно в независима *in vitro* клетъчна линия (*Segovia, Ortiz, 1997*) и кодира транспортера на биоптерин (*Ku'ndig et al., 1999*). Много CNV изглежда са широко разпространени в различни класове *Leishmania*. **Делеция в хромозома 27 е често срещана също**, което може да е древен сегрегиращ полиморфизъм. В това проучване са **демонстрирани полезността на геномните данни**

за разбиране на функционалните генетични вариации и въздействията върху фенотипа и не на последно място механизмите на лекарствена резистентност. Делцията в MSL локуса например е свързана с неуспех в лечението с милтефозин, за първи път документирана в Бразилия, но в последствие открита и в изолати от Хондурас, което предполага по-широко географско разпространение. Това изследване предоставя първия изчерпателен поглед върху глобалното разпространение, на база целогеномно секвениране, и дава яснота относно генетичното разнообразие на двата най-патогенни вида *Leishmania*. Данните от целогеномното секвениране показват влиянието на анеуплоидията върху генетичното разнообразие и показва различни геномни рекомбинации в различни географски региони. Изследването на CNV по отношение на ролята на повтарящите се последователности е показателно за конкретни региони като очевидни горещи точки за генериране на генетично разнообразие. Освен това, наличието на този широк набор от геномни данни за *L. donovani* и *L. infantum* позволява да се идентифицират и разберат произхода на хибридните изолати в много огнища. Тази публикация предоставя още един ценен ресурс за изследване на отделни локуси за разбиране на функционалните вариации, както и за поставяне на по-фокусирани изследвания в глобален контекст.

Заклучения и бъдещи насоки

В тези проучвания се подчертава разнообразието на рода *Leishmania* и променливите, които водят до диверсификация. Потвърждава се уместността на използването на различни подходи, като „omics“ технологии, генетична манипулация и комбиниран скрининг, за изясняване на механизмите за лекарствена резистентност и идентифициране на нови химиотерапевтични цели за лайшманиоза. Секвенирането на генома на лайшманиите ще разкрие много повече разновидности, генни варианти и детерминанти за резистентност на тези паразити. Освен това все повече се подчертава необходимостта от молекулярни техники за изследване на регулацията на пътя и установяване на нови индуцируеми системи за *Leishmania*. Проучване върху взаимовръзката между гостоприемник-*Leishmania* spp., ще допринесе за по-доброто разбиране на сложността на механизмите за лекарствена резистентност, терапевтичния неуспех и голямата адаптивност на тези коварни паразити.

Лайшманиозите остават широко разпространени и недостатъчно докладвани в много страни от Южна Европа, Северна Африка и Близкия изток. Съществува необходимост от подобряване на превенцията и контрола на лайшманиозата въз основа на солиден надзор върху хората, животните и векторите, както и от повишаване на обществената осведоменост, като се следва подходът „Едно здраве“. Настоящите мерки за профилактика и контрол на лайшманиозата и достъпът до валидни диагностични методи и ефективни лечения са недостатъчни. Това би могло да има важни последици за заболяванията, включително увеличаване на заболяемостта в ЕС и съседните му държави; разпространението на *Leishmania* spp. в нови области, които остават незабелязани; увеличаване на неуспеха на лечението и развитието на резистентност към терапевтичната схема.

Мерките за профилактика и контрол на лайшманиозите, достъпът до валидни диагностични методи и насоки и достъпът до ефективно лечение трябва да бъдат унифицирани и стандартизирани, за да може да се осъществява активен надзор и да се взимат навременни мерки за разпространяващите се в нови зони *Leishmania* spp. Необходимо е да се наблегне в разработването на стандартни методи за молекулярна диагностика, базирана на целогеномно секвениране, за да се получават по-навременни, пълни и информативни резултати, които ще послужат при вземането на своевременни мерки и решения.

Изготвил:

Красимира Захариева,

Главен експерт, Дирекция ОРХВ, ЦОРХВ

Използвана литература:

- *Global genome diversity of the Leishmania donovani complex - Susanne U Franssen, Caroline Durrant, Olivia Stark, Bettina Moser, Tim Downing, Hideo Imamura, Jean-Claude Dujardin, Mandy J Sanders, Isabel Mauricio, Michael A Miles, Lionel F Schnur, Charles L Jaffe, Abdelmajeed Nasereddin, Henk Schallig, Matthew Yeo, Tapan Bhattacharyya, Mohammad Z Alam, Matthew Berriman, Thierry Wirth, Gabriele Schoñian, James A Cotton*
- *Genome Assembly and Genome Annotation of Leishmania martiniquensis Isolated from a Leishmaniasis Patient in Thailand - Songtham Anuntakarun , Atchara Phumee , Vorthon Sawaswong , Kesmanee Praianantathavorn , Witthaya Poomipak , Rungrat Jitvaropas , Padet Siriyasatien and Sunchai Payungporn*
- *Impact of Genetic Diversity and Genome Plasticity of Leishmania spp. in Treatment and the Search for Novel Chemotherapeutic Targets - Ana Maria Murta Santi and Silvana Maria Fonseca Murta*
- *Genome and transcriptome analyses of Leishmania spp.: opening Pandora's box - Angela Kaysel Cruz and Felipe Freitas-Castro*
- *Surveillance, prevention and control of leishmaniasis in the European Union and its neighbouring countries – ECDC, EFSA*
- *Genomes of Leishmania parasites directly sequenced from patients with visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent - Malgorzata A. Domagalska, Hideo Imamura, Mandy Sanders, Frederik Van den Broeck, Narayan Raj Bhattarai, Manu Vanaerschot, Ilse Maes, Erika D'Haenens, Keshav Rai, Suman Rijal, Matthew Berriman, James A. Cotton, Jean-Claude Dujardin*
- *Integrative genomic, proteomic and phenotypic studies of Leishmania donovani strains revealed genetic features associated with virulence and antimony-resistance - Zhiwan Zheng, Jianping Chen, Guangxu Ma, Abhay R. Satoskar and Jiao Li*
- *Chromosome-scale genome sequencing, assembly and annotation of six genomes from subfamily Leishmaniinae - Hatim A Imutairi, Michael D. Urbaniak, Michelle D. Bates, Narissara Jariyapan, Godwin Kwakye-Nuako, Vanete Thomaz Soccol, Waleed S. Al-Salem, Rod J. Dillon, Paul A . Bates & Derek Gatherer*
- *Application of next generation sequencing (NGS) for descriptive analysis of 30 genomes of Leishmania infantum isolates in Middle-North Brazil - Kátia Silene Sousa Carvalho, Wilson José da Silva Júnior, Marcos da Silveira Regueira Neto, Vladimir Costa Silva, Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior, Valdir Queiroz Balbino, Dorcas Lamounier Costa & Carlos Henrique Nery Costa*