

ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У КОНТРОЛІ ПАЗАРИТАРНОЇ СИТУАЦІЇ

Для контролю паразитарної ситуації щодо актуальних у соціальному аспекті паразитів тварин розроблено метод детекції та ідентифікації яєць паразитичних нематод домашніх хижаків *Toxocara canis*, *Toxocara cati* і *Toxascaris leonina* в довіллі з використанням полімеразної ланцюгової реакції. Розроблено та синтезовано олігонуклеотидні праймери, теоретично розраховано і практично оптимізовано умови їх роботи. Перевірено специфічність, чутливість та відтворюваність розроблених праймерів на нативному генетичному матеріалі та суміші з органо-мінеральними зразками довілля. Доведено ефективність методу, що перевищує існуючі аналоги на 10,4%.

Постановка проблеми

Серед актуальних питань, пов'язаних з екологічною безпекою життєдіяльності людини і утриманням домашніх тварин, особливої уваги заслуговує профілактика соціально небезпечних геогельмінтозів, зокрема, таких поширених інвазій, як токсокароз та токскарроз собак і котів. Їм належить чільне місце у структурі паразитарного забруднення в умовах урбанізованих територій та агроландшафтів. Вирішення цієї проблеми нерозривно пов'язане з необхідністю інтенсифікації фундаментальних і прикладних наукових досліджень в галузі діагностики, профілактики та лікування паразитарних хвороб. Розробка і впровадження в лабораторну практику нових високотехнологічних молекулярно-генетичних методів досліджень, зокрема, полімеразної ланцюгової реакції (ПРЛ), дозволить вчасно та ефективно здійснювати контроль паразитарної ситуації шляхом виявлення осередків паразитарного забруднення і зниження захворюваності населення та свійських тварин [1, 2, 7].

Аналіз останніх досліджень та постановка завдання

Нематодам з ряду *Ascaridida*, до яких належать збудники токсокарозу (*Toxocara canis* (Werner, 1782) та *Toxocara cati* (Schrank, 1788)) і токскаррозу (*Toxascaris leonina* (von Linstow, 1902)), притаманна значна екологічна стійкість до абіотичних чинників середовища. Пропагативні стадії (яйця і личинки) паразитів здатні до тривалого збереження в компонентах довілля (грунті, воді, продуктах харчування, побутових та виробничих предметах), через які збудники хвороб можуть бути занесені в організми різних хазяїв, в тому числі й людини. Так, при інвазуванні токсокарами неспецифічних хазяїв можливий розвиток, так званого, синдрому «visceral larva migrans» або розвиток еколого-паразитичного

явища «паратенічний паразитизм», які зумовлюють патологічні зміни в організмі людини чи тварини, важко діагностуються і лікуються [3, 5].

Профілактика паразитарного забруднення аскаридами може бути суттєво вирішена шляхом знищення паразитів на різних стадіях їх розвитку. Водночас, на практиці недостатньої уваги надається питанням розриву епізоотичних ланцюгів при гельмінтозах, зокрема, шляхом детекції та елімінації їх пропативних стадій. У зв'язку з цим, перспективним напрямом досліджень є розробка експрес-методів одномоментного виявлення в організмі хазяїна і середовищі його існування гельмінтів з різних таксономічних груп. Одним із них є полімеразна ланцюгова реакція, яка знайшла широке застосування у діагностиці інфекційних та інвазійних хвороб [1, 5, 4].

Незважаючи на тривалий термін використання ПЛР-методик у діагностичній практиці, вони залишаються актуальними й наразі. Фундаментальні молекулярно-генетичні дослідження у паразитології та дослідження структури геному нематод з ряду *Ascaridida* дозволили зробити ряд важливих відкриттів, пов'язаних з механізмами їх адаптації до ендopазаритизму, систематику, філогенетичною спорідненістю видів, впровадженням методу на основі ПЛР у діагностику інвазійних хвороб [6, 8, 9].

В Україні, через недостатність фінансування галузей біологічної, медичної, ветеринарної науки та практики і відсутність сучасного оснащення лабораторій, досі користуються застарілими еколого-паразитологічними методами, приділяють недостатньо уваги розробці та впровадженню нових. Стандартизовані методи не завжди є ефективними, а розробка їхніх аналогів із застосуванням молекулярно-генетичних методів в Україні не проводилася взагалі.

Метою дослідження було розробити і вивчити аналітичні характеристики праймерів для виявлення та ідентифікації актуальних у соціальному аспекті геогельмінтів домашніх хижаків у різних зразках об'єктів довкілля з використанням ПЛР.

Об'єкти та методика досліджень

Молекулярно-генетичні дослідження проводили у лабораторії молекулярної біології Інституту ветеринарної медицини УААН. Теоретичну розробку олігонуклеотидних праймерів проводили за допомогою електронних баз даних GenBank, EMBL, Entrez та DDBJ; комп'ютерних програм Vector NTI Suite, Align X, FASTA та BLASTA on line, а синтез здійснювала Науково-виробнича фірма «Литех».

Матеріалом для позитивного контролю були статевозрілі нематоди видів *T. canis*, *T. leonina* та суспензії яєць *T. cati* на різних стадіях ембріонального розвитку, негативного – деіонізована автоклавована вода.

Виділення ДНК проводили використовуючи комплект реагентів «ДНК-сорб-В». Ампліфікацію здійснювали за допомогою чотириканального ампліфікатора «Терцик». Результати реакції визначали за допомогою електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації у 2%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію та подальшим переглядом гелю на ультрафіолетовому (УФ) транслюмінаторі. Позитивно вважали пробу при наявності смужки жовтогарячого кольору розміром 394 нуклеотидні залишки (н.з.).

Для перевірки таксономічної специфічності розроблених праймерів було проаналізовано зразки ДНК від 12 видів паразитів тварин, п'яти штамів бактерій, генетичний матеріал великої рогатої худоби, свині, kota, собаки і курки. Чутливість методу перевіряли на зразках, що містили 1000, 100, 10 та 2 яєць *T. cati* в 0,1 см³. Відтворюваність ПЛР визначали шляхом триразового повторення постановки реакції з позитивними і негативними зразками в п'яти варіантах. Можливість інгібування реакції речовинами, що входять до складу ґрунту, води природних водойм, рослинності та тваринних екскрементів вивчали на експериментальних моделях шляхом їх комбінування з яйцями *T. cati*.

Еколого-паразитологічні дослідження територій помешкання домашніх і бездомних хижих тварин здійснювали впродовж літньо-осіннього періоду 2010–2011 років у місцях, потенційно значимих щодо забруднення екскрементами тварин (дитячі та спортивні майданчики, сквери, парки, прибудинкові території житлових мікрорайонів м. Київ). Для лабораторних досліджень відбирали проби ґрунту, піску, води, трави. Еколого-паразитологічні дослідження проводили за традиційними методиками та ПЛР.

Результати досліджень та їх обговорення

Вибір послідовностей нуклеотидів праймерів є ключовим етапом у створенні високоспецифічного методу на основі ПЛР для ідентифікації та детекції одномоментного виявлення декількох видів гельмінтів тварин. Для розробки специфічних праймерів було визначено декілька придатних для цього маркерних послідовностей. Серед них для подальшої роботи було відібрано консервативну ділянку *cox 1* мітохондріальної ДНК, яка є спільною для генетично споріднених нематод *T. canis*, *T. cati* та *T. leonina*. Найвдалішою виявилася пара праймерів, що мають послідовність:

AT15'TTTGGGCATCCTGAGGTTTATA3'іAT25'CATGCAAGATAATATCCA
GACTAG 3'.

Розроблені праймери є специфічними для зв'язування з ділянками матричної ДНК. Теоретично вони не мають гомології з нуклеотидними послідовностями інших організмів (бактерії, віруси та еукаріоти). Винятком є нематода *Ascaris suum* (Goeze, 1782) – збудник аскарозу свиней. Зважаючи на небезпечність для людини усіх видів паразитів тварин з ряду *Ascaridida*, а також універсальність способів боротьби з ними у доквілі, вважаємо властивість праймерів виявляти

близькоспоріднені види аскаридід додатковою універсальною перевагою праймерів.

Теоретично розраховано і експериментально визначено найкращий режим ампліфікації та склад ПЛР-суміші, за яких синтетичні олігонуклеотидні праймери здатні приєднуватися до консервативної ділянки ДНК, множинно копіюватися і виявлятися класичними методами детекції.

Оптимальним був склад ампліфікаційної суміші об'ємом 0,025 см³. Він вміщував: ПЛР-буфера – 0,012 см³, dNTP – 0,004 см³, праймерів АТ 1 та АТ 2 – по 0,0025 см³ і очищену ДНК – 0,004 см³. У кожену пробу нашаровували 0,03 см³ мінерального масла.

Режим ампліфікації складався з 35-ти циклів, кожний з яких включав денатурацію ДНК при 95°C – 30 с; відпал праймерів при 50°C (53°C, 58°C або 62°C) – 1 хв; синтез компліментарних ланцюгів при 72°C – 1 хв.

Після електрофоретичного розділу ампліконів в агарозному гелі відмічали світіння смужок жовтогарячого кольору на теоретично розрахованому рівні (394 н.з.), що свідчить про позитивний результат ПЛР.

Подальшим кроком оптимізації ПЛР-протоколу було визначення специфічності розроблених праймерів. З цією метою провели виділення ДНК із паразитичних організмів таких видів: *A. suum*, *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786); *Taenia hydatigena* (Pallas, 1766); *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859); *Dipylidium caninum* (Linnaeus, 1758); *Trichostrongylus instabilis* (Railliet, 1893); *Trichuris vulpis* (Frolich, 1789); *Parascaris equorum* (Goese, 1782); *Uncinaria stenocephala* (Railliet, 1884); *Demodex canis* (Bergerin, 1846); *Oesophagostomum dentatum* (Rudolphi, 1803); *Eimeria suis* (Joen, 1971); штамів бактерій: *Escherichia coli* (Escherich, 1885); *Salmonella dublin* (Salmon and Smit, 1885); *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884); *Streptococcus faecalis* (Paterson, 1933); *Pasteurella multocida* (Lehmann and Neumann, 1899) і тканин від тварин. Постановку реакції проводили згідно з оптимізованим протоколом. У жодному випадку не було зареєстровано позитивного результату, що свідчить про високу специфічність розроблених праймерів.

Мінімальна чутливість реакції становила два яйця нематоди в 1 см³ субстрату, що вважається достатньо чутливим показником.

При перевірці відтворюваності методу в усіх випадках були зафіксовані ідентичні результати. У позитивних зразках інтенсивність світіння смужки і довжина ампліфікованих продуктів були однаковими.

У пробах об'єктів довкілля, штучно контамінованих яйцями *T. cati*, реєстрували позитивний результат. Дещо розмитою була смужка в зразку з екскрементами (рис.). Такий результат можна пояснити високим вмістом у ньому біологічно активних речовин, які можуть виступати інгібіторами реакції.

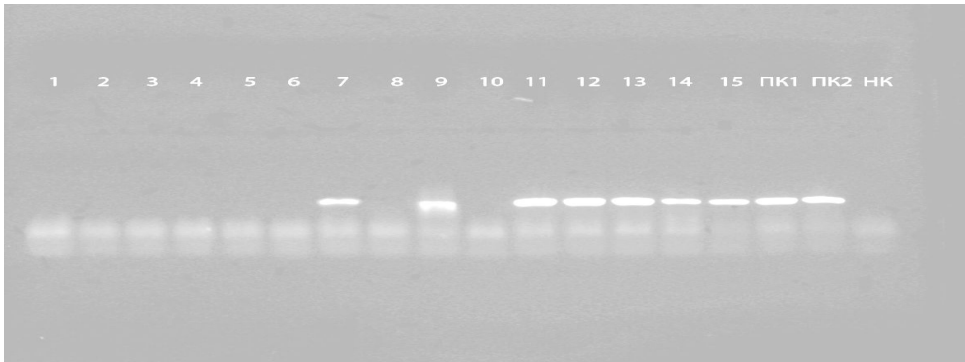


Рис. Електрофореграма продуктів полімеразної ланцюгової реакції

Примітка: 1–5 – ДНК тварин; 6 – трава; 7 – трава, контамінована яйцями токсокар; 8 – ґрунт; 9 – ґрунт, контамінований яйцями токсокар; 10 – вода; 11 – вода, контамінована яйцями токсокар; 12–15 – зразки з вмістом 1000, 100, 10 і 2 яйця аскариди; ПК1 – позитивний контроль (100 яєць *T. cati*); ПК2 – позитивний контроль (м'язова тканина нематода *T. canis*); НК – негативний контроль

Модифіковано методики підготовки зразків об'єктів довкілля (ґрунт, зішкребки, змиви, екскременти) до вилучення та екстракції нуклеїнових кислот інвазійних агентів. Доведено доцільність застосування флотаційного розчину на основі хлориду натрію з подальшим двократним відмиванням у дистильованій воді вилучених із проб яєць нематод.

В результаті дослідження 58-и проб об'єктів довкілля (ґрунт, пісок, трава, вода) традиційним еколого-паразитологічним методом діагностики і ПЛР позитивні результати реєстрували у 14-и зразках, досліджених ПЛР, що свідчить про присутність в них нуклеїнових кислот, комплементарних визначень у праймерах послідовності нуклеотидів аскаридід. Водночас, у зразках, досліджених класичним методом, яйця аскаридід собак та кішок реєстрували лише у 8 пробах, які були підтверджені ПЛР. Виявлені ПЛР позитивні проби перевищують показник виявлення зародків аскаридід стандартизованими загальноприйнятими методами на (6 проб) – 10,4%. Із них 4 – проби ґрунту, 1 – води та 1 – піску.

Результати проведеного дослідження дозволяють визначити переваги застосування методу ПЛР для контролю еколого-паразитологічної ситуації, серед яких слід відзначити його високу ефективність, суттєву економію часу для постановки реакції (8 год проти 30–35 год), можливість одночасного дослідження мінімум 36-и проб різного біологічного походження (продукти харчування, ґрунт, трава, вода, екскременти тощо) та здатність ідентифікувати ДНК нематод ряду *Ascaridida* у присутності мільйонів інших. Крім того, впровадження у практику ПЛР-методів індикації збудників паразитозів

дозволить частково вирішити проблему дефіциту кадрів паразитологічної ланки за рахунок універсальності підходів і автоматизації процесу дослідження.

Таким чином, розроблені праймери можуть бути використані для виявлення нуклеїнових кислот паразитичних нематод *T. leonina*, *T. canis* та *T. cati* методом ПЛР. Експериментальні досліді і перевірка у виробничих умовах показали позитивні результати і доцільність застосування методу на основі ПЛР для еколого-гельмінтологічних обстежень, що може забезпечити надійне прогнозування змін паразитологічної ситуації на урбанізованих територіях та своєчасну профілактику паразитарного забруднення.

Висновки

Розроблено і апробовано метод детекції та ідентифікації соціально небезпечних геогельмінтів тварин з ряду *Ascaridida* (*T. leonina*, *T. canis* та *T. cati*), який може бути ефективно застосований для контролю паразитарної ситуації, а саме моніторингових обстежень докільця з метою виявлення осередків паразитарного забруднення.

В результаті проведених досліджень оптимізовано ПРЛ-протокол, доведено високий рівень специфічності, чутливості та відтворюваності розроблених праймерів. Порівняльний аналіз традиційних еколого-паразитологічних методів і полімеразної ланцюгової реакції на лабораторних моделях та виробничих умовах показав вищу (на 10,4%) рентабельність застосування полімеразної ланцюгової реакції для виявлення осередків паразитарного забруднення.

Перспективи подальших досліджень будуть пов'язані з розробкою діагностичної тест-системи на основі ПЛР для визначення рівня паразитарного забруднення докільця та діагностики аскаридідозної інвазії у специфічних хазяїв і організмі людини. Здатність розроблених праймерів ідентифікувати нематоду *A. suum* дозволяє говорити про їх універсальність та можливість застосування методу, наприклад, для проведення еколого-паразитологічного обстеження продуктів харчування рослинного походження, при виробництві яких часто використовують незезаражені стоки від сільськогосподарських тварин, в тому числі і свиней.

Література

1. Баранов В.С. Молекулярная медицина: молекулярная диагностика, превентивная медицина и генная терапия / В.С. Баранов // Молекулярная биология. – 2000. – № 4. – С. 684–695.

2. Волошина Н.О. Паразитарне забруднення докільця збудниками підряду *Ascaridata* та його взаємозв'язок із інвазованістю тварин [електронний ресурс] / Н.О. Волошина // Наукові доповіді НУБіП України. – 2010. – № 1 (17). Режим доступу до журналу: <http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2010-1/10vnoiia.pdf>.

3. *Гасамова Т.А.* Токсокароз: распространение и влияние на репродуктивное здоровье / *Т.А. Гасамова* // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2003. – № 4. – С. 11–15.

4. *Мавров И.И.* Роль молекулярно-биологических методов исследования в контроле за развитием заболеваний / *И.И. Мавров, А.П. Белозоров* // Дерматология та венерология. – 2006. – № 2 (32). – С. 35–38.

5. Пути улучшения качества лабораторной диагностики гельминтозов / *Д.А. Долбин, Л.Р. Смирнова, Е.В. Агафонова [и др.]* // Казанский медицинский журнал. – 2007. – Т. 88, № 4. – С. 398–401.

6. *Стегній Б.Т.* Молекулярна епізоотологія : визначення завдань та основних понять / *Б.Т. Стегній, А.П. Герілович, В.В. Пригін* // Ветеринарна медицина України. – 2008. – № 1. – С. 19–21.

7. *Черепанов А.А.* Профилактика социально опасных болезней в системе экологических мероприятий / *А.А. Черепанов, Н.Л. Новиков* // Тр. Всерос. ин-та гельминтологии. – 2003. – Т. 39. – С. 268–287.

8. PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats / *M.W. Li, R.Q. Lin, H.H. Chen [et al.]* // Mol. Cell. Probes. – 2007. – № 21. – P. 349–354.

9. The complete mitochondrial genomes for three *Toxocara* species of human and animal health significance / *M.W. Li, R.Q. Lin, H.Q. Song [et al.]* // BMC Genomics. – 2008. – Vol. 16. – P. 224.
