

УДК 619:616.993.192.66:636.7

© 2013

*Грубіч П. Ю., кандидат ветеринарних наук,
Курман А. Ф., кандидат біологічних наук,
Лепета Л. В., науковий співробітник,
Пархоменко Є. А., молодший науковий співробітник*
Інститут свинарства і АПВ НААН України

РОЗРОБКА ПЛР ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИДОВОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗБУДНИКІВ БАБЕЗІОЗУ ТВАРИН

Рецензент – кандидат ветеринарних наук І. М. Ксьонз

Розроблена система олігонуклеотидних праймерів, що дозволяє ампліфікувати в ПЛР ділянки гену 18S рРНК 6 видів роду Babesia. Наведено особливості конструювання праймерів та випробування мультиплексної ПЛР тест-системи для ідентифікації представників роду Babesia. Визначені довжини ампліфікованих фрагментів – від 299 до 258 пар нуклеотидів для Babesia canis, Babesia divergens, Babesia caballi, Babesia major, Babesia bovis. Досліджено 342 зразки крові від різних видів тварин і встановлено 100 % збіг із результатами мікроскопічних досліджень.

Ключові слова: бабезіоз, діагностика, тест-система, ідентифікація, праймери, нуклеотиди.

Постановка проблеми. Бабезіоз в Україні є поширеною серед домашніх тварин сезонною хворобою і займає за кількістю випадків і тяжкістю перебігу одне з провідних місць серед інвазійних захворювань.

Відомо, що у кожного виду тварин бабезіоз викликає певний вид збудника, проте тривалий час видова ідентифікація здійснювалася виключно за морфологічними ознаками збудника, які варіювали в досить широких межах. Однак, остаточно не з'ясовано: чи може викликати захворювання в одного виду тварин збудник іншого виду.

Наразі є недостатньо вивченими належність до роду *Babesia* окремих видів збудника, видові властивості збудників та патогенез захворювання, зокрема, механізми, що пригнічують розвиток збудника в організмі.

Відсутні ефективні засоби специфічної профілактики бабезіозу, а хіміотерапія є надзвичайно токсичною, з вираженою побічною дією.

Аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. Використання молекулярно-генетичних методів дало змогу внести певну ясність у класифікацію родини *Piroplasmida* ссавців та розділити їх на 4

первинні групи, зокрема: родів *Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* та *Babesia microti* [1]. У світовій практиці використовуються засоби ідентифікації бабезій, що розроблені на основі молекулярно-генетичних методів. Однак вони дають змогу визначати лише окремі види бабезій [2–4]. В Україні таких засобів розроблено не було.

Метою нашої роботи була розробка системи ідентифікації бабезій на основі молекулярно-генетичних особливостей та конструювання діагностичної ПЛР тест-системи.

Основним завданням є розробка системи олігонуклеотидних праймерів для виготовлення ПЛР тест-системи з видового типування бабезій та молекулярної діагностики бабезіозу тварин.

Методика досліджень. За допомогою програми MEGA [5] визначали консервативні та варіабельні, в межах роду *Babesia*, ділянки гену 18S рРНК. Консервативні послідовності були використані для розробки ПЛР-тест системи, що дозволяла ампліфікувати послідовності ділянок гену 18S рРНК 6 видів роду *Babesia*: *Babesia canis*, *Babesia divergens*, *Babesia caballi*, *Babesia major*, *Babesia bovis*. Варіабельні ділянки гену 18S рРНК були використані для розробки видоспецифічної системи олігонуклеотидних праймерів, яка давала змогу ідентифікувати три види роду *Babesia*, а саме: *Babesia canis*, *Babesia divergens* та *Babesia bovis*.

Структуру олігонуклеотидних праймерів визначали з використанням програми FastPCR [6]. Параметри для розробки праймерів були наступні: довжина від 18 до 24 нуклеотидів, температура відпаду від 58 °С до 63 °С. У результаті була розроблена система олігонуклеотидних праймерів (*Babesia* sp.): прямиї BSPF та зворотні BSPR, що теоретично дозволяли б ампліфікувати в ПЛР ділянки гену 18S рРНК 6 видів роду *Babesia*: *Babesia canis*, *Babesia divergens*, *Babesia caballi*, *Babesia major*, *Babesia bovis*. Нуклеотидні послідовності праймерів наведено в таблиці 1.

3. Пери праймерів та довжини продуктів ПЛР, що дозволяють видоідентифікувати три види роду Babesia

№ з/п	Пара праймерів	Вид	Довжина продукту ампліфікації (п. н.)	Примітки
1	BCANF/BSPR	Babesia canis	325	Видо-специфічні
2	BSPF/BBOVR	Babesia divergens	146	Видо-специфічні
3	BSPF/BDIVR	Babesia bovis	233	Видо-специфічні

4. Кількість досліджених методом ПЛР зразків за видами тварин

Вид тварини	Кількість досліджених зразків	Кількість позитивних зразків	Співпадання з результатами мікроскопії, %
Собака	168	112	100
Кінь	92	58	100
Велика рогата худоба	67	41	100
Дрібна рогата худоба	8	1	100
Людина	7	0	100
Усього	342	212	

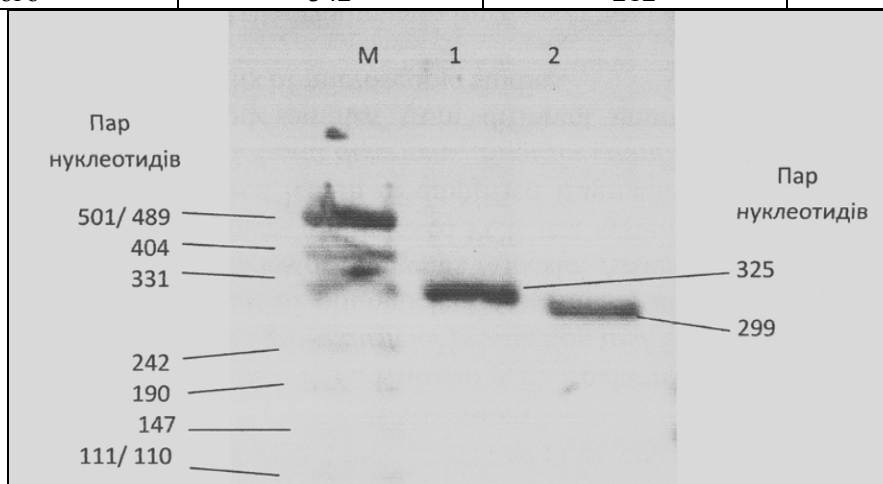


Рис. Електрофоретичне розділення у 2 % агарозному гелі продуктів ампліфікації:
 М – маркер молекулярної маси *rUC19/MspI*, 1 – продукт ПЛР специфічної ділянки гену 18S рРНК *Babesia canis*, 2 – продукт ПЛР консервативної ділянки гену 18S рРНК представників роду *Babesia*.

Із метою діагностики максимально значної кількості представників видів роду *Babesia* була використана пара праймерів BSPF/BSPR. Нуклеотидна послідовність згаданих олігонуклеотидних праймерів наведена у таблиці 1. Ця система праймерів дозволяє ампліфікувати в ПЛР ділянки певного розміру гену 18S рРНК представників шести видів роду *Babesia* (*Babesia* sp.) (табл. 2).

Пари праймерів та довжини продуктів ПЛР, що дозволяють видо-ідентифікувати види *Babesia canis*, *Babesia divergens* та *Babesia bovis*, наведені у таблиці 3.

Перевірка роботи на клінічному біоматеріалі діагностичних ПЛР-тест систем показала високу специфічність ампліфікації консервативної ділянки гену 18S рРНК представників роду *Babesia* та специфічної ділянки гену 18S рРНК виду

Babesia canis. Розділ продуктів ампліфікації показано на рисунку.

Випробування мультиплексної ПЛР тест-системи проводили у лабораторних умовах у процесі дослідження зразків крові тварин, у тому числі діагноз на бабезіоз, яким був встановлений із використанням методу мікроскопії. Загалом досліджено 342 зразки крові. Дані щодо видової належності біологічних зразків наведена у таблиці 4.

Як видно із даних таблиці 4, генетичний матеріал бабезій був виявлений у 100 % зразків крові, де бабезіоз діагностовано шляхом мікроскопії.

Висновки: 1. Таким чином, нами розроблена, сконструйована та випробувана мультиплексна ПЛР тест-система для видової ідентифікації трьох видів роду *Babesia*.

2. Розміри ампліфікованих фрагментів ділянки гену 18S рРНК, одержані у ході експериментальної перевірки ПЛР тест-системи, співпали з розмірами, що теоретично прогнозувалися.

3. Використання олігонуклеотидних праймерів BSPF, BSPR для ампліфікації консервативної ділянки гену 18S рРНК теоретично дозволяють проводити загальну ідентифікацію представників роду *Babesia*. Крім того, за розмірами фраг-

ментів ПЛР здійснюється попередня ідентифікація 299 п. н. (*Babesia canis*, *Babesia divergens*), 285 п. н. (*Babesia caballi*, *Babesia major*), 268 п. н. (*Babesia bovis*).

4. Мультиплексну ПЛР тест-систему для видової ідентифікації представників роду *Babesia* доцільно надалі використовувати як у наукових дослідженнях, так і для проведення діагностики бабезіозу тварин.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. *Babesia microti*-group parasites compared phylogenetically by complete sequencing of the CCTeta gene in 36 isolates / [R. Nakajima, M. Tsuji, K. Oda, A. Zamoto-Niikura et al] // J. Vet. Med. Sci. – 2009. – V.71(1). – P. 55–68.

2. Specific and Highly Sensitive Primers for PCR Detection of *Babesia bovis* / [Nutchapatarapadungkit, Suporn Nuchadomrong, Nison Sattayasai, Patchima Indrakamhang et al] // ScienceAsia. – 2004. – V 30. – P. 67–73.

3. The use of different diagnostic tools for *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle in Menofia, Egypt / [Mohamed Nayel, Khaled Mohamed El-Dakhly, Mahmoud Aboulaila, Ahmed Elsify et al] // Parasitology Research. – 2012. – V. 111. – P. 1019–1024.

4. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle / [T. Oliveira-Sequeira, M. Oliveira, Jr. J. Araujo, A. Amarante] // Int. J. Parasitol. – 2005. – V. 35. – P. 105–111.

5. *Kumar S.* MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment / S. Kumar, K. Tamura, M. Nei // Briefings In Bioinformatics. – 2004. – Vol. 5, №2. – P. 150–163.

6. «FastPCR» [Електронний ресурс] – Системні вимоги: Microsoft Windows 7/Vista/2003/XP/2000 (32-Bit (x86) or 64-Bit), 2 GB RAM, 1280x800 minimum screen resolution. – Режим доступу: <http://primerdigital.com/fastpcr.html>