

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Molekulinės biologijos studijų programos IV kurso studentė

Ieva ŠAPOKIENĖ

Bakalaurinis darbas

Mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų identifikavimas naudojant skirtingus pradmenis

Darbo vadovas

Doc., Dr. R. Bernotienė

Vilnius 2017

Gyvybės mokslų centras

**Mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų identifikavimas naudojant
skirtingus pradmenis**

Darbas atliktas Gamtos tyrimų centro P. B . Šivickio parazitologijos laboratorijoje

Ieva Šapokienė

Darbo vadovas

Doc., Dr. Rasa Bernotienė

TURINYS

Santrumpos.....	4
IVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Paukščių hemosporidinių parazitų vystymasis.....	8
1.2. Paukščių hemosporidinių parazitų tyrimai tradiciniais ir molekuliniiais metodais.....	9
1.3. Mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų nustatymas	11
1.3.1. Mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų nustatymas šviesinės mikroskopijos ir PGR metodais.....	12
1.3.2. Mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų aptikimas sekoskaitos analizės ir TA-klonavimo metodu.....	13
1.3.3. Mišrių paukščių hemosporidijų nustatymas lazerinės mikrodisekcijos metodu	14
2. TYRIMŲ METODAI IR MEDŽIAGA	16
2.1. Medžiaga	16
2.2. Reagentai.....	16
2.2.1. Pradmenys	16
2.2.2. Kitos naudotos medžiagos.....	16
2.3. Metodai	17
2.3.1. DNR mėginių paruošimas tyrimui	17
2.3.2. Polimerazės grandininė reakcija.....	17
2.3.3. Elektroforezė	20
2.3.4. DNR nusodinimas	20
2.3.5. Sekų analizė.....	21
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	22
3.1. Rezultatai.....	22
3.1.1. Genetinių linijų nustatymas mėginiuose su pavienėmis infekcijomis, parazitų aptikimas naudojant PGR	22
3.1.2. Mėginių su mišriomis infekcijomis parengimas.....	23
3.1.3. HaemNFI/HaemNR3 ir HAEMF/HAEMR2 pradmenys	23
3.1.4. AE989/AE982 ir HaemF/AE982 pradmenys	24
3.1.5. AE986/AE987 pradmenys.....	24
3.1.6. AE298/AE299 ir AE0064/AE0066 pradmenys	24
3.1.7. COIF/COIR ir COIF2/COIR2 pradmenys	24
3.1.8. ClpCF/ClpCR ir ClpCF2/ClpCR2 pradmenys	25
3.1.9. Tirtų pradmenų jautrumas <i>Haemoproteus</i> ir <i>Plasmodium</i> genčių parazitams	27
3.1.10. Optimalių sąlygų paieška	27
3.2. Rezultatų aptarimas	29
IŠVADOS	32
PADĖKA.....	33
SANTRAUKA	34
SUMMARY	35
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	36

Santrumpos

BLAST (angl. The Basic Local Alignment Search Tool) – sekų panašumą nustatanti programa

bp – bazių pora

ClpC – apikolpasto kazeino proteazės C genas

COI – citochromo oksidazės I genas

dH₂O – distiliuotas vanduo

DNR – deoksiribonukleorūgštis

dNTP – deoksinukleozido-5'-trifosfatas

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

NCBI (angl. National Center for Biotechnology Information) – duomenų bazė

PGR – polimerazės grandininė reakcija

rDNA (angl. ribosomal DNA) – DNR seka koduojanti ribosominę RNR

RNR – ribonukleino rūgštis

TA-klonavimas – sekų, kuriose yra timino ir adenino nukleotidai klonavimas

TBE – tris/borato/EDTA buferis

TE – tris-EDTA buferis

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometanas

IVADAS

Hemosporidiniai parazitai (Apicomplexa: Hemosporida) – protistų grupė, parazituojanči varliagyvių, roplių, paukščių ir žinduolių organizme. Šių parazitų vystymosi ciklui yra būtini bent du šeimininkai – stuburinis, kuriame parazitas dauginasi nelytiniu būdu, ir dvisparnis kraujasiurbis vabzdys, kuriame parazitas dauginasi lytiniu ir nelytiniu būdais. Pastarasis yra galutinis šeimininkas ir pernešėjas (Valkiūnas, 2005).

Laukinėje gamtoje aptinkami Plasmodiidae šeimos maliariniai parazitai kaip modeliniai objektai yra labai svarbūs žmogaus maliarijos tyrimuose. Maliarija plačiai paplitusi šiltuosiuose kraštuose ir nuo šios ligos kasmet miršta daugiau nei 2 mln. žmonių (Martisen ir kt., 2008). *Haemoproteus* genties parazitai yra tiriama mažiau, tačiau jų tyrimai taip pat yra labai reikšmingi, dėl didžiulės rūšių įvairovės ir sukeltų sunkių ir dažnai mirtinų paukščių ligų (Rollison D ir Hay SI, 2012).

Paukščių maliarijos sukėlėjai ir jiems giminingi hemosporidiniai parazitai yra paplitę visame pasaulyje išskyrus Antarktidą, jų įvairovė labai didelė, todėl pastaraisiais metais jie intensyviai tiriama kaip modeliniai organizmai siekiant išaiškinti parazito-šeimininko sąveikas, poveikį šeimininkui: pastaruoju metu plačiai pradėti taikyti jų tyrimai molekuliniiais metodais suteikė galimybę lengviau diagnozuoti parazitus ir atskleidė didelę jų vidurūšinę įvairovę – buvo išaiškinta daugybė šių parazitų genetinių linijų (Valkiūnas, 2005; Atkinson, 2008; Bensch ir kt., 2009; Braga ir kt., 2011; Perkins, 2014).

Tiriant paukščių maliarijos sukėlėjų ir jiems giminingų hemosporidinių parazitų įvairovę šeimininkuose iškyla mišrių infekcijų viename šeimininke problema. Nustatyta, kad mišrios infekcijos kai kuriose paukščių rūšyse sudaro apie 80% visų užsikrėtimo atvejų (Valkiūnas ir kt., 2003, 2006; Beadell ir kt., 2004; Pérez-Tris ir Bensch, 2005; Dimitrov ir kt., 2015). Paukščiai dažnai užsikrėtę ne vienu, o keletui rūšių ar genetinių linijų priklausančiais parazitais, tačiau tiriant juos PGR metodais, dažniausiai aptinkami tik vienos genetinės linijos parazitai ir šis reiškinys, nėra tiesiogiai susijęs su skirtinga parazitų koncentracija paukščių kraujyje (Martinez ir kt., 2009).

Stengiantis išs্পęsti mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų nustatymo molekuliniiais metodais problemą kuriami atskiroms parazitų gentims specifiniai pradmenys, kurie leistų tikslingiau aptikti ir nustatyti vienos kurios nors genties parazito rūšį šeimininko organizme, tačiau dėl šių genčių filogenetinio panašumo yra labai sunku sukurti specifines pradmenų poras galinčias identifikuoti tik vienos genties parazitus. Nepaisant to yra kuriami

pradmenys specifiniai *Haemoproteus* ir *Plasmodium* gentims, o taip pat buvo sukurti pradmenys specifiniai *Plasmodium relictum* rūšies pSGS1 genetinės linijos parazitams (Palinauskas ir kt., 2008). Gamtos tyrimų centro P. B. Šivickio parazitologijos laboratorijoje yra sukaupta gausi paukščių hemosporidinių parazitų medžiaga, todėl naudojantis šia medžiaga tirsiau kai kurių pradmenų gebėjimą nustatyti mišrias paukščių hemosporidinių parazitų infekcijas.

Darbo tikslas: Nustatyti naudojamų pradmenų efektyvumą tiriant eksperimentiškai sukurtas *Plasmodium* ir *Haemoproteus* genčių mišrias infekcijas.

Darbo uždaviniai:

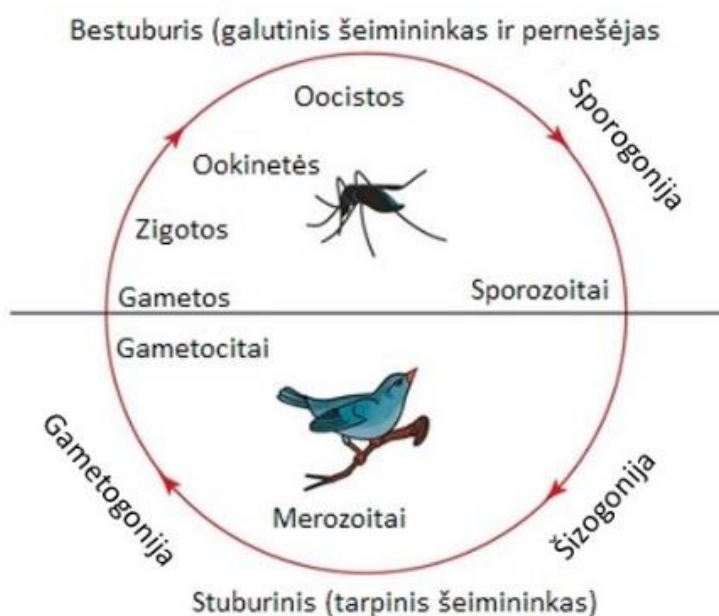
1. Ištirti mėginius su pavienėmis infekcijomis naudojant vieną genetinį žymenį ir parengti mėginius su mišriomis infekcijomis tolimesniems tyrimams;
2. Panaudojant septynis skirtingus genų fragmentus padauginančius pradmenis, nustatyti jų jautrumą eksperimentiškai sukurtų mišrių hemosporidinių paukščių parazitų infekcijų identifikavimui;
3. Nustatyti naudotų pradmenų jautrumą atskiroms parazitų gentims eksperimentiškai sukurtose mišriose infekcijose;
4. Rekomenduoti pradmenis, kurie galėtų būti naudojami mišrių hemosporidinių parazitų infekcijų nustatymui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Hemosporidiniai parazitai yra paplitę laukinėje gamtoje, dažniausiai paukščių kraujyje aptinkamos hemosporidijos priklauso trim gentims: *Haemoproteus*, *Plasmodium* ir *Leucocytozoon*. Šių genčių parazitai infekuoja raudonuosius kraujo kūnelius (*Leucocytozoon* taip pat infekuoja ir baltuosius kraujo kūnelius) ir kitus organus stuburiniame šeimininke (Atkinson ir Van Riper, 1991, Valkiūnas 2005). Hemosporidinių parazitų tyrimai svarbūs evoliucijos ir ekologijos mokslams, dėl šių parazitų lengvo aptikimo infekuotame šeimininke ir infekcijos intensyvumo nustatymo naudojant kraujo tepinėlių analizę. Tokiu būdu yra lengva atskirti užkrėstus paukščius nuo sveikų (Valkiūnas, 2005).

1.1. Paukščių hemosporidinių parazitų vystymasis

Haemoproteus, *Plasmodium* ir *Leucocytozoon* genčių parazitai genetiniu požiūriu yra labai glaudžiai susiję, panašūs ir jų gyvenimo ciklai. Šių parazitų vystymosi ciklui yra būtini bent du šeimininkai – stuburinis, kuriame parazitas dauginasi nelytiniu būdu, ir dvisparnis kraujasiurbis vabzdys, kuriame parazitas dauginasi lytiniu ir nelytiniu būdais (1.1 pav.) (Valkiūnas, 2005).



1.1 pav. Bendrinė hemosporidinių parazitų vystymosi schema (pagal Levin ir Parker, 2016).

Maitinimosi metu infekuotas vabzdys į paukščio organizmą inokuliuoja sporozoitus, kuriems patekus į įvairius organus vyksta nelytinis dauginimasis. Šio proceso metu iš sporozoitų susiformuoja merozoitai, jie toliau migruoja į eritrocitus, kur subręsta iki mikrogametocitų ir makrogametocitų. Vabzdys, besimaitindamas tokio paukščio krauju

įsiurbia infekuotus eritrocitus ir jiems patekus į vabzdžio viduriniąją žarną gametocitai inicijuoja parazito gametogenezę (lytinio dauginimosi procesą). Pagrindinę įtaką gametogenezės pradžiai daro deguonies ir anglies dioksido koncentracijos pasikeitimas gametocitais infekuotam kraujui patekus iš stuburinio į bestuburį. Gametogenezės metu vyksta mikrogametocitų ir makrogametocitų susilieėjimas, susiformuoja zigota, kuri virsta ookinete. Ookinetė prasiskverbia per peritrofinę membraną ir vidurinėsios žarnos epitelį, ir apsupta bazalinio sluoksnio virsta oocista. Oocistai plyšus sporozoitai patenka į hemocelį iš kurio migruoja į seilių liaukas. Kai kraujasiurbis vabzdys pakartotinai maitinasi stuburinio gyvūno krauju, ciklas kartojasi iš naujo (Valkiūnas, 2005).

Esminis skirtumas tarp *Leucocytozoon* ir *Haemoproteus* bei *Plasmodium* genčių yra tas, kad *Leucocytozoon* genties parazitai nei vienoje vystymosi stadijoje neturi maliarinio pigmento – hemozoino, kuris turi tendenciją kauptis mikrogametocitų galuose. Pagrindinis skirtumas tarp *Haemoproteus* ir *Plasmodium* genčių parazitų vystymosi ciklą – hemoproteidų merontai vystosi tik vidaus organuose, o plazmodijų merontai gali vystytis ir organuose ir eritrocituose, kas leidžia lengvai diagnozuoti maliarinių parazitų sukeltą infekciją (Valkiūnas, 2005; Peirce, 1989). Skiriasi šių trijų genčių pernešėjai: Haemoproteidae šeimos parazitus dažniausiai perneša smulkieji mašalai, priklausantys Ceratopogonidae šeimai, ir retais atvejais kraujasiurbės musės, priklausančios Hippoboscidae šeimai; Plasmodiidae šeimos parazitų vektoriais gali būti *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Mansonia* genčių uodai, priklausantys Culicidae šeimai; Leucocytozoidae šeimos parazitų pernešėjai dažniausiai būna kraujasiurbės musės priklausančios Simulidae šeimai, ir labai retais atvejais smulkieji mašalai priklausantys Ceratopogonidae šeimai (Valkiūnas, 2005).

1.2. Paukščių hemosporidinių parazitų tyrimai tradiciniais ir molekuliniiais metodais

Hemosporidinių parazitų aptikimui laukinėje gamtoje dažniausiai naudojama paukščių kraujo tepinėlių analizė arba polimerazės grandininė reakcija.

Kraujo tepinėlių analizė (jos metu Gimzos dažais dažyti preparatai tiriami šviesinės mikroskopijos būdu) ilgą laiką buvo vienas pagrindinių hemosporidinių parazitų aptikimo būdų, tačiau dėl kai kurių šio metodo trūkumų paraleliai pradėti taikyti modernesni molekuliniai tyrimų metodai. Vienas iš trūkumų yra tas, jog dėl mažo parazitėmijos intensyvumo arba morfologiškai panašių rūšių dažnai neįmanoma įvardinti paukščių hemosporidinio parazito rūšies. Kitas trūkumas būtų sudėtinga mėginių analizė, dėl kartais

pasitaikančių atvejų, kai kraujo tepinėliai nusidažo prastai. Nepaisant šių trūkumų mikroskopijos metodas yra geresnė alternatyva tiriant mišrias hemosporidines infekcijas nei PGR pagrindu paremti metodai, ypač tais atvejais, kai mišrią infekciją sudaro gerai morfologiškai besiskiriančios parazitų rūšys ir užsikrėtimo jais intensyvumas yra aukštas (Valkiūnas, 2005; Pérez-Tris ir Bensch, 2005). Šis metodas nėra efektyvus tiriant kelių morfologiškai nesiskiriančių rūšių mišrias infekcijas.

Jau daugiau nei 20 metų PGR metodas yra naudojamas paukščių hemosporidinių parazitų nustatymui. Pirmasis PGR pagrindu veikiantis metodas paukščių hemosporidijų nustatymui identifikavo *Plasmodium* genties parazitus kraujo mėginiuose paimtuose iš Havajuose gyvenančių paukščių. Šio nustatymo metu buvo naudojami pradmenys padauginantys ribosominės RNR 18S subvienetą. Šiuo būdu buvo galima aptikti tik mažą *Plasmodium* genties parazitų grupę, todėl šie pradmenys nebuvo taikomi plačiai (Feldman ir kt., 1995). S. Bensch su kolegomis (2000) sukūrė pirmą plačiai naudojamą PGR protokolą, kuriuo galima identifikuoti tiek *Plasmodium*, tiek *Haemoproteus* genčių parazitus. Šiame protokole naudojamas mitochondrinės DNR citochromo b geno fragmentas. Minėtas protokolas kartu su kitais šiek tiek modifikuotais PGR protokolais (Hellgren ir kt., 2004; Waldenström ir kt., 2004) ir dabar yra plačiai naudojamas paukščių hemosporidinių parazitų tyrimuose (Bensch ir kt., 2009). Vadovaujantis šiais protokolais reikalingos dvi lizdinės PGR reakcijos, padauginančios 619bp ir 478bp citochromo b geno fragmentus, – pirmasis PGR jautrus visoms trimis hemosporidinių parazitų gentims, o antrasis PGR identifikuoja tik *Haemoproteus* ir *Plasmodium* gentims priklausančius parazitus (Bensch ir kt., 2000; Waldenström ir kt., 2004; Hellgren ir kt., 2004). Nors metodas efektyvus nustatant hemosporidinių parazitų DNR, tiriant didelius kiekius pavyzdžių sugaištama nemažai laiko ir reikia daug reagentų. Fallon su kolegomis spręsdamas šią problemą sukūrė standartinį PGR protokolą, kurio metu padauginamas trumpesnis (154bp ilgio) koncervatyvios rDNA regiono fragmentas (Fallon ir kt., 2003). Pradmenys jautrūs nustatant *Haemoproteus* ir *Plasmodium* gentis, tačiau neidentifikuoja *Leucocytozoon* genties parazitų. Šis protokolas yra veiksmingas aptinkant hemosporidinius parazitus, tačiau yra mažai veiksmingas juos identifikuojant, nes trumpa DNR seka yra mažai informatyvi ir negali tiksliai nustatyti patalito rūšies ar genetinės linijos. Siekiant gilinti žinias apie hemosporidinių parazitų genetinę įvairovę bei didinti parazitų aptikimą naudojant PGR metodą pradėta kurti įvairius lizdinės PGR protokolus siekiant nustatyti ir padauginti hemosporidinių parazitų DNR, kurių parazitemijs intensyvumas šeimininke yra žemas (Fecchio ir kt., 2003).

Realaus laiko PGR tapo plačiai naudojamu ir patogiu metodu nustatant ligos sukėlėjus (viruso, bakterijos, parazito DNR) šeimininko organizme (Wang ir kt., 2014; Xu ir kt., 2015). Taip pat šis metodas pradėtas taikyti paukščių hemosporidinių parazitų aptikimui, dažniausiai parazitacijos lygiui arba naujų specifinių linijų nustatymui (Bell ir kt., 2015). Bell su kolegomis atliko bandymą, kurio metu naudodami realaus laiko PGR sėkmingai identifikavo pavienes *Plasmodium*, *Haemoproteus* ir *Leucocytozoon* genčių parazitų infekcijas (Lutz 2015). Prieš bandymą mėginiai buvo ištirti naudojant lizdinės PGR protokolus ir šviesinę mikroskopiją. Šio eksperimento metu tie patys kraujo mėginiai tirti trimis skirtingais metodais ženklių skirtumų neparodė, gauti rezultatai buvo panašūs. Šiuo eksperimentu buvo įrodyta, jog realaus laiko PGR yra toks pats efektyvus kaip ir prieš tai naudoti standartinės ir lizdinės PGR metodai tiriant pavienes paukščių hemosporidines (Bell ir kt., 2015).

PGR principu paremtiems paukščių hemosporidijų tyrimams įgaunant pagreitį S. Bensch su kolegomis (2009) sukūrė MalAvi duomenų bazę, kurioje pateikti visi duomenys apie paukščių hemosporidinių parazitų genetines linijas. Paukščių hemosporidinių parazitų genetinės linijos yra nustatomos pagal mitochondrinės DNR citochromo b geno fragmentą. Daug informacijos taip pat yra sukaupta įvairiuose literatūros šaltiniuose ir Genų banke (NCBI), tačiau šia informacija sunku naudotis dėl kelių priežasčių: skirtingos tyrėjų komandos kartais naudoja ne vienodus genetinių linijų parazitų pavadinimus; mokslininkai naudoja skirtingus genų fragmentus padauginančius pradmenis parazitų identifikavimui (Bensch ir kt., 2009).

1.3. Mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų nustatymas

Naudojant molekulinis tyrimo metodus atrasta nepaprastai didelė hemosporidinių parazitų vidurūšinė įvairovė, tačiau buvo pripažinta, jog šis metodas nėra jautrus nustatant mišrias infekcijas ir dažniausiai gali parodyti tik vieną organizme esančią parazito rūšį ar genetinę liniją. Mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų nustatymo molekuliniiais metodais problemos išsprendimas būtų labai svarbus ne tik atliekant ekologinius ir evoliucinius tyrimus, tačiau ir tam, kad būtų galima geriau įvertinti hemosporidinių parazitų įvairovę gamtoje ir suprasti šeimininko-parazito sąveiką.

1.3.1. Mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų nustatymas šviesinės mikroskopijos ir PGR metodais

Dimitrov ir kt. (2014, 2015) ištyrė tų pačių paukščių mėginius tiek PGR, tiek mikroskopijos būdu nustatė, jog abiejų metodų naudojimas padidina mišrių hemosporidinių infekcijų aptikimo galimybes laukinių paukščių populiacijose. Įrodyta, kad PGR metodas yra ne toks jautrus kaip kraujo mėginių mikroskopavimas nustatant mišrias infekcijas rūšių, kurios skiriasi morfologiniais požymiais. Nepaisant to, tų pačių kraujo mėginių mikroskopijos tyrimas gali neaptikti kraujyje esančių parazitų, organizmo užsikrėtimo parazitais pradžioje, arba esant labai žemai parazitų koncentracijai kraujyje, taip pat mikroskopija yra visiškai nejautri seserinių (morfologiškai identiškų, tačiau priklausančių skirtingoms genetinėms linijoms ar rūšims) hemosporidinių parazitų rūšių nustatymui. PGR metodo jautrumo problemos nustatant mišrias infekcijas sietinos su skirtingu pradmenų jautrumu skirtingoms parazitų genetinėms linijoms arba žemu vienos iš genetinių linijų intensyvumu tiriamojoje medžiagoje, kas lemia mažą išskirtos DNR kiekį. Įdomu tai, jog Zehtindjiev ir kt. (2012) ir Schaer ir kt. (2015) publikavo straipsnius apie tai, kad skirtingi pradmenys aptinka skirtingas genetines linijas nepriklausomai nuo to, kuri parazito rūšis ar genetinė linija dominuoja paukščio organizme. Dar vienas įdomus faktas, jog V. Palinauskas su kolegomis (2015) atliko eksperimentą, kurio metu tyrė du skirtingus iš to paties paukščio tą pačią dieną skirtingomis valandomis paimtus mėginius PGR metodu. Tiriamas paukštis buvo užkrėstas dviejų skirtingų genetinių linijų maliariniais parazitais. Ryte paimtame mėginyje aptikta pavienė *Plasmodium homocircumflexum* (pCOLL4 linijos) rūšies parazito infekcija, o dienos metu paimtame mėginyje – pavienė *P. relictum* (pLZFUL01 linijos) rūšies infekcija. Šis eksperimentas dar kartą patvirtino, jog PGR metodas nėra jautrus nustatant mišrias paukščių hemosporidijų infekcijas ir priklausomai nuo parazito stadijos ar kitų dar nežinomų priežasčių gali parodyti tik vieną kraujo mėginyje esančią infekciją (Palinauskas ir kt., 2015). Pastaruoju metu tiriant mišrias paukščių hemosporidines infekcijas rekomenduojama lygiagrečiai taikyti tiek tradicinius, tiek molekulinis tyrimo metodus (Bernotienė ir kt. 2010).

R. Bernotienė su kolegomis (2016) atliko tyrimus citochromo oksidazės I ir apikoplasto kazeino proteazės C geno fragmentus padauginančių pradmenų jautrumo eksperimentiškai sukurtose mišrioje infekcijose nustatymui. Eksperimento metu buvo tiriamas dvigubų pikų elektroferogramose dažnis esant mišrioms infekcijoms. Nustatyta, jog nei vieni minėtus geno fragmentus padauginantys pradmenys nėra jautrūs mišrių infekcijų nustatymui. Svarbu paminėti tai, jog citochromo oksidazės I fragmentas pSGS1 ir pGRW11

genetinių linijų parazituose yra identiškas, todėl šie pradmenys nėra tinkami mišrių infekcijų nustatymui, jei parazituoja būtent šių genetinių linijų parazitai (Bernotienė ir kt., 2016).

Skirtingų pradmenų jautrumas nustatant mišrias infekcijas dar nėra gerai ištirtas, tačiau šie tyrimai yra labai svarbūs tam, kad galėtume identifikuoti gamtoje taip dažnas mišrias infekcijas, o tuo pačiu geriau suprastume ir daugiau sužinotume apie parazitų įvairovę laukinių paukščių populiacijose.

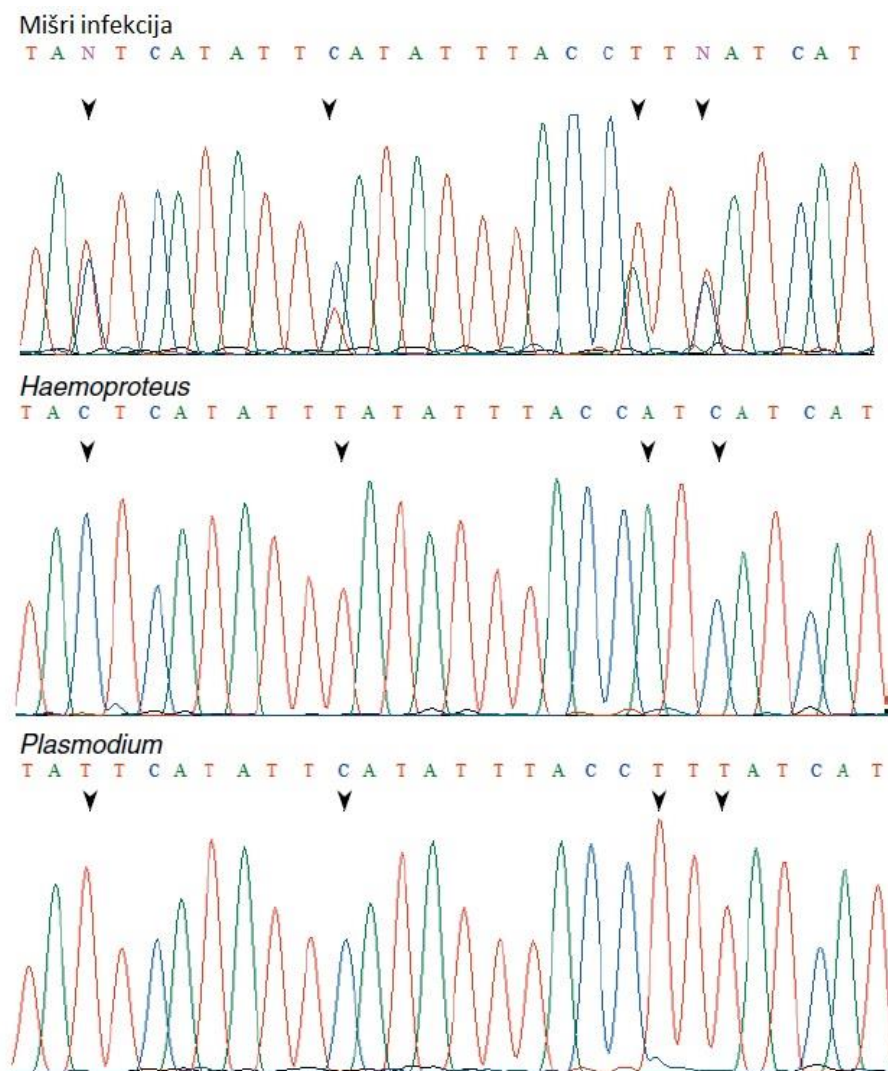
1.3.2. Mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų aptikimas sekoskaitos analizės ir TA-klonavimo metodu

Pérez-Tris ir Bensch (2005) pateikė paprastą ir patikimą metodą mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų nustatymui paremtą citochromo b geno fragmento sekoskaitos analize. Po pirmo padauginimo dvigubos infekcijos nustatomos elektroferogramose (1.2 pav.) aptikus dvigubus nukleotidų pikus (jie parodo, jog mėginyje pasireiškia dviejų genetinių linijų sekos). Jei mėginyje yra randamas bent vienas dvigubas pikas, toks mėginys amplifikuojamas antrą kartą ir gautas PGR produktas klonuojamas įterpus jį į vektorius (Pérez-Tris ir Bensch, 2005).

Pagrindinės metodo problemos: PGR reakcijai naudojama totalinė parazito ir šeimininko DNR (parazito DNR koncentracija mėginyje lyginant su šeimininko DNR koncentracija yra maža), todėl tai gali sukelti DNR pakaitas amplifikacijos proceso metu, ypač tuomet jei jos įvyksta pirmuose cikluose; dėl dvigubų pikų intensyvumo pasikeitimo elektroferogramose sunku įvertinti ar tiriamas individas tikrai yra užsikrėtęs abiejų genetinių linijų parazitais (Pérez-Tris ir Bensch, 2005). Tais atvejais kai genetinės linijos yra žinomos ir skiriasi vos keliais nukleotidais, pagal dvigubus pikus galima identifikuoti abi genetines linijas (lyginant su jau žinomomis sekomis), tačiau daugeliu atvejų kai dvigubų pikų mėginyje yra daug, identifikuoti jame esančias genetines linijas be TA-klonavimo yra neįmanoma (Pérez-Tris ir Bensch, 2005).

Eksperimento metu buvo įrodyta, jog skirtingų genčių (*Haemoproteus/Plasmodium*) mišrias infekcijas gerokai sunkiau identifikuoti nei tos pačios genties (*Plasmodium/Plasmodium* ar *Haemoproteus/Haemoproteus*) mišrias infekcijas, nes dauguma pradmenų yra sukurti naudojant konservatyvias *Plasmodium* genties sekas (Richard ir kt., 2002). Tokiu atveju yra tikimybė jog pirmiausia ir bus padauginami šio parazito genties genai (Pérez-Tris ir Bensch, 2005). Sunku sukurti pradmenis, kurie galėtų amplifikuoti

kiekvienos genties parazitų DNR atskirai dėl šių genčių artimų filogenetinių ryšių ir sekų panašumo (Hellgren ir kt., 2004).



1.2 pav. Pavienių ir mišrių infekcijų elektroferogramų fragmentai (pagal Pérez-Tris ir Bensch, 2005).

1.3.3. Mišrių paukščių hemosporidijų nustatymas lazerinės mikrodisekcijos metodu

Haemoproteus ir *Plasmodium* genčių parazitų stadijų tyrimai pavienėse kraujo ląstelėse ar pernešėjuose lazerinės mikrodisekcijos metodu, gali būti naudojami ir tiriant mišrias paukščių hemosporidinių parazitų infekcijas. Iš pavienių ląstelių, merontų ar oocistų lazerinės mikrodisekcijos būdu “iškirpus” vieną ląstelę ar oocistą (joje paprastai būna keli šimtai genetiškai identiškų ląstelių) galima išskirti parazito DNR, kuri suteiktų informacijos apie parazitų linijas esančias mėginyje ir leistų kurti branduolinius žymenis parazitų genetinėms linijoms nustatyti (Palinauskas ir kt., 2010). Šio metodo pagalba galima išspręsti Pérez-Tris ir S. Bensch (2005) aprašytą problemą dėl parazito ir šeimininko DNR koncentracijų santykio kraujo mėginyje (Pérez-Tris ir Bensch, 2005). Iš tiriamų kraujo

tepinėlių yra iškerpama viena ląstelė (1.3 pav.) ir iš vienos ląstelės išskirta DNR toliau tiriama PGR metodais ir sekvenuojama nustatant, kokiai genetinei linijai priklauso mėginyje esantis parazitas. Šis metodas puikiai tinka eksperimentiškai sukurtoms infekcijoms nustatyti, tačiau taikyti jį tyrimuose norint nustatyti mišrias parazitų infekcijas kraujo mėginiuose paimtuose iš laukinių paukščių, gali būti sudėtinga dėl parazitų genetinių linijų kombinacijų įvairovės infekuotame individe bei jų morfologinio panašumo (Durrant ir kt., 2006; Palinauskas ir kt., 2010). Be to iš vienos ląstelės išskiriamas labai mažas DNR kiekis, kas dažnai lemia prastus PGR rezultatus. DNR išskyrimas iš oocistų teikia didesnę DNR kiekį, tačiau oocistos formuojasi tik pernešėjuose.



1.3 pav. Lazerinės mikrosidekcijos būdu kerpamas parazito (*Plasmodium relictum*) gametocitas. A – ląstelė membraniniame tepinėlyje; B – membraninis tepinėlis su iškirpta ląstele; C – membraninis tepinėlis po ląstelės iškirpimo. Skalė = 10µm (pagal Palinauską ir kt., 2010)

2. TYRIMŲ METODAI IR MEDŽIAGA

2.1. Medžiaga

Tyrimuose naudota DNR medžiaga su pavienėmis infekcijomis yra surinkta Gamtos tyrimų centro P. B. Šivickio parazitologijos laboratorijoje dirbančių darbuotojų. Naudoti ir tirti 26 mėginiai su pavienėmis paukščių hemosporidinių parazitų infekcijomis.

2.2. Reagentai

2.2.1. Pradmenys

Naudoti pradmenys atskiesti 10 kartų.

AE0064 (tiesioginis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

AE0066 (atvirkštinis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

AE298 (tiesioginis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

AE299 (atvirkštinis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

AE982 (atvirkštinis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

AE986 (tiesioginis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

AE987 (atvirkštinis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

AE989 (tiesioginis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

ClpCF (tiesioginis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

ClpCF2 (tiesioginis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

ClpCR (atvirkštinis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

ClpCR2 (atvirkštinis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

COIF (tiesioginis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

COIF2 (tiesioginis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

COIR (atvirkštinis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

COIR2 (atvirkštinis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

HaemF (tiesioginis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

HaemNFI (tiesioginis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

HaemNR3 (atvirkštinis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

HaemR (atvirkštinis pradmuo) – gamintojas UAB „Nanodiagnostika“

2.2.2. Kitos naudotos medžiagos

2mM dNTP Mix (dNTP Mix 2mM each 1mL) – gamintojas „Thermofisher Scientific“

6x MassRuler (DNA Loading Dye 1mL) – gamintojas „Thermofisher Scientific“

Agarozės gelis – gaminamas iš 285ml distiliuoto vandens, 15ml 10xTBE buferio ir 6g agarozės. Mišinys kaitinamas kol virsta vienalyčiu skysčiu.

DreamTaq (DreamTaq DNR polimerazė 5u/μl 500u) – gamintojas „Thermofisher Scientific“

DreamTaq buferis (10x DreamTaq buffer includes 20mM MgCl₂ 1,25mL) – gamintojas „Thermofisher Scientific“

DreamTaq MasterMix (2x) – gamintojas „Thermofisher Scientific“

Gene Ruler (100bp Plus DNA Ladder 0,5μg/μL 50μg) – gamintojas „Thermofisher Scientific“

MgCl₂ (25mM MgCl₂ 1,25mM) – gamintojas „Thermofisher Scientific“

MgCl₂ (25nM MgCl₂ 0,6ml) – gamintojas „Thermofisher Scientific“

Midori Green – gamintojas „NIPPON Genetics Europe GmbH“

Phusion High-Fidelity PCR MasterMix – gamintojas „Thermofisher Scientific“

Taq buferis (10x Taq buffer with (NH₄)₂SO₄ 0,6ml) – gamintojas „Thermofisher Scientific“

Taq DNR polimerazė (5u/μl 100u) – gamintojas „Thermofisher Scientific“

Vanduo (Water nuclease-free 1,25mL) – gamintojas „Thermofisher Scientific“

2.3. Metodai

2.3.1. DNR mėginių paruošimas tyrimui

Tyrimuose naudoti paukščių kraujo mėginiai su *Haemoproteus* ir *Plasmodium* genčių infekcijomis buvo išgauti iš natūraliai infekuotų paukščių. Tyrimuose naudota DNR, išskirta amonio acetato išskyrimo metodu, pamatuotas išskirtos DNR kiekis ir visuose mėginiuose jis buvo suvienodintas įpylus atitinkamą TE buferio kiekį. Visuose mėginiuose bendra DNR koncentracija buvo vidutiniškai 41±16 ng/ml. Mikroskopijos būdu nustatyta, kad mėginiuose yra pavienės paukščių hemosporidinių parazitų infekcijos. Šie darbai buvo atlikti P. B. Šivickio parazitologijos laboratorijos darbuotojų.

2.3.2. Polimerazės grandininė reakcija

Tyrimo metu naudoti tiek standartinės, tiek lizdinės PGR metodai. Reakcijoms mėgintuvėliuose paruošiami 25μl mišiniai kurių sudėtyje yra: 2μl tiriamos DNR, 12.5μl DreamTag Master Mix, 8.5μl vandens be nukleazų ir po 1μl kiekvieno pradmens. Įsitikinti jog tyrimas sėkmingas paruošiami neigiamas (vanduo be nukleazės) ir teigiamas (pavyzdys, kuris buvo teigiamas tiriant mikroskopiniu būdu) mėginiai. Pasirenkamos pradmenims ir polimerazei optimaliausios temperatūros ir leidžiama PGR.

479bp ilgio citochromo b geno fragmentas buvo padauginas lizdinės PGR būdu vadovaujantis Bensch ir kt., 2000; Hellgren ir kt., 2004 protokolais ir naudojant dvi pradmenų poras – HaemFNI/HaemNR3 ir HAEMF/HAEMR2. Pirmos PGR metu naudoti pradmenys HaemFNI [5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3'] ir HaemNR3 [5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3] padaugina apie 619 bazių porų mitochondrinio citochromo b geno fragmentą, o antros PGR metu pradmenys HAEMF [5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3'] ir HAEMR2 [5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'] padaugina trumpesnį 479bp citochromo b fragmentą. Polimerazės grandininė reakcija atliekama ATC 401 Biotecha termocikleryje. Pirmosios reakcijos terminė eiga tokia: pirminė denatūracija – 3 min. 94°C; 30 ciklų – 30s. 94°C, pradmenų prisijungimas 30s. 50°C, 45s. 72°C; galutinis pailginimas vyksta 10min. 72°C temperatūroje. Antrosios PGR metu su pradmenimis HAEMF/HAEMR2 naudojama 2μl pirmosios PGR produkto. Terminė eiga tokia pati kaip pirmosios tik vietoje 30 ciklų atliekami 35 ciklai.

Visi mūsų tirti nepublikuoti pradmenys buvo sukurti Tempe universitete (JAV) ir pirmą kartą išbandyti su Europoje aptinkamais hemosporidiniais parazitas. Naudojant dar nepublikuotus AE989 [5'-TATGCAYGCTACHGGWGCTAC-3'] ir AE982 [5'-AAACGACCATATAAAATRWARATAG-3'] pradmenis standartinės PGR metodu padauginamas 813bp citochromo b geno fragmentas. Reakcija vykdoma Eppendorf Mastercycler gradient termocikleryje, jos terminė eiga: pirminė denatūracija – 3 min. 94°C; 33 ciklai – 30s. 94°C, pradmenų prisijungimas 30s. 57°C, 45s. 72°C; galutinis pailginimas vyksta 5 min. 72°C temperatūroje.

Kita taip pat nepublikuota pradmenų pora HaemF/AE982 kaip ir prieš tai minėta amplifikuojama standartinės PGR metodu ir gaunamas panašaus ilgio citochromo b fragmentas. Reakcija vykdoma Eppendorf Mastercycler gradient termocikleryje, jos terminė eiga: pirminė denatūracija – 3 min. 94°C; 35 ciklai – 30s. 94°C, pradmenų prisijungimas 30s. 50°C, 45s. 72°C; galutinis pailginimas vyksta 10min. 72°C temperatūroje.

894bp ilgio citochromo b geno fragmentą lizdinės PGR metodu padauginantys pradmenys AE298/AE299 ir AE0064/AE0066 taip pat dar nėra publikuoti. Pirmos PGR metu pradmenys AE298 [5'-TGTAATGCCTAGACGTATTCC-3'] ir AE299 [5'-GTCAAWCAAACATGAATATAGAC-3'] padaugina mitochondrinio citochromo b geno fragmentą, o antros PGR metu pradmenys AE0064 [5'-TCTATTAATTTAGYWAAAGCAC-3'] ir AE0066 [5'-GCTTGGGAGCTGTAATCATAAT-3'] padaugina 860bp ilgio citochromo

b fragmentą. Polimerazės grandininė reakcija atliekama ATC 401 Biotecha termocikleryje. Pirmosios reakcijos terminė eiga tokia: pirminė denatūracija – 4 min. 94°C; 36 ciklai – 45s. 94°C, pradmenų prisijungimas 45s. 54°C, 1min. 30s. 72°C; galutinis pailginimas vyksta 10min. 72°C temperatūroje. Antrosios PGR metu su pradmenimis AE0064/AE0066 naudojama 2μl pirmosios PGR produkto. Terminė eiga tokia pati kaip pirmosios tik vietoje 36 atliekama 30 ciklų ir pradmenų prisijungimo temperatūra nuo 54°C pakeliama iki 57°C.

Paskutiniai naudoti citochromo b geno fragmentą padauginantys pradmenys AE986 [5'-AGTGGATGGTGYTTYAGATAYTTAC-3'] ir AE987 [5'-AGGTGTTGCATATNTATYWACTGG-3']. Reakcija vykdoma standartinės PGR metodu Ependorf Mastercycler gradient termocikleryje. Gaunami 509bp ilgio fragmentai. Reakcijos terminė eiga: pirminė denatūracija – 5 min. 94°C; 34 ciklai – 30s. 94°C, pradmenų prisijungimas 30s. 59°C, 45s. 72°C; galutinis pailginimas vyksta 5min. 72°C temperatūroje.

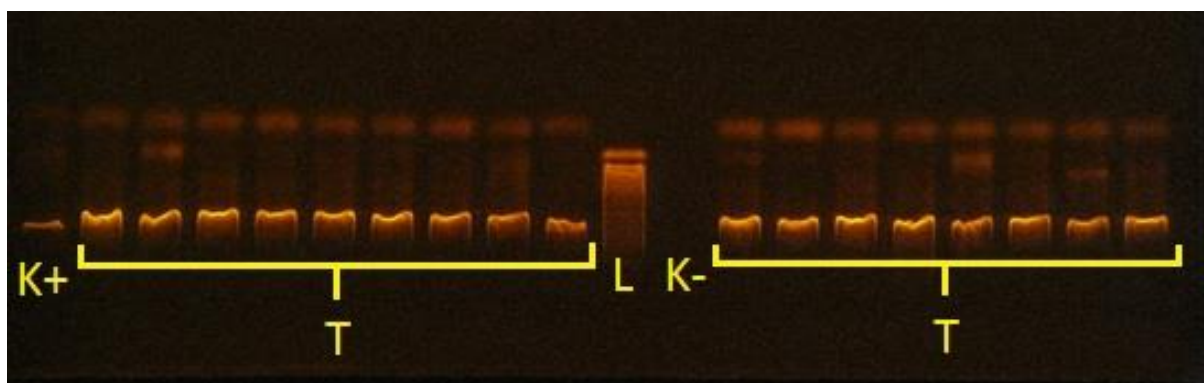
Citochromo oksidazės I fragmentas padauginamas lizdinės PGR metodu naudojant COIF/COIR ir COIF2/COIR2 pradmenis. Pirmos PGR metu pradmenys COIF [5'-CTATTTATGGTTTTTCATTTTTATTTGGTA-3'] ir COIR [5'-AGGAATACGTCTAGGCATTACATTAAATCC-3'] padaugina mitochondrinio citochromo oksidazės I geno fragmentą, o antros PGR metu pradmenys COIF2 [5'-ATGATATTTACARTTCAYGGWATTATTATG-3'] ir COIR2 [5'-GTATTTTCTCGTAATGTTTTACCAAAGAA-3'] padaugina 998 bazių porų ilgio citochromo oksidazės I geno fragmentą. Polimerazės grandininė reakcija atliekama ATC 401 Biotecha termocikleryje. Pirmosios reakcijos terminė eiga tokia: pirminė denatūracija – 4 min. 94°C; 35 ciklai – 20s. 94°C, pradmenų prisijungimas 30s. 60°C, 50s. 68°C; galutinis pailginimas vyksta 7min. 68°C temperatūroje. Antrosios PGR metu naudojama 2μl pirmosios PGR produkto. Reakcijos terminė eiga: pirminė denatūracija – 1 min. 94°C; 40 ciklų – 20s. 94°C, pradmenų prisijungimas 20s. 52°C, 50s. 68°C; galutinis pailginimas vyksta 7min. 68°C temperatūroje.

Apikoplasto kozeino protazė C geno fragmentas padauginamas lizdinės PGR metodu naudojant dvi pradmenų poras – ClpCF/ClpCR ir ClpCF2/ClpCR2. Pirmo lizdinės PGR etapo metu pradmenys ClpCF [5'-AAACTGAATTAGCAAAAATATTA-3'] ir ClpCR [5'-CGWGCWCCATATAAAGGAT-3'] padaugina clpC geno fragmentą, o antro etapo metu pradmenys ClpCF2 [5'-GATTTGATATGAGTGAATATATGG-3'] ir ClpCR2 [5'-CCATATAAAGGATTATAWG-3'] padaugina 523 bazių porų ilgio clpC geno fragmentą. Polimerazės grandininė reakcija vyksta Ependorf Mastercycler gradient termocikleryje.

Pirmosios reakcijos terminė eiga: pirminė denatūracija – 4 min. 94°C; 34 ciklai – 30s. 94°C, pradmenų prisijungimas 30s. 45°C, 50s. 62°C; galutinis pailginimas vyksta 7min. 68°C temperatūroje. Antrosios reakcijos metu su pradmenimis naudojama 2μl pirmosios PGR produkto. Antrosios reakcijos terminė eiga: pirminė denatūracija – 1 min. 94°C; 39 ciklai – 30s. 94°C, pradmenų prisijungimas 30s. 48°C, 30s. 68°C; galutinis pailginimas vyksta 7min. 68°C temperatūroje.

2.3.3. Elektroforezė

Ruošiamas 2% agarozės gelis (285ml dH₂O, 15ml 10xTBE, 6g agarozės). DNR elektroforezė vykdoma 2% agarozės gelyje panardintame į TBE buferį, naudojant 10V/cm įtampą (Cleaver Scientific Ltd). Į agarozės gelyje esančius šulinėlius dozatoriumi įleidžiama po 3μl PGR produkto sumaišyto su 1μl DNR dažo, taip pat po 3μl su 1μl DNR dažo sumaišytos teigiama (pavyzdys, kuris buvo teigiamas tiriant mikroskopijos būdu) ir neigiama (vanduo be nukleazės) kontrolės, ir 1μl genų liniuotės sumaišytos su 1μl DNR dažo. Leidžiama elektros srovė ir po elektroforezės geliai analizuojami ultravioletinėje šviesoje naudojant Cleaver Scientific Ltd transiliumatorių ir vaizdo kamerą (2.1 pav.).



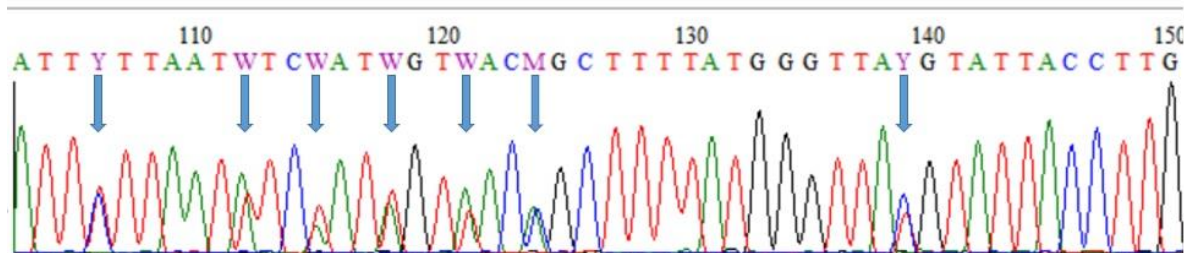
2.1 pav. Citochromo b fragmentai 2% agarozės gelyje, panaudojus HAEMF/HAEMR2 pradmenis. K+ – teigiama kontrolė, K- – neigiama kontrolė, L – genų liniuotė, T – teigiami mėginiai.

2.3.4. DNR nusodinimas

DNR nusodinimas vykdomas amonio acetato metodu. Į mėginį, kuriame po elektroforezės liko 21μl PGR produkto, įpilame 11μl amonio acetato ir 37μl 99% etanolio (kambario temperatūros). 15 minučių inkubuojame kambario temperatūroje, 10 minučių centrifuguojame (10,000 aps./min.). Supernatantas susiurbiamas ir į likusį PGR produktą įpilame 150μl 70% etanolio (atšaldyto). Po 5 minučių centrifugavimo (10,000 aps./min.) pašaliname supernatantą ir paliekame nakčiai išdžiūti. Kitą dieną į mėginius įpilame 16μl vandens be nukleazės ir užšaldome. Tokie mėginiai jau yra paruošti sekvenavimui ir yra siunčiami į UAB „Nanodiagnostiką“.

2.3.5. Sekų analizė

Po sekvenavimo gautos sekos analizuojamos naudojant BioEdit (Hall, 1999) programą jas lyginant su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis panaudojus BLAST paiešką. Nagrinėjant elektroferogramas (2.2 pav.) ieškomi dvigubi pikai, kurie parodo, jog tirtame mėginyje pasireiškia abiejų parazitų amplifikuoto geno fragmento sekos arba tiriama, kurį iš dviejų parazitų mišrioje infekcijoje identifikuoja atitinkami pradmenys.



2.2 pav. SFC4/GRW11 eksperimentiškai sukurtos mišrios infekcijos elektroferogramos fragmentas. Rodyklėmis pažymėti dvigubi pikai, rodantys skirtingus nukleotidus.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Rezultatai

3.1.1. Genetinių linijų nustatymas mėginiuose su pavienėmis infekcijomis, parazitų aptikimas naudojant PGR

Visi pavienių infekcijų mėginiai buvo sėkmingai amplifikuoti naudojant HaemFNI/HaemNR3 ir HAEMF/HAEMR2 pradmenis amplifikuojant citochromo b geno fragmentą pagal Bensch ir kt., 2000; Hellgren ir kt., 2004 protokolą. Atlikus elektroforezę visi teigiami mėginiai buvo nusodinti ir atiduoti sekvenuoti ir pagal gautas sekas nustatytos genatinės linijos bei gentys (3.1 lentelė) parodė, jog naudoti pradmenys yra jautrūs nustatant pavienes paukščių hemosporidijų infekcijas.

3.1 lentelė. Tirtų mėginių linijos bei gentys, kurioms jie priklauso.

Nr.	Mėginys	Citochromo b genas	Rūšis
1.	59/12c	YWT1	<i>Haemoproteus motacillae</i>
2.	241	ROBIN1	<i>H. attenuatus</i>
3.	192/13c	SFC4	<i>Haemoproteus sp.</i>
4.	98/13c	SISKIN1	<i>H. tartakovskyi</i>
5.	446/11c	PFC1	<i>H. pallidus</i>
6.	91/13c	SISKIN1	<i>H. tartakovskyi</i>
7.	106/13c	SISKIN1	<i>H. tartakovskyi</i>
8.	186/13c	SISKIN1	<i>H. tartakovskyi</i>
9.	96/11c	HAWF1	<i>H. tartakovskyi</i>
10.	269/14c	ROFI2	<i>Haemoproteus sp.</i>
11.	52/14c	LULU1	<i>H. balmorali</i>
12.	426	YWT2	<i>H. motacillae</i>
13.	399/14c	SISKIN1	<i>H. tartakovskyi</i>
14.	287/14c	HAWF2	<i>H. concavocentralis</i>
15.	1321	GRW4	<i>Plasmodium relictum</i>
16.	31	TURDUS2	<i>H. minutus</i>
17.	446/11c	PFC1	<i>H. pallidus</i>
18.	152/13c	SISKIN1	<i>H. tartakovskyi</i>
19.	Cc34/11c	SGS1	<i>P. relictum</i>
20.	92/13c	SISKIN1	<i>H. tartakovskyi</i>
21.	12/12c	RBS1	<i>H. subtilis</i>
22.	134/12c	SYBOR01	<i>H. parabelopolskyi</i>
23.	Cc32/11	TURDUS1	<i>P. circumflexum</i>
24.	Cc53/11	GRW2	<i>P. ashfordi</i>
25.	96/11c	HAWF1	<i>H. tartakovskyi</i>
26.	527	ERIRUB01	<i>P. elongatum</i>

3.1.2. Mėginių su mišriomis infekcijomis parengimas

Iš mėginių su pavienėmis paukščių hemosporidinių parazitų infekcijomis paruošti mėginiai su dvigubomis paukščių hemosporidinių parazitų infekcijomis tolimesniems tyrimams – dviejų mėginių išskirta DNR buvo sumaišyta vienodomis proporcijomis. Prieš tai visų mėginių DNR koncentracija buvo suvienodinta atskiedžiant juos TE buferiu. Mėginių, iš kurių buvo išskirta DNR parazitacija buvo panaši. Buvo sukurti tokie dvigubų infekcijų deriniai, kurie dažnai sutinkami laukinėje gamtoje: buvo sukurta 17 *Haemoproteus* ir *Plasmodium* ir 4 dviejų genetinių linijų *Plasmodium* genties mišrių infekcijų (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Dvigubos paukščių hemosporidinės infekcijos sumaišius jau nustatytų pavienių paukščių hemosporidinių infekcijų parazitų genetines linijas.

Nr.	Ekspirimentaiškai sukurtos mišrios infekcijos	Genetinės linijos
1.	ROBIN/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
2.	SFC4/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
3.	SISKIN1/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
4.	TURDUS2/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
5.	RB1/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
6.	YWT1/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
7.	HAWF1/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
8.	SYBOR01/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
9.	ROFI2/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
10.	PFC1/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
11.	LULU1/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
12.	HAWF2/SGS1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
13.	SYBOR1/ERIRUB1	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
14.	SFC4/GRW11	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
15.	SISKIN1/GRW11	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
16.	HAWF1/GRW11	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
17.	HAWF2/GRW11	<i>Haemoproteus</i> x <i>Plasmodium</i>
18.	TURDUS1/SGS1	<i>Plasmodium</i> x <i>Plasmodium</i>
19.	GRW4/SGS1	<i>Plasmodium</i> x <i>Plasmodium</i>
20.	GRW11/SGS1	<i>Plasmodium</i> x <i>Plasmodium</i>
21.	SGS1/ERIRUB1	<i>Plasmodium</i> x <i>Plasmodium</i>

3.1.3. HaemNFI/HaemNR3 ir HAEMF/HAEMR2 pradmenys

Citochromo b geno fragmentą lizdinės PGR metodu padauginantys pradmenys HaemNFI/HaemNR3 ir HAEMF/HAEMR2 buvo jautrūs nustatant hemosporidinius parazitus. Jie sėkmingai identifikavo parazitus esančius 90,5% mėginių, tačiau nebuvo specifiniai nustatant vienos genties hemosporidinius parazitus. Iš visų sėkmingai amplifikuotų mėginių su mišriomis *Haemoproetus spp.* ir *Plasmodium spp.* parazitų genties infekcijomis pradmenys identifikavo 4 dvigubas infekcijas (23,5%), o mišriuose *Plasmodium spp.* ir *Plasmodium spp.*

mėginiuose mišrių infekcijų jie nenustatė (3.3 lentelė). Mišrioje *Haemoproteus spp.* ir *Plasmodium spp.* parazitų genties infekcijose šie pradmenys identifikavo 41% *Haemoproteus* ir 24% *Plasmodium* genties parazitų.

3.1.4. AE989/AE982 ir HaemF/AE982 pradmenys

Abidvi citochromo b geno fragmentą standartinės PGR metodu padauginančios pradmenų poros tyrimų duomenimis buvo jautrios identifikuojant tik *Haemoproteus* genties parazitus. Mėginiuose su mišriomis *Haemoproteus spp.* ir *Plasmodium spp.* infekcijomis jos nustatė 64,7% ir 76,5% hemosporidijų atitinkamai. Šie pradmenys mišrių infekcijų nenustatė. Mūsų tyrimų rezultatai rodo, kad šie pradmenys yra specifiniai *Haemoproteus* genties parazitams ir neidentifikuoja *Plasmodium* genties parazitų (3.3 lentelė). Mišrioje *Plasmodium spp.* ir *Plasmodium spp.* mėginiuose šie pradmenys hemosporidinių parazitų neaptiko.

3.1.5. AE986/AE987 pradmenys

Citochromo b geno fragmentą standartinės PGR metodu gausinantys pradmenys AE986/AE987 mūsų tyrimų duomenimis buvo specifiniai nustatant *Plasmodium* genties parazitus (3.3 lentelė). Mėginiuose su mišriomis *Haemoproteus spp.* ir *Plasmodium spp.* infekcijomis jie sėkmingai aptiko 76,5% *Plasmodium* genties parazitų, o eksperimentiškai sukurtose mėginiuose su mišriomis *Plasmodium spp.* ir *Plasmodium spp.* infekcijomis pradmenys identifikavo 1 dvigubą infekciją (25%) ir 3 *Plasmodium* genties parazitus (75%).

3.1.6. AE298/AE299 ir AE0064/AE0066 pradmenys

Lizdinės PGR metodu citochromo b geno fragmentą amplifikuojantys pradmenys AE298/AE299 ir AE0064/AE0066 sėkmingai nustatė 80,1% hemosporidinių parazitų tirtuose mėginiuose (3.3 lentelė). Mėginiuose su mišriomis *Haemoproteus spp.* ir *Plasmodium spp.* infekcijomis pradmenys identifikavo 17,6% dvigubų infekcijų, 41% *Plasmodium* genčiai priklausančių parazitų infekcijų ir 23,5% *Haemoproteus* genties parazitų infekcijų (tiriant mišrias *Haemoproteus/Plasmodium* infekcijas), o mėginiuose su mišriomis *Plasmodium spp.* ir *Plasmodium spp.* genčių infekcijomis pradmenys nustatė 3 *Plasmodium* genčiai priklausančius parazitus (75%), mišrių infekcijų neidentifikavo.

3.1.7. COIF/COIR ir COIF2/COIR2 pradmenys

Mitochondrinės citochromo oksidazės I geno fragmentą lizdinės PGR metodu padauginantys pradmenys COIF/COIR ir COIF/COIR2 sėkmingai identifikavo vos 52,4%

hemosporidinius parazitus. Mėginiuose, kuriuose buvo mišrios *Haemoproteus* ir *Plasmodium* genčių parazitų infekcijos pradmenys nustatė 1 mišrią infekciją (5,9%), 3 *Plasmodium* genčiai priklausančių parazitų infekcijas (17,6%) ir 4 *Haemoproteus* genčiai priklausančių parazitų infekcijas (23,5%), o mėginiuose su mišriomis *Plasmodium spp.* ir *Plasmodium spp.* genčių infekcijomis pradmenys nustatė 3 *Plasmodium* genčiai priklausančius parazitus (75%).

Žinoma, kad pSGS1 ir pGRW11 genetinių linijų sekos amplifikuotame geno fragmente yra identiškos (Bernotienė ir kt., 2016), todėl esant šių dviejų genetinių linijų mišriai infekcijai jos identifikuoti naudojant COI sekas padauginančius pradmenis būtų neįmanoma (3.3 lentelė).

3.1.8. ClpCF/ClpCR ir ClpCF2/ClpCR2 pradmenys

Apikoplasto kozeino proteazės C geno fragmentą lizdinės PGR metodu gausinantys pradmenys ClpCF/ClpCR ir ClpCF2/ClpCR2 buvo jautrūs nustatant hemosporidinius parazitus (3.3 lentelė). Iš 21 tirtų mėginio jie sėkmingai nustatė 20 hemosporidinių parazitų infekcijų (95,3%). Mėginiuose, kuriuose buvo mišrios *Haemoproteus* ir *Plasmodium* genčių infekcijos pradmenys sėkmingai identifikavo po 47% tiek *Haemoproteus*, tiek *Plasmodium* infekcijų. Dvigubų infekcijų pradmenys nenustatė. Tiriant mėginius su mišriomis *Plasmodium* ir *Plasmodium* genčių infekcijomis pradmenys sėkmingai identifikavo parazitus visuose mėginiuose. Buvo aptikta viena dviguba infekcija (25%) ir trys pavienės infekcijos (75%)

3.3 lentelė. Dvigubos paukščių hemosporidinės infekcijos sumaišius jau nustatytų pavienių paukščių hemosporidinių infekcijų parazitų genetines linijas. Linijos nustatytos naudojant skirtingus pradmenis.

Eksperimentiškai sukurtos mišrios infekcijos	Linijos nustatytos naudojant skirtingus pradmenis						
	HaemNFI/HaemNR3 HaemF/HaemR	AE989/AE982	HaemF/AE982	AE986/AE987	AE298/AE299 AE0064/AE0066	COIF/COIR COIF2/COIR2	ClpCF/ClpCR ClpCF2/ClpCR2
ROBIN/SGS1	ROBIN	-	-	-	ROBIN/SGS1	SGS1	ROBIN
SFC4/SGS1	SFC4	SFC4	SFC4	SGS1	SFC4/SGS1	SFC4/SGS1	-
SISKIN1/SGS1	SISKIN1	SISKIN1	SISKIN1	SGS1	SGS1	SISKIN1	SGS1
TURDUS2/SGS1	TURDUS2	-	TURDUS2	SGS1	TURDUS02	TURDUS2	TURDUS2
RBS1/SGS1	SGS1	RBS1	RBS1	SGS1	-	-	RBS1
YWT1/SGS1	SGS1	YWT1	YWT1	SGS1	-	SGS1	SGS1
HAWF1/SGS1	HAWF1	HAWF1	HAWF1	SGS1	HAWF1	HAWF1	HAWF1
SYBOR01/SGS1	SYBOR01/SGS1	SYBOR01	SYBOR01	SGS1	SGS1	-	SGS1
ROFI2/SGS1	-	ROFI2	ROFI2	SGS1	ROFI2/SGS1	-	ROFI2
PFC1/SGS1	PFC1/SGS1	-	PFC1	SGS1	SGS1	SGS1	PFC1
LULU1/SGS1	LULU1	-	-	-	SGS1	-	LULU1
HAWF2/SGS1	SGS1	HAWF2	HAWF2	SGS1	HAWF2	HAWF2	HAWF2
SYBOR1/ERIRUB1	ERIRUB01	SYBOR01	SYBOR01	ERIRUB01	SYBOR01	-	ERIRUB01
SFC4/GRW11	SFC4/GRW11	SFC4	SFC4	GRW11	GRW11	-	GRW11
SISKIN1/GRW11	SISKIN1/GRW11	SISKIN1	SISKIN1	GRW11	GRW11	-	GRW11
HAWF1/GRW11	-	-	-	-	HAWF1	-	GRW11
HAWF2/GRW11	HAWF2	-	-	-	-	-	GRW11
TURDUS1/SGS1	SGS1	-	-	SGS1	TURDUS1	TURDUS1	SGS1
GRW4/SGS1	GRW4	-	-	SGS1	-	-	SGS1
GRW11/SGS1	GRW11	-	-	SGS1/GRW11	GRW11	SGS1=GRW11	SGS1=GRW11
SGS1/ERIRUB1	ERIRUB01	-	-	ERIRUB01	SGS1	SGS1	SGS1
Nustatytų mišrių infekcijų kiekis (%)	4(19)	0(0)	0(0)	1(5)	3(14)	1(5)	0(0)
Nustatytos <i>Plasmodium</i> rūšys (%)	8(38)	0(0)	0(0)	16(76)	10(48)	7(33)	12(57)
Nustatytos <i>Haemoproteus</i> rūšys (%)	7(33)	11(52)	13(62)	0(0)	4(19)	3(14)	8(38)

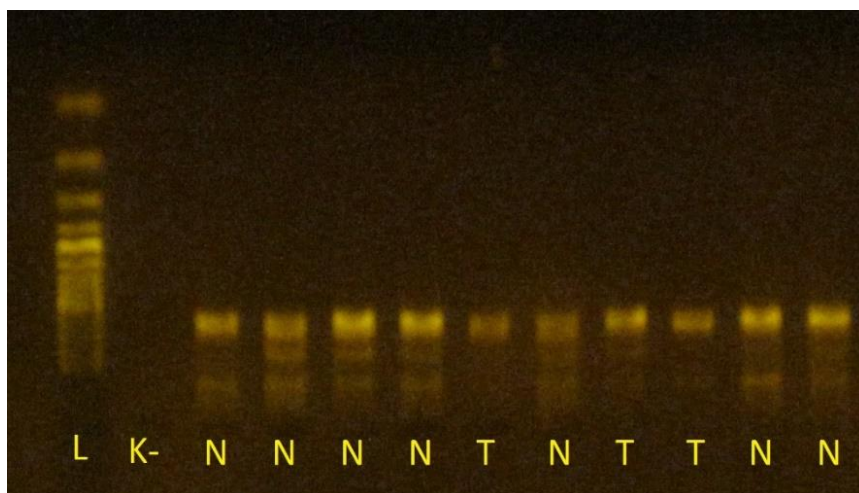
^a Abiejų genetinių linijų sekos tirtame geno regione yra identiško

3.1.9. Tirtų pradmenų jautrumas *Haemoproteus* ir *Plasmodium* genčių parazitams

Tyrimų rezultatai parodė, kad kai kurie iš tirtų pradmenų porų yra ypač jautrūs vienos hemosporidinių parazitų genties identifikavimui ir visiškai nejautrūs kitos genties parazitų nustatymui. Pavyzdžiui tik *Haemoproteus* genties parazitus nustatė citochromo b geno fragmentą ampifikuojantys pradmenys HaemF/AE982 ir AE989/AE982, priešingai visiškai nejautrūs *Haemoproteus* genties parazitams, bet ypač jautrūs *Plasmodium* genties parazitų nustatymui buvo AE986/AE987 pradmenys. Naudojant HaemF/HaemR2 pradmenis mišrioje *Haemoproteus* ir *Plasmodium* infekcijoje 7 atvejais iš 17 buvo identifikuoti *Haemoproteus* ir tik 4 atvejais – *Plasmodium* parazitai. Kiti pradmenys padaugino panašų santykį abiemis gentims priklausančių parazitų DNR: atitinkamai 5 ir 6; 4 ir 3; 8 ir 8 iš 17 mišrių skirtingoms gentims priklausančių parazitų infekcijų tiriant su pradmenimis AE0064/AE0066 ir COIF/COIR, ir ClpCF/ClCR.

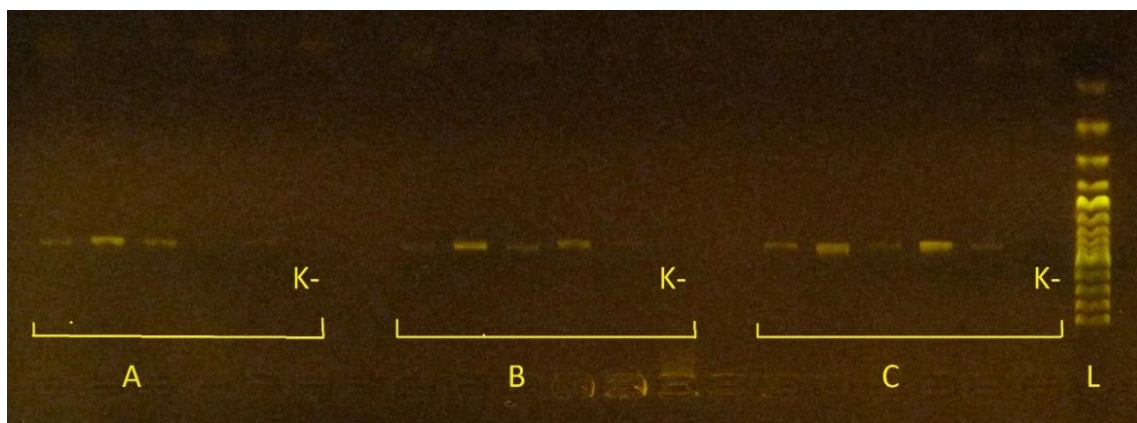
3.1.10. Optimalių sąlygų paieška

Dėl įvairių priemonių tokių kaip baltymai, RNR, nespecifiniai PGR produktai, PGR reakcijos komponentai (pradmenys, dNTP, fermentai) ar organinės medžiagos (etanolis) kai kurių mėginių elektroforezės gelio nuotraukose buvo matomos skirtingo ilgio fragmentų ruožai (3.1 pav.). Siekiant išspręsti šią problemą buvo mėginama optimizuoti PGR sąlygas. Tam tikslui buvo imtasi keturių veiksmų – $MgCl_2$ koncentracijos keitimo PGR mišinyje, temperatūros keitimo pradmenų prijungimo etapo metu, skirtingų polimerazių naudojimo bei tiriamo mėginio praskiedimo TE buferiu (x100).



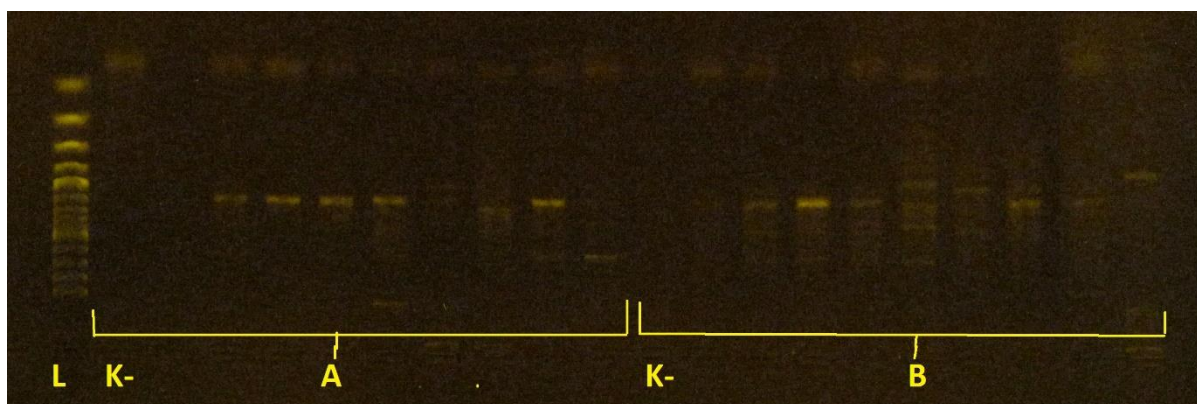
3.1 pav. Citochromo b fragmentai 2% agarozės gelyje, panaudojus AE986/AE987 pradmenis. K- – neigiama kontrolė; L – genų liniuotė; N – nesėkmingai amplifikuotas mėginys su skirtingo ilgio fragmentų ruožais; T – teigiamas, sėkmingai amplifikuotas mėginys.

Norint surasti optimaliausias sąlygas efektyviam pradmenų veikimui PGR mišiniuose buvo keičiama $MgCl_2$ koncentracija. Eksperimentas buvo atliekamas naudojant mėginius su pavienėmis hemosporidinėmis infekcijomis, citochromo b geno fragmentą padauginančius pradmenis HaemF/AE982 ir DreamTaq polimeraze. Eksperimento metu į PGR mišinius buvo įpilta 0,5 μ l, 1 μ l ir 2 μ l $MgCl_2$. Rezultatai parodė, kad žymus pradmenų efektyvumo skirtumas analizuojant agarozės gelį (3.2 pav.) neužfiksuotas, šis optimizavimo metodas tyrimuose su mišriomis parazitų infekcijomis naudotas nebuvo.



3.2 pav. Citochromo b fragmentai 2% agarozės gelyje, naudojant HAEMF/AE982 pradmenis ir skirtingas $MgCl_2$ koncentracijas. A – mėginiai su 0,5 μ l $MgCl_2$; B – mėginiai su 1 μ l $MgCl_2$; C – mėginiai su 2 μ l $MgCl_2$; K- – neigiama kontrolė; L – genų liniuotė.

Siekiant optimizuoti citochromo b geno fragmentą gausinančių AE986/AE987 ir AE298/AE299 bei AE0064/AE0066 pradmenų efektyvumą mėginiai buvo ruošiami naudojant ne DreamTaq MasterMix, o Phusion High-Fidelity PCR MasterMix (3.3 pav). Bandymai didinti pradmenų efektyvumą naudojant skirtingas polimerazes buvo nesėkmingi, todėl visi mėginiai toliau tirti ruošiant mėginius su DreamTaq MasterMix.



3.3 pav. Citochromo b fragmentai 2% agarozės gelyje, naudojant AE986/AE987 pradmenis ir skirtingas polimerazes. A – mėginiai su DreamTaq MasterMix; B – mėginiai su Phusion High-Fidelity PCR MasterMix; K- – neigiama kontrolė; L – genų liniuotė.

Geriausi rezultatai tiriant mėginius lizdinės PGR metodu ir naudojant AE298/AE299 ir AE0064/AE0066 pradmenis buvo pasiekti naudojant DreamTaq polimerazę ir keičiant pradmenų prisijungimo etapo temperatūras. Pirmosios PGR metu pradmenų prisijungimo etapo temperatūra nuo 53°C pakelta iki 54°C, o antrosios PGR metu pradmenų prisijungimo etapo temperatūra nuo 56°C pakelta iki 57°C. Keliant temperatūrą dar aukščiau pradmenų efektyvumas mažėjo. Siekiant surasti idealiausias sąlygas efektyviam AE986/AE987 pradmenų veikimui PGR mišiniai buvo ruošiami naudojant DreamTaq MasterMix ir po vieną laipsnį keliama pradmenų prisijungimo temperatūra (nuo 56°C iki 60°C). Geriausi PGR rezultatai buvo gauti naudojant 59°C pradmenų prisijungimo.

Norint pasiekti optimaliausių rezultatų tiriant mėginius standartinės PGR metodu ir naudojant AE989/AE982 ir HaemF/AE982 pradmenis, tiriami eksperimentiškai sukurti mišrių infekcijų mėginiai buvo atskiesti TE buferiu (x100). Hemosporidinių parazitų aptikimo tikimybė naudojant pradmenis AE989/AE982 eksperimentiškai sukurtuose mišrių *Haemoproteus/Plasmodium* genčių mėginiuose nuo 23,5% padidėjo iki 76,5%, o naudojant pradmenis HaemF/AE982 hemosporidijų aptikimo tikimybė nuo 58,8% išaugo iki 88,2%. Tokį ženklų aptikimo tikimybės padidėjimą gali lemti tai, jog atskiedus mėginį jame sumažėjo šeimininko (šiuo atveju paukščio) DNR koncentracija ir pradmenys galėjo gerokai lengviau prisikabinti prie parazito DNR (Pérez-Tris ir Bensch, 2005). Su kitais pradmenimis šis bandymas išmėgintas nebuvo, tačiau tai galėtų būti puikus sprendimas siekiant pagerinti PGR išeią.

3.2. Rezultatų aptarimas

Remiantis gautais rezultatais nustatyta, kad HaemFNI/HaemNR3 ir HAEMF/HAEMR2 pradmenys efektyviai nustato pavienes infekcijas. Turimais duomenimis šie pradmenys nėra jautrūs identifikuojant eksperimentiškai sukurtas mišrias paukščių hemosporidinių parazitų infekcijas (nustatė tik 19% mišrių infekcijų). Panašūs rezultatai buvo gauti Bernotienės ir kolegų (2016) atliktuose tyrimuose tiriant mišrias *Haemoproteus/Plasmodium* ir *Plasmodium/Plasmodium* genčių infekcijas, tačiau įdomu tai, jog minėti pradmenys buvo jautrūs nustatant dvigubas infekcijas mišrioje *Haemoproteus/Haemoproteus* genčių infekcijose, o tokių infekcijų mes šiame darbe netyrėme.

Hemosporidinių parazitų aptikimas eksperimentiškai sukurtose mišrioje infekcijose naudojant PGR septynis skirtingus geno fragmentus padauginančius pradmenis buvo nuo 52,4% iki

95,3%, nepaisant to, kad siekiant gauti kuo tikslesnius rezultatus PGR buvo kartojamas mažiausiai tris kartus. Tiriant kai kurių pradmenų jautrumą PGR buvo kartojamas tol, kol buvo gauti teigiami rezultatai (apie tai plačiau 3.1.8. optimalių sąlygų paieškų skyriuje).

Iš visų naudotų pradmenų hemosporidines infekcijas geriausiai identifikuoja apikoplasto kazeino proteazės C geno fragmentą amplifikuojantys pradmenys ClpCF/ClpCR (20 iš 21) ir citochromo b geno fragmentą amplifikuojantys pradmenys HaemF/HaemR2 (19 iš 21) (3.3 lentelė). Nei vienas PGR protokolas neparodo visų mišrių infekcijų, o amplifikuoja tik vieno parazito, esančio mėginyje, DNR. Dvigubų infekcijų aptikimas naudojant septynis skirtingus geno fragmentus mėginiuose siekė nuo 0 iki 19% (3 lentelė) (kai kurie pradmenys dvigubų parazitų infekcijų neidentifikavo visiškai). R. Bernotienės ir kolegų eksperimentinių tyrimų metu tiriant mišrias *Haemoproteus* ir *Plasmodium* genčių infekcijas dvigubų infekcijų pradmenys HaemF/HaemR2 neaptiko, nors bendra mišrių infekcijų aptikimo dalis buvo panaši (20%).

Jautriausiai *Haemoproteus* genties parazitus eksperimentiškai sukurtose infekcijose nustatė citochromo b geno fragmentą amplifikuojantys pradmenys HaemF/AE982 ir AE989/AE982 (62 ir 52% atitinkamai, šie pradmenys visiškai neidentifikavo *Plasmodium* infekcijų), o *Plasmodium* genties parazitų nustatyme (76%) efektyviausi citochromo b geno fragmentą amplifikuojantys pradmenys AE986/AE987 (3.3 lentelė). Šie pradmenys dar nėra publikuoti, bet pagal gautus tyrimų rezultatus tikėtina, jog jų panaudojimas kombinuojant juos su kitais pradmenimis bus naudingas mišrių hemosporidinių infekcijų nustatyme.

Dabartiniai molekuliniai tyrimai paremti mitochondrinio citochromo b geno fragmento analize atskleidė, kad paukščių hemosporidinių parazitų genetinė įvairovė yra gerokai didesnė nei jų morfologinė įvairovė (Beadell ir kt., 2004; Pérez-Tris ir Bensch, 2005; Dimitrov ir kt., 2013; Bernotienė ir kt., 2016). Naujų dar nežinomų rūšių nustatymas rodo, kad vyksta fenomenali šeimininko-parazito koevoliucija, kurios metu parazitas periodiškai pereina į naujas paukščių rūšis (Bensch ir kt., 2000). Molekulinių tyrimų plėtojimas yra labai svarbus hemosporidinių parazitų identifikavimui laukinėje gamtoje, nes parazitemijos lygis laukinėje gamtoje gyvenančiuose paukščiuose dažnai būna žemas ir parazitų identifikavimas šviesinės mikroskopijos būdu yra labai sudėtingas (Pérez-Tris ir Bensch, 2005). Norint daugiau sužinoti apie paukščių hemosporidinių parazitų įvairovę geriausia yra derinti tradicinius bei molekulinis tyrimų metodus (Valkiūnas, 2005). Pastaruoju metu paukščių hemosporidinių parazitų nustatymas laukinėje gamtoje vykdomas vien tik naudojant PGR metodus, tad metodų, leidiančių identifikuoti mišrias infekcijas naudojant tik PGR sukūrimas

yra labai svarbus, nes mišrios infekcijos yra labai dažnos gamtoje (Bensch ir kt., 2000; Clark ir kt., 2014; Perkins, 2014). Dažnai viename šeimininke aptinkama ne vienas ar du, o trys ar net keturi skirtingi parazitai. Kelių skirtingų pradmenų naudojimas tiriant paukščių hemosporidinius parazitus galėtų palengvinti mišrių infekcijų identifikavimą. Pavyzdžiui tiriant mišrias *Haemoproteus* ir *Plasmodium* infekcijas naudojant HaemF/AE982 ir AE986/AE987 pradmenų kombinaciją, mišrių infekcijų aptikimas teoriškai būtų apie 76%, o tiriant mišrias *Plasmodium* ir *Plasmodium* infekcijas su AE986/AE987 ir lizdinės PGR pradmenis AE298/AE299, AE0064/AE0066, teorinis mišrių infekcijų aptikimas būtų apie 75%. Svarbu paminėti, kad visi tirti citochromo b geno fragmentai persidengia su citochromo b fragmentu, pagal kurį yra identifikuojamos hemosporidinių parazitų genetinės linijos (Bensch ir kt., 2009), todėl naudojant šiuos pradmenis pagal gautas sekas galima nesunkiai identifikuoti parazitų genetines linijas (lyginant su MalAvi duomenų bazėje deponuotomis sekomis).

Mišrios hemosporidinių parazitų infekcijos dažnai yra virulentiškesnės nei pavienės infekcijos ir gali sukelti paukščių žūtį (Pérez-Tris ir Bensch, 2005; Dimitrov ir kt., 2013). Mirtinų hemosporidinių parazitų rūšių identifikavimas yra labai svarbus norint sustabdyti masines infekcijas zoologijos soduose ir paukščių ūkiuose, kuriuose daugybinės paukščių mirtys pridaro daug nuostolių, taip pat ir norint išsaugoti nykstančias paukščių rūšis (Levin ir kt., 2009; Hill ir kt., 2010; Chagas ir kt., 2016).

Lizdinės PGR metodas yra greičiausias ir pigiausias būdas hemosporidinių parazitų genetinių linijų nustatymui, lyginant su kitais gerokai brangesniais ir daug laiko užimančiais metodais. TA-klonavimo metodas būtų puikus įrankis išsprendžiantis mišrių infekcijų aptikimą gamtoje, tačiau šis metodas yra brangus ir reikalauja daug laiko bei resursų (Pérez-Tris ir Bensch, 2005). Kitas mano aptartas lazerinės mikrodisekcijos metodas taip pat yra labai brangus ir užimantis daug laiko, todėl yra retai taikytinas hemosporidinių parazitų genetinių linijų nustatymui laukinėje gamtoje, tačiau šio metodo panaudojimas naujų pradmenų kūrimui yra didžiulis indėlis lizdinės PGR metodo jautrumo gerinimui (Durrant ir kt., 2006; Palinauskas ir kt., 2010).

IŠVADOS

1. Tirtuose iš paukščių kraujo išskirtos DNR mėginiuose nustatytos 27 genetinės linijos priklausančios *Plasmodium* ir *Haemoproteus* gentims, ir iš šių mėginių buvo sukurtas 21 mėginys su dvigubomis paukščių hemosporidinių parazitų infekcijomis tolimesniems tyrimams;
2. Turimais duomenimis geriausiai hemosporidinių paukščių infekcijas aptiko apikoplasto kazeino proteazės C geno fragmentą (ClpCF2/ClpCR2) ir citochromo b geno fragmentą (HaemF/HaemR2) amplifikuojantys pradmenys.
3. Tirti genų fragmentų pradmenys nėra jautrūs identifikuojant eksperimentiškai sukurtas mišrias hemosporidinių paukščių infekcijas;
4. Jautriausiai *Haemoproteus* genties parazitus identifikavo citochromo b geno fragmento pradmenys HaemF/AE982, o *Plasmodium* genties parazitus – citochromo b geno fragmento pradmenys AE986/AE987.
5. Tyrimas parodė, kad siekiant nustatyti mišrias hemosporidinių parazitų infekcijas būtina naudoti kelis PGR protokolus lygiagrečiai. Rekomenduojame:
 - a. Mišrių *Haemoproteus spp.* ir *Plasmodium spp.* infekcijų nustatymui rekomenduočiau rinktis citochromo b geno fragmento pradmenų poras - HaemF/AE982 ir AE986/AE987 naudojant juos lygiagrečiai.
 - b. Mišrių *Plasmodium spp.* ir *Plasmodium spp.* infekcijų nustatymui siūlyčiau naudoti kelis pradmenis lygiagrečiai: citochromo b geno fragmento pradmenis - AE986/AE987 ir lizdinės PGR pradmenis AE298/AE299, AE0064/AE0066.

PADĖKA

Dėkoju Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto P. B. Šivickio laboratorijos vadovui Habil. Dr. G. Valkiūnui už galimybę atlikti tyrimus jo vadovaujamoje laboratorija. Šis tyrimas buvo finansuotas Lietuvos mokslo tarybos (MIP038/2015)

Dėkoju visiems P. B. Šivickio parazitologijos laboratorijos darbuotojams, kurie mielai atsakė ir pakonsultavo dėl visų iškilusių klausimų. Ypatingai esu dėkinga darbo vadovei Doc. Dr. R. Bernotienei už skirtą laiką, kantrybę, vertingą informaciją ir duotus reikšmingus patarimus.

SANTRAUKA

Mišrių paukščių hemosporidinių parazitų infekcijų identifikavimas naudojant skirtingus pradmenis

Paukščių hemosporidiniai (Apicomplexa: Haemosporida) parazitai yra paplitę laukinėje gamtoje ir kai kurios rūšys gali sukelti sunkias ar net mirtinas ligas tiek paukščiams, tiek kraujasiubiams vabzdžiams. Mišrios hemosporidinės infekcijos tai skirtingų genčių, rūšių arba genetinių linijų sukeltos infekcijos vieno šeimininko organizme. Skirtingų tyrimų duomenimis mišrių hemosporidinių infekcijų paplitimas laukinėje gamtoje yra nuo 6% iki 80%. Naudojant tik PGR paremtus tyrimo metodus mišrios paukščių hemosporidinių parazitų infekcijos nėra nustatomos, todėl prarandama labai didelė dalis informacijos apie šių parazitų įvairovę gamtoje.

Darbo tikslas – nustatyti naudojamų pradmenų efektyvumą tiriant eksperimentiškai sukurtas *Haemoproteus* ir *Plasmodium* genčių mišrias infekcijas.

Panaudojant gamtos tyrimų centre surinktą paukščių hemosporidinių parazitų medžiagą buvo sukurtas 21 mėginys su mišria hemosporidinių parazitų infekcija vienodomis dalimis sumaišant panašios koncentracijos išskirtos DNR mėginius. Buvo tiriami 7 skirtingi PGR protokolai, kurių dėka amplifikuojama mitochondrinė ar apikoplasto DNR genų fragmentai.

Nustatyta, kad geriausiai hemosporidinių paukščių infekcijas aptiko apikoplasto kazeino proteazės C geno fragmentą ir citochromo b geno fragmentą (HaemF/HaemR2) amplifikuojantys pradmenys. Nei viena pradmenų pora nebuvo jautri nustatant dvigubas infekcijas – daugiausiai mišrių infekcijų (19%) identifikavo HaemF/HaemR2 pradmenys. Nustatyta, kad HaemF/AE982 ir AE989/AE982 pradmenys yra specifiniai *Haemoproteus* genties parazitams, o AE986/AE987 – *Plasmodium* genties parazitams. Tyrimas parodė, kad siekiant nustatyti mišrias hemosporidinių parazitų infekcijas būtina naudoti kelis PGR protokolus lygiagrečiai. Darbe rekomendavome PGR protokolų kombinacijas, kurias naudojant lygiagrečiai galima nustatyti daugiausiai mišrių infekcijų.

SUMMARY

Detection of avian haemosporidian parasite mixed infections using different primers

Avian hemosporidian (Apicomplexa: Haemosporida) parasites are widespread in the wildlife and some species cause severe or even fatal diseases to avian hosts and blood sucking insects. Mixed haemosporidian infections are infections caused by several parasites depending to different genera, species or genetic lineages. Different studies revealed the presence of mixed haemosporidian infections from 6% to 80% - in the wild. Mixed hemosporidian infections can not be detected using only PCR methods, so PCR based methods underestimate the biodiversity of these parasites in wildlife.

The main task of this study – to evaluate the efficacy of investigates primer set in detection of experimentaly designed *Plasmodium* and *Haemoproteus* mixed infection.

According to Natural Research Center avian hemosporidian parasites material were created 21 samples with mixed hemosporidian infection by mixing same amount of similar concentrations extracted DNA samples. Mitochondrial and apicoplast DNA genes fragments were analyzed by using seven different PCR protocols.

It was found that the most sensitive primer sets for detection of avian hemosporidian infections were ClpC primers (ClpCF2/ClpCR2) and cyt b primers (HaemF / HaemR2). Neither one primer set was sensitive to detect mixed infections. The highest number of mixed infections was identified (19%) using HaemF/HaemR2 primer set. It was found that HaemF / AE982 and AE989 / AE982 primers were specific for *Haemoproteus* parasites, and AE986 / AE987 primers were specific for *Plasmodium* parasite detection. The experiment showed that application of several PCR-based assays in parallel would help o detect mixed haemosporidian parasite infections. In this study we have recommended combinations of PCR protocols which will help to identify mixed infections using PCR methods.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Atkinson CT, Riper III C. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon, and Haemoproteus. In: Loye, J.E. and Zuk M. (Eds.) Bird – parasite interactions: ecology, evolution, and behaviour. Oxford etc.: Oxford University Press, psl. 19-48.
2. Atkinson, CT, 2008. Haemoproteus. In: Atkinson, CT, Thomas NJ, Hunter BC (Eds.), Parasitic Diseases of Wild Birds. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, psl. 13-35.
3. Beadell JS, Gering E, Austin J, Dumbacher JP, Peirce MA, Pratt TK, Atkinson CT, Fleischer RC. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. Mol Ecol. 2004 Dec;13(12):3829-44. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2004.02363.x
4. Bell JA, Weckstein JD, Fecchio A, Thach VV, 2015. A new real-time PCR protocol for detection of avian haemosporidians. Parasites Vectors 8, 383. DOI: 10.1186/s13071-015-0993-0
5. Bensch S, Hellgren O, Prez-Tris J, 2009. MalAvi: a public database of malariaparasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. Mol. Ecol. Resour. 9, 1353-1358. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02692.x
6. Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Ostman O, Hansson B, Westerdahl H, Pinheiro RT, 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of Plasmodium and Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B, Biol. Sci. 267, 1583-1589. DOI: 10.1098/rspb.2000.1181
7. Bernotienė R, Palinauskas V, Iezhova T, Murauskaitė D, Valkiūnas G. Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): A comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections Exp Parasitol. 2016 Apr;163:31-7. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.01.009
8. Chagas CRF, Valkiūnas G, Guimarães LO, Monteiro EF, Guida FJ, Simões RF, Rodrigues PT, Luna EJA and Kirchgatter K, 2016. Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megapolis. Malaria Journal 2017 16:83. DOI: 10.1186/s12936-017-1729-8
9. Clark NJ, Wells K, Dimitrov D, Clegg SM. Co-infections and environmental conditions drive the distributions of blood parasites in wild birds. J Anim Ecol. 2016 Nov;85(6):1461-1470. DOI: 10.1111/1365-2656.12578

10. Dimitrov, D., Palinauskas, V., Iezhova, T.A., Bernotienė, R., Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D., Zehindjiev, P., Ilieva, M., Shapoval, A.P., Bolshakov, C.V., Markovets, M.Y., Bensch, S., Valkiūnas, G., 2015. *Plasmodium* spp.: an experimental study on vertebrate host susceptibility to avian malaria. *Exp. Parasitol.* 148, 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.11.005>
11. Dimitrov, D., Valkiūnas, G., Zehindjiev, P., Ilieva, M., Bensch, S., 2013. Molecular characterization of haemosporidian parasites (Haemosporida) in yellow wagtail (*Motacilla flava*), with description of in vitro ookinetes of *Haemoproteus motacillae*. *Zootaxa* 3666 (3), 369-381. DOI: <https://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3666.3.7>
12. Dimitrov, D., Zehindjiev, P., Bensch, S., Ilieva, M., Iezhova, T., Valkiūnas, G., 2014. Two new species of *Haemoproteus* Kruse, 1890 (Haemosporida, Haemoproteidae) from European birds, with emphasis on DNA barcoding for detection of haemosporidians in wildlife. *Syst. Parasitol.* 87 (2), 135-151. DOI: 10.1007/s11230-013-9464-1
13. Durrant KL, Beadell JS, Ishtiaq F, Graves GR, Olson SL, Gering E, Peirce MA, Milensky CM, Schmidt BK, Gebhard C, Fleischer RC, 2006. Avian haematzoa in South America: a comparison of temperate and tropical zones. *Ornithol. Monogr.* 60, 98-111. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/40166831>
14. Fallon SM, Ricklefs RE, Swanson BL, Bermingham E. 2003. Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. *J Parasitol* 89(5):1044-7. DOI: 10.1645/GE-3157
15. Fecchio A, Lima MR, Svensson-Coelho M, Marini MA, Ricklefs RE. Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil. *Parasitology.* 2013;140:181–92. DOI: 10.1017/S0031182012001412
16. Feldman RA, Freed LA and Cann RL. 1995. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Mol. Ecol.* 4. 663-673.
17. Garnham, P.C.C., 1966. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford.
18. Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Oxford University Press. Nucleic Acids Symposium Series No. 41*; 95-98.
19. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S, 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium* and *Haemoproteus* from avian blood. *J. Parasitol.* 90, 797-802. DOI: 10.1645/GE-184R1

20. Hill AG, Howe L, Gartrell BD, Alley MR, 2010. Prevalence of *Leucocytozoon* spp., in the endangered yellow-eyed penguin *Megadyptes antipodes*. *Parasitology*. Vol. 137 (10):1477-1485. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182009991910>
21. Levin II, Outlaw CD, Vargas HF, Parker GP, 2009. *Plasmodium* blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). *Biological conservation*. Elsevier. Vol. 142 (12): 3191-3195. DOI: 10.1016/j.biocon.2009.06.017
22. Lutz HL, Hochachka WM, Engel JI, Bell JA, Tkach VV, Bates JM, et al. Parasite prevalence corresponds to host life history in a diverse assemblage of Afrotropical birds and haemosporidian parasites. *PLoS One*. 2015; DOI: 10.1371/journal.pone.0121254
23. Martinez J, Martinez-de la Puente J, Herrero J, Delcerro S, Lobato E, Rivero-de Aguilar J, Vasquez R, Marino S. A restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: on the inefficiency of general primers for detection of mixed infections. *Parasitology*. 2009 Jun;136(7):713-22. DOI: 10.1017/S0031182009006118
24. Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ, 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol. Phylogenetics Evol.* 47, 261-273. DOI: 10.1016/j.ympev.2007.11.012
25. Miller RE and Fowler ME, *Flower's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*, Volume 7, Chapter 47 - Levin II and Parker PG. Hemosporidian Parasites: Impacts on Avian Hosts. 356
26. Mukhin A, Palinauskas V, Platonova E, Kobylkov D, Vakoliuk I, Valkiūnas G. The Strategy to Survive Primary Malaria Infection: An Experimental Study on Behavioural Changes in Parasitized Birds. *Publikuotas internete*. Adresas: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4951008/>
27. Palinauskas V, Dolnik OV, Valkiūnas G, and Bensch S, 2010. Laser Microdissection Microscopy and Single Cell PCR of Avian Hemosporidians. *Int. J. Parasitol.* 96(2):420-424. DOI: <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2247.1>
28. Palinauskas V, Valkiūnas G, Bolshakov CV, Bensch S. 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Exp Parasitol.* DOI: 10.1016/j.exppara.2008.09.001
29. Palinauskas V, Žiegytė R, Ilgūnas M, Iezhova TA, Bernotienė R, Bolshakov C, Valkiūnas, G, 2015. Description of the first cryptic avian malaria parasite,

- Plasmodium homocircumflexum* n. sp., with experimental data on its virulence and development in avian hosts and mosquitoes. *Int. J. Parasitol.* 45 (1), 51-62. DOI: 10.1016/j.ijpara.2014.08.012
30. Peirce MA 1989. The significance of avian hematozoa in conservation strategies. *ICBP Tech. Pub. No. 10*: 69-76.
 31. Pérez-Tris, J., Bensch, S., 2005. Diagnosing genetically diverse avian malarial infections using mixed sequencing analysis and TA-cloning. *Parasitology* 131, 15-23. DOI: 10.1017/S003118200500733X
 32. Perkins SL, 2014. Malaria's many mates: past, present and future of the systematics of the order Haemosporida. *J. Parasitol.* 100, 11-25. DOI: 10.1645/13-362.1.
 33. Richard FA, Sehgal RNM, Jones HI and Smith TB (2002). A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *Journal of Parasitology* 88, 819–822 DOI: 10.1645/0022-3395(2002)088[0819:ACAOPB]2.0.CO;2
 34. Rollison D and Hay SI, 2012. *Advances in Parasitology*. Academic Press. 183-184
 35. Schaer J, Reeder DM, Vodzak ME, Olival KJ, Weber N, Mayer F, Matuschewski K, Perkins SL, 2015. Nycteria parasites of Afrotropical insectivorous bats. *Int. J. Parasitol.* 45 (6), 375-384. DOI: 10.1016/j.ijpara.2015.01.008
 36. Valkiunas G, Iezhova TA, Krizanauskiene A, Palinauskas V, Sehgal RN, Bensch S. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *J Parasitol.* 2008 Dec;94(6):1395-401. DOI: 10.1645/GE-1570.1
 37. Valkiūnas, G., 2005. *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton.
 38. Valkiūnas, G., Bensch, S., Iezhova, T.A., Križanauskienė, A., Bolshakov, C.V., 2006. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites : microscopy is still essential. *J. Parasitol.* 92, 418-422. DOI: 10.1645/GE-3547RN.1
 39. Valkiūnas, G., Kazlauskienė, R., Bernotienė, R., Bukauskaitė, D., Palinauskas, V., Iezhova, T.A., 2014. Haemoproteus infections (Haemosporida, Haemoproteidae) kill bird-biting mosquitoes. *Parasitol. Res.* 113, 1011-1018. DOI: 10.1007/s00436-013-3733-4
 40. Waldenström J, Bensch S, Hasselquist D, Östman Ö, 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90, 191–194. DOI: 10.1645/GE-3221RN

41. Wang L, Liu Y, Zhang S, Wang Y, Zhao J, Miao F, et al. A SYBR-green I quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for rabies viruses with different virulence. *Viol Sin.* 2014;29:131–2. DOI: 10.1007/s12250-014-3378-1
42. Xu W, Morris U, Aydin-Schmidt B, Msellem MI, Shakely D, Petzold M, et al. SYBR green real-time PCR-RFLP assay targeting the *Plasmodium* cytochrome b gene – a highly sensitive molecular tool for malaria parasite detection and species determination. *PLoS One.* 2015; DOI: 10.1371/journal.pone.0120210.
43. Zehindjiev P, Križanauskienė A, Bensch S, Palinauskas V, Asghar M, Dimitrov D, Scebbba S, Valkiūnas G, 2012. A new morphologically distinct avian malaria parasite that fails detection by established polymerase chain reaction-based protocols for amplification of the cytochrome b gene. *J. Parasitol.* 98, 657-666. DOI: 10.1645/GE-3006.1