



Основан 1881 Founded

БИОМОЛЕКУЛЯРНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ВИДОВИЯ СЪСТАВ НА ПРИЧИНТЕЛИТЕ НА ТРИХИНЕЛОЗНИ ВЗРИВОВЕ, ИЗВЪРШВАНИ В НРЛ „ДИАГНОСТИКА НА ПАРАЗИТОЗИТЕ“ КЪМ НЦЗПБ

А. Иванова, Н. Цветкова, Р. Харизанов,
И. Райнова, Р. Борисова, И. Кафтанджиев

НЦЗПБ, гр. София

Трихинелозата е природно и синантропно огнищна зооантропоноза, причинявана от нематоди от род *Trichinella*. Хората и животните се заразяват чрез поглъщане на недобре термично обработени опаразитени месни продукти, в които има инвазиоспособни ларви.

В Европа дивите свине най-често са опаразитени с *T. britovi*. В България доминиращ вид сред дивите животни също е *T. britovi*, докато *T. spiralis* се изолира значително по-рядко.



С помощта на молекулярно-генетичните методи в рода *Trichinella*, са описани:

- 8 вида - *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. papuae* и *T. zimbabwensis* и
- 4 допълнителни генотипа (*Trichinella* T6, T8, T9 и T12) , чиито таксономичен статус все още не е изяснен.

В България са доказани видовете *T. britovi*, *T. spiralis* и *T. pseudospiralis*.



Сравнителният анализ на три нуклеотидни последователности, които принадлежат към ITS1, ITS2 и ESV, позволява еднозначна идентификация на повечето от таксоните с епидемиологично значение: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis* и *Trichinella-T6*.



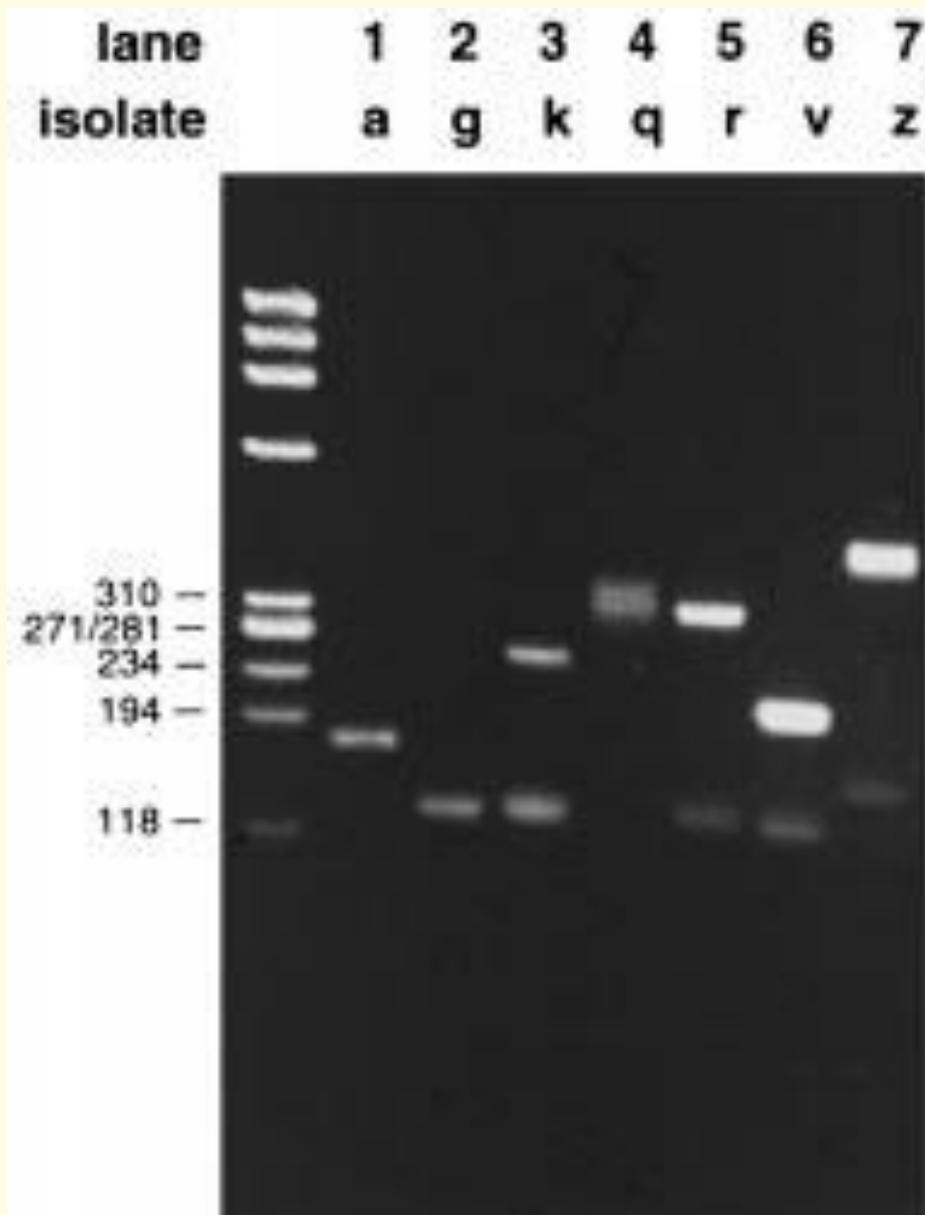
За генотипиране на трихинелните ларви широко се прилага **мултиплексната PCR**. При разработения от Zarlenga и съавт. (1999) мултиплексен PCR анализ се генерира уникален електрофоретичен профил от ДНК бандове.

Мултиплексният nested PCR метод, протича в два етапа – в първия се използват две двойки праймери, а във втория – пет двойки праймери.



- Анализът се осъществява чрез електрофореза на продуктите от амплификацията през 2% агарозен гел.
- За контрола се използват лабораторни щамове на *T. spiralis* и *T. britovi* с доказана видова принадлежност.
- Продуктите от амплификацията са с характерни големини, позволяващи разграничаване на трихинелните видовете: за *T. spiralis* – **173bp** и за *T. britovi* – **127 и 253bp**.





Фиг. 1. Електрофоретично разделяне през агарозен гел на продукти от мултиплексна PCR:

- (1) *T. spiralis*;
- (2) *T. nativa*;
- (3) *T. britovi*;
- (4) *T. pseudospiralis*;
- (5) *Trichinella T5*;
- (6) *Trichinella T6*;
- (7) *T. nelsoni*

Маркерът за молекулно тегло е разградена с *NotI* фХ174 ДНК.

(Източник: Zarlenga, D.S.M., et al. Int. J. Parasitol. 1999, 29, 1859–1867)

МАТЕРИАЛИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ

- Биопсичен и постмортален материал от засегнати мускули или месо (местен продукт, кайма)
- Пробата (50 g) се смела с изкуствен стомашен сок (8 ml солна киселина и 5 g пепсин в 1 литър вода) в съотношение 1:20 (месо:стомашен сок).
- Получената от разграждането на месото жълтеникава течност се прецежда през цедка в конични чаши и се оставя 20 мин. да се утаи.
- Седиментът се изтегля и се поставя в петриева паничка, предметно или часовниково стъкло.
- Микроскопирането се извършва на увеличение 100x



Фиг. 2. ТРИХИНЕЛНА ЛАРВА СЛЕД ИЗОЛИРАНЕ С ИЗКУСТВЕН СТОМАШЕН СОК



За молекулярно типизиране пречистените ларви се съхраняват в 70% етанол в хладилник.

Единични ларви се суспендират в 5 μ l вода и замразяват при минус 20°C до използването им за изолиране на ДНК.



Екстракция на ДНК

➤ **1-ви метод - процедура, описана от Zarlenga и съавт. (1999).**

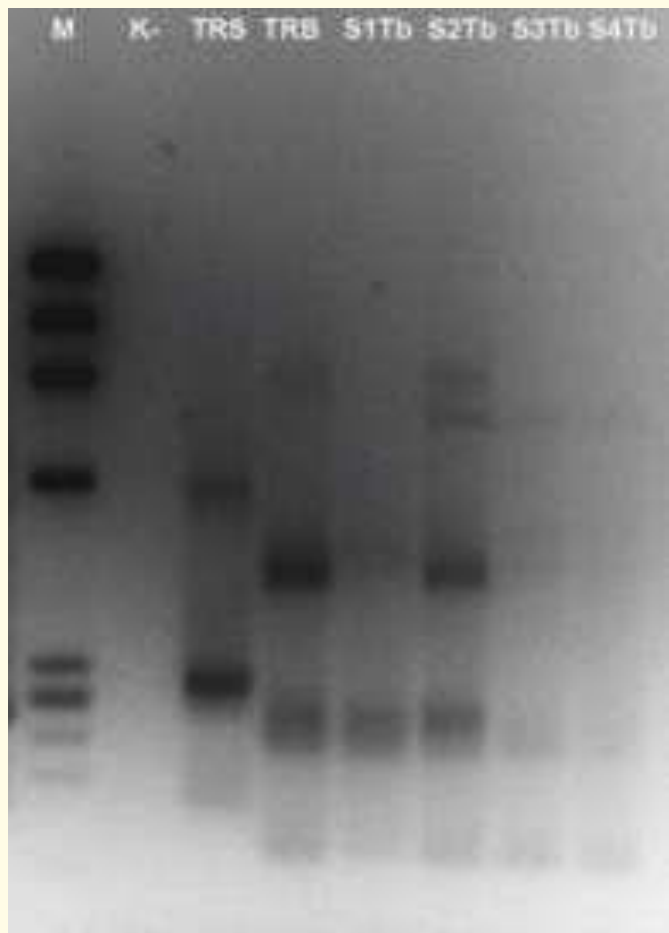
- Единични ларви се поставят в епруветка с 15 μ l PCR буфер, инкубират при 90°C за 15 мин.
- Температурата се понижава до 65°C, добавят се 10 μ g/ml протеиназа K, пробите се инкубират за цяла нощ.
- Инактивирането на протеиназа K се извършва чрез повишаване на температурата до 90°C за 15 мин.

➤ **2-ри метод - Екстракция на ДНК с търговски кит**

- Следва се протокола на производителя на кита, използван за изолиране на ДНК.



Фиг. 2. Видова идентификация на *TRICHINELLA* ЧРЕЗ МУЛТИПЛЕКСНА РСР.



2,5% агарозен гел, оцветен с етидиев бромид.

Стартове:

(M) Маркер – ФХ174 HaeIII/RF;

(2) K-,

(3) *T. spiralis*;

(4) *T. britovi*;

(5-8) диагностични проби, 4 единични ларви, изолирани

от луканка от дивечово месо

(отстреляно диво прасе), гр. Казанлък, март 2016 год.

БИОМОЛЕКУЛЯРНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ВИДОВИЯ СЪСТАВ НА ПРИЧИНИТЕЛТЕ НА ТРИХИНЕЛОЗНИ ВЗРИВОВЕ ЗА ПЕРИОДА 2013-2017 ГОДИНА

- От част от регистрираните в страната трихинелозни взривове при хората са събрани ларви на *Trichinella spp.* от заразено месо от домашни и диви животни.
- Идентифицирани са два вида – *T. britovi* и *T. spiralis*.
- По отношение на гостоприемника, преобладаващият вид сред дивите свине е *T. britovi* (n = 5), за периода в проби от диво прасе не е идентифициран видът *T. spiralis*.
- Сред изолатите, получени от продукти от домашни животни *T. britovi* е открит в 2 случая, а *T. spiralis* - в 1.
- Сред естествено инфектираните диви животни, които не са свързани с епидемиите, е установен само видът *T. britovi*.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Молекулярно-биологичните методи:
 - имат важна роля в диагностиката, управлението и мониторинга на паразитните заболявания.
 - са високо ефективни и чувствителни за откриване на паразитни инфекции, независимо от типа инфекция и предоставените за изследване материали.
 - помагат за контролиране на смъртността от паразитните заболявания.



Националната референтна лаборатория за диагностика на паразитозите към НЦЗПБ, разполага с необходимата апаратура, диагностикуми и квалифициран персонал за извършване на молекулярно-диагностична дейност в областта на паразитните заболявания, вкл. определяне на видовия състав на причинителите на трихинелоза при животните и в този аспект би могла да бъде от полза както в областта на хуманната, така и в областта на ветеринарната медицина при дейности касаещи опазващи общественото здраве.



Благодаря за вниманието!

