

Курманова М. К.

Kurmanova M. K.

**ДИАГНОСТИКА ГЕНОМНОЙ СТРУКТУРЫ ПАРАЗИТОВ РЫБ  
DACTYLOGYRUS VARICORHINI (BYCHOWSKY, 1957) МЕТОДОМ  
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ****DIAGNOSTICS OF THE GENOMIC STRUCTURE OF THE PARASITES  
OF FISH DACTYLOGYRUS VARICORHINI (BYCHOWSKY, 1957)  
BY THE METHOD OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL TIME**

Вид паразитов рыб *Dactylogyrus varicorhini* (Bychowsky, 1957) относится к широко распространённому роду *Dactylogyrus*, поражающих с разной интенсивностью кожу, жабры и плавники рыб, и многих видов водных беспозвоночных. Некоторые могут стать причиной изъязвлений поверхности тела, клоаки, мочеточников и даже кровеносных сосудов.

Большинство представителей рода *Dactylogyrus* паразитируют, передвигаясь по поверхности тела и питаясь слизистыми выделениями кожи и детритом, циркулирующим за счет тока воды через жабры. Моногенетические сосальщики вооружены многочисленными хитиноидными крючками, позволяющими им крепиться к телу во время питания.

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 гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов для выявления генома вида *Dactylogyrus varicorhini* у карповых рыб, возможная для использования ветеринарной службой. Подобраны оптимальные режимы

постановки реакции и концентрации химических реагентов для постановки реакции.

The fish parasite species *Dactylogyrus varicorhini* (Bychowsky, 1957) belongs to the widespread genus *Dactylogyrus*, affecting the skin, gills, and fins of fish and many aquatic invertebrates with varying intensity. Some can cause ulceration of the body surface, cloaca, ureters, and even blood vessels.

Most members of the genus *Dactylogyrus* parasitize by moving along the surface of the body and feeding on mucous secretions of the skin and detritus, circulating due to the flow of water through the gills. Monogenetic flukes are armed with numerous chitinoid hooks that allow them to attach to the body during feeding.

Polymerase chain reaction (PCR) is a molecular diagnostics method that has become the "gold standard" for many infections, time-tested and thoroughly tested clinically. High sensitivity and specificity of the method make it possible to reliably detect single pathogens in biological material based on their genetic information. The analytical sensitivity of PCR for most viruses and bacteria is 1000 microorganisms in 1 ml of sample. The specificity of PCR for viral, chlamydial, mycoplasma and most other bacterial infections reaches 100%. PCR in the laboratory diagnosis of infections is characterized by rapidity, 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 species *Dactylogyrus varicorhini* in cyprinids, which can be used by the veterinary service. The optimal regimes for setting up the reaction and the concentration of chemical reagents for setting up the reaction have been selected veterinary service. The optimal regimes for setting up a reaction and concentration of chemical reagents for setting up a reaction have been selected.

**Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция, дезоксирибонуклеиновая кислота, паразиты рыб. жабры, дактилогирис.

**Key words:** polymerase chain reaction, deoxyribonucleic acid, fish parasites, gills, dactylogyrus.

**Курманова Марина Келлетовна** – кандидат биологических наук, ст. преподаватель кафедры механизации сельского хозяйства, ФГБОУ ВО Кабардино-Балкарский ГАУ  
Тел.: 8 928 722 81 75  
E-mail: ksmk1984@mail.ru

**Kurmanova Marina Kelletoovna** – Candidate of biological sciences, Art. Lecturer, Department of Mechanization of Agriculture, FSBEI HE Kabardino-Balkarian SAU  
Tel.: 8 928 722 81 75  
E-mail: ksmk1984@mail.ru

Одной из наиболее существенных отрицательных сторон в развитии культурных рыбных хозяйств, в особенности хозяйств прудового и нерестово-вырастного типа, являются заболевания рыбы [1-4]. Нередко вспыхивающая эпизоотия может свести на нет всю работу рыбоводов, вызвав поголовную гибель рыбы, или резко снизить количество и качество продукции [1]. По мере роста и развития культурных форм рыбного хозяйства вопрос о предохранении рыбы от заболеваний и о лечебных мероприятиях становится все более и более актуальным [3, 5, 6].

Причины заболеваний рыбы могут быть различны. Их можно разделить на четыре группы. Во-первых, инфекционные заболевания, вызываемые бактериями и вирусами. Сюда относятся краснуха карповых, фурункулез лососевых и многие другие [7].

Вторая группа – грибковые заболевания, среди которых особенно распространен бранхиомикоз (заболевание жабр) и болезни, вызываемые сапролегнией. Третью, весьма разнородную группу, составляют заболевания, в основе этиологии которых лежат нарушения обмена веществ и авитаминозы, обуславливаемые обычно недостатками пищевого режима [8]. Наконец, самую обширную 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. [9].

Для лабораторной диагностики сосальщиков 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 учетом результатов (ПЦР-РВ) [10]. Использование для ПЦР-РВ зонда, меченного флуоресцентными метками, позволяет уменьшить время постановки реакции до двух часов. Отсутствие необходимости в постановке электрофоретической визуализации ПЦР значительно уменьшает риск получения ложно-положительных результатов [11]. В отечественной и зарубежной научной литературе многократно и в разные годы описана возможность применения ПЦР для выявления генома этого биологического объекта.

**Материалы и методы.** В работе были использованы пробы от рыб, выловленных в частном прудовом хозяйстве Кабардино-Балкарской Республики. Чувствительность разрабатываемого метода выделения генома *Dactylogyrus varicorhini* (Burchowsky, 1957) оценивали, используя 10-кратное разведение выделенной ДНК из проб рыб. С целью оценки воспроизводимости показателей тестируемых образцов каждый эксперимент проводили в трех повторах независимыми постановками ПЦР-РВ.

*Выделение ДНК* вида *Dactylogyrus varicorhini* (Burchowsky 1957) проводили 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.

*ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов.* Для подбора оптимальных условий проведения ПЦР использовали набор «Оптимизация ПЦР» (ЗАО «Силекс», г. Москва). Далее в ходе ряда экспериментов ПЦР-РВ были установлены оптимальный объем (25 мкл) и состав реакционной смеси с содержанием следующих компонентов: 10 ммоль каждого праймера, 5 ммоль флуоресцентного зонда, 1 ед. Taq- полимераза, 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°C – 3 мин.;

- цикл 1: 90°C – 15 с, 57°C – 15 с, 72°C – 15 с (5 повторов, без детекции);

- цикл 2: 90°C – 15 с, 57°C – 15 с, 72°C – 15 с (35 повторов, с учетом флуоресценции по каналу FAM при температуре 57°C).

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

*Конструирование праймеров и зонда.* 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-gtttacgtacgtacgtaacgtcagggtta-BHQ1-3'.

**Результаты и обсуждение.** С целью оценки перспективности использования гена ДНК полимеразы вида *Dactylogyrus varicorhini* (Bychowsky, 1957) в качестве ДНК-мишени для разработки ПЦР в реальном времени проводили выравнивание нуклеотидных последовательностей данного гена различных штаммов и изолятов депонированных в GeneBank.

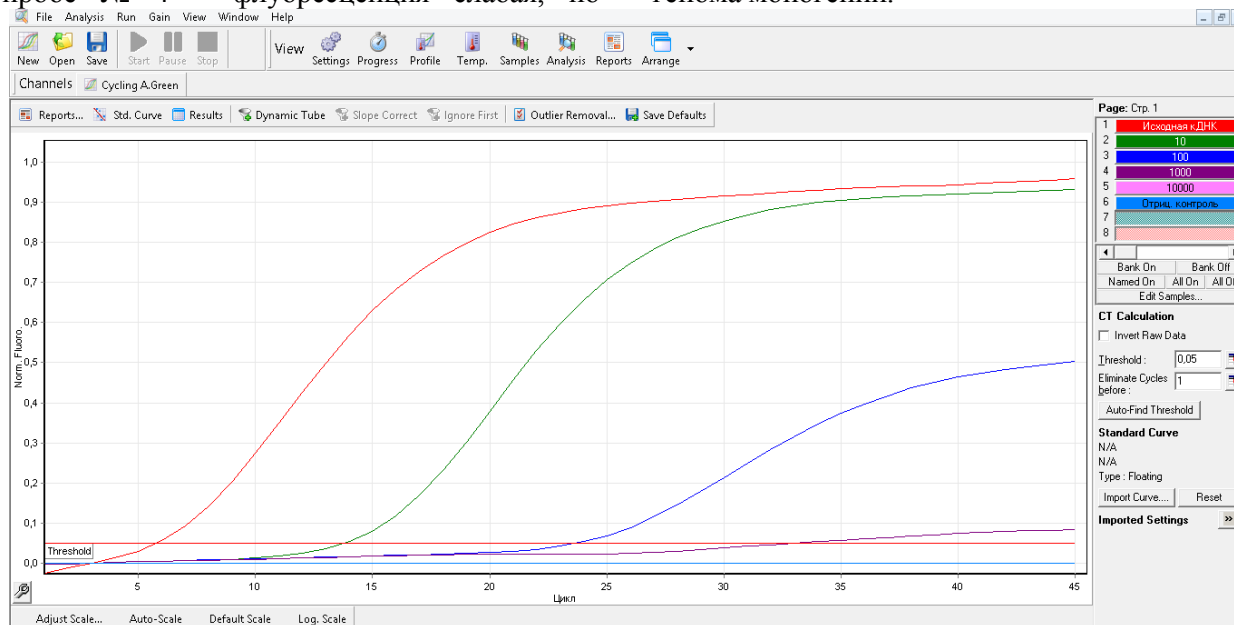
На основании полученных результатов выравнивания были определены варибельные и консервативные участки полимеразы, на которую были подобраны олигонуклеотидные праймеры, обеспечивающие амплификацию фрагмента и зонд формата TaqMan с флуоресцентными метками FAM и BHQ1, позволяющего учитывать результаты реакции в режиме

реального времени. Выбор праймеров и зонда обоснован рекомендациями Littlewood D. 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 исследований 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 «Материалы и методы». Аналитическую чувствительность метода определяли с использованием панели из ряда 10-кратных разведений ДНК моногении. Для оценки воспроизводимости результатов выявления два независимых исследователя провели параллельный анализ образцов, использованных 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%.

St – (величина порогового цикла) – цикл начала увеличения флуоресценции, на котором сигнал уже достоверно отличим от приборного шума, но при этом еще 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 St 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 четкая корреляция между концентрацией искомой ДНК в образце и накоплением флуоресцентного сигнала. Величина St для пробы № 4 (ДНК разведённая в 1000 раз) составила – 33,15. Это значит, что в данной пробе флуоресцентный сигнал, достаточный для обнаружения амплификатором, был накоплен только к 33 циклу реакции. Это показывает прямую

зависимость между концентрацией вирусного материала в исследуемом материале и чувствительностью реакции. Как видно из рисунка 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 показывают высокую эффективность амплификации фрагмента генома моногении.



№	Name	Type	Ct	Given Conc (Kon	Calc(Копи	% Var	Rep.Ct
1	Исходная ДНК	Unknown	5,80				
2	10	Unknown	13,86				
3	100	Unknown	23,77				
4	1000	Unknown	33,15				
5	10000	Unknown	NEG(NTC)				
6	Отриц.контроль	Unknown	NEG(NTC)				

**Рисунок 1** – ПЦР-РВ на пробах разведения выделенной ДНК из проб, содержащих геном моногении

проба №1 – исходная к ДНК; проба № 2 – к ДНК разведённая в 10 раз; проба № 3 – к ДНК разведённая в 100 раз; проба № 4 – к ДНК разведённая в 1000 раз; проба № 5 – к ДНК, разведённая в 10 000 раз; проба № 6 – Отрицательный контроль.

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 отсчета (относительный количественный анализ).

**Выводы.** Таким образом, разработан способ качественного выявления генома вида *Dactylogyrus varicorhini* (Burchowsky, 1957) полимеразной цепной реакции в реальном времени. Данный метод может быть

рекомендован к апробированию в ветеринарных лабораториях.

## Литература

1. Справочник по болезням рыб / В.С. Осетров. – М.: Колос, 1978. – 351 с.

## References

1. Spravochnik po boleznyam ryb / V.S. Osetrov. – M.: Kolos, 1978. – 351 s.
  2. Биоразнообразиие эктопаразитов сем. Gyrodactylidae van Benedeni et Hose, 1863 у рыб в бассейне реки Сулак / К.Г. Алиева, А.В. Атабиев, И.И. Махиев, Н.М. Мирзоева, И.А. Биттиров, М.М. Газаев, А.М. Биттиров // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2017. – № 18. – С. 13-15.
  3. Эпизоотологическая характеристика рода *Proteocephalus* у рыб в водоемах Северного Кавказа / К.Г. Алиева, М.М. Шахмурзов, И.И. Махиев, Н.М. Мирзоева, И.А. Биттиров, М.М. Газаев, А.М. Биттиров // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2017. – № 18. – С. 16-18.
  4. Биттиров А.М. Физико-химические характеристики водной среды, как показатели степени загрязнения водоемов // Сб. «Биофизические аспекты загрязнения биосферы». – Наука, 2005. – С. 9-11.
  5. Паразитофауна полиаквакультуры озера «Алтудское» в равнинной зоне Кабардино-Балкарии / К.Г. Алиева, М.М. Газаев, Н.М. Мирзоева, А.А. Биттирова, И.И. Махиев, К.М. Курманова, М.Х. Житиева, А.М. Биттиров // В сборнике «Биоразнообразие и рациональное использование природных ресурсов»: материалы докладов IV Всеросс. заочной научно-практической конференции с международным участием. Дагестанский государственный педагогический университет, кафедра ботаники. – 2016. – С. 38-40.
  6. Видовая структура и нозология семейства сем. Gyrodactylidae van Benedeni et Hose, 1863 у сазана в речном бассейне региона Северного Кавказа / К.Г. Алиева, М.М. Газаев, М.М. Газаев, И.И. Махиев, А.Б. Иттиев, С.А. Беккиева, А.М. Биттиров // Сборник научно-исследовательских работ, посвященный 60-летию со дня рождения доктора ветеринарных наук, профессора Кабардиева С.Ш., Махачкала. – 2015. – С. 261-264.
  7. Ногеров У.О., Биттиров А.М. Итоги изучения видового состава экто- и эндопаразитов рыб бассейна рек юга России // Материалы Всероссийского совещания-симпозиума «Роль российской школы гельминтологов в развитии паразитологии». – Москва, 1998. – С. 148-156.
2. Bioraznoobrazie ektoparazitov sem. Gyrodactylidae van Benedeni et Hose, 1863 u ryb v bassejne reki Sulak / K.G. Alieva, A.V. Atabiev, I.I. Mahiev, N.M. Mirzoeva, I.A. Bittirov, M.M. Gazaev, A.M. Bittirov // Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami. – 2017. – № 18. – S. 13-15.
  3. Epizootologicheskaya harakteristika roda *Proteocephalus* u ryb v vodoemah Severnogo Kavkaza / K.G. Alieva, M.M. Shahmurzov, I.I. Mahiev, N.M. Mirzoeva, I.A. Bittirov, M.M. Gazaev, A.M. Bittirov // Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami. – 2017. – № 18. – S. 16-18.
  4. Bittirov A.M. Fiziko-himicheskie harakteristiki vodnoj sredy, kak pokazateli stepeni zagryazneniya vodoemov // Sb. «Biofizicheskie aspekty zagryazneniya biosfery». – Nauka, 2005. – S. 9-11.
  5. Parazitofauna poliakvakul'-tury ozera «Altudskoe» v ravninnoj zone Kabardino-Balkarii / K.G. Alieva, M.M. Gazaev, N.M. Mirzoeva, A.A. Bittirova, I.I. Mahiev, K.M. Kurmanova, M.H. Zhitieva, A.M. Bittirov // V sbornike «Bioraznoobrazie i racional'noe ispol'zovanie prirodnyh resursov»: materialy dokladov IV Vseross. zaochnoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodnym uchastiem. Dagestanskij gosudarstvennyj pedagogicheskij universitet, kafedra botaniki. – 2016. – S. 38-40.

6. Vidovaya struktura i nozologiya semejstva sem. Gyrodactylidae van Benedeni et Hose, 1863 u sazana v rechnom bassejne regiona Severnogo Kavkaza / *K.G. Alieva, M.M. Gazaev, M.M. Gazaev, I.I. Mahiev, A.B. Ittiev, S.A. Bekkueva, A.M. Bittirov* // Sbornik nauchno-issledovatel'skih rabot, posvyashchennyj 60-letiyu so dnya rozhdeniya doktora veterinarnyh nauk, professora Kabardieva S.SH., Mahachkala. – 2015. – S. 261-264.

7. *Nogerov U.O., Bittirov A.M.* Itogi izucheniya vidovogo sostava ekto- i endoparazitov ryb bassejna rek yuga Rossii // Materialy Vserossijskogo soveshchaniya-simpoziuma «Rol' rossijskoj shkoly gel'mintologov v razvitii parazitologii». – Moskva, 1998. – S. 148-156.

8. Экстенсивность инвазии диплостомоза рыб в прудовых водоемах Кабардино-Балкарской Республики / *М.Х. Житиева, К.Г. Алиева, М.К. Курманова, М.М. Газаев, Н.М. Мирзоева, А.А. Биттирова, И.И. Махиев, А.М. Биттиров* // Сборник материалов Межрегионального семинара-совещания. – Нальчик, 2016. – С. 61-62.

9. Особенности региональной эпизоотологии аписомоза терского усача в природных водоемах Северного Кавказа / *К.Г. Алиева, И.И. Махиев, М.Г. Газимагомедов, Н.М. Мирзоева, М.Х. Житиева, М.К. Курманова, А.М. Биттиров* // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2016. № 17. – С. 14-16.

10. [Экологическая структура паразитарной фауны карповых рыб в магистральных реках Терек, Малка, Баксан, Черек и Чегем](#) / *А.М. Биттиров, М.Х. Казанчев, Н.М. Мирзоева, А.Б. Иттиев, М.К. Курманова* // [Вестник Красноярского государственного аграрного университета](#). – 2008. – № 2. – С. 85-92.

11. Биogeография эктопаразитов сем. Epistylididaekahl, 1933 у рыб природных водоемов бассейна р. Терек / *К.Г. Алиева, И.И. Махиев, М.Г. Газимагомедов, Н.М. Мирзоева, М.Х. Житиева, М.К. Курманова, М.М. Газаев, А.М. Биттиров* // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2016. – № 17. – С. 17-20.

8. Ekstensivnost' invazii diplostomoza ryb v prudovyh vodoemah Kabardino-Balkarskoj Respubliki / *M.H. Zhitieva, K.G. Alieva, M.K. Kurmanova, M.M. Gazaev, N.M. Mirzoeva, A.A. Bittirova, I.I. Mahiev, A.M. Bittirov* // Sbornik materialov Mezhregional'nogo seminar-soveshchaniya. – Nal'chik, 2016. – S. 61-62.

9. Osobennosti regional'noj epizootologii apisomoza terskogo usacha v prirodnyh vodoemah Severnogo Kavkaza / *K.G. Alieva, I.I. Mahiev, M.G. Gazimagomedov, N.M. Mirzoeva, M.H. Zhitieva, M.K. Kurmanova, A.M. Bittirov* // Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami. – 2016. – №17. – S. 14-16.

10. Ekologicheskaya struktura parazitarnoj fauny karpovyh ryb v magistral'nyh rekah Terek, Malka, Baksan, Cherek i Chegem / *A.M. Bittirov, M.H. Kazanchev, N.M. Mirzoeva, A.B. Ittiev, M.K. Kurmanova* // Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2008. – № 2. – S. 85-92.

11. Biogeografiya ektoparazitov sem. Epistylididaekahl, 1933 u ryb prirodnyh vodoemov bassejna r. Terek / *K.G. Alieva, I.I. Mahiev, M.G. Gazimagomedov, N.M. Mirzoeva, M.H. Zhitieva, M.K. Kurmanova, M.M. Gazaev, A.M. Bittirov* // Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami. – 2016. – №17. – S. 17-20.