

Метод выделения ДНК *O. Felineus* для выявления описторхоза

Доминова И.Н.¹, Патрушев М.В.¹, Огородова Л.М.², Новицкий В.В.²

O. felineus DNA extraction method for opisthorchiasis detection

Dominova I.N., Patrushev M.V., Ogorodova L.M., Novitsky V.V.

¹ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Доминова И.Н., Патрушев М.В., Огородова Л.М., Новицкий В.В.

Проведено сравнение методов выделения ДНК *Opisthorchis felineus* из образцов фекалий для последующего использования в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Сравнительный анализ выбранных методов экстракции ДНК из образцов фекалий, содержащих яйца *O. felineus*, позволил установить, что наиболее эффективной методикой для идентификации описторхоза посредством ПЦР является модернизированный протокол на основе применения магнитных частиц.

Ключевые слова: Выделение ДНК, описторхоз, магнитные частицы.

Opisthorchis felineus DNA extraction methods from fecal samples were compared. Comparative analysis of selected methods of DNA extraction from fecal samples containing eggs *O. felineus*, revealed that the most effective method for the identification of opisthorchiasis by PCR protocol is upgraded through the use of magnetic particles.

Key words: DNA extraction, opisthorchiasis, magnetic particles.

УДК 576.985.122.21.577.213.7

Введение

Описторхоз является распространенным заболеванием, в мире им заражены около 2 млн человек. Большинство из них проживают в России, странах бывшего СССР (Украина, Белоруссия и Казахстан), а также на северо-востоке и севере Таиланда, где наиболее часто население употребляет сырую рыбу (Sadun, 1955; Harinasuta, Vajrasthira, 1960; Wykoff и др., 1965; Preuksaraj и др., 1982) [25].

На территории Российской Федерации описторхоз вызван печеночным сосальщиком вида *Opisthorchis felineus* (класс *Trematoda*, семейство *Opisthorchiidae*). Одним из наиболее крупных эндемических очагов описторхоза в мире является Обь-Иртышский бассейн, который включает 10 краев и областей России и Казахстана.

Данное заболевание распространено также в бассейнах Днепра, Немана и Волго-Камском. В 2003 г. в бассейне Среднего Приобья частота заражения описторхозом составляла 51—82%, а в некоторых районах — более 95%. По данным статистики известно, что через год после приезда из неэндемических районов в район

с очагом описторхоза, заражаются 11,5—17,9% лиц, через 1,5 года — 42,0%, через 5 лет — 46,7% и далее частота инвазии возрастает до 73,7%. В 2011 г. в Томской области было зарегистрировано 2 327 впервые выявленных случаев описторхоза, в том числе 1 027 — у детей. За 7,5 мес 2012 г. в области зарегистрировано 1 429 впервые заболевших описторхозом, в том числе 536 детей [1, 4, 9, 12, 15, 16, 21].

Диагноз заражения *Opisthorchis felineus* обычно ставится на основании нахождения яиц сосальщиков в фекалиях. Тем не менее, паразитологический метод диагностики имеет много недостатков, давая ложноположительные результаты при обнаружении яиц кишечных сосальщиков или ложноотрицательные при низкой степени инфицирования и при непроходимости желчных путей, при которой яйца не могут быть обнаружены в фекалиях. Именно поэтому в последние годы для выявления описторхоза активно развиваются молекулярные методы, демонстрирующие большую эффективность, в частности в связи с использованием иммунодиагностики и ДНК-диагностики [25].

Различные иммунологические методы используются для выявления циркулирующих антител либо для обнаружения антигенов в фекалиях. Детекция ан-

тигенов в фекалиях должна быть основана на выявлении моноклональных антител, поскольку они очень специфичны, хорошо воспроизводимы, и могут быть получены в больших количествах при относительно низких затратах. Результат выявления антител обнадеживает, но это еще не дает практической возможности для получения антигена в большом количестве для повседневного использования. Клонирование генов, экспрессирующих специфический антиген может помочь решить проблему, однако она все еще находится в начальной стадии. В последнее время несколько генов *O. viverrini*, таких как гены фермента глутатион S-трансферазы (GST), белка-предшественника вителлина В яичной скорлупы. Рекомбинантные белки, полученные посредством клонирования этих генов, находятся на стадии исследования (Viyanant, не опубликовано). Другие альтернативные методы в разработке эффективной серологической диагностики могут быть осуществлены путем определения специфических классов иммуноглобулинов или подклассов. Кроме того, данный метод может обеспечить не только точные данные для эпидемиологических, но и для таксономических исследований. Эти методы еще не достаточно развиты для их широкого применения при диагностике заболевания [7, 10, 13, 18]. Одним из альтернативных методов выявления описторхоза может стать ПЦР-диагностика, позволяющая обнаруживать специфические фрагменты ДНК паразита в фекалиях больных.

Молекулярные подходы к дифференциальной диагностике печеночных и кишечных сосальщиков были апробированы в лабораторных условиях S. Wongratana-cheewin и др. (2001, 2002) [26, 27]; T.H. Le и др. (2006) [8]; U. Thaenkhram и др. (2007) [23]; M. Sato и др. (2009) [17].

Специфический зонд к ДНК в пробе был использован R. Sermswan и соавт. (1991) [19], и S. Sirisinha (1991) [20]. Метод показал высокую специфичность для *O. viverrini*, а его чувствительность была сопоставима с микрокопированием. ПЦР-метод был разработан S. Wongratana-cheewin и соавт. (2001), которые сообщили, что всего лишь $2 \cdot 10^{17}$ нг геномной ДНК *O. viverrini* может быть обнаружено в фекалиях подопытных животных [19, 20, 26].

Хотя приведенные выше методы оказались очень эффективными для диагностики описторхоза, следует отметить, что ни один из них не может заменить микроскопическое исследование.

На практике чувствительность молекулярной диагностики не является удовлетворительной из-за проблем экстракции ДНК и последующего проведения ПЦР, так как содержание яиц в фекалиях не высоко из-за низкой скорости производительности яиц паразитами *Opisthorchioidea* (ВОЗ, 1995), толстой скорлупы их яиц, кроме того образцы фекалий содержат вещества, способные ингибировать ПЦР [22]. Несмотря на попытки по улучшению чувствительности и специфичности копро-ДНК-диагностики инфекций [6, 11, 22, 26] процедура отнимает много времени. Кроме того, чувствительность копро-ДНК-диагностики остается ниже, чем микрокопирование [2, 6, 11, 22, 24, 27, 28].

Цель исследования — разработать систему выделения ДНК *Opisthorchis felineus* из образцов фекалий с последующим ее использованием в полимеразной цепной реакции для обнаружения *Opisthorchis felineus* в исследуемых пробах.

Материал и методы

Объектом исследования явились образцы биологических проб (фекалии) людей с подтвержденным диагнозом «описторхоз».

В работе были использованы следующие реагенты: тиоцианат гуанидина, натрий лауроилсаркозил, цитрат натрий дигидрат, трис-(гидроксиметил) аминотетан, ЭДТА, ацетат натрия тригидрат, Tween-20, Triton X-100 (Amresco, США); натрий хлорид, натрий гидроокись, додецилсульфат натрия («Хеликон», Россия), поливинилпирролидон PVP K-30 (Sigma-Aldrich, США).

Растворы веществ: раствор тиоцианата гуанидина, содержащий 4 моль тиоцианата гуанидина, 25 ммоль цитрата натрия, 0,5% лауроилсаркозил натрия; 1 моль раствор Tris-HCl с pH 8,4; 2 моль раствор хлористого натрия; TES, содержащий 1 ммоль Tris-HCl, 1 ммоль ЭДТА, 0,5 моль NaCl; TE, содержащий 10 ммоль Tris-HCl, 2 ммоль ЭДТА; лизирующий буфер № 1, содержащий 100 ммоль ацетата натрия, 50 ммоль ЭДТА, 50 ммоль хлорида натрия, 2% поливинилпирролидона PVP K-30, 1,4% додецилсульфата натрия; лизирующий буфер № 2, содержащий 30 ммоль Tris-HCl, 30 ммоль ЭДТА, 800 ммоль тиоцианата гуанидина, 5% Tween-20, 0,5% Triton X-100; раствор протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл в 10 ммоль Tris-HCl, 1 ммоль CaCl₂, 30% глицероле готовили путем разведения соответствующих реактивов в деионизированной воде, произведенной Milli-Q Integral Water Purification

System (Millipore), до определенных концентраций и значений pH, которые доводили концентрированными уксусной и соляной кислотами, хранили при требуемых температурах в зависимости от раствора. Также была приготовлена адсорбирующая смесь, состоящая из картофельного крахмала и микрокристаллической целлюлозы в соотношении 3 : 1.

Метод выделения ДНК, разработанный P. Chomczynski и N. Sacchi (1986) [5], основан на лизирующем воздействии хаотропного агента (4 моль раствора гуанидина изотиоцианата) на клетки в процессе прогревания при температуре 95 °С с последующим добавлением pH-буфера (1 моль раствора Tris-HCl), экстракцией ДНК фенолом и хлороформом и преципитацией этанолом. ДНК растворяли в растворе Tris-HCl-ЭДТА.

Метод выделения ДНК с применением магнитных частиц, разработанный R. Boom и др. (1990) [3], основан на лизирующем воздействии хаотропного агента (4 моль раствора гуанидина изотиоцианата) на клетки в процессе прогревания при 95 °С с последующим добавлением pH-буфера (1 моль раствора Tris-HCl и 2 моль раствора хлорида натрия) и магнитных частиц, покрытых диоксидом кремния, с последующим промыванием магнитных частиц от примесей раствором Tris-HCl-ЭДТА-хлорид натрия и элюированием с них адсорбированной ДНК раствором Tris-HCl-ЭДТА.

Для подтверждения экстрагирования ДНК *O. felineus* из биологических проб (гомогената марит *O. felineus* и фекалий зараженных яйцами *O. felineus*) были использованы праймеры к митохондриальным генам COX 1: Forward: 5'-GGGTTTGGGAATGATTAGTC-3', Reverse: 5'-CACAGAGGCAGAAAGAACT-3' и COX 3: Forward: 5'-GTTGACTTCTTCTGTGACG-3', Reverse: 5'-CCACAACCACACATAATCC-3'. Праймеры были подобраны с помощью программы CLC Genomics Workbench.

Результаты и обсуждение

В качестве возможных систем для выделения ДНК из фекалий были опробованы три метода, в частности классический метод выделения ДНК, разработанный Chomczynski и Sacchi (метод 1), метод выделения с применением магнитных частиц (метод 2) и методика,

основа которой была описана в патенте US 7005266 B2 (метод 3) [14].

Методы 1 и 2 описаны в разделе «Материал и методы», в данном разделе описывается лишь метод, основанный на патенте US 7005266 B2. Суть его заключается в том, что мы помещали 250—300 мг фекалий в пробирку, добавляли к образцу лизирующий раствор № 1, перемешивали смесь до гомогенного состояния и прогревали в микроволновой печи при 1 000 Вт. После этого смесь центрифугировали, супернатант отбирали в пробирки, содержащие адсорбирующую смесь, перемешивали содержимое и центрифугировали. Полученный таким образом супернатант переносили в пробирки, в которые предварительно была добавлена протеиназа К, добавляли лизирующий буфера № 2 и инкубировали смесь при температуре 70 °С в течение 10 мин. Затем добавляли 96%-й этанол и переносили смесь на колонку, продолжительность инкубации смеси на колонках составляла 30 мин при комнатной температуре. Отмывали колонку холодным TES, ДНК элюировали раствором Tris-HCl-ЭДТА.

Образцы ДНК были использованы для постановки ПЦР с последующей детекцией результатов посредством гель-электрофореза в 1%-м агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием и применением геледокументирующей системы (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о неэффективности применения методов выделения ДНК № 1 и № 2, поскольку результат экстракции ДНК *O. felineus* был отрицательным в этих пробах. В то время как модернизированный нами протокол метода 3 дал положительный результат.

Экспериментальные и клинические исследования

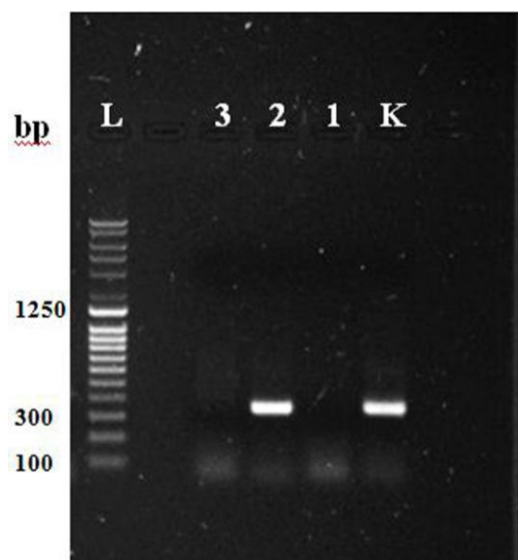
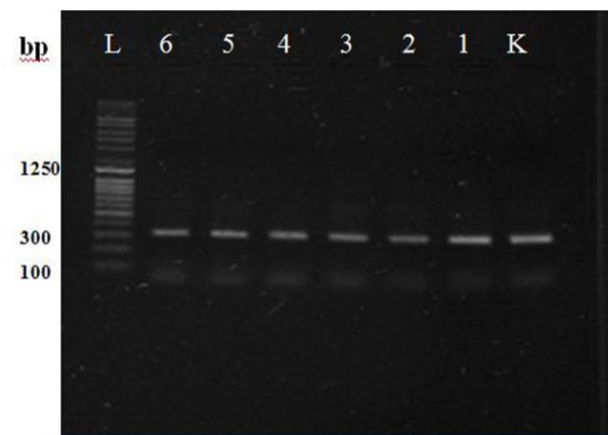
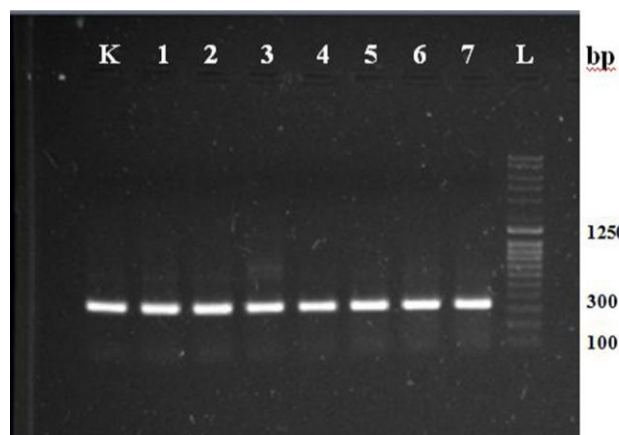


Рис. 1. Электрофореграмма образцов ДНК, выделенных тремя различными методиками: К — контрольная ДНК, выделенная из гомогената мариит *O. felineus* с применением магнитных частиц; 1 — ДНК, выделенная из фекалий с применением метода № 1; 2 — ДНК, выделенная из фекалий в соответствии с методом № 3; 3 — ДНК, выделенная из фекалий с применением метода № 2; L — маркер размеров ДНК



а

б

Рис. 2. Электрофореграммы образцов ДНК, выделенных с применением модернизированного протокола метода № 3: К — контрольная ДНК, выделенная из гомогената мариит *O. felineus*; 1—7 — пробы ДНК, выделенные из фекалий методом №3; L — маркер размеров ДНК; а — праймеры к митохондриальному гену COX1; б — праймеры к митохондриальному гену COX3

Подтверждение эффективности экстрагирования ДНК в соответствии с модернизированным протоколом метода 3 осуществлялось посредством многократного выделения образцов ДНК и постановки с ними ПЦР с двумя различными праймерами к митохондриальным генам *O. felineus* COX1 и COX3 с последующей визуализацией экстрагированной ДНК в УФ-свете, для чего проводили электрофорез в 1%-м агарозном геле. При использовании данной методики выделение ДНК было зафиксировано во всех образцах, что подтверждают электрофореграммы выделения ДНК описторхов, представленные на рис. 2.

Заключение

Сравнительный анализ выбранных методов экстракции ДНК из образцов фекалий, содержащих яйца *O. felineus*, позволил установить, что единственной эффективной методикой для идентификации факта заражения описторхозом посредством ПЦР является модернизированный протокол на основе применения магнитных частиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, ГК № 16.522.12.2006.

Литература

1. Описторхоз: заболеваемость, контрольно-надзорные ме-

- роприятия и профилактика. Пресс-релиз. Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Томской области. 2012.
2. *Banoo S., Bell D., Bossuyt P. et al.* TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4 (12 Suppl). S. 20—32.
 3. *Boom R. et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids // *J. Clin. Microbiol.* 1990. № 3. P. 495—503.
 4. *Cheng Y.Z., Xu L.S., Chen B.J. et al.* Survey on the current status of important human parasitic infections in Fujian province // *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 2005. 23. P. 283—287 [in Chinese].
 5. *Chomczynski P., Sacchi N.* The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytic biochemistry*, 1987, 162, 156—159.
 6. *Duengai K., Sithithaworn P., Rudrappa U.K. et al.* Improvement of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in human stool samples // *J. Clin. Microbiol.* 2008. Jan. № 46 (1). P. 366—368.
 7. *Glupov V.V., Khokhlova N.I., Khvoshchevskaia M.F. et al.* The use of immunoblotting for studying *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) antigens. *Med Parazitol (Mosk)* 1997; 1: 17—9 [in Russian].
 8. *Le T.H., Van De N., Blair D. et al.* *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination // *Exp. Parasitol.* 2006. Feb. № 112 (2). P. 109—114.
 9. *Lun Z., Gasser R.B., Lai D. et al.* Clonorchiasis: a key food-borne zoonosis in China // *Lancet Infect. Dis.* 2005. № 5. P. 31—41.
 10. *Meniavtseva T.A., Ratner G.M., Struchkova S.V. et al.* Immunoenzyme analysis in the diagnosis of opisthorchiasis. I. The development of an immunoenzyme method for determining IgM antibodies to the *Opisthorchis* antigen // *Med. Parazitol. (Mosk.)* 1996. № 1. P. 41—43.
 11. *Möller B., Schmidt J., Mehlhorn H.* PCR diagnosis of infections with different species of *Opisthorchiidae* using a rapid clean-up procedure for stool samples and specific primers // *Parasitol. Res.* 2007. № 100. P. 905—909.
 12. *Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V.* *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia // *Parasitol. Int.* 2012. Mar. № 61 (1). P. 25—31. Epub 2011 Aug 5.
 13. *Nöckler K., Dell K., Schuster R., Voigt W.P.* Indirect ELISA for the detection of antibodies against *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) in foxes // *Vet. Parasitol.* 2003. № 110. P. 207—215.
 14. *Nucleic acid isolation from stool samples and other inhibitor-rich biological materials*, патент USA 7005266 B2, QIAGEN GMBH.
 15. *Ogorodova L.M., Freidin M.B., Sazonov A.E. et al.* A pilot screening of prevalence of atopic states and opisthorchosis and their relationship in people of Tomsk Oblast // *Parasitol. Res.* 2007. № 101. P. 1165—1168.
 16. *Posokhov P.S.* Clonorchosis in the Amur River Basin. 1st ed. Khabarovsk: Far East State Medical University; 2004 [in Russian].
 17. *Sato M., Thaenkham U., Dekumyoy P., Waikagul J.* Discrimination of *O. viverrini*, *C. sinensis*, *H. pumilio* and *H. taichui* using nuclear DNA-based PCR targeting ribosomal DNA ITS regions // *Acta Trop.* 2009. № 109. P. 81—83.
 18. *Schuster R., Gregor B., Heidrich J. et al.* A seroepidemiological survey on the occurrence of opisthorchiid liver flukes in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Berlin, Germany // *Parasitol. Res.* 2003. № 90. P. 400—404.
 19. *Sermiswan R., Mongkolsuk S., Panyim S., Sirisinha S.* Isolation and characterization of *Opisthorchis viverrini* specific DNA probe // *Mol. Cell. Probes.* 1991. № 5 (6). P. 399—407.
 20. *Sirisinha S., Chawengkirtikul R., Sermiswan R. et al.* Detection of *Opisthorchis viverrini* by monoclonal antibody-based ELISA and DNA hybridization // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991. № 44 (2). P. 140—145.
 21. *Skrjabin K.I., Petrov A.M.* Superfamily *Opisthorchoidea* Faust, 1929. Trematodes of man and animals. *Osnovy trematodologii.* Moscow: Nauka, 1950. [in Russian].
 22. *Stensvold C.R., Saijuntha W., Sithithaworn P. et al.* Evaluation of PCR based coprodiagnosis of human opisthorchiasis // *Acta. Trop.* 2006. № 97. P. 26—30.
 23. *Thaenkham U., Visetsuk K., Dung do T., Waikagul J.* Discrimination of *Opisthorchis viverrini* from *Haplorchis taichui* using COI sequence marker // *Acta. Trop.* 2007. Jul. № 103 (1). P. 26—32.
 24. *Traub R.J., Monis P.T., Robertson I.D.* Molecular epidemiology: a multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses // *Int. J. Parasitol.* 2005. № 35. P. 1295—307.
 25. *Upatham E.S., Viyanant V.* *Opisthorchis viverrini* and opisthorchiasis: a historical review and future perspective // *Acta. Trop.* 2003. Nov. № 88 (3). P. 171—176.
 26. *Wongratanacheewin S., Pumidonming W., Sermiswan R.W. et al.* Development of a PCR-based method for the detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected hamsters // *Parasitology.* 2001. № 122. P. 175—180.
 27. *Wongratanacheewin S., Pumidonming W., Sermiswan R.W. et al.* Detection of *Opisthorchis viverrini* in human stool specimens by PCR // *J. Clin. Microbiol.* 2002. № 40 (10). P. 3879—3880.
 28. *Yang S., Rothman R.E.* PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings // *Lancet Infect. Dis.* 2004. № 4. P. 337—348.

Поступила в редакцию 06.10.2012 г.

Утверждена к печати 14.11.2012 г.

Сведения об авторах

И.Н. Доминова — Балтийский федеральный университет им. И. Канта (г. Калининград).

Экспериментальные и клинические исследования

М.В. Патрушев — канд. биол. наук, Балтийский федеральный университет им. И. Канта (г. Калининград).

Л.М. Огородова — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАМН, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ (г. Томск).

В.В. Новицкий — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Доминова Ирина Николаевна, тел. 8-401-259-55-95, доб. 6630; e-mail: IDominova@kantiana.ru