

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЦЕРКАРИЙ ТРЕМАТОД *TRICHOBILHARZIA SP. C* ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (СООБЩЕНИЕ 2)

С.В. Ризевский, Л.Н. Акимова, В.П. Курченко, Н.Н. Кузуб\*

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

*\*НИИ Криминалистики и судебной экспертизы Министерства Юстиции  
Республики Беларусь*

Трематоды в цикле своего развития являются паразитами различных беспозвоночных и позвоночных животных: насекомых, рыб, амфибий, птиц и млекопитающих. Актуальность исследования (идентификации) трематод, паразитирующих в теплокровных животных, связана с тем, что некоторые из них вызывают церкариоз у людей. Морфологическая идентификация фуркоцеркарий может быть подтверждена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Использование специфических и неспецифических праймеров позволяет выявлять наличие церкарий определенных родов, видов и исследовать их внутривидовой полиморфизм.

Основным возбудителем церкариоза в водоемах Республики Беларусь являются церкарии группы *Trichobilharzia ocellata*, принадлежащие семейству *Schistosomatidae*. Видовая систематика этих церкарий неоднозначна и различается у ряда авторов [1, 3]. Под понятием «*Trichobilharzia ocellata*» разные авторы часто описывают различные виды этих трематод, а некоторые исследователи считают *T. ocellata* группой, объединяющей в себе несколько видов [1]. Целью работы являлось разработка методик идентификации церкарий наиболее актуального для изучения рода – *Trichobilharzia* - с использованием ПЦР анализа со специфическими и универсальными праймерами.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Церкарии и спороцисты трематод были получены из зараженных моллюсков *L. stagnalis*, *L. auricularia*, *L. ovata*, *P. corneus* и др., собранных в период май-октябрь 2007 на озере Нарочь и на озере близ деревни Полоневичи Держинского района Минской области. Церкарий выделяли из воды, в которой содержался моллюск, и непосредственно из пораженной печени моллюска. Спороцисты выделяли из печени. Материал помещали в 70% этанол и хранили при -20°C.

#### **Выделение ДНК.**

Для последующего проведения полимеразной цепной реакции из отобранного материала была выделена ДНК. Из пораженной печени моллюска под бинокулярным микроскопом извлекали спороцисты и отдельные церкарии. Их промывали несколько раз в бидистиллированной воде для предотвращения загрязнения проб посторонней ДНК (в частности, ДНК моллюска). Затем спороцисты и церкарии помещали по одной в пробирки для ПЦР, куда вносили 50-200 мкл (в зависимости от предполагаемого количества ДНК в объекте) 5% суспензии Chelex 100 в воде. В смесь добавляли протеиназу К до конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали при 65°C 30 минут. Смесь перемешивали на Vortex каждые 10 минут. После этого смесь термостатировали 8 минут при 99°C, затем центрифугировали на микроцентрифуге Eppendorf 3 минуты при 12500 об/мин. Водную фазу переносили в новые пробирки и хранили выделенную ДНК при -20°C. ДНК церкарий из воды, в которой содержался моллюск, выделяли по такой же методике и по методике, описанной нами ранее [2].

#### **ПЦР со специфическими праймерами.**

Данный метод ПЦР основан на том, что, используя специфические праймеры, сконструированных из известных последовательностей, можно избирательно (специфично) амплифицировать только ДНК тех организмов, в геноме которых присутствуют такие последовательности. ДНК из других объектов, не содержащая специфичной последовательности, амплифицироваться не будет. Это позволяет идентифицировать одни организмы среди других.

В ходе нашей работы мы использовали специфичные для рода *Trichobilharzia* праймеры T1323-1 (5'-GTGACTTGCTACAGGTTGG-3'), T1323-2 (5'-GACGACAATAGTTGGGGT-3') и T1323-R (5'-GGCAAGCTCGTATACCATTC-3'), описанные в литературе [3].

ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Смесь содержала (указаны конечные концентрации в смеси): 180 мкМ dNTP, 500 мкМ каждого праймера, 3,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1x Taq Buffer (10мМ Tris-HCl, 50мМ KCl, 0.8% Nonidet P40), 1 ед. Taq-polimerase, 5 мкл р-ра ДНК. ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (Россия) в режиме: 95°C 4 мин, 36 циклов (95°C 1 мин, 55°C 1 мин, 72°C 1 мин), 72°C 10 мин. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-фосфатном буфере. Визуализацию результатов проводили на гель-сканере VDS-CL (Amersham Biosciences).

#### **ПЦР с ITS-праймерами.**

Применение ПЦР с ITS-праймерами основано на том, что участки генома, содержащие фрагменты, кодирующие рибосомальные РНК, имеют в своем составе как консервативные (собственно, участки, кодирующие рРНК), так и переменные спейсерные последовательности (рис 1). Консервативные участки позволяют подобрать праймеры для амплификации всей ITS-области и отдельных ее частей. Благодаря переменным участкам, получаемые в результате ПЦР продукты у различных организмов могут различаться по величине и иметь различные последовательности. Это позволяет изучать полиморфизм внутри родственных групп и судить об их филогенетическом родстве.

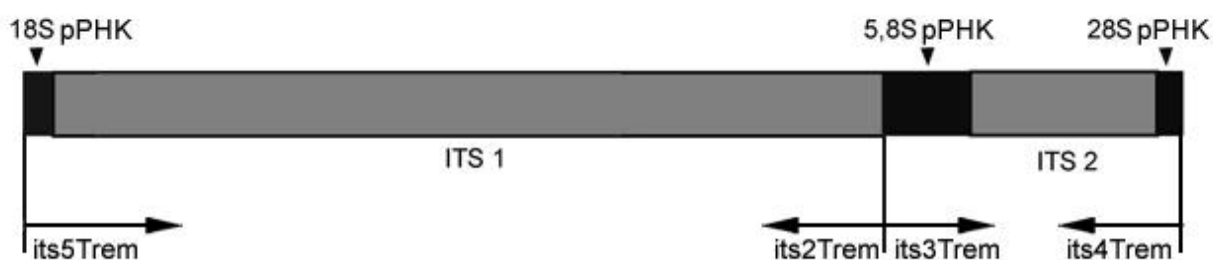


Рис. 1. Схема ITS-области трематод. Черным цветом показаны участки, кодирующие рРНК. Серым - переменные последовательности. Стрелками показаны места и направления отжига праймеров.

Нами была проведена амплификация ДНК *Trichobilharzia* с тремя парами ITS-праймеров – its5Trem и its4Trem; its5Trem и its2Trem; its3Trem и its4Trem, известными из литературы [4] и имеющими следующие нуклеотидные последовательности: its5Trem (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), its4Trem (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), its3Trem (5'- GCGTCGATGAAGAGTGCAGC-3'), its2Trem (5'- GCTGCACTCTTCATCGACGC-3'). Применяя данные праймеры в различных комбинациях, мы амплифицировали как полный ITS-участок, так и его части в отдельности.

ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Смесь содержала (указаны конечные концентрации в смеси): 180 мкМ dNTP, 500 мкМ каждого праймера, 3,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1x Taq Buffer (10мМ Tris-HCl, 50мМ KCl, 0.8% Nonidet P40), 1 ед. Taq-polimerase, 5 мкл р-ра ДНК. ПЦР проводили в режиме: 95°C 5 мин, 35 циклов (95°C 1 мин, 50°C 45 сек, 72°C 2 мин), 72°C

10 мин. Получаемые в результате продукты разделяли методом электрофореза в 2% агарозном геле.

#### **ПЦР с RAPD-праймерами.**

RAPD-ПЦР использует в качестве праймеров короткие декамерные олигонуклеотиды, отжигающиеся на множественных сайтах ДНК. ДНК различных организмов имеет такие сайты, а так как число таких сайтов и расстояние между ними может различаться, то и продукты, получаемые в результате амплификации ДНК различных организмов, также будут различны. Использование метода RAPD-анализа позволяет сравнивать получаемые ПЦР-паттерны различных видов организмов и внутривидовых форм, а, следовательно, и сами виды и формы; позволяет изучать полиморфизм родственных групп организмов.

Для исследования церкарий двух *Trichobilharzia*, полученных из моллюсков из различных водоемов нами был применен RAPD-ПЦР с праймерами OpB-01 (5'-GTTTCGCTCC-3'), OpE-06 (5'-AAGACCCCTC-3'), OpF-05 (5'-CCGAATCCCC-3'). ПЦР проводили в смеси, объемом 20 мкл. Смесь содержала (указаны конечные концентрации в смеси): 180 мкМ dNTP, 750 мкМ праймера, 3,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1x Taq Buffer (10мМ Tris-HCl, 50мМ KCl, 0.8% Nonidet P40), 1 ед. Taq-polimerase, 2 мкл р-ра ДНК. ПЦР проводили в режиме: 94°C 4 мин, 40 циклов (94°C 1 мин, 38°C 1 мин, 72°C 2 мин). Получаемые в результате продукты разделяли методом электрофореза в 2% агарозном геле.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.**

**Идентификация фуркоцеркарий рода *Trichobilharzia* семейства *Schistosomatidae* среди представителей семейств *Strigeidae*, *Diplostomatidae*.**

Для подтверждения результатов морфологической идентификации и для доказательства возможности применения метода ПЦР для диагностики церкарий трематод *Trichobilharzia* выделенную ДНК подвергли амплификации со специфическими праймерами. Использовали две пары праймеров T1323-1, T1323-R и T1323-2, T1323-R, являющихся специфическими для рода *Trichobilharzia* [3].

На рисунке 2А представлены результаты амплификации ДНК, выделенной из церкарий *Trichobilharzia* (дорожка 2), церкарий семейств *Strigeidae* (дорожка 3) и *Diplostomatidae* (дорожка 4) с праймерами T1323-1 и T1323-R. В результате ПЦР успешно амплифицировалась только ДНК *Trichobilharzia*. Были получены основные фрагменты с

массами ~200, ~600 пар оснований, что подтверждает принадлежность исследованной ДНК роду *Trichobilharzia* и согласуется с данными литературы [3].

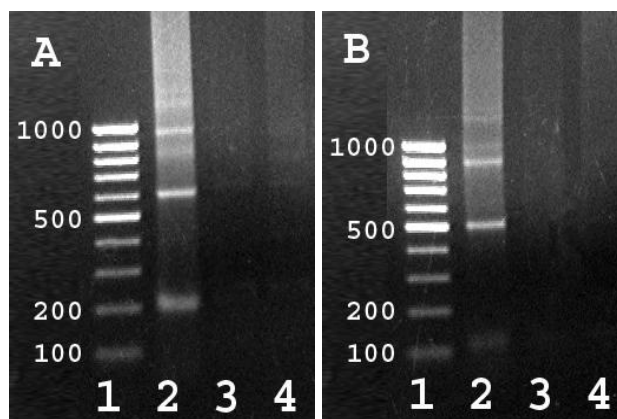


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК со специфическими праймерами T1323-1, T1323-R (А) и T1323-2, T1323-R (В) трематод *Trichobilharzia* (дорожка 2), *Strigeidae* (дорожка 3) и *Diplostomatidae* (дорожка 4). Дорожка 1 - стандарты молекулярных масс ДНК.

Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК с праймерами T1323-2 и T1323-R представлена на рисунке 2В. Образующиеся фрагменты с массами ~100 и ~500 пар оснований также подтверждают родовую принадлежность исследованной *Trichobilharzia*.

Для оценки возможности использования в качестве матрицы ДНК полученной из различных проб (единичных церкарий, единичных спороцист и гепатопанкреаса инфицированных трематодами *Trichobilharzia* моллюсков), проведена амплификация со специфическими праймерами. Анализ результатов амплификации, представленных на рисунке 3, показывает, что ДНК, выделенная из всех исследованных образцов пригодна для проведения ПЦР-анализа. Однако целесообразнее использовать ДНК, выделенную из единичных церкарий, так как в ходе ее амплификации образуется меньше неспецифических фрагментов.

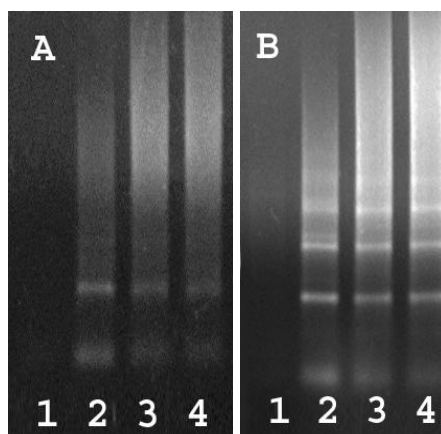


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК *Trichobilharzia*, выделенной из единичных церкарий (дорожка 2), единичных спорозист (дорожка 3) и фрагмента гепатопанкреаса пораженного моллюска (дорожка 4) со специфическими праймерами T1323-1, T1323-R (А) и T1323-2, T1323-R (В). Дорожка 1 – проба без ДНК.

Таким образом, показана возможность применения метода ПЦР со специфическими праймерами для идентификации личинок трематод рода *Trichobilharzia*. Использование праймеров T1323-1, T1323-2 и T1323-R позволяет достоверно выявлять данный род среди представителей других фуркоцеркарий, в частности - семейств *Strigeidae* и *Diplostomatidae*, слабо различающихся морфологически. Примененный в работе метод выделения ДНК и метод ПЦР позволяют идентифицировать даже единичную церкарию *Trichobilharzia*, и могут быть применены для диагностики там, где метод морфологической идентификации практически невозможен.

**Возможности использования ПЦР с ITS-праймерами для оценки видовой принадлежности церкарий рода *Trihobilharzia*.**

Так как амплификация со специфическими праймерами позволила доказать принадлежность исследованных церкарий к роду *Trichobilharzia*, нами была предпринята попытка установить их видовую принадлежность с помощью метода ПЦР с ITS-праймерами.

Мы основывались на том предположении, что разные виды *Trichobilharzia*, имея различные вариабельные последовательности внутри всего ITS-участка, в результате амплификации будут давать продукты различной массы. Нами была проведена

амплификация ДНК *Trichobilharzia* с тремя парами ITS-праймеров – its5Trem, its4Trem; its5Trem, its2Trem; its3Trem, its4Trem. Полученные в результате амплификации фрагменты были разделены методом электрофореза (рис. 4). С помощью программы Fragment Analysis v 1.1a (Molecular Dynamics) рассчитана их масса. В качестве образца сравнения были использованы маркеры молекулярных масс ДНК GeneRuler DNA Ladder 1k bp и 100bp (Fermentas). В результате амплифицировались фрагменты массами 1313 пар оснований (весь ITS-участок), 853 и 507 (отдельные фрагменты ITS-участка). Обе *Trichobilharzia* (из оз. Нарочь и из оз. близ д. Полоневичи) давали одинаковые продукты.

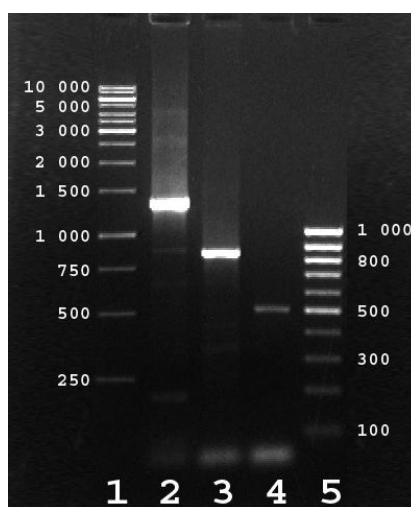


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК *Trichobilharzia* sp. с ITS-праймерами: its5Trem, its4Trem (дорожка 2); its5Trem, its2Trem (дорожка 3); its3Trem, its4Trem (дорожка 4). Дорожки 1 и 5 – стандарты масс ДНК.

Мы также проанализировали сиквенированные последовательности ITS-области различных видов *Trichobilharzia* из данных литературы [1, 4] и GenBank. Учитывая структуру праймеров, теоретически была рассчитана масса фрагментов, которые могли бы быть получены для наиболее распространенных и изученных в Европе видов: *T. szidati*, *T. franki*, *T. regenti*. Данные о массах этих фрагментов и о продуктах, полученных в ходе нашего исследования, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Массы фрагментов ITS-области различных видов *Trichobilharzia*

| В и д<br>трематод<br>ы | its5Trem<br>-its4Tre<br>m | its5Trem<br>-its2Tre<br>m | its3Trem<br>-its4Tre<br>m | №<br>послед-ти<br>в GenBank | Авторы                      |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>T. szidati</i>      | 1330                      | 848                       | 502                       | AF263828                    | Dvorak, J. et al., 2002     |
| <i>T. szidati</i>      | 1329                      | 847                       | 502                       | AY713972                    | Rudolfova, J., et al., 2005 |
| <i>T. szidati</i>      | 1203                      | 721                       | 502                       | AY713967                    | Rudolfova, J., et al., 2005 |
| <i>T. franki</i>       | 1555                      | 1069                      | 506                       | AF356845                    | Dvorak, J. et al., 2002     |
| <i>T. franki</i>       | 1586                      | 1098                      | 508                       | AY713973                    | Rudolfova, J., et al., 2005 |
| <i>T. franki</i>       | 1578                      | 1092                      | 508                       | AY713966                    | Rudolfova, J., et al., 2005 |
| <i>T. regenti</i>      | 1914                      | 1428                      | 506                       | AF263829                    | Dvorak, J. et al., 2002     |
| <i>T. sp.</i>          | 1313                      | 853                       | 507                       | -                           | данная работа               |

Сравнительный анализ (таблица 1) показал, что исследованная нами *Trichobilharzia* принадлежит к виду *T. szidati* (Neuhaus, 1952), исследованному Dvorak, J. et al., 2002 и Rudolfova, J., et al., 2005. Такой вывод стал возможен благодаря большому сходству продуктов, полученных нами в результате амплификации, и продуктов, рассчитанных исходя из сиквенированных последовательностей ITS-участка *T. szidati* №№ AF263828, AY71397. Кроме того, полученные нами фрагменты существенно отличаются от фрагментов, которые могли бы быть получены при амплификации ДНК *T. franki* и *T. regenti*, что также подтверждает наше предположение о принадлежности исследованной нами трематоды к виду *T. szidati*.

#### Использования RAPD-анализа для изучения внутривидового полиморфизма церкарий *Trichobilharzia*.

В результате проведенного RAPD-анализа ДНК, выделенной из церкарий *Trichobilharzia* различных водоемов (из озера близ д. Полоневичи Держинского района и из озера Нарочь) были выявлены некоторые сходства и различия этих двух организмов.

ПЦР с праймерами OpE-06 и OpF-05 (рис. 5 А и В) выявил значительный внутривидовой полиморфизм двух исследованных *Trichobilharzia*.



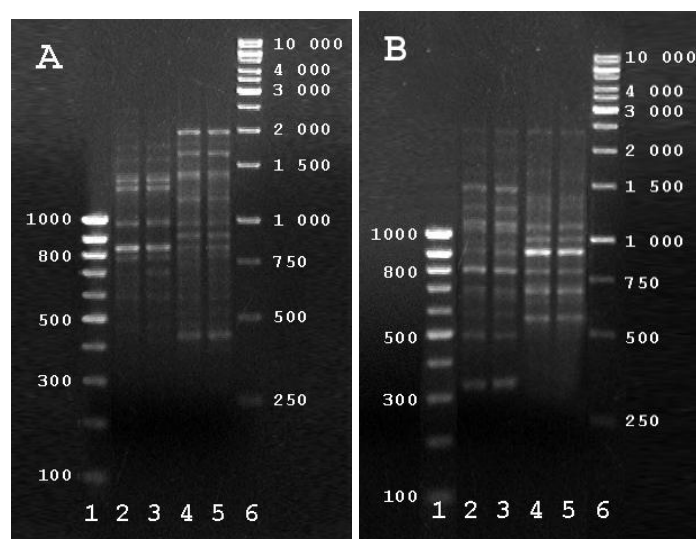


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов RAPD-ПЦР с праймерами OpE-06 (А) и OpF-05 (В) ДНК *Trichobilharzia* из различных водоемов. Дорожка 2, 3 – *Trichobilharzia* из озера близ д. Полоневичи Держинского района, 4, 5 – *Trichobilharzia* из озера Нарочь. Дорожки 1 и 6 - стандарты масс ДНК.

В каждом из проведенных ПЦР амплифицировались 10-15 различных продуктов в диапазоне масс 250-2500 пар оснований. Использование праймера OpE-06 позволило выявить значительные различия между двумя исследованными объектами. Большинство получаемых с этим праймером продуктов отличались у двух *Trichobilharzia*. При использовании праймера OpF-05 амплифицировались как одинаковые фрагменты (например, ~700, ~750, ~1000 пар оснований), так и уникальные для каждой из исследованных церкарий *Trichobilharzia*.

На рис. 5 приведена электрофореграмма продуктов ПЦР с RAPD праймером OpB-01.

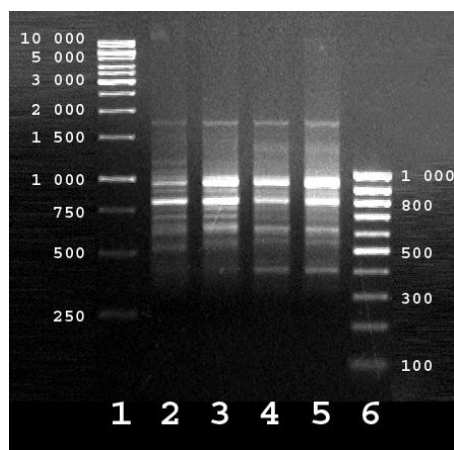


Рис. 6. Электрофореграмма продуктов RAPD-ПЦР с праймером OpB-01 ДНК *Trichobilharzia* из различных водоемов. Дорожка 2, 3 – *Trichobilharzia* из озера близ д. Полоневици Держинского района, 4, 5 – *Trichobilharzia* из озера Нарочь. Дорожки 1 и 6 - стандарты масс ДНК.

В результате амплификации с праймером OpB-01 было получено до 10 различных фрагментов величиной от 400 до 1700 пар оснований. ПЦР-паттерны двух различных проб *Trichobilharzia* имели в общем сходный вид. Однако среди продуктов нарочанской пробы присутствовали фрагменты ~400 и ~1400 пар оснований, отсутствующие в продуктах *Trichobilharzia* из озера близ д. Полоневици, где, наоборот, имелись уникальные фрагменты размером ~700 пар оснований.

Проведенный RAPD-анализ позволил выявить различия между двумя исследованными *Trichobilharzia*. Несмотря на то, что церкарии принадлежат к одному виду трематод (что подтверждалось идентичностью масс продуктов ПЦР с ITS праймерами), внутри этого вида имеет место полиморфизм.

В заключение работы нами сделаны следующие выводы:

1. Использование метода ПЦР со специфическими праймерами T1323-1, T1323-2, T1323-R позволяет точно и избирательно идентифицировать церкарии опасного для человека рода *Trichobilharzia*. В качестве материала для проведения амплификации может выступать ДНК, выделенная из различных источников: пораженного гепатопанкреаса

моллюсков, спороцист и отдельных церкарий трематод, полученных как из печени моллюска, так и выделенных из воды.

2. Проведенный анализ продуктов ПЦР с ITS-праймерами позволил идентифицировать церкарии *Trichobilharzia* до вида. По результатам сравнения полученных нами данных с литературными, мы заключили, что исследованная нами *Trichobilharzia* принадлежит к виду *T. szidati*.

3. С помощью метода RAPD-анализа выявлен полиморфизм церкарий *Trichobilharzia* из двух различных водоемов: озера Нарочь и озера близ д. Полоневичи Держинского района Минской области. Степень выявляемого полиморфизма во многом зависит от использованных праймеров. Применение праймеров OpE-06 и OpF-05 позволяет сделать это с большим успехом, благодаря существенным различиям масс среди продуктов двух исследованных объектов. Использование же праймера OpB-01 дает в результате амплификации во многом сходную картину и не демонстрирует заметных генетических отличий между *Trichobilharzia* из озера Нарочь и *Trichobilharzia* из озера близ д. Полоневичи.

#### Литература:

1. Rudolfová J., V. Hampl V., Bayssade-Dufour C., Lockyer A. E., Littlewood D. T. J., and Horák P. Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host // *Parasitology Research*. – 2004.
2. Ризевский С.В., Климович Е.Н., Акимова Л.Н., Кузуб Н.Н., Курченко В.П. Оценка зараженности легочных моллюсков личинками трематод на озере Нарочь // Проблема церкариоза в Нарочанском регионе. – Материалы семинара, проведенного ГПУ НП «Нарочанский» на базе УНЦ «Нарочанская биологическая станция имени Г. Г. Винберга» БГУ 1–2 ноября 2006. – Минск (Медисонт), 2007.– С. 140–154.
3. Hertel J., Hamburger J., Haberl B. and Haas W. Detection of bird schistosomes in lakes by PCR and filter-hybridization // *Parasitology Research*. – 2002.

4. Dvorak J., Vanacova S., Hampl V., Horak P. Comparison of European *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences // *Parasitology*. – 2002. – V 124 . – p. 307-313.
5. Semyenova, S.K., Chrisanfova, G.G., Filippova, E.K., Beer, S.A., Voronin, M.V., Ryskov, A.P. Individual and population variation in cercariae of bird schistosomes of the *Trichobilharzia ocellata* species group as revealed with the polymerase chain reaction // *Genetika*. – 2005. – T.41. - № 1. – p. 17-22.

IDENTIFICATION OF CERCARIA OF TREMATODA *TRICHOBLIHARZIA SP.* WITH  
THE POLYMERASE CHAIN REACTION

S.V. Rizevsky, L.N. Akimova, V.P. Kurchenko, N.N. Kuzub

The polymerase chain reaction with specific, arbitrary (RAPD-PCR) and ITS primers was used to identify the species in cercariae of schistosomes of the *Trichobilharzia ocellata* species group (*Trematoda, Schistosomatidae*) and to study the population variation. We showed the probability of using specific primers T1323-1, T1323-2, T1323-R for identification the *Trichobilharzia* among other furcocercariae (*Strigeidae, Diplostomatidae*). We used DNA isolation method that allow to extract DNA suitable for PCR from different sources: from water, from hepatopancreas of infected mollusk, from sporocist or even from individual cercaria.

We used PCR with ITS-primers to amplify the whole ITS-region and its parts. Obtained data was compared with three European species of bird schistosomes of the genus *Trichobilharzia* (*T. franki, T. regenti* , and *T. szidati*) from GenBank. Comparison of sizes of products showed that cercaria we studied belongs to *T. szidati*, discovered by Dvorak, J. et al., 2002 and Rudolfova, J., et al., 2005.

RAPD-PCR was used to study the polymorphism of cercaria of *Trichobilharzia* from Naroch and from small lake of Polonevichi village, Derzhinski region. RAPD-PCR was carried out with 3 arbitrary primers, OpB-01, Ope-06 and OpF-05. Each primer detected different levels of among-group variation and revealed considerable genetic differentiation of cercariae.