

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ИНДИКАЦИЯ ГРИБОВ РОДОВ *ASPERGILLUS* И *ASCOSPHEAERA*

Шуралева Э.А.^{1,2}, Мухомин М.Н.^{1,2}, Нудайшиминье Э.В.¹, Хаммадов Н.И.², Осман К.А.²,

Петрова Е.А.², Фаизов Т.Х.²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет

²ФЦ микотоксикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань

Широкая номенклатура грибов рода *Aspergillus*, ведущее место по числу таксонов, распространению и биологической активности среди представителей класса *Deuteromycetes*, во многом обуславливают актуальность вопроса индикации аспергиллеза. Большинство их являются фитопатогенными, а токсигенные свойства проявляются в организме как человека, так и разных видов животных, микроорганизмов, насекомых, в том числе пчел [1]. Наиболее часто в Российской Федерации и других странах причиной заболеваний пчел являются такие возбудители этого рода, как *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* и другие. Наряду с грибами рода *Aspergillus* немаловажное значение в патологии пчел имеет и другой род – *Ascospheara*, который представлен только одним специфичным для пчел видом *A. aris*. Дифференциация возбудителей этих основных микозов пчел на ранних стадиях позволяет своевременно предпринять меры по подавлению их распространения, сохранению пчелосемей и получению безопасной для человека продукции пчеловодства [2, 3].

Пчелы заражаются аспергиллезом в основном при употреблении нектара и пыльцы, где содержатся споры гриба. Ткани расплода и взрослых пчел разрушаются в результате патогенного действия токсинов, выделяемых грибами. Аскофероз проявляется в основном в сырую холодную погоду. Личинки покрываются плесенью, приобретают желтый цвет. Взрослые пчелы не болеют, но могут являться носителями гриба *A. aris*.

Недостаток оперативных способов индикации и идентификации возбудителей данных микозов [4] направило вектор наших исследований на создание ПЦР тест-системы для дифференциальной диагностики аспергиллеза и аскофероза. Классическая лабораторная диагностика микозов пчел основывается на микологических исследованиях с оценкой культурально-морфологических свойств выделяемых культур грибов. Недостаток заключается в том, что метод является длительным по времени и не всегда позволяет провести точную идентификацию выросшей культуры [4, 5].

Нами разработана дифференциальная диагностика аспергиллеза и аскофероза пчел на основе молекулярно-генетических подходов. Разработанная нами тест-система основана на использовании специфических нуклеотидных последовательностей геномов биоценозов пчел. Это позволяет использовать ее для ранней индикации и идентификации возбудителей аспергиллеза и аскофероза в биотических (пчелы, личинки), биогенных (продукты пчеловодства) объектах, и компонентах окружающей среды (растения, инвентарь и т.д.).

Ранее проведенный биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей участков ДНК грибов рода *Ascospheara* – *A. aris* и рода *Aspergillus* – *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* позволил сконструировать оптимальные праймеры и зонды с целью дальнейшего их использования в разработке ПЦР тест-системы для дифференциальной индикации возбудителей аскофероза и аспергиллеза пчел. Была определена их высокая специфичность и чувствительность в отношении различных штаммов биоценозов микозов пчел.

Набор тест-системы для дифференциальной индикации микозов. Разработанный нами набор реагентов для проведения ПЦР включает комплект для выделения ДНК из исследуемого материала; комплект для ПЦР-амплификации ДНК в режиме реального времени; комплект контрольных образцов. Комплект для выделения ДНК из исследуемого материала состоит из лизирующего раствора, сорбента, растворов для отмывки, элюирующего раствора. В комплект для ПЦР-амплификации ДНК входит: ПЦР-смесь 1 ASP (общие компоненты с праймерами и зондом, специфичными роду *Aspergillus*), ПЦР-смесь 2 ASC (общие компоненты с праймерами и зондом, специфичными роду *Ascospheara*). Комплект контрольных образцов состоит из положительного контроля 1 – ДНК рода *Aspergillus*, положительного контроля 2 – ДНК рода *Ascospheara*, отрицательного контроля. Комплекты реагентов для проведения ПЦР могут храниться в холодильнике или транспортироваться при температуре +2 – 8 °С не более 5 сут. Используемые компоненты реагентов для изготовления ПЦР-смеси и комплекты контрольных образцов хранятся в морозильной камере при температуре –20 °С, а срок их годности составляет 12 мес с даты изготовления.

Отбор материала для исследования. Материалы из ульев (пчелы и личинки) и продукты пчеловодства отбирают отдельными инструментами. Материалы, которые могут быть подвергнуты анализу: образцы пчел – 10-50 шт с одного улья, образцы личинок – 10-50 шт с одного улья, мед – 5-50 мл, другие продукты пчеловодства – 10-50 г, вода (питьевая, сточная, из водоемов) – 20-100 мл, почва – 10-50 г, соскобы с инвентаря – 0,1-10 г. Биологический материал доставляется в лабораторию в чистой посуде в течение суток. Допускается хранение вышеперечисленного материала до проведения исследования в течение суток в холодильнике при температуре +2 – 8 °С и длительно в морозильной камере при температуре –20 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала. Подготовка исследуемого материала. Для подготовки

исследуемого материала используют разные инструменты: пестики, стерильные ступки, пинцеты, ножницы, скальпели, пипеточные дозаторы разных объемов, наконечники с аэрозольным барьером и полипропиленовые пробирки объемом от 1,6 до 10,0 мл. Воду центрифугируют 15–20 мин на центрифуге при 10000 об/мин, верхнюю фракцию удаляют, оставив в пробирке 50 мкл. Мед, продукты пчеловодства, образцы пчел и личинок, почву, соскобы с инвентаря тщательно растирают в гомогенизаторах

или с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавляя стерильный физиологический раствор (из расчета примерно 1:1), и тщательно перемешивают. 500 мкл полученной суспензии переносят в стерильные пластиковые пробирки объемом 1,5 мл. Пробирки центрифугируют при 13000 об/мин в течение 10 мин. Удаляют надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция). Полученный материал готов для выделения ДНК.

Методика проведения дифференциальной индикации микозов пчел. Работа в режим реального времени, проведение ПЦР включает следующие основные этапы: выделение ДНК, амплификация и детекция с учетом результатов. Из исследуемого материала, которым служат образцы пчел, личинок, мед, другие продукты пчеловодства, пробы компонентов окружающей среды, выделяют ДНК. Твердофазная сорбция заключается в следующем: лизис исследуемого материала, в качестве детергента используется насыщенный раствор гуанидина тиоционата; сорбция ДНК на сорбенте; неоднократные отмывки; эликция ДНК в элюирующий буфер. Амплификация полученного специфического участка ДНК возбудителей аспергиллеза и аскофероза происходит в программируемом амплификаторе, в котором после активации фермента происходит многократное повторение циклов денатурации и отжига олигонуклеотидов (праймеры и зонды). Во время начала нового (отдельного) цикла (нагрев с 60 до 94°C) с помощью фермента Taq-полимеразы происходит синтез комплементарных цепей ДНК и в режиме реального времени автоматически детектируются результаты ПЦР посредством измерения флуоресценции соответствующей реакционной смеси.

Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора проводится автоматически во время амплификации. Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется с помощью программного обеспечения, поставляемого

с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором. В образцах, содержащих ДНК рода *Aspergillus* и/или ДНК *Ascosphaera* программа фиксирует положительный результат для *Aspergillus* и/или *Ascosphaera* соответственно. При учете результатов с помощью ПЦР-детектора программа фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфичности (наличие ДНК рода *Aspergillus* и/или ДНК *Ascosphaera*) попадает в зону неопределенности результатов. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

Аналитические характеристики разработанной методики. Чувствительность разработанной тест-системы при исследовании проб объектов окружающей среды, биологического материала и чистых культур *A. fumigatus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans* и *A. niger* составляет 1×10^2 м.к./мл. Специфичность проверялась на изолятах и штаммах грибов как этих родов, так и других (*Basidiomycota*, *Emeticella*, *Neosartorya*, *Alachnomyces* и *Trichorhynchon*), а также ДНК человека и пчелы. Неспецифических реакций (ложноположительных результатов) при тестировании не выявлено.

Заключение. Таким образом, созданная ПЦР тест-система может быть внедрена в ветеринарную практику для ранней диагностики основных микозов пчел, а также мониторинга их возбудителей в окружающей среде, в том числе в объектах пчеловодства, а дифференциальная идентификация возбудителей аспергиллеза и аскофероза позволит провести своевременные мероприятия по подавлению распространения заболеваний с использованием соответствующих антимикотических средств.

Список литературы

1. Мухоминов М.Н., Вахитова Д.Г. Потенциальная патогенность штаммов грибов рода *Aspergillus* для медоносных пчел. Иммунопатол., аллергол, инфектол. 2010; 1: 119–20.
2. Смирнов А.М., Клочко Р.Т., Лутанский С.Н. Ветеринарно-санитарные мероприятия на пасаках. Ветеринария. 2000; 8: 3–6.
3. Клочко Р.Т., Лутанский С.Н. Болезни пчел: проблемы и решения. Пчеловодство. 2011; 9: 28–31.
4. Дьяков Ю.Т., Шнырева А.В., Сергеев А.Ю. Введение в генетику грибов. М.: Academia, 2005.
5. Jensen AB, Aronstein K, Flores JM, Vorvodic S, Palacio M, Sptvak M. Standard methods for fungal brood disease research. J Apic Res. 2013; 52(1): doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.13.