

Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького
Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies

doi:10.15421/nvlvet7820

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

<http://nvlvet.com.ua/>

УДК 619:616.993.192.6-076.616-071.577.2.08.636.2.636.7

Індикація та видова диференціація найпростіших роду *Babesia* за методом ПЛР у кліщах, знятих з тварин

Ю.О. Мокрий¹, І.М. Ксьонз¹, П.Ю. Грубіч¹, Р.О. Касала², О.М. Лисак²
nabor_2008@i.ua, igor.ksyonz@ukr.net, gruba@i.ua, olvetlab@gmail.com

¹Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН,
вул. Шведська Могила, 1, м. Полтава, 36013, Україна;

²Клініка ветеринарної медицини «ОлВет»,
вул. Молодіжна, 55, м. Івано-Франківськ, 76000, Україна

У статті наведено результати досліджень щодо індикації та видової диференціації найпростіших роду *Babesia* в організмі кліщів, знятих, з собак та великої рогатої худоби. Діагностичні дослідження здійснювались за допомогою мультиплексної ПЛР-тест системи власної розробки, що дозволяє визначати у будь-яких біологічних зразках наявність ДНК представників 6 видів роду *Babesia*, а саме: *B. canis*, *B. divergens*, *B. caballi*, *B. major*, *B. bigemina*, *B. bovis*, три з яких – видоспецифічно, за розміром бендів на електрофореграмах продуктів ампліфікації. Означена тест-система містить 2 прямих і 3 зворотних праймери, що фланкують фрагменти ДНК гена, який кодує 18S rRNA найпростіших роду *Babesia*.

Дослідженню підлягали кліщі, зняті з 17 собак різних порід і статевовікового статусу та 12 голів великої рогатої худоби. В результаті ДНК бабезій виявлено у 11 зразках, вісім з яких диференційовано як *Babesia canis*, два – як *Babesia bovis* та один – як *Babesia divergens*. Виходячи з отриманих результатів до тварин, в кліщах знятих з яких виявляли бабезій, вироблялась та чи інша стратегія лікувально-профілактичних заходів.

Пропонований у статті підхід дозволяє визначати можливі ризики інвазування бабезіями на самих ранніх стадіях захворювання. Наявність чи відсутність найпростіших роду *Babesia* в організмі кліщів, що живилися кров'ю тварин, дають можливість не проводити досить токсичні для організму лікувальні заходи, або ж провести упереджувальну терапію задовго до появи клінічних ознак бабезіозу. Особливе значення це має для вагітних самиць та особливо чутливих до бабезіозу порід собак. Перспективою подальших досліджень є розроблення ПЛР-тест-систем для індикації і диференціації інших кліщових інфекцій та інвазій.

Ключові слова: *Babesia*, кліщі, собаки, велика рогата худоба, мультиплексна ПЛР-тест-система, індикація, диференціація.

Индикация и видовая дифференциация простейших рода *Babesia* методом ПЦР у клещей, снятых с животных

Ю.А. Мокрый¹, И.Н. Ксёنز¹, П.Ю. Грубич¹, Р.О. Касала², О.Н. Лысак²
nabor_2008@i.ua, igor.ksyonz@ukr.net, gruba@i.ua, olvetlab@gmail.com

¹Институт свиноводства и агропромышленного производства НААН,
ул. Шведская Могила, 1, г. Полтава, 36013, Украина;

²Клиника ветеринарной медицины «ОлВет»,
ул. Молодежная, 55, г. Ивано-Франковск, 76000, Украина

В статье изложены результаты исследований по индикации и видовой дифференциации простейших рода *Babesia* в организме клещей, снятых с собак и крупного рогатого скота. Диагностические исследования осуществлялись с помощью

Citation:

Mokryi, Yu.O., Ksyonz, I.M., Grubich, P.Yu., Kasala, P.O., Lysak, O.M. (2017). Indication and species differentiation of the *Babesia* genus protozoa by means of the pcr method in ticks taken off animals. *Scientific Messenger LNUVMB*, 19(78), 99–103.

мультиплексной ПЦР-тест системы собственной разработки, позволяющей определять в любых биологических образцах наличие ДНК представителей 6 видов рода *Babesia*, а именно: *B. canis*, *B. divergens*, *B. caballi*, *B. major*, *B. bigemina*, *B. bovis*, три из которых – видоспецифически, по размеру бэндов на электрофореграммах продуктов амплификации. Данная тест-система содержит 2 прямых и 3 обратных праймера, фланкирующих фрагменты ДНК гена, кодирующего 18S rRNA простейших рода *Babesia*.

Исследованию подлежали клещи, снятые с 17 собак различных пород и половозрастного статуса и 12 голов крупного рогатого скота. В результате ДНК бабезий обнаружено в 11 образцах, восемь из которых дифференцировано как *Babesia canis*, два – как *Babesia bovis* и один – как *Babesia divergens*. Исходя из полученных результатов к животным, в клещах снятых из которых обнаруживали бабезий, применялась та или иная стратегия лечебно-профилактических мероприятий.

Предлагаемый в статье подход позволяет определять возможные риски инвазирования бабезиями на самых ранних стадиях заболевания. Наличие или отсутствие простейших рода *Babesia* в организме клещей, питающихся кровью животных, дают возможность не проводить достаточно токсичные для организма лечебные мероприятия или же провести упреждающую терапию задолго до появления клинических признаков бабезиоза. Особое значение это имеет для беременных самок и особенно чувствительных к бабезиозу пород собак. Перспективой дальнейших исследований является разработка ПЦР-тест-систем для индикации и дифференциации других клещевых инфекций и инвазий.

Ключевые слова: *Babesia*, клещи, собаки, крупный рогатый скот, мультиплексная ПЦР-тест-система, индикация, дифференциация.

Indication and species differentiation of the *Babesia* genus protozoa by means of the pcr method in ticks taken off animals

Yu.O. Mokryi¹, I.M. Ksyonz¹, P.Yu. Grubich¹, P.O. Kasala², O.M. Lysak²
nabor_2008@i.ua, igor.ksyonz@ukr.net, gruba@i.ua, olvetlab@gmail.com

¹Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production NAAS,
Shvedska Mohyla Str., 1, Poltava, 36013, Ukraine;

²Veterinary Medicine Clinic «OlVet»,
Molodizhna Str., 55, Ivano-Frankivsk, 76000, Ukraine

The article presents the study results on the indication and species differentiation of the *Babesia* genus protozoa in the organism of ticks taken off dogs and cattle. Diagnostic tests were performed using a multiplex PCR test system, being a self-engineering product, which allows to determine the DNA presence of 6 *Babesia* genus species in any biological samples, namely: *B. canis*, *B. divergens*, *B. caballi*, *B. major*, *B. bigemina*, *B. bovis*, three of them being species-specific, by the bands' size at the amplification products' electrophoregrams. The above test system contains 2 direct and 3 reverse primers flanking the DNA fragments of the gene encoding the 18S rRNA of the *Babesia* genus protozoa.

The subject of the study were ticks obtained from 17 dogs of different breeds and sex-age status and 12 units of livestock (cattle). As a result, the babesial DNA was detected in 11 samples, eight of which were differentiated as *Babesia canis*, two as *Babesia bovis* and one as *Babesia divergens*. Based on the results obtained, the animals, whose ticks, taken off them, had babesia detected, one or another strategy was developed for treatment and prophylaxis measures.

The approach suggested in the present article permits identifying the possible risks of babesia invasion at the earliest stages of the disease. Presence or absence of the *Babesia* genus protozoa in the body of sanguivorous ticks permits avoiding treatments rather toxic for the organism, or to carry out preventive therapy long before the babesiosis clinical symptoms' manifestation. It is vitally important for pregnant females and especially sensitive to babesiosis dog breeds.

The prospect of further research is development of the PCR test systems for indicating and differentiating other tick-borne infections and invasions.

Key words: *Babesia*, ticks, dogs, cattle, multiplex PCR test system, indication, differentiation.

Вступ

Бабезіоз є групою сезонних трансмісивних захворювань ссавців різних видів, що викликається найпростішими роду *Babesia* (Staykov, 2007). Ці збудники є одними з найбільш поширених гемоспоридій ссавців (Boustani and Gelfand, 1996). У ветеринарній практиці бабезіоз тварин діагностуються переважно за етіологічними чинниками (сезон, знаходження на тварині кліща-переносника тощо), клінічними проявами та мікроскопією мазків, приготованих із периферійної крові на предмет виявлення бабезій у еритроцитах (CLSI, 2000). Проте ці методи мають достатню достовірність лише у випадках значного розвитку типових клінічних проявів захворювання – на ранніх стадіях або за атипового перебігу інвазії вони є малоефективними. З врахуванням же важких наслідків при вже

розвиненому патологічному процесі та досить високої токсичності хіміотерапевтичних препаратів проблема ранньої, високочутливої та специфічної діагностики є актуальною. Наразі до таких методів слід віднести молекулярно-генетичні, зокрема полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) (Morozov, 2010).

У зв'язку з цим нами була поставлена мета апробувати можливість виявлення найпростіших роду *Babesia* в організмі, знятих з тварин кліщів за допомогою мультиплексної ПЛР-тест-системи власної розробки.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводились в умовах лабораторії генетики Інституту свинарства та агропромислового виробництва НААН та ПЛР-лабораторії клініки вете-

ринарної медицини «ОлВет» м. Івано-Франківська.

Матеріалом для досліджень слугували зразки ДНК, виділені із 21 кліща, знятого із 17 собак та 8 кліщів – з 8 голів великої рогатої худоби. Для цього кліщів, що жились кров'ю однієї тварини, розтирали у фарфоровій ступці з додаванням стерильного фізіологічного розчину NaCl з подальшим освітленням отриманої суспензії на центрифугі при 3000 об/хв впродовж 30 с. Супернатант суспензії використовували для виділення ДНК за допомогою комерційно доступного комплексу реагентів «ПРОБА-РАПИД» виробництва ООО «НПО ДНК Технолоґія» (Росія). Ступки й товчачики після закінчення роботи ретельно відмивали й обробляли препаратом «Chelex-100».

Індикацію та диференціацію babesій здійснювали за допомогою мультиплексної ПЛР-тест-системи власної розробки (Mokryi et al., 2017). Означена ПЛР-тест-система містить синтезовані на наше замовлення у фірмі «Thermo Electron Corporation» (Germany) два прямих (BCANF: 5'- GTGACC-CAAACCCTCACCAGA -3'; BSPF: 5'- CCATTGGAGGGCAAGTCTGGT -3') і три зворотних (BDIVR: 5'- TCCCAAAGCGAAGTGCAATCTCG -3'; BBOVR: 5'- CCAAAGTCAACCAACGGTACGACA -3'; BSPR: 5'- ACGAATGCCCCCAACCGTT -3') олігонуклеотидних праймери, що фланкують фрагменти гена 18S рРНК найпростіших роду *Babesia*, а також реагенти для ПЛР виробництва фірми «Fermentas UAB» (Lithuania).

Параметри реакційної суміші становили: 2,5 мкл 10-кратного буферу (670 мМ Tris-HCl, pH 8,8 за температури 25 °C, 20 мМ БСА, 166 мМ амонію сірчанокислого (NH₄)₂SO₄, 100 мМ 2-β-меркаптоетанол) («Fermentas UAB», Lithuania), 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP («Fermentas UAB», Lithuania), 2 мкл 50 мМ MgCl₂ («Fermentas UAB», Lithuania), 2–3 од. Taq-полімерази (*Thermus aquaticus*) («Fermentas UAB», Lithuania), 0,5 мкл (0,1 опт. один.) кожного з п'яти праймерів та зразок досліджуваної ДНК – до кінцевої концентрації в суміші. 1 мкг/см³, деіонізованої води до об'єму 25 мкл. На ампліфікаційну суміш на шарувували 25 мкл мінеральної олії. Параметри ампліфікації становили: перший цикл – 93 °C впродовж 60 с, наступні 35 циклів – 93 °C, 60 °C та 72 °C по 30 с кожний та останній 37 цикл – 72 °C впродовж 60 с.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в поліпропіленових мікроцентрифужних пробірках об'ємом 0,6 см³ на термоциклері «Biometa TRIO-Thermoblock» (Germany) в 25 мкл ПЛР-суміші.

Фракціювання продуктів ампліфікації здійснювали методом горизонтального електрофорезу у 2,0% агарозному гелі в електрофоретичній камері «Cleaver Scientific Ltd.» (UK) із візуальною оцінкою на УФ-транслюмінаторі виробництва НВО «Прогрес» (Україна), після фарбування бромистим етидієм.

Продуктами ПЛР виступають фрагменти гена 18S рРНК представників роду *Babesia*, що мають розміри від 268 до 298 пар нуклеотидів, консервативний для babesій шести видів (*B. canis*, *B. caballi*, *B. divergens*, *B. major*, *B. bigemina* та *B. bovis*), які є патогенними для собак, коней, худоби та людей, а також фрагменти

розмірами 325, 233 та 146 пар нуклеотидів, специфічні для трьох видів babesій (*B. canis*, *B. bovis*, *B. divergens*) (Mokryi et al., 2017).

Як позитивні контролю використовували зразок ДНК *B. Canis*, виділений із периферійної крові собаки та зразок ДНК *B. Bovis*, виділений із периферійної крові телиці, що хворіли на babesіоз. Негативним контролем виступала стерильна деіонізована вода. Як маркер розміру ДНК використовували *pUC19/MspI* («Fermentas UAB», Lithuania).

Результати та їх обговорення

Мультиплексна ПЛР-тест-система створювалась не стільки як альтернативний мікроскопічному методу діагностики babesійних інвазій, а як метод, що дозволяє не лише виявляти ДНК babesій у будь-якому біологічному матеріалі, а й проводити їх видову диференціацію. В процесі ж практичного застосування означеної діагностики визначилась ще одна його суттєва перевага, а саме можливість індикації ДНК babesій в кліщах, що практично неможливо у будь-який інший доступний спосіб лабораторної діагностики. Перевага полягає в тому, що наявність чи відсутність найпростіших роду *Babesia* в організмі кліща дозволяє оцінити ризики зараження ними тварин на доклінічній стадії. Від результатів досліджень існує пряма залежність щодо вироблення стратегії лікування.

Дослідженню підлягав 21 кліщ, знятий із 17 собак. При цьому по одному кліщу було знято з 14 собак, по 2 кліщі з трьох і 3 кліщі з двох тварин, зокрема: кліщ знятий з пса породи німецька вівчарка (м. Полтава) (1); кліщ знятий з цуценяти породи лабрадор (м. Полтава) (2); кліщі (два), зняті з вагітної суки породи російський спанієль (м. Полтава) (3); кліщ, знятий з пса породи середньоазійська вівчарка (м. Полтава) (4); кліщ, знятий з суки породи німецька вівчарка (м. Полтава) (5); кліщі (два), зняті з пса породи ротвейлер (м. Полтава) (6); кліщ, знятий з суки породи хаскі (м. Івано-Франківськ) (7); кліщі (три), зняті з пса породи ірландський сеттер (м. Івано-Франківськ) (8); кліщ, знятий з пса породи аляскінський маламут (м. Івано-Франківськ) (9); кліщ, знятий з вагітної суки породи англійський кокер-спанієль (м. Івано-Франківськ) (10); кліщ, знятий з пса породи кавказька вівчарка (м. Івано-Франківськ) (11); кліщ знятий, з пса породи лабрадор (м. Івано-Франківськ) (12); кліщ, знятий з суки породи стафордширський тер'єр (м. Івано-Франківськ) (13); кліщ, знятий з цуценяти породи німецька вівчарка (м. Івано-Франківськ) (14); кліщі (два), зняті з вагітної суки породи кавказька вівчарка (м. Івано-Франківськ) (15); кліщі (три), зняті з пса породи чау-чау (м. Івано-Франківськ) (16); кліщ, знятий з суки породи хаскі (м. Івано-Франківськ) (17). Усі кліщі були ідентифіковані як представники роду *Dermacentor*. Кліщі, зняті з кожної собаки, розтирали в окремій хімічно чистій фарфоровій ступці зі стерильним фізіологічним розчином. З отриманої суспензії виділяли ДНК і проводили ПЛР з детекцією продуктів ампліфікації в агарозному гелі (рис. 1).



Рис. 1. Електрофореграма ПЛР-продуктів 17 зразків біологічного матеріалу від кліщів, знятих з собак, досліджених за допомогою мультиплексної ПЛР-тест-системи для індикації та видової диференціації найпростіших роду *Babesia*. Доріжки: 1, 3, 6, 9–10, 12, 15 – смуги розміром 325 п.н. (*B. canis*) та 298 п.н. (рід *Babesia*); 2, 4–5, 7–8, 11, 13–14, 16–17 – негативний результат; «+» – позитивний контроль; «-» – негативний контроль; М – маркер розміру ДНК *pUC19/MspI* («Fermentas UAB», Lithuania).

Дослідженню також підлягало 12 кліщів, знятих із 12 голів великої рогатої худоби, зокрема: кліщ, знятий з корови ДП «ДГ ім. 9 січня» Хорольського р-ну Полтавської обл. (1); кліщі зняті з телиці (2) та корови (3) приватних власників с. Лючки Косівського р-ну Івано-Франківської обл.; кліщі, зняті з корів приватних власників с. Коростовичі Галицького р-ну Івано-Франківської обл. (4, 5); кліщ, знятий з корови приватного власника с. Медуха Галицького р-ну Івано-Франківської обл. (6); кліщ, знятий з корови приватного власника с. Гринівці Тлумацького р-ну Івано-Франківської обл. (7); кліщ, знятий з теляти приватного власника с. Колінці Тлумацького р-ну Івано-

Франківської обл. (8); кліщі, зняті з корів приватного власника с. Тучапи Снятинського р-ну Івано-Франківської обл. (9, 10); кліщі, зняті з теляти (11) та корови (12) приватних власників с. Кодобна Калуського р-ну Івано-Франківської обл. Кліщі, зняті з великої рогатої худоби, також були ідентифіковані як представники роду *Dermacentor*.

Кліщі, зняті з кожної тварини, як і зняті з собак, розтирали в ступці зі стерильним фізіологічним розчином. З отриманої суспензії виділяли ДНК і проводили ПЛР з детекцією продуктів ампліфікації в агарозному гелі (рис. 2).

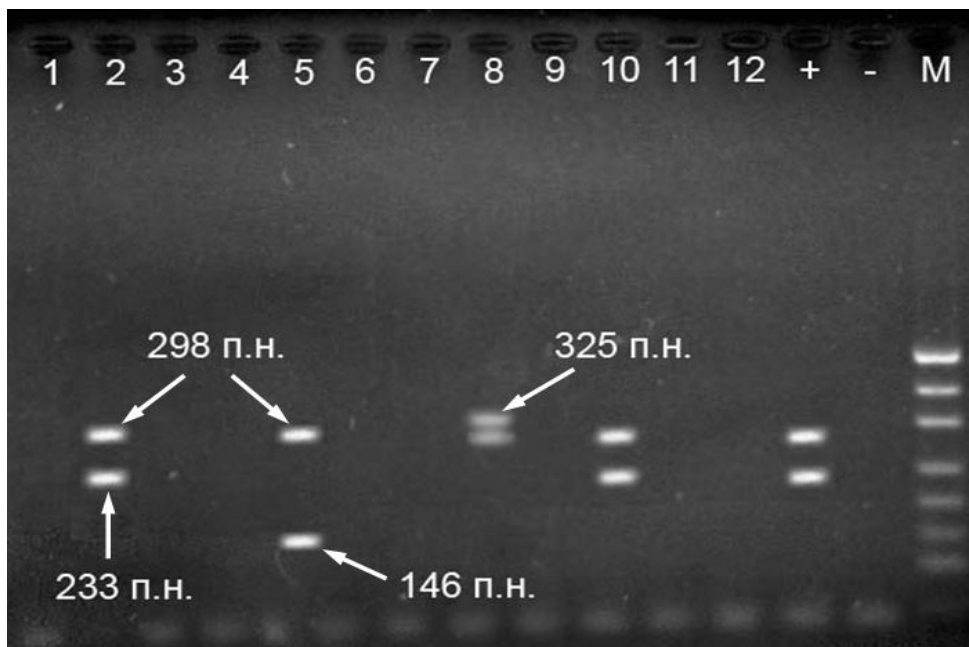


Рис. 2. Електрофореграма ПЛР-продуктів 12 зразків біологічного матеріалу від кліщів, знятих з великої рогатої худоби, досліджених за допомогою мультиплексної ПЛР-тест-системи для індикації та видової диференціації найпростіших роду *Babesia*. Доріжки: 2, 5, 8, 10 – смуги розміром 298 п.н. (рід *Babesia*); 2, 10 – смуги розміром 233 п.н. (*B. bovis*); 5 – смуга розміром 146 п.н. (*B. divergens*); 8 – смуга розміром 325 п.н. (*B. canis*); 1, 3–4, 6–7, 9, 11–12 – негативний результат; «+» – позитивний контроль (смуги розміром 298 п.н. (рід *Babesia*) та 233 п.н. (*B. bovis*)); «-» – негативний контроль; М – маркер розміру ДНК *pUC19/MspI* («Fermentas UAB», Lithuania).

Дослідження проводились у кожному випадку безпосередньо після зняття кліщів з тварин, а потім було продубльовано усі 17 зразків кліщів, знятих з собак, та 12 – знятих з худоби, у трьох повторах. Результати були аналогічними.

Як видно з електрофореграм, результати досліджень 29 вищезазначених біологічних зразків при застосуванні мультиплексної ПЛР-тест-систем демонструють її адекватність.

Результати досліджень кліщів, знятих з собак, було використано для розроблення стратегії лікування у кожному випадку. Десять тварин, у кліщах знятих з яких не було виявлено ДНК бабезій, не підлягали будь-яким лікувальним заходам. Стосовно тварин, у кліщах знятих з яких було виявлено ДНК *Babesia canis*, вироблялась стратегія різна стратегія.

Зокрема за псами порід німецька вівчарка (1), ротвейлер (6) та лабрадор (12), а також вагітних сук порід російський спанієль (3), англійський кокер-спанієль (10) та кавказька вівчарка (м. Івано-Франківськ) (15) проводилось клінічне спостереження з періодичним відбором периферичної крові з вушної вени для виявлення бабезій, метою якого було надання ветеринарної допомоги на ранніх етапах паразитемії. При цьому бабезії в еритроцитах було виявлено на четверту добу в крові пса породи ротвейлер (6) та на шосту добу в крові суки породи російський спанієль (3). У інших собак інвазія була відсутня.

Пса породи маламут (9) було піддано упереджувальній терапії, оскільки собаки цієї породи є надзвичайно чутливими до бабезіозу і лікувальні заходи, зазвичай є ефективними лише на найблизькій ранній стадії захворювання.

Стосовно великої рогатої худоби, у кліщах знятих з яких було виявлено ДНК *Babesia bovis* та *Babesia divergens* (2, 5, 10), то їх власникам було рекомендовано звернутись до місцевих фахівців ветеринарної медицини при виникненні перших ознак бабезіозу. Стосовно ж теляти, у кліщі знятому з якої було виявлено ДНК *Babesia canis*, така рекомендація не надавалась, оскільки цей збудник не є інвазивним для худоби.

Висновки

Розроблена мультиплексна ПЛР-тест-система, до складу якої входять 2 прямі та 3 зворотні олігонуклеотидні праймери, що фланкують різні за розміром

фрагменти ДНК гена, який кодує 18S rRNA найпростіших роду *Babesia*, дає можливість виявляти ДНК та диференціювати видову належність бабезій у будь-якому біологічному матеріалі, зокрема в суспензіях, приготованих з кліщів роду *Dermacentor*, знятих з собак.

Можливість виявлення ДНК найпростіших роду *Babesia* в організмі кліщів, знятих з тварин, дозволяє прийняти рішення щодо необхідності проведення лікувальних заходів до прояву клінічних ознак бабезіозу.

Перспективою подальших досліджень є розроблення ПЛР-тест-систем для індикації і диференціації інших кліщових інфекцій та інвазій (бореліоз, туляремія, рикетсіоз тощо).

Бібліографічні посилання

- Boustani, M.R., Gelfand, J.A. (1996) «Babesiosis». Clinical Infectious Diseases, 22(4), 611–615. doi: 10.1093/clinids/22.4.611.
- CLSI (2000) Laboratory Diagnosis of Blood-borne Parasitic Diseases; Approved Guideline. CLSI document M15-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. ISBN 1562384015.
- Mokryi, Yu.O., Ksyonz, I.M., Pochernyayev, K.F., Kurman, A.F. (2017) «Indication and species differentiation of the babesia protozoan genus by the polymerase chain reaction». Veterinary medicine, biotechnology and biosafety. 3(1), 5–11.
- Morozov, Y.N. (2010) «Perspektivy primeneniya metodov molekulyarnoy parazitologii v monitoringe za sotsial'no-znachimymi parazitozami». Molekulyarnaya diagnostika. sb. tr. VII Vseros. nauchno-prakt. konferentsii s mezhdunar. uchastiyem. 2, 304–307 (in Russian).
- Staykov V.V. (2007). Babezioz. Veterinariya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh. 7, 23–25 (in Russian).

Received 25.09.2017

Received in revised form 10.10.2017

Accepted 16.10.2017