

УДК 619.576.895.132

<https://doi.org/10.31016/978-5-6053355-1-1.2025.26.244-249>

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГОМО- И ГЕТЕРОЗИГОТНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА β -ТУБУЛИНА У ПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Пименов И. А.^{1,2},

аспирант, лаборант

лаборатории иммунологии и молекулярных исследований,

pimenov@vniigis.ru

Аннотация

В статье представлены данные о применении молекулярно-генетических тестов для диагностики возникновения мутантных аллелей в гене β -тубулина, у паразитических нематод *Haemonchus contortus*, приводящих к формированию генетически обусловленной резистентности к бензимидазолам. Исследования проводили на паразитических нематодах, выделенных из желудочно-кишечных трактов овец, выращенных на территории Ставропольского края и Республики Ингушетии. В данных овцеводческих хозяйствах осуществляли регулярную дегельминтизацию всего поголовья м. р. с. препаратами бензимидазольного ряда. Для установления таксономической принадлежности исследуемых гельминтов проводили реакцию «вложенной» ПЦР с последующим рестрикционным анализом полученных ампликонов. ДНК, принадлежащие нематодам вида *H. contortus*, подвергали последующему изучению методом «мультиплексной» ПЦР для выявления гомо- и гетерозиготных аллелей гена β -тубулина в генотипе нематод. В реакции были использованы две пары видоспецифичных праймеров, различные комбинации которых позволяли выявлять наличие или отсутствие однонуклеотидных замен в гене β -тубулина. Данные однонуклеотидные замены, обуславливающие возникновение резистентности к препаратам бензимидазольного ряда, являются рецессивным признаком. Используемая нами

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6)

² Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (117218, Россия, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28)

методика может быть применена для своевременного выявления начальных стадий формирования резистентного генотипа в популяции паразитических нематод семейства Trichostrongylidae на уровне стада.

Ключевые слова: нематоды пищеварительного тракта, резистентность, Trichostrongylidae, *Haemonchus contortus*, мелкий рогатый скот

THE USE OF MOLECULAR GENETIC METHODS TO DETECT HOMO- AND HETEROZYGOUS ALLELES OF THE β -TUBULIN GENE IN PARASITIC NEMATODES *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Pimenov I. A.^{1,2},

Postgraduate Student, Laboratory Assistant
at the Laboratory of Immunology and Molecular Research,
pimenov@vniigis.ru

Abstract

The article presents data on the use of molecular genetic tests to diagnose the occurrence of mutant alleles in the β -tubulin gene in parasitic nematodes *Haemonchus contortus* that lead to the formation of genetically determined resistance to benzimidazoles. The studies were conducted on parasitic nematodes isolated from the gastrointestinal tracts of sheep raised in the Stavropol Territory and the Republic of Ingushetia. On these sheep farms, regular deworming of the entire small cattle with benzimidazole preparations was carried out. To establish the taxonomic affiliation of the studied helminths, a nested PCR was performed followed by a restriction analysis of the obtained amplicons. DNAs belonging to *H. contortus* nematodes were subsequently studied by the multiplex PCR to identify homo- and heterozygous alleles of the β -tubulin gene in the nematode genotype. The reaction used two pairs of species-specific primers different combinations of which made it possible to detect the presence or absence of single-nucleotide substitutions in the β -tubulin gene. These single-nucleotide substitutions which cause the resistance to benzimidazole drugs are a recessive trait. The technique we use can be applied to timely identify the initial stages of the formation of a resistant genotype in a population of parasitic nematodes of the Trichostrongylidae family at the herd level.

¹ Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (6, Miklouho-Maklaya st., Moscow, 117198, Russia)

² All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia)

Keywords: gastrointestinal nematodes, resistance, Trichostrongylidae, *Haemonchus contortus*, small cattle

Введение. Снижение паразитарной нагрузки животных является основным направлением политики современного животноводства, которое достигается путем внедрения в хозяйства систематических мероприятий по дегельминтизации. Проведение подобных мероприятий положительно сказывается на здоровье животных, однако зачастую может приводить к формированию устойчивости паразитов к антигельминтным препаратам [2].

Материалы и методы. Исследования проводили на паразитических нематодах вида *Haemonchus contortus*, выделенных из желудочно-кишечных трактов овец, выращенных на территории Ставропольского края и Республики Ингушетии. Каждую нематоду сохраняли в отдельной промаркированной пробирке типа «эппендорф» при -20°C вплоть до начала проведения молекулярно-генетических исследований.

Выделение нативной геномной ДНК проводили с использованием коммерческого набора для экстракции ДНК из микроколичеств тканей «ДНК-Экстран-2», производства фирмы «Синтол», г. Москва, согласно рекомендациям производителя. Аликвоты геномной ДНК сохраняли вплоть до использования при -20°C .

Для амплификации ДНК использовали термоциклер T-100 Bio-Rad и коммерческий набор реактивов Master Mix, Евроген. Режим проведения ПЦР, используемые реактивы и расчет конечной концентрации реагентов в реакционной смеси для амплификации фрагмента ДНК осуществляли согласно руководству WAAVP, 2006 [3].

Определение вида проводили с использованием эндонуклеазы RsaI. В качестве основного компонента для реакции с эндонуклеазой RsaI (производства фирмы «Сибэнзим», Новосибирск) использовали полученный фрагмент ДНК (ампликон) методом «вложенной» ПЦР [5].

Выявление резистентного генотипа *H. contortus* проводили методом «мультиплексной» аллель-специфичной ПЦР. «Мультиплексную» ПЦР осуществляли с использованием специфичных для нематод вида *H. contortus* праймеров, позволяющих определять гомо- и гетерозиготные аллели гена β -тубулина [3].

Анализ всех продуктов проводили в 2,5% агарозном геле в ТВЕ буфере, окрашенном бромистым этидием при УФ-излучении в геледокументирующей системе GelDoc, Bio-Rad.

Результаты исследований. Определение видовой принадлежности исследуемых паразитических нематод проводили методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Для этого из половозрелых гельминтов была выделена нативная ДНК, используемая для проведения последующих молекулярно-генетических исследований. Первый этап характеризовался постановкой реакции «вложенной» ПЦР. Данную реакцию проводили для амплификации участка ДНК, кодирующего ген β -тубулина, поскольку причиной формирования резистентности к препаратам бензимидазольного ряда у нематод сем. *Trichostrongylidae* является наличие однонуклеотидных замен в данном участке ДНК паразита. На первой стадии проведения «вложенной ПЦР» использовали общие для *Trichostrongylus colubriformis*, *Haemonchus contortus* и *Teladorsagia circumcincta* праймеры Pn1-Pn2. Вторую стадию проводили с праймерами Pn3-Pn4 [1]. Полученный ампликон подвергали расщеплению эндонуклеазой *RsaI* [2]. Исходя из полученных результатов, были отобраны ДНК *H. contortus* для проведения аллель-специфичной «мультиплексной» ПЦР с использованием двух пар праймеров Ph1-Ph2 и Ph3-Ph4 [3], различные комбинации которых позволяют выявлять наличие и отсутствие мутаций в аллелях гена β -тубулина.

Поскольку резистентность является рецессивным признаком, то для выявления гомо- и гетерозиготных аллелей гена β -тубулина использовали следующие комбинации праймеров: одновременное использование праймеров Ph1+Ph2+Ph3 для выявления рецессивных аллелей и одновременное использование праймеров Ph1+Ph2+Ph4 для выявления доминантных аллелей.

В ходе проведения мультиплексной аллель-специфической ПЦР нами были получены аллели гена β -тубулина характерные для гомо- и гетерозиготных особей *H. contortus* (рис. 1). На треках № 3–4 представлены ампликоны нематоды, обладающей гетерозиготным генотипом, поскольку были амплифицированы фрагменты ДНК, несущие как рецессивную (трек № 3, фрагмент размером 250 н. п.) так и доминантную (трек № 4, фрагмент размером 550 н. п.) аллель гена β -тубулина. На треках № 1–2 представлены ампликоны нематоды, обладающей гомозиготным по рецессивному признаку генотипом (трек № 2 – отсутствие доминантной аллели гена). На треках № 5–6 представлены ампликоны, характерные для гомозиготных по доминантному признаку особей (трек № 5 – отсутствие рецессивной аллели гена).

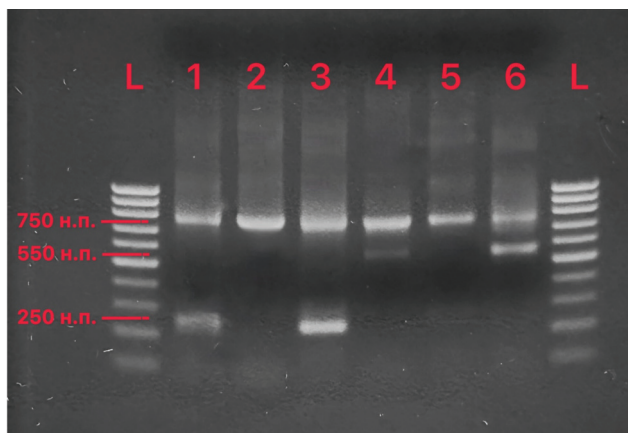


Рис. 1. Результаты гель-электрофореза мультиплексной аллель-специфичной ПЦР:

Треки № 1–2 – амплифицированные участки ДНК *H. contortus*, характерные гомозиготному по рецессивному признаку генотипу;

Треки № 3–4 – амплифицированные участки ДНК *H. contortus*, характерные гетерозиготному генотипу;

Треки № 5–6 – амплифицированные участки ДНК *H. contortus*, характерные гомозиготному по доминантному признаку генотипу;

Треки «L» – DNA ladder, шаг 100 bp

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения молекулярно-генетических методов для достоверного выявления наличия резистентности к препаратам бензимидазольного ряда у паразитических нематод вида *H. contortus*. Наряду с этим, используемый метод позволяет диагностировать ранние этапы формирования гетерозиготных аллелей гена β -тубулина нематод на уровне стада, что дает возможность своевременно корректировать мероприятия по дегельминтизации в хозяйствах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 23-26-00220).

Список источников

1. Пименов И. А., Варламова А. И., Афанасьев А. Д., Одоевская И. М. Анализ наличия резистентности у паразитических нематод *Haemonchus contortus* к антигельминтным препаратам бензимидазольного ряда методом гнез-

- довой изотермической амплификации (ПЦР) // Российский паразитологический журнал. 2024. Т. 18. № 2. С. 170–178.
2. Пименов И. А., Одоевская И. М., Плиева А. М., Варламова А. И. Возможности использования «вложенной» ПЦР-ПДРФ для таксономической идентификации личинок L3 семейства Trichostrongylidae, Leiper, 1912 // Российский паразитологический журнал. 2024. Т. 18. № 3. С. 264–273.
 3. Coles G. C., Jackson F., Pomroy W. E., Prichard R. K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M. A., Vercruysse J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance // *Veterinary Parasitology*. 2006; 136(3–4): 167–85.
 4. Kaplan R. M., Denwood M. J., Nielsen M. K., Thamsborg S. M., Torgerson P. R., Gilleard J. S., Dobson R. J., Vercruysse J., Levecke B. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W. A. A. V. P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine // *Veterinary Parasitology*. 2023; 318: 109936.
 5. Rajagopal A., Sabu L., Radhika R., Devada K., Jain Jose K., Thomas N., Aravindakshan T. V. Development of PCR-RFLP for the detection of benzimidazole resistance polymorphisms in isotype 1 β -tubulin gene of *Trichostrongylus colubriformis* // *Small Ruminant Research*. 2023; 222: 106954.

References

1. Pimenov I. A., Varlamova A. I., Afanasyev A. D., Odoevskaya I. M. Analysis of benzimidazole anthelmintic resistance in parasitic nematodes *Haemonchus contortus* using nested isothermal amplification (PCR). *Russian Journal of Parasitology*. 2024; 18(2):170–178. (In Russ.)
2. Pimenov I. A., Odoevskaya I. M., Plieva A. M., Varlamova A. I. Possibilities of using nested PCR-RFLP for taxonomic identification of L3 larvae of the family Trichostrongylidae, Leiper, 1912. *Russian Journal of Parasitology*. 2024; 18(3): 264–273. (In Russ.)
3. Coles G. C., Jackson F., Pomroy W. E., Prichard R. K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M. A., Vercruysse J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 2006; 136(3–4):167–85.
4. Kaplan R. M., Denwood M. J., Nielsen M. K., Thamsborg S. M., Torgerson P. R., Gilleard J. S., Dobson R. J., Vercruysse J., Levecke B. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W. A. A. V. P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. *Veterinary Parasitology*. 2023; 318: 109936.
5. Rajagopal A., Sabu L., Radhika R., Devada K., Jain Jose K., Thomas N., Aravindakshan T. V. Development of PCR-RFLP for the detection of benzimidazole resistance polymorphisms in isotype 1 β -tubulin gene of *Trichostrongylus colubriformis*. *Small Ruminant Research*. 2023; 222: 106954.