

## Выявление паразита *Monogenea* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

М.К. Курманова, канд. с.-х. наук; А.А. Мишхожев, канд. с.-х. наук  
ФГБОУ ВО Кабардино-Балкарский ГАУ

Моногенеи (моногенетические сосальщики) – широко распространённая группа паразитов из типа плоские черви, поражающих кожу, жабры и плавники рыб и водных беспозвоночных. Некоторые могут стать причиной изъязвлений поверхности тела, клоаки, мочеточников и даже кровеносных сосудов. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод молекулярной диагностики, ставший для многих инфекций «золотым стандартом», проверен временем и тщательно апробирован клинически. Высокая чувствительность и специфичность метода позволяют гарантированно обнаруживать единичные возбудители в биологическом материале на основе их генетической информации. Аналитическая чувствительность ПЦР для большинства вирусов и бактерий составляет 1000 микроорганизмов в 1 мл пробы. Специфичность ПЦР для вирусных, хламидийных, микоплазменных и большинства других бактериальных инфекций достигает 100%. ПЦР в лабораторной диагностике инфекций характеризуется быстротой, непревзойдённой чувствительностью и высокой специфичностью. Разработана качественная ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов для выявления генома паразита карповых рыб, возможная для использования отечественной ветеринарной службой. Подобраны оптимальные режимы постановки реакции и концентрации химических реагентов для постановки реакции.

**Ключевые слова:** ПЦР, ДНК, паразиты, рыба, цепная реакция, диагностика.

Одной из наиболее существенных отрицательных сторон в развитии культурных рыбных хозяйств, в особенности хозяйств прудового и нерестово-выростного типа, являются заболевания рыбы. Нередко вспыхивающая эпизоотия может свести на нет всю работу рыбоводов, вызвав поголовную гибель рыбы, или резко снизить количество и качество продукции. По мере роста и развития культурных форм рыбного хозяйства вопрос о предохранении рыбы от заболеваний и о лечебных мероприятиях становится всё более и более актуальным.

Причины заболеваний рыбы могут быть различны. Их можно разделить на четыре группы. Первая группа – инфекционные заболевания, вызываемые бактериями и вирусами. Сюда относятся краснуха карповых, фурункулез лососевых и многие другие. Вторая группа – грибковые заболевания, среди которых особенно распространён бранхиомикоз (заболевание жабр) и болезни, вызываемые сапролегнией. Третью весьма разнородную группу составляют заболевания, в основе этиологии которых лежат нарушения обмена веществ и авитаминозы, обусловленные обычно недостатками пищевого режима. Наконец, самую обширную четвёртую группу составляют заболевания паразитарной этиологии, вызываемые паразитами, принадлежащими к различным группам животного мира, простейшим, моно- и дигенетическим сосальщикам, ленточным и круглым червям, скребням, паразитическим веслоногим рачкам и др. [1–8].

Для лабораторной диагностики моногении в России не разработано тестов на основе анализа генома. Одним из перспективных подходов к решению этого вопроса является использование полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов (ПЦР-РВ).

Использование для ПЦР-РВ зонда, меченного флуоресцентными метками, позволяет уменьшить время постановки реакции до 2 час. Отсутствие необходимости в постановке электрофоретической визуализации ПЦР значительно уменьшает риск получения ложно-положительных результатов [9–11].

В зарубежной научной литературе многократно и в разные годы описана возможность применения ПЦР для выявления генома этого биологического объекта [12, 13].

**Материал и методы исследования.** В работе были использованы пробы от рыб, выловленных в частном прудовом хозяйстве Кабардино-Балкарской Республики. Чувствительность разрабатываемого метода оценивали, используя 10-кратные разведения выделенной ДНК из проб рыб. С целью оценки воспроизводимости показателей тестируемых образцов каждый эксперимент проводили в трёх повторах независимыми постановками ПЦР-РВ.

ДНК выделяли методом нуклеосорбции на силикагеле. С этой целью использовали набор ДНК-сорб («Интерлабсервис», г. Москва) согласно инструкции производителя. Выделенную ДНК использовали в качестве матрицы для постановки ПЦР. В качестве отрицательного контроля использовали 1×TE буфер, pH 8.0.

Для подбора оптимальных условий проведения ПЦР использовали набор «Оптимизация ПЦР» (ЗАО «Силекс», г. Москва). Далее в ходе ряда экспериментов ПЦР-РВ были установлены оптимальный объём (25 мкл) и состав реакционной смеси с содержанием следующих компонентов: 10 ммоль каждого праймера; 5 ммоль флуоресцентного зонда; 1 ед. Taq-полимеразы; 2,5 ммоль MgCl<sub>2</sub>; 0,2 ммоль дНТФ; 5мкл кДНК матрицы. ПЦР проводили на амплификаторе RotorGene

6000 («Corbett Research», Австралия) по следующей программе:

- предварительная денатурация 90 °С – 3 мин.;
- цикл 1: 90 °С – 15 с.; 57 °С – 15 с.; 72 °С – 15 с. (5 повторов, без детекции);
- цикл 2: 90 °С – 15 с.; 57 °С – 15 с.; 72 °С – 15 с. (35 повторов, с учётом флуоресценции по каналу FAM при температуре 57 °С).

Учёт результатов реакции осуществляли с помощью программного обеспечения прибора RotorGene 6000.

Для подбора праймеров использовали нуклеотидную последовательность гена ДНК полимеразы моногении, размером 90 н.п., фланкированного праймерами MonF 5'-gatcgaggtcgtatgctc-3' и MonR 5'-ccatgtcgtaacgtaccgta-3' (GeneBank NCBI № KY863907). Последовательность флуоресцентного зонда – RVz-5'-FAM-gtttaccgtacgtacgtaacgtcagggta-BHQ1-3'.

**Результаты исследования.** С целью оценки перспективности использования гена ДНК полимеразы моногении в качестве ДНК-мишени для разработки ПЦР в реальном времени проводили выравнивание нуклеотидных последовательностей данного гена различных штаммов и изолятов, депонированных в GeneBank. На основании полученных результатов выравни-

вания были определены переменные и консервативные участки полимеразы, на которую были подобраны олигонуклеотидные праймеры, обеспечивающие амплификацию фрагмента и зонд формата TaqMan с флуоресцентными метками FAM и BHQ1, позволяющего учитывать результаты реакции в режиме реального времени. Выбор праймеров и зонда обоснован рекомендациями D. Littlewood et al. Последовательности подобранных праймеров специфичны ко всем нуклеотидным последовательностям известных моногении депонированных в GeneBank. Данные праймеры и зонд были синтезированы в НПФ «Литех» (г. Москва). На следующем этапе исследования определяли оптимальные условия ПЦР-РВ с подобранными праймерами и зондом с использованием ДНК, выделенной из рыб. В результате этого были определены оптимальные концентрации реактивов и оптимальный температурный режим амплификации. Данные представлены в разделе «Материал и методы». Аналитическую чувствительность метода определяли с использованием панели из ряда 10-кратных разведений ДНК моногении (рис. 1). Для оценки воспроизводимости результатов выявления два независимых исследователя провели параллельный анализ образцов, использованных

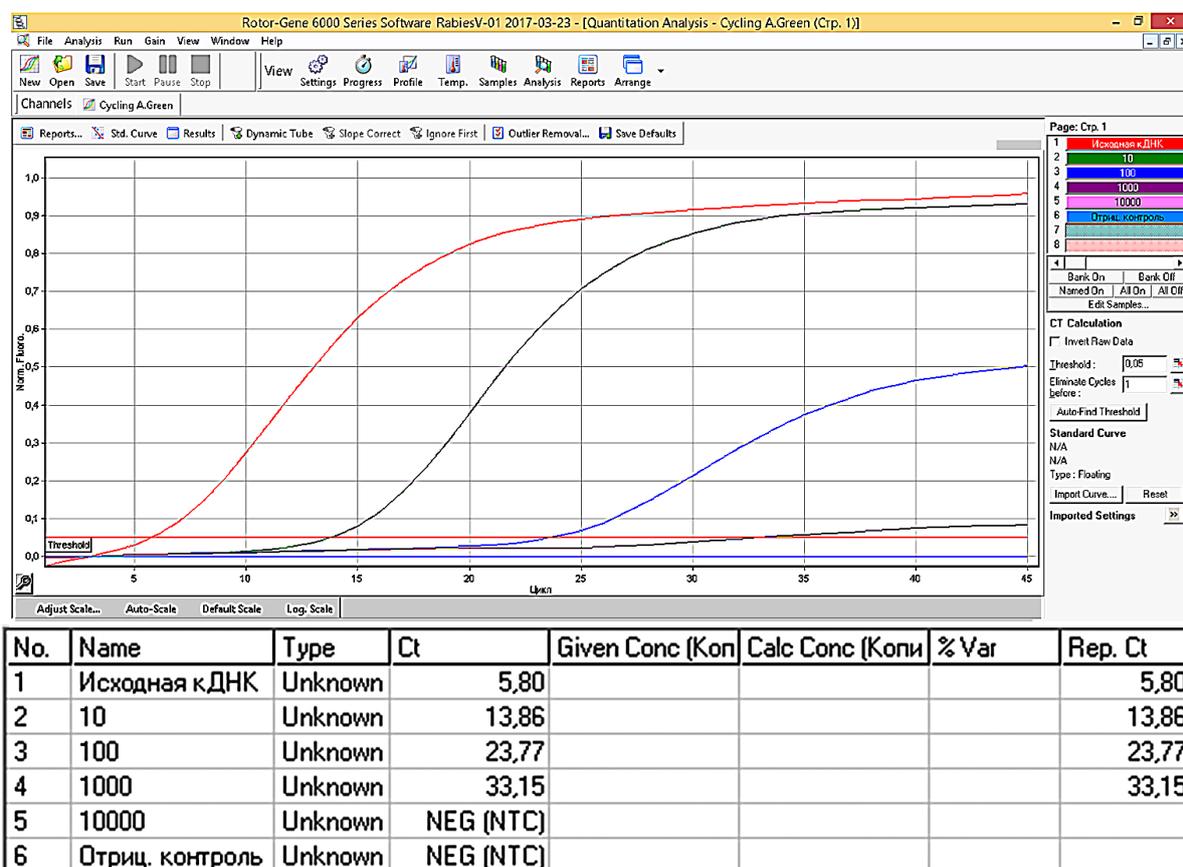


Рис. 1 – ПЦР-РВ на пробах разведения выделенной ДНК из проб, содержащих геном моногении: проба № 1 – исходная кДНК; проба № 2 – кДНК, разведённая в 10 раз; проба № 3 – кДНК, разведённая в 100 раз; проба № 4 – кДНК, разведённая в 1000 раз; проба № 5 – кДНК, разведённая в 10 000 раз; проба № 6 – отрицательный контроль

при определении специфичности реакции. На конечном этапе эксперимента были получены сходные данные для всех проб; коэффициент вариации между значениями в параллельном анализе составил не более 5%.

На рисунке 1  $C_t$  (величина порогового цикла) – цикл начала увеличения флуоресценции, на котором сигнал уже достоверно отличим от приборного шума, но при этом ещё наблюдается экспоненциальный рост сигнала. Данная величина прямо пропорциональна логарифму исходной концентрации ДНК-мишени. Иными словами, чем больше концентрация ДНК моногении в исследуемом материале, тем раньше становится очевидным, что исследуемая проба положительна. В нашем случае для пробы № 1 величина  $C_t$  равна 5,80. Чем ниже это значение, тем выше содержание в пробе вирусной нуклеиновой кислоты, а в нашем случае – генома моногении. Полимеразная цепная реакция – это качественная реакция, но существует чёткая корреляция между концентрацией искомой ДНК в образце и накоплением флуоресцентного сигнала. Величина  $C_t$  для пробы № 4 составила – 33,15. Это значит, что в данной пробе флуоресцентный сигнал, достаточный для обнаружения амплификатором, был накоплен только к 33-му циклу реакции. Это показывает прямую зависимость между концентрацией вирусного материала в исследуемом материале и чувствительностью реакции. Как видно по рисунку 1, в пробах № 1, 2 и 3 – уверенный флуоресцентный сигнал, свидетельствующий об обнаружении в пробе генома моногении. В пробе № 4 флуоресценция слабая, но достаточная для того, чтобы прибор детектировал его. В пробе № 5 (ДНК, разведённая в 10 000 раз) сигнал уже не детектировался. Вместе с этим, данная пара праймеров и зонда показывает высокую эффективность амплификации фрагмента генома моногении.

**Вывод.** Описанный метод основан на том, что в процессе накопления продукта ПЦР происходит эквивалентное накопление сигнала флуоресценции. Это возможно благодаря присутствию в составе реакции специализированного специфичного флуоресцентного ДНК-зонда, изменяющего свою способность к флуоресценции при накоплении специфического продукта.

Особенностью данного метода является способность определять исходную концентрацию ДНК-мишени, анализируя кинетику накопления флуоресцентного сигнала в ходе реакции. Во всех вариантах реализации количественной оценки происходит сравнение кинетики накопления сигнала в образце с неизвестным количеством ДНК-мишени с кинетикой накопления сигнала в неких других образцах, обозначаемых как стандартные, количество ДНК-мишени, в которых известно (абсолютный количественный анализ) или принимается за точку отсчёта (относительный количественный анализ).

Таким образом, разработан способ качественного выявления генома моногении полимеразной цепной реакции в реальном времени. Данный метод может быть рекомендован к апробированию в ветеринарных лабораториях.

### Литература

1. Афанасьев В.И. Инфекционные и инвазионные болезни рыб в прудовых хозяйствах Северного Кавказа и способы борьбы с ним // Тезисы докл. Всес. семин. ветврачей-ихтиопатологов. М., 1996. 80 с.
2. Быховский Б.Е. Моногенетические сосальщики, их систематика и филогения. М.-Л.: Изд. АН СССР, 1957-а. 509 с.
3. Воронин Л.К. Вопросы профилактики болезней рыб на внутренних водоёмах РФ. Л.: ГосНИОРХ., 1995. 37 с.
4. Гвоздев Е.В. Моногены рыб Казахстана и Средней Азии. Алма-Ата: Tethys, 2001. 124 с.
5. Дубров А.И. Гидробионты р. Терек и их паразитарный комплекс // Гидробиология. 1998. № 1. С. 53–55.
6. Карабекова Д.У. Влияние интродукции рыб на фауну моногений (Monogenea) озера Иссык-Куль // East European Scientific Journal. 2016. V. 5. 4(8). С. 15–18.
7. Лукьяненко В.И. Гельминты рыб р. Дон. М.: Пищевая промышленность, 2010. 47 с.
8. Макарычев Ф.А. Санитарно-гельминтологическая оценка рыбы в прудах // Рыбное хозяйство. 1997. № 7. С. 67.
9. Мишхожев А.А. Влияние паразитических факторов на хозяйственно-полезные признаки голштинского скота: дис. ... канд. с.-х. наук. Нальчик, 2019.
10. Меркурьева Е.К., Шангин-Боеозовский Г.Н. Генетика с основами биометрии. М.: Колос, 1983. 400 с.
11. Плохинский Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников. М.: Колос, 1969. 256 с.
12. Chaabane A, Neifar L, Gey D, Justine J-L. Species of *Pseudorhabdosynochus* (Monogenea, Diplectanidae) from groupers (*Mycteroperca* spp. Epinephelidae) in the Mediterranean and Eastern Atlantic Ocean, with special reference to the *beverleyburtonae* group and description of two new species. PLOS ONE. 2016b; doi: 10.1371/journal.pone.0159886
13. Justine J-L, Beveridge I, Boxshall GA, Bray RA, Moravec F, Trilles J-P, et al. An annotated list of parasites (Isopoda, Copepoda, Monogenea, Digenea, Cestoda and Nematoda) collected in groupers (*Serranidae*, *Epinephelinae*) in New Caledonia emphasizes parasite biodiversity in coral reef fish. *Folia Parasitol.* 2010; 57: 237–62. doi: 10.14411/fp.2010.032

**Курманова Марина Келлетовна**, кандидат сельскохозяйственных наук  
**Мишхожев Азамат Асланбиевич**, кандидат сельскохозяйственных наук  
 ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный аграрный университет имени В.М. Кокова»  
 Россия, 360030, Кабардино-Балкарская Республика, г. Нальчик, пр. Ленина, 1в  
 E-mail: ksmk1984@mail.ru; azamat151@yandex.ru

## Detection of Monogenea parasite by real-time polymerase chain reaction

**Kurmanova Marina Kelletozna**, Candidate of Agriculture  
**Mishkhozhev Azamat Aslanbievich**, Candidate of Agriculture  
Kabardino-Balkarian State Agrarian University named after V.M. Kokova  
1v, Lenin Ave., Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, 360030, Russia  
E-mail: ksmk1984@mail.ru; azamat151@yandex.ru

Monogeneans (monogenetic flukes) are a widespread group of flatworm parasites that infect the skin, gills and fins of fish and aquatic invertebrates. Some can cause ulceration of the surface of the body, cloaca, ureters and even blood vessels. Polymerase chain reaction (PCR) is a method of molecular diagnostics that has become the «gold standard» for many infections. It has been time-tested and thoroughly tested clinically. The high sensitivity and specificity of the method make it possible to detect individual pathogens in biological material based on their genetic information. The analytical sensitivity of PCR for most viruses and bacteria is 1000 micro-organisms per 1 ml of sample. PCR specificity for viral, chlamydia, Mycoplasma and most other bacterial infections reaches 100%. PCR in laboratory diagnostics of infections is characterized by speed, unsurpassed sensitivity and high specificity. A high-quality PCR with hybridization-fluorescent accounting of the results has been developed to identify the genome of the cyprinid parasite, which is possible for use by the domestic veterinary service. The optimal regimes for setting up a reaction and concentration of chemical reagents for setting up a reaction have been selected.

**Key words:** PCR, DNA, parasites, fish, chain reaction, diagnostics