



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.1.009>



Шуманская С.Ю.✉, Григорьева Е.Е., Дронина А.М., Фомина Е.Г.
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Беларусь

Сравнительный анализ методов выделения генетического материала из фекальных образцов и пути оптимизации молекулярно-генетической диагностики лямблиоза

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: обзор литературы – Шуманская С.Ю., Дронина А.М.; концепция и дизайн исследования – Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е., Дронина А.М., Шуманская С.Ю.; сбор материала, проведение лабораторных исследований – Шуманская С.Ю.; статистическая обработка данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста – Шуманская С.Ю., Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е.; редактирование – Дронина А.М., Фомина Е.Г.

Благодарности: лаборатории биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных инфекций Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии – за предоставленную возможность выполнения исследования, 24-й городской поликлинике спецмедосмотров и кафедре детских инфекционных болезней Белорусского государственного медицинского университета – за предоставление образцов биологического материала.

Подана: 11.08.2023

Принята: 12.02.2024

Контакты: s.shumanskaia@mail.ru

Резюме

Введение. Возбудителем лямблиоза является *Giardia lamblia* – одноклеточное простейшее, поражающее преимущественно желудочно-кишечный тракт человека и животных, что вызывает существенное нарушение состояния здоровья и приводит к неблагоприятным социально-экономическим последствиям.

Цель. Определение оптимального метода экстракции генетического материала для успешной молекулярно-генетической диагностики лямблиоза.

Материалы и методы. Получено и исследовано 57 образцов фекалий, ДНК *Giardia lamblia* удалось обнаружить в 6 образцах с помощью ПЦР-диагностики в режиме реального времени. Выделение ДНК из образцов осуществлялось с использованием 3 методов: колоночного выделения, экстракции на сорбенте и многократного замораживания/оттаивания с последующей обработкой протеиназой К.

Результаты. Несмотря на простоту получения материала, фекалии являются сложными для молекулярно-генетических исследований образцами, т. к. обладают неоднородной структурой и содержат большое количество ингибиторов ПЦР. Ключевым моментом для контроля достоверности результатов экстракции ДНК из фекальных образцов является использование внутреннего контрольного образца. Применяемые в настоящее время коммерческие наборы реагентов, предназначенные для выделения из фекалий генетического материала, позволяют получить надежные результаты диагностики лямблиоза при условии осуществления дальнейшей амплификации ДНК *Giardia lamblia*. Регистрация порогового сигнала при ПЦР-диагностике не зависела от концентрации тотальной ДНК, полученной в ходе экстракции и измеренной спектрофотометрическим методом.

Заключение. ПЦР-диагностика паразитарных инвазий, в частности лямблиоза, является надежным, высокочувствительным и специфичным методом исследования, хотя и достаточно трудоемким. Внедрение его в практику способствует улучшению качества диагностического поиска, а также снижению времени постановки диагноза, затрат на лечение и дополнительные исследования, а также будет содействовать установлению особенностей эпидемического процесса лямблиоза на территории Беларуси и усовершенствованию санитарно-противоэпидемических мероприятий.

Ключевые слова: лямблиоз, протозооз, инвазия, генетический материал, экстракция ДНК, молекулярно-генетическая диагностика, ПЦР в реальном времени, ингибирование ПЦР-реакции

Sviatlana Yu. Shumanskaya✉, Elena E. Grigorieva, Alina M. Dronina, Elena G. Fomina
Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology,
Minsk, Belarus

Comparative Analysis of Genetic Material Extraction Methods from Fecal Samples and Optimization Ways for Molecular Genetic Diagnosis of Giardiasis

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: literature review – Sviatlana Yu. Shumanskaya, Alina M. Dronina; study concept and design – Elena G. Fomina, Elena E. Grigorieva, Alina M. Dronina, Sviatlana Yu. Shumanskaya; material collecting, laboratory research – Sviatlana Yu. Shumanskaya; statistical data processing, results analysing and interpreting, text writing – Sviatlana Yu. Shumanskaya, Elena G. Fomina, Elena E. Grigorieva; editing – Alina M. Dronina, Elena G. Fomina.

Acknowledgments: the authors express their gratitude to the laboratory of biotechnology and immunodiagnostics of especially dangerous infections of the Republican Research and Practical Center of Epidemiology and Microbiology for the opportunity to perform the study, and to the 24th City Polyclinic for Special Medical Examinations and the Department of Pediatric Infectious Diseases of the Belarusian State Medical University for providing samples of biological material.

Submitted: 11.08.2023

Accepted: 12.02.2024

Contacts: s.shumanskaia@mail.ru

Abstract

Introduction. The causative agent of giardiasis is *Giardia lamblia*, a single-celled protozoan that mainly affects the gastrointestinal tract of humans and animals, causing significant health impairment and leading to adverse social and economic consequences.

Purpose. To determine the optimal method of genetic material extraction for successful molecular genetic diagnosis of giardiasis.

Materials and methods. A total of 57 fecal samples were obtained and analyzed; *Giardia lamblia* DNA was detected in 6 samples by real-time PCR diagnostics. DNA extraction from the samples was carried out by three methods: column extraction, sorbent extraction, and repeated freezing/thawing followed by treatment with proteinase K.

Results. The key point for verifying the validity of DNA extraction results from fecal samples is the use of an internal reference sample. The currently used commercial reagent kits intended for genetic material extraction from feces allow obtaining reliable results of giardiasis diagnostics, under condition of further amplification of *Giardia lamblia* DNA.



The threshold signal registration in PCR diagnostics did not depend on the concentration of total DNA obtained by extraction and measured spectrophotometrically.

Conclusion. PCR diagnostics of parasitic invasions, in particular giardiasis, is a reliable, highly sensitive and specific method, although rather laborious. Its introduction into practice will contribute to improving the quality of diagnostic searching, as well as reducing the diagnostic time, treatment costs and additional tests, and will promote establishing specific features of the epidemic process of giardiasis in Belarus and enhancing sanitary and anti-epidemic measures.

Keywords: giardiasis, protozoosis, invasion, genetic material, DNA extraction, molecular genetic diagnostics, real-time PCR, PCR inhibition

■ ВВЕДЕНИЕ

Лямблиоз – это инфекционное заболевание человека и животных, преимущественно с вовлечением желудочно-кишечного тракта, вызываемое паразитическими простейшими *Giardia lamblia*. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире от инвазии страдает 280 миллионов человек, наиболее высокие уровни заболеваемости регистрируются в развивающихся странах [1]. Фекально-оральный механизм передачи является наиболее характерным для данной инвазии. *Giardia lamblia* в жизненном цикле имеет 2 формы: высокоустойчивую к факторам окружающей среды форму цисты и активно размножающуюся в тонком кишечнике и колонизирующую его, вызывая заболевание, форму трофозойта [2]. Несмотря на то, что *Giardia lamblia* является кишечным паразитом, присутствие его в организме приводит к разнообразным клиническим проявлениям не только со стороны желудочно-кишечного тракта, но и центральной нервной системы, кожи и других органов [3].

В связи с разнообразием клинических симптомов, а также отсутствием специфических маркеров при «традиционных» лабораторных исследованиях диагноз «лямблиоз» полностью зависит от результатов выполнения данных исследований. Исследование образцов стула с помощью классической микроскопии используется повсеместно в Республике Беларусь как быстрый, недорогой и простой метод. Однако микроскопия обладает низкой чувствительностью, и ее результаты в значительной степени зависят от навыков специалиста, осуществляющего исследование, а также от количества цист в материале, времени доставки образцов в диагностические лаборатории, особенностей жизненного цикла возбудителя. Во многих странах для диагностики лямблиоза используется иммунохроматографический метод выявления антигена простейшего, который может быть рассмотрен как экономически эффективная альтернатива микроскопии. Описанные «традиционные» методы могут обладать низкой чувствительностью при малом содержании возбудителя в исходном образце, а также не дают представления о различиях генетических вариантов *Giardia lamblia*, циркулирующих на территории нашей страны.

В настоящее время «золотым стандартом» лабораторной диагностики инфекционных и многих неинфекционных агентов является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Методы, основанные на выявлении генетического материала *Giardia lamblia*, обладают высокой чувствительностью и специфичностью, а также являются эффективными при низкой паразитологической нагрузке и могут использоваться как важный

инструмент для быстрой постановки диагноза и дальнейшей эффективной этиотропной терапии.

Однако использование метода ПЦР может быть затруднено для диагностики лямблиоза по нескольким причинам. Во-первых, ПЦР по-прежнему ошибочно считается дорогостоящим методом исследования, хотя затраты на него значительно ниже того скрытого экономического и социального ущерба, который наносят паразитарные инвазии.

Во-вторых, осуществление ПЦР-диагностики в отношении *Giardia lamblia* связано с необходимостью проведения обязательного этапа выделения генетического материала из биологических образцов (фекалий). Трудности этого этапа могут возникать при решении двух ключевых задач – разрушении цист лямблий и очистке образцов от ингибиторов ПЦР.

На практике свежесобранные образцы биоматериала (фекалий) перед проведением исследований часто проходят стадию замораживания в связи с необходимостью доставки образцов в специализированные лаборатории для проведения ПЦР. Трофозоиты паразита разрушаются уже через несколько часов после отбора пробы, без этапа замораживания. В полученных образцах, как правило, остаются высокоустойчивые к действию неблагоприятных факторов среды, стабильные инвазивные формы – цисты. Размер наружной стенки зрелой цисты составляет около 300 нм, для сравнения – величина клеточной стенки грамотрицательных бактерий колеблется от 14 до 17 нм. Поэтому трудность процесса выделения заключается в необходимости разрушения этой защитной оболочки достаточно трудоемкими и агрессивными методами для получения генетического материала с целью его дальнейшего исследования.

Второй трудновыполнимой задачей при исследовании фекальных образцов является необходимость минимизации количества ингибиторов ПЦР. Из-за неинвазивности, удобства получения и информативности отражения состояния организма образцы кала являются широко используемым материалом для проведения исследований. Однако метод ПЦР, основанный на анализе образцов стула, может быть менее чувствительным из-за присутствия большого количества ингибиторов ПЦР, которыми являются липиды, билирубин, соли желчных кислот, полисахариды из слизи, бактерии микробиоты, продукты разложения пищи и др. Сложность исследования также заключается в том, что не существует одинаковых по своим свойствам образцов, так как состав проб зависит от множества факторов (характер питания, особенности работы желудочно-кишечного тракта, наличие/отсутствие хронических заболеваний и/или патологий, состав микробиоты и др.). Ингибиторами ПЦР также могут являться вещества, используемые на этапе обогащения образцов: дихромат калия или формалин.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение оптимального метода экстракции генетического материала для успешной молекулярно-генетической диагностики лямблиоза.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 57 образцов биологического материала (фекалий), собранных от пациентов с симптомами, не исключающими лямблиоз.



Выделение ДНК *Giardia lamblia*

Для осуществления исследования использовалось 100 мкг каждого образца стула. Нуклеиновую кислоту экстрагировали непосредственно из цельных образцов фекалий, без какой-либо дополнительной подготовки.

Для сравнительного анализа выделения нуклеиновых кислот использовались коммерческие наборы AccuPrep Stool DNA Extraction Kit (BIONEER, Республика Корея) и «S-Сорб» (СИНТОЛ, Российская Федерация) в соответствии с инструкциями производителей и модифицированный метод многократного замораживания/оттаивания с обработкой протеиназой К и последующей фенол-хлороформной экстракцией.

Для повышения точности и достоверности полученных результатов выделения к каждому образцу добавлялось равное количество экзогенного внутреннего контрольного образца (далее – ВКО, IAC (английский вариант)) из набора для генодиагностики *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* «Прото-ПЦР/РВ» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь.

Генетический материал из каждой пробы элюировали в 50 мкл буфера. Очищенные образцы ДНК хранились при – 20 °С до дальнейшего использования.

ПЦР в режиме реального времени

Полученный генетический материал проанализирован методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием отечественного набора для генодиагностики *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* «Прото-ПЦР/РВ» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь) и коммерческого набора «ФБио – ДНК *Giardia lamblia*» (ООО «ФБио», Российская Федерация) в соответствии с инструкцией производителя. Для осуществления исследования использовалось по 5 мкл очищенных образцов ДНК. Постановку ПЦР осуществляли на термоциклере Quant Studio 5.0 (Applied Biosystems, США). Обработку полученных данных проводили в программной среде Quant Studio Design and Analysis Software 1.3.1 (Applied Biosystems).

Оценку концентрации и чистоты полученных нуклеиновых кислот осуществляли по поглощению света при длине волны 260 и 280 нм спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoPhotometer® NP80 (Implen, Германия).

Остатки каждого образца биоматериала были маркированы соответствующим образом и хранились без каких-либо консервантов при температуре –20 °С до дальнейших исследований.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-генетическое исследование образцов для выявления *Giardia lamblia*

За время проведения исследований из организаций здравоохранения получено 57 образцов биоматериала (проб стула). В связи с тем, что фекалии были отобраны у пациентов с симптомами, не исключающими лямблиоз, было решено относиться ко всем образцам как к «условно положительным». В каждый образец на начальном этапе экстракции нуклеиновой кислоты было добавлено равное количество внутреннего контрольного образца (плазмидная ДНК, кодирующая специальный ген-мишень). В тождественных лабораторных исследованиях осуществлено выделение

генетического материала с последующей ПЦР-диагностикой в режиме реального времени. Из 57 образцов после ПЦР в режиме реального времени на наличие ДНК *Giardia lamblia* положительные результаты получены в 6 образцах.

Сложность исследований заключалась в наблюдении эффекта ингибирования ПЦР-реакции, которое отслеживалось по наличию/отсутствию пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала ВКО пороговой линии (Ct – пороговый цикл). При проведении лабораторных экспериментов ингибирование сигнала выхода ВКО и генетического материала *Giardia lamblia* наблюдалось практически в каждом образце (рис. 1).

Для преодоления этой трудности принято решение о необходимости дополнительного этапа разведения образца генетического материала водой, свободной от нуклеаз. Опытным путем рассмотрены разведения в 2, 5, 10, 20 и 100 раз.

Флуоресцентные сигналы образцов, разведенных в 2 раза, не имели значительных отличий от таковых неразведенных. При рассмотрении варианта разведения в 5 раз выявлено, что значения пороговых циклов сигнала ВКО колебались от 27-го цикла до ингибирования, для ДНК *Giardia lamblia* – в некоторых образцах от 17-го цикла до ингибирования или отсутствия сигнала.

В ходе проведения экспериментальных исследований установлено, что наиболее оптимальным без ущерба для результата ПЦР-диагностики являлось разведение образцов выделенных нуклеиновых кислот 1 к 10.

В ряде случаев понадобилось повторное выделение генетического материала ввиду невозможности преодоления ингибирования ПЦР. Следует обратить внимание на риски получения ложноотрицательных результатов при низком содержании генетического материала *Giardia lamblia* в образцах при чрезмерном разведении пробы.

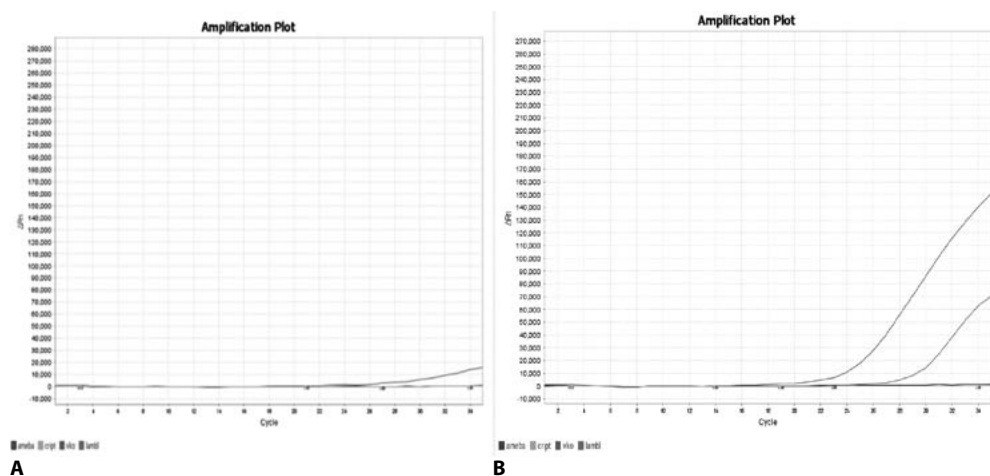


Рис. 1. Кинетика накопления флуоресцентного сигнала ВКО и ДНК *Giardia lamblia*

при исследовании 29-го образца (А – без разведения, В – с разведением в 5 раз)

Fig. 1. Kinetics of fluorescent signal of IAC and *Giardia lamblia* DNA accumulation in 29th sample testing (А – without dilution, В – with 5-fold dilution)

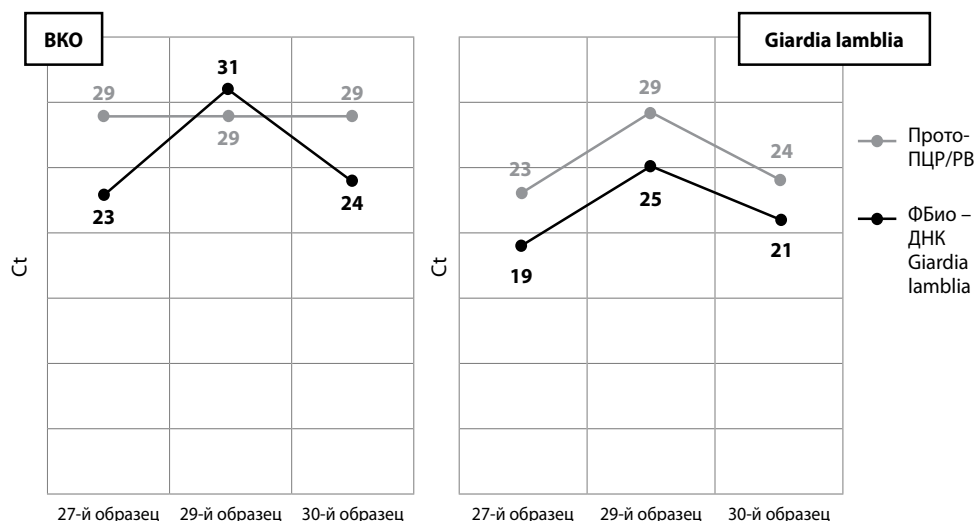


Рис. 2. Сравнение значений порогового цикла для ВКО и *Giardia lamblia* при использовании набора «Прото-ПЦР/РВ» и «ФБио – ДНК *Giardia lamblia*»

Fig. 2. Comparison of threshold cycle values for IAC and *Giardia lamblia* using the reagent kit for *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, and *Entamoeba histolytica* genetic diagnostics by polymerase chain reaction with real-time detection of reaction products "Proto-PCR/RT" and the reagent kit for *Giardia lamblia* DNA detection by real-time polymerase chain reaction "FBio – *Giardia lamblia* DNA"

Положительный результат при использовании отечественного набора реагентов для генодиагностики «Прото-ПЦР/РВ» выявлен в 6 образцах биоматериала, что составило 10,5% от общего количества исследованных образцов. Для валидации полученных результатов молекулярно-генетических исследований использовался коммерческий набор реагентов для выявления ДНК *Giardia lamblia* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «ФБио – ДНК *Giardia lamblia*» (ООО «ФБио», Российская Федерация), имеющий в своем составе эндогенный ВКО. Результаты выявления генетического материала *Giardia lamblia* совпали в 100% случаев.

При более детальном сравнении результатов использования двух наборов было установлено, что флуоресцентный сигнал в положительных образцах при применении отечественного набора регистрировался на 3–5 циклов раньше. Репрезентативные результаты представлены для трех образцов (рис. 2).

Сравнительная характеристика методов экстрагирования ДНК *Giardia lamblia* из биологических образцов (фекалий)

До настоящего времени в лабораторной диагностике лямблиоза отсутствует единый подход для экстракции генетического материала *Giardia lamblia* из биообразцов. В научной литературе описано множество используемых методов разрушения цист простейших с целью выделения генетического материала: многократное замораживание/оттаивание, обработка ультразвуком, кипячение, обработка детергентами, протеиназой К и др. Большое количество исследователей в своих экспериментах

используют коммерческие наборы для выделения ДНК биологических агентов из фекалий [4–8].

С целью установления оптимального метода количественной и качественной экстракции ДНК *Giardia lamblia* для проведения молекулярно-генетических исследований выполнено сопоставление результатов выделения тремя различными методами, которые имели широкое применение согласно литературным источникам. Для сравнительного анализа использовались 6 образцов биоматериала, положительных на наличие гена-мишени *Giardia lamblia* по результатам ПЦР-диагностики в режиме реального времени.

В сравнительную оценку включались: метод колоночного выделения с использованием коммерческого набора AccuPrep Stool DNA Extraction Kit (BIONEER, Республика Корея), метод экстракции на сорбенте коммерческого набора «S-Сорб» (СИНТОЛ, Российская Федерация) и метод, описанный во многих научных статьях в различных модификациях, включающий пробоподготовку (многократное замораживание/оттаивание, обработка протеиназой К) с последующей фенол-хлороформной экстракцией [7, 9]. Во всех трех сравниваемых методах выделения рекомендации по использованию адаптировались для улучшения экстракции ДНК.

В ходе эксперимента оценено время и количество манипуляций, затраченных на пробоподготовку и этап выделения образцов ручным методом и коммерческими наборами, в т. ч. с включением времени инкубации и продолжительности этапов центрифугирования. Для экстракции ДНК с использованием колоночного и сорбентного методов в среднем требовалось от 1 до 1,5 часа, тогда как продолжительность метода многократного замораживания/оттаивания с последующей фенол-хлороформной экстракцией в среднем составила 6–6,5 часа.

Из трех оцененных методов наименее трудозатратным со стороны исследователя оказался метод колоночного выделения с использованием коммерческого набора AccuPrep Stool DNA Extraction Kit, что является фактором, способствующим минимизации риска заноса каких-либо ингибиторов ПЦР извне.

При проведении сравнительного анализа выхода сигналов детекции для ВКО при использовании выбранных методов установлено, что метод многократного замораживания/оттаивания с последующей инкубацией с протеиназой К способствовал более ранней регистрации пороговых циклов, чем при использовании коммерческих наборов (рис. 3).

Обращает на себя внимание «изломленность» кривой, отражающей пороговые циклы ВКО, полученные на основе ДНК, выделенной с использованием «S-Сорб», (разница C_t составляет 8 циклов, от 21 до 29), и относительная «линейность» двух других кривых $\Delta C_t = 3$ и $\Delta C_t = 4$ цикла, характерных для генетического материала, полученного при применении AccuPrep Stool DNA Extraction Kit и фенол-хлороформной экстракции соответственно.

Однако совместная оценка пороговых циклов ДНК *Giardia lamblia* и ВКО показала, что при использовании метода многократного замораживания/оттаивания с инкубацией с протеиназой К кривые флуоресцентного сигнала пересекают пороговую линию на более поздних циклах, чем при использовании для экстракции коммерческих методов, за исключением 30-го образца (рис. 4).

В 34-м образце, выделенном данным методом, сигнал ДНК *Giardia lamblia* выявлен не был, несмотря на регистрацию сигнала ВКО уже на 22-м цикле. Такая особенность

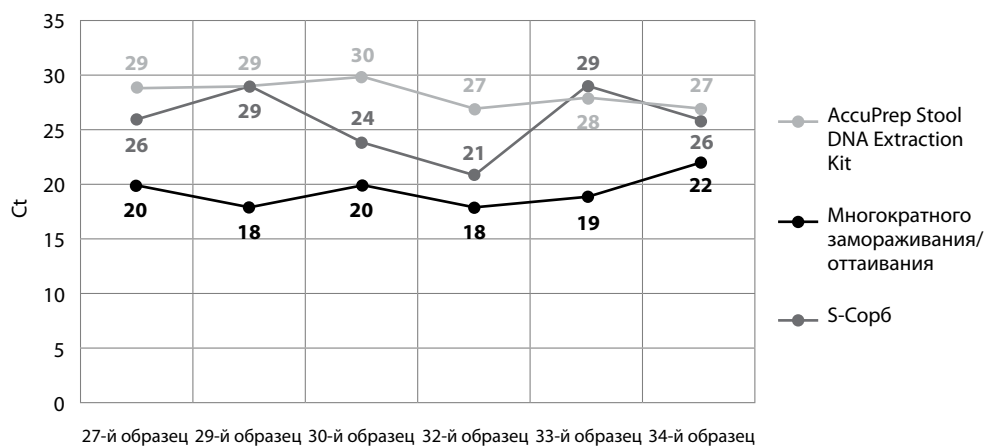


Рис. 3. Детекция пороговых циклов ВКО при исследовании положительных образцов, выделенных тремя методами
Fig. 3. Detection of threshold cycles of IAC in testing of positive samples extracted by three methods

может быть связана с потерей нуклеиновой кислоты патогена при осуществлении многоэтапной фенол-хлороформной экстракции, что привело в конечном итоге к снижению концентрации гена-мишени ниже порога чувствительности его выявления.

Более ранние пороговые циклы детекции ДНК *Giardia lamblia* наблюдались при использовании метода выделения на сорбенте с применением коммерческого набора «S-Сорб» (рис. 4).

Результаты пересечения кривых флуоресцентного сигнала ДНК *Giardia lamblia* пороговой линии, которые были получены при использовании колоночного метода (AccuPrep Stool DNA Extraction Kit, BIONEER, Республика Корея), указывали на его эффективность в отношении проведенных исследований, но C_t регистрировались на более поздних циклах. Такая особенность полученных результатов может быть связана со свойствами самих фекальных образцов, которые могут иметь в составе вещества, препятствующие эффективному протеканию этапов выделения.

Оценка количественных и качественных характеристик выделенного материала осуществлялась спектрофотометрическим методом.

Известно, что макромолекулы поглощают свет, поэтому длины волн, при которых происходит поглощение, и степень поглощения могут использоваться для их качественной и количественной характеристики.

Максимальное поглощение нуклеиновыми кислотами осуществляется при длине волны 260 нм. Это означает, что фотометрическая абсорбция наблюдается при 260 нм и прямо коррелирует с концентрацией ДНК.

Отношение поглощения при длинах волн в 260 нм и 280 нм (260 нм/280 нм) может служить индикатором чистоты полученного образца ДНК. Исследуемый образец ДНК считается «чистым» при соотношении 260 нм/280 нм, приблизительно равном 1,8. Меньшее значение соотношения свидетельствует о большом количестве

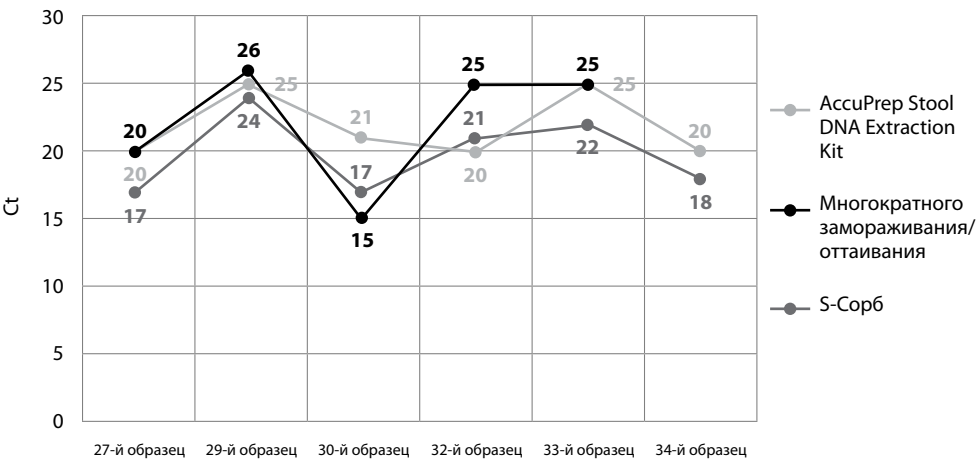


Рис. 4. Детекция пороговых циклов ДНК Giardia lamblia при исследовании положительных образцов, выделенных тремя методами
Fig. 4. Detection of Giardia lamblia DNA threshold cycles in testing of positive samples extracted by three methods

примесей белка, фенола или иных загрязнений, имеющих значительное поглощение при 280 нм [10].

Следует отметить, что для большинства образцов, вне зависимости от используемого набора для выделения ДНК, этот показатель незначительно колебался, близко к коэффициенту 1,8 (рис. 5). Наиболее удаленными от оптимального значения оказались 2 образца, выделенные набором «S-Corb»: № 29 и № 34 с соотношением 260 нм/280 нм, равным 1,4 и 2,1 соответственно.

Концентрации ДНК, полученные при измерениях, имели мало сопоставимые результаты и не давали каких-либо четких представлений об эффективности методик выделения генетического материала (рис. 5). Можно предположить, что такие показатели связаны с особенностями самих исследуемых образцов фекалий, которые не являются гомогенными, с одной стороны, и химическим составом наборов, принципами, лежащими в основе их работы, – с другой.

В среднем измеренные значения концентрации тотальной ДНК при выделении различными наборами отличались не более чем в 2 раза, лишь в одном случае концентрация отличалась более чем в 50 раз.

Исходя из изложенного, важно подчеркнуть, что фекальные образцы – это сложный для исследования биологический материал. Обязательно использование внутреннего контрольного образца на этапе выделения генетического материала для оценки эффективности очистки ДНК и наличия оставшихся ингибиторов ПЦР. Рекомендуется отбирать материал в различных участках, т. к. цисты Giardia lamblia находятся в различных количествах в «местах скоплений», поэтому отсутствует возможность повлиять на вероятность попадания цист в отобранные для исследования 100 мкг.

Полученные разнонаправленные результаты, с одной стороны, дополнительно подтверждают тезис о том, что фекальные образцы являются особым биологическим

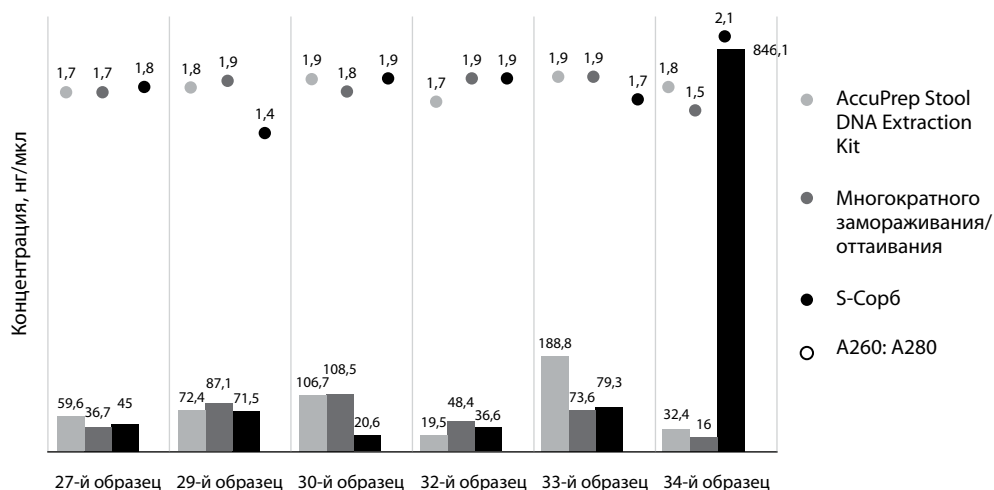


Рис. 5. Качественные и количественные характеристики ДНК *Giardia lamblia*, выделенной различными методами

Fig. 5. Qualitative and quantitative characteristics of *Giardia lamblia* DNA extracted by various methods

материалом, требующим внимательного отношения, но, с другой стороны, могут быть связаны с небольшим количеством исходных положительных образцов, включенных в сравнительный анализ. Однако следует отметить, что методы выделения с использованием сорбента и метод колоночного выделения оказались оптимальными в нашем исследовании по соотношению затраченных на исследование усилий и полученного результата.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что пробы фекалий имеют ряд преимуществ как биоматериал для проведения диагностических исследований, таких как неинвазивность и простота получения, отсутствие специфических условий для хранения или транспортировки, возможности быстрого получения дополнительных образцов и т. д., использование проб стула для проведения ПЦР-диагностики является трудоемким процессом. Универсальный, простой и надежный метод экстракции ДНК особенно необходим для облегчения проведения своевременной и эффективной ПЦР-диагностики лямблиоза, с последующим назначением пациентам этиотропной терапии и эрадикацией возбудителя для предупреждения дальнейшего распространения эпидемического процесса инвазии. Данный метод также поспособствует развитию молекулярно-эпидемиологических исследований, которые помогут выявить генотипические особенности *Giardia lamblia*, циркулирующих на территории Республики Беларусь.

Следует отметить, что важным условием в работе с фекальными образцами является использование экзогенного внутреннего контрольного образца на начальном этапе выделения генетического материала для достоверности полученных результатов и контроля наличия ингибиторов ПЦР. При постановке ПЦР в режиме реального

времени по выходу флуоресцентного сигнала внутреннего контрольного образца можно судить об успешности экстракции генетического материала, в том числе при проведении дополнительных этапов разведения при наблюдении эффекта ингибирования ПЦР-реакции.

Динамика регистрации пороговых значений флуоресцентных сигналов детекции ДНК *Giardia lamblia*, полученной в выполненном нами исследовании при экстракции тремя различными методами, была мало сопоставима с концентрацией тотальной ДНК, что, вероятно, можно связать с недостаточной степенью очистки образцов в процессе выделения, а также с особенностями самих фекальных образцов, которые являются неоднородными по своей структуре.

При качественной оценке методов выделения по соотношению поглощения при длинах волн 260 нм/280 нм результаты всех сравниваемых методов выделения показали незначительные колебания, близкие к требуемому коэффициенту 1,8. Согласно данным сравнительной характеристики методов экстракции ДНК *Giardia lamblia* современные коммерческие наборы с использованием колоночного метода и выделения на сорбенте в своей эффективности не уступали, а по некоторым позициям превосходили «ручной» метод экстракции ДНК.

Внедрение простых и быстрых методов выделения генетического материала в лабораторную практику позволит ускорить получение результатов исследований, повысить их диагностическую надежность, что является важным как для практического здравоохранения, так и для дальнейшего выполнения научных исследований в затронутом направлении.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Einarsson E., Ma'ayeh S., Svärd S.G. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*. 2016;34:47–52. doi: 10.1016/j.mib.2016.07.019.
2. Hemphill A., Müller N., Müller J. Comparative Pathobiology of the Intestinal Protozoan Parasites *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, and *Cryptosporidium parvum*. *Pathogens*. 2019;8(3):116. doi: 10.3390/pathogens8030116.
3. Shestakova M., Fazylova A. Clinical features of giardiasis in patients of different ages *Children's medicine of the North-West*. 2021;4:14–22. (in Russian)
4. Verweij J.J., Blange R.A., Templeton K., Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(3):1220–1223. doi: 10.1128/jcm.42.3.1220-1223.2004.
5. Nishida Y., Morimoto N., Korenaga M., Genotyping *Giardia intestinalis* by Using DNA Extracted from Long-Term Preserved Human Specimens Stained with Chlorazol Black E. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2016;69(3):244–247. doi: 10.7883/yoken.jjid.2014.543.
6. Jerez Puebla L.E., Núñez Fernández F.A., Fraga J., Concordance of *Giardia duodenalis* assemblages determined by different PCR methodologies in three observational studies in Cuba. *Experimental Parasitology*. 2020;209. doi: 10.1016/j.exppara.2019.107814.
7. Minvielle M.C., Molina N.B., Polverino D., First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(1):98–103. doi: 10.1590/s0074-02762008000100015.
8. Lass A., Karanis P., Korzeniewski K. First detection and genotyping of *Giardia intestinalis* in stool samples collected from children in Ghazni Province, eastern Afghanistan and evaluation of the PCR assay in formalin-fixed specimens. *Parasitology Research*. 2017;116(8):2255–2264. doi: 10.1007/s00436-017-5529-4.
9. Babaei Z., Razmjou E., Oormazdi H. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Experimental Parasitology*. 2011;128:159–162. doi: 10.1016/j.jiid.2010.02.2134.
10. Svirid A., Pokhodnya Yu. Workshop on the discipline «Chemical-analytical methods in ecology (BSP). Minsk «ECM of the Ministry of Finance», 2018 teaching aid – International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University. 27–32. Available at: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/194099> (in Russian)