Научная статья

УДК 619.576.895.132

https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-3-264-273

Возможности использования «вложенной» ПЦР-ПДРФ для таксономической идентификации личинок L3 семейства Trichostrongylidae, Leiper, 1912

Илья Александрович Пименов [1], Ирина Михайловна Одоевская [2], Айшет Магомедовна Плиева [3], Анастасия Ивановна Варламова [4]

[1, 2, 4] Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва, Россия

[3] ФГБОУ ВО «Ингушский государственный университет», Магас, Россия

[1] mr.pimenov123@yandex.ru, https://orcid.org/0009-0001-8712-6073

[2] odoevskayaim@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-3644-5592

[3] aishet57@mail.ru

[4] arsphoeb@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8364-5055

Аннотация

Цель исследования – применить молекулярно-генетические методы исследований для выявления таксономической принадлежности паразитических нематод желудочно-кишечного тракта овец сем. Trichostrongylidae, используя «вложенную» ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

Материалы и методы. Паразитические нематоды: личинки стронгилят L3, полученные в результате инкубирования проб фекалий овец. Выделение геномной ДНК проводили с использованием коммерческого набора для экстракции ДНК из микроколичеств тканей (фирма «Синтол», Москва), согласно рекомендациям производителя. Для амплификации ДНК использовали термоциклер T-100 Bio-Rad и коммерческий набор реактивов Master Mix, Евроген. Режим проведения ПЦР осуществляли согласно руководству WAAVP, 2006. Реакцию рестрикции эндонуклеазой RsaI амплифицированных фрагментов трихостронгилид проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя фермента («Сибэнзим», г. Новосибирск).

Результаты и обсуждение. Для определения таксономической принадлежности личинок стронгилят, выделенных после инкубации фекалий, полученных от овец, были проведены молекулярно-генетические исследования методом «вложенной» ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Данный метод дает возможность с наименьшими трудозатратами идентифицировать генотипы трех видов стронгилят: *Haemonchus contortus, Trichostrongylus colubriformis, Teladorsagia circumcincta* на стадии личинки.

Ключевые слова: *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, паразитические нематоды, трихостронгилиды, ПЦР-ПДРФ, рестриктаза

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Гранта РНФ №23-26-00220.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует.

Для цитирования: *Пименов И. А., Одоевская И. М., Плиева А. М., Варламова А. И.* Возможности использования «вложенной» ПЦР-ПДРФ для таксономической идентификации личинок L3 семейства Trichostrongylidae, Leiper, 1912 // Российский паразитологический журнал. 2024. Т. 18. № 3. С. 264–273.

https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-3-264-273

© Пименов И. А., Одоевская И. М., Плиева А. М., Варламова А. И., 2024

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
The content is available under Creative Commons Attribution 4.0 License.

Original article

Possibilities of using nested PCR-RFLP for taxonomic identification of L3 larvae of the family Trichostrongylidae, Leiper, 1912

Ilya A. Pimenov [1], Irina M. Odoevskaya [2], Aishet M. Plieva [3], Anastasiya I. Varlamova [4]

[1, 2, 4] All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (VNIIP – FSC VIEV), Moscow, Russia

[3] FSBEI HE Ingush State University, Magas, Russia

[1] mr.pimenov123@yandex.ru, https://orcid.org/0009-0001-8712-6073

[2] odoevskayaim@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-3644-5592

[3] aishet57@mail.ru

[4] arsphoeb@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8364-5055

Abstract

The purpose of the research is to apply molecular genetic research methods to identify the taxonomic affiliation of gastrointestinal parasitic sheep nematodes of the family Trichostrongylidae using nested PCR followed by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.

Materials and methods. Parasitic nematodes, L3 Strongylata larvae obtained from incubated fecal samples of sheep. The genomic DNA was isolated using a commercial kit for DNA extraction from micro-quantities of tissues (Synthol, Moscow) as per the manufacturer's guidelines. For DNA amplification, a T-100 Bio-Rad thermal cycler and a commercial Eurogen Master Mix reagent kit were used. The PCR regime was performed according to the WAAVP guidelines, 2006. The restriction endonuclease Rsa I of amplified Trichostrongylidae fragments was performed according to guidelines of the enzyme manufacturer (Sibenzyme, Novosibirsk).

Results and discussion. To determine the taxonomic affiliation of Strongylata larvae isolated after incubation of feces from sheep, molecular genetic studies were performed using nested PCR followed by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. This method makes it possible to identify, with the least effort, the genotypes of three species of Strongylata *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, and *Teladorsagia circumcincta* at the larval stage.

Keywords: *Teladorsagia circumcincta; Haemonchus contortus; Trichostrongylus colubriformis*, parasitic nematodes, Trichostrongylidae, PCR-RFLP, restriction enzyme

Acknowledgments. The study was conducted with financial support from the Russian Science Foundation Grant No. 23-26-00220.

Financial Disclosure: none of the authors has financial interest in the submitted materials or methods.

There is no conflict of interests.

For citation: Pimenov I. A., Odoevskaya I. M., Plieva A. M., Varlamova A. I. Possibilities of using nested PCR-RFLP for taxonomic identification of L3 larvae of the family Trichostrongylidae, Leiper, 1912. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2024; 18(3):264–273. (In Russ.).

https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-3-264-273

© Pimenov I. A., Odoevskaya I. M., Plieva A. M., Varlamova A. I., 2024

Введение

Во всем мире гельминтозы являются глобальной проблемой современного здравоохранения и ветеринарии. Нематодозы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) жвачных животных наносят серьезный ущерб экономике животноводческой отрасли сельского хозяйства во многих странах мира, в особенности, в регионах, где практикуется пастбищное скотоводство [7, 9, 10, 14-17].

Точная видовая идентификация стронгилят важна для выявления фауны нематод, паразитирующих в ЖКТ у мелких жвачных животных, изучения эпизоотологии распространения паразитарных болезней и определения стратегий борьбы с геогельминтозами [5, 6].

Классические методы определения видовой принадлежности гельминтов основаны на изучении методами световой микроскопии морфологических и морфометрических особенностей паразитов [1, 26, 27]. В настоящее время российские ветеринарные специалисты для таксономической идентификации личиночных стадий (L3) трихостронгилид используют преимущественно методы световой микроскопии, основанные на изучении морфологии и морфометрии гельминта, в том числе по числу клеток кишечника и строению краниального (головного) и каудального (хвостового) отделов тела личинки. Однако, вышеупомянутые методы требуют наличия квалифицированных специалистов-морфологов, и не всегда позволяют выявить таксономическую принадлежность яиц и всех личиночных стадий развития стронгилят [15, 24, 27]. Вышеуказанные методы дают возможность проводить таксономический анализ популяции нематод ЖКТ сельскохозяйственных жвачных животных при постмортальных исследованиях на убойных пунктах, или на личинках, с определённой долей достоверности, поскольку многие морфометрические показатели у L3 сем. Trichostrongylidae перекрываются [13, 26, 27].

Широко применяемые в ветеринарии исследования *in vivo* позволяют выявить наличие резистентности к определённому классу применяемых фармакологических средств на уровне всей популяции паразитических нематод в конкретном стаде и не позволяют дифференцировать восприимчивые и устойчивые к воздействию антигельминтных препаратов виды стронгилят [8, 15, 16, 17].

Современные методы молекулярной биологии позволяют использовать новые инструменты для видовой идентификации всех стадий развития трихостронгилид [8, 16, 20, 25, 28].

Большинство этих методов основаны на разновидностях полимеразной цепной реакции (ПЦР) и успешно используются для выявления генетических мутаций, приводящих к возникновению устойчивости к антигельминтным препаратам [5, 11, 12, 23].

Исходя из имеющегося в лаборатории оборудования, нами был освоен используемый в молекулярной генетике метод ПЦР-ПДРФ (полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК). Данный метод востребован в случаях, когда отсутствует возможность провести прямое секвенирование изучаемого фрагмента ДНК при необходимости изучения таксономического состава гельминтов сем. Trichostrongylidae в популяциях нематод, паразитирующих у овец [4, 21].

Материалы и методы

Паразитические нематоды. Личинок стронгилят L3 получали из свежесобранных проб фекалий овец.

Протокол получения L3 из яиц трихостронгилид. Фекалии овец в чашках Петри смачивали водой и перемешивали шпателем до получения однородной массы. Инкубацию проводили при 27–28 ° в течение 1–2 недель с обязательным ежедневным проветриванием чашек Петри и наблюдением за появлением личинок (L3) на дне устройства типа «звездочка». Каждую особь помещали на предметное стекло для изучения морфофизиологических особенностей L3 методом световой микроскопии. Нематод сохраняли в отдельных промаркированных пробирках типа «Эппендорф» при -20 ° вплоть до начала проведения молекулярно-генетических исследований.

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

Проведение «вложенной ПЦР». Для амплификации ДНК использовали термоциклер T-100 Bio-Rad и коммерческий набор реактивов Master Mix, Евроген. Режим проведения ПЦР, используемые реактивы и расчёт конечной концентрации реагентов в реакционной смеси для амплификации фрагмента ДНК осуществляли согласно руководствам WAAVP [8, 13, 24].

На первом этапе ПЦР использовали праймеры Pn1-Pn2 [13, 24]. Полученный продукт использовали в качестве матрицы для про-

ведения второго этапа «вложенной» ПЦР с праймерами Pn3-Pn4 [13, 24].

Режим проведения «вложенной» ПЦР: 96° – 2 мин, 95° – 45 с, отжиг при 57° – 55 с, 72° – 65 с, элонгация цепи 72° – 35 циклов, последний раунд 72° – 5 мин, сохранение продукта при 8°. Количество амплифицированного фрагмента ДНК в пробах анализировали с помощью прибора Fluorometer Qubit 3,0, Invitrogen.

Полученный фрагмент ДНК (амплификон) использовали в качестве основного компонента для проведения реакции с эндонуклеазой RsaI (фирма «Сибэнзим», г. Новосибирск).

Протокол проведения реакции рестрикции с эндонуклеазой RsaI. 10 мкл амплифицированного продукта «вложенной» ПЦР (25–30 пмол.), эндонуклеаза RsaI – 40 ед., RsaI-буфер – 2 мкл. Инкубация в течение 1,5 ч при 37°.

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

Результаты и обсуждение

Для получения живых личинок стронгилят L3 пробы фекалий отбирали непосредственно из прямой кишки жвачного животного. Данное требование связано с тем, что фекалии, собранные с земли, часто бывают контаминированы свободноживущими нематодами, которые в процессе инкубации численно могут доминировать над паразитическими нематодами, что препятствует проведению дифференциального подсчета числа личинок паразитических нематод в пробах [27].

Свободноживущие представители отряда Rhabditidae морфологически отличаются от личинок стронгилят тем, что большинство свободноживущих нематод, встречающихся в фекальных культурах, являются взрослыми особями, а не личинками, а также имеют рабдитовидный пищевод (т. е. с двумя заметными луковицами каудально) и длинный хвост, без закрывающей оболочки.

Однако, следует отметить, что в процессе таксономической идентификации яиц и личинок трихостронгилид по морфологическим и морфометрическим критериям, мы столкнулись со значительными сложностями.

В настоящее время единственным практическим методом, доступным для прижизненной количественной оценки пропорций представителей родов паразитических нематод, присутствующих в конкретном жвачном животном, является идентификация личинок, которые развиваются из яиц при инкубации проб фекалий. Следует особо отметить, что освоение метода В. Ф. Никитина (патент № SU 1391625 A1) и его использование позволило существенно оптимизировать процесс выделения вылупившихся из яиц личинок и в конечном результате получить из фекалий чистую культуру жизнеспособных, активно двигающихся личинок L3 стронгилят.

В основе метода лежат особенности поведения инвазионных личинок в окружающей среде – хемотаксис и передвижение вверх по направлению к чистой воде [2]. При интенсивном заражении яйцами гельминтов фекалий овец после завершения времени инкубации в термостате в устройстве «звездочка» можно было обнаружить до нескольких сотен активно двигающихся личинок стронгилят. Личинки имели видимые морфологические особенности, позволяющие проводить таксономическую идентификацию последних (морфометрия, строение хвостового конца, число кишечных клеток и др.) с определённой степенью достоверности [1, 26, 27].

Для уточнения полученных ранее результатов таксономической идентификации состава популяции личинок паразитических нематод по морфологическим и морфометрическим критериям были проведены молекулярно-генетические исследования методом «вложенной» ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Для этого было проведено выделение геномной ДНК из 167 экз. паразитических нематод. При проведении молекулярных исследований были использованы праймеры к внутренним (ITS) и внешним (ETS) транскрибируемым спейсерам и последовательностям, выбранным из малых и больших субъединиц генов рибосомальной ДНК трихостронгилид. Нуклеотидные последовательности прямых и обратных праймеров были подобраны с учётом гомологии с последовательностями ДНК видов: *Haemonchus contortus, Trichostrongylus colubriformis* и *Teladorsagia circumcincta* [8, 13, 24]. На первом этапе исследований была применена изотермическая реакция (ПЦР) с «общими» праймерами Pn1-Pn2, амплифицирующими фрагмент ДНК, имеющийся у всех

видов трихостронгилид и не свойственный свободноживущим нематодам:

Pn1 – F 5' GGC AAA TAT GTC CCA CGT GC 3'
Pn2 – R 5' GAA GCG CGA TAC GCT TGA GC 3'

В результате проведенного первого этапа «вложенной» ПЦР были достигнуты сразу две цели: во-первых, исключена возможность амплификации в ПЦР геномной ДНК свободноживущих нематод (рабдитид), и, во-вторых, получено экспоненциальное увеличение количества целевого продукта – ДНК трихостронгилид.

Для проведения второго этапа «вложенной» ПЦР нами были использованы праймеры Pn3–Pn4, дизайн которых был разработан A. Silvestre, J. F. Humbert [24] на основании результатов биоинформационного анализа. Олигонуклеотидные структуры праймеров (Pn3 и Pn4) были гомологичны определённым фрагментам последовательностей ДНК *H. contortus, T. colubriformis* и *T. circumcincta*:

Pn3 – F 5' GGA ACA ATG GAC TCT GTT CG 3'
Pn4 – R 5' GGG AAT CGA AGG CAG GTC GT 3'

В качестве матрицы для проведения «вложенной» ПЦР с праймерами Pn3–Pn4 использовали амплифицированные фрагменты ДНК, полученные ранее в изотермической реакции с праймерами Pn1–Pn2. В результате были получены амплификоны размером 820 н.п., содержащие фрагменты ДНК представителей трех наиболее патогенных и часто встречающихся видов сем. Trichostrongylidae (рис., треки № 1, 3, 5).

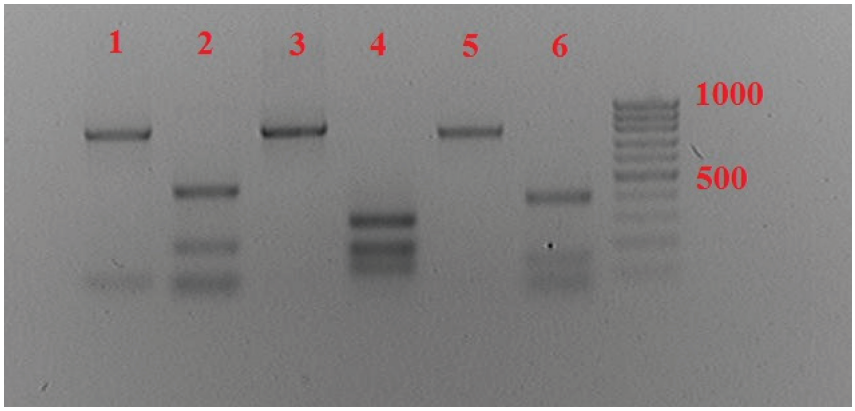

Рис. Паттерны рестрикции, полученные для трех видов семейства Trichostrongylidae:

треки № 1, 3, 5 – последовательности амплифицированных фрагментов Pn3-Pn4 (820 п.н.) видов *H. contortus, T. circumcincta* и *T. colubriformis*, соответственно; трек № 2 – *H. contortus* – 440, 190 и 140 п.н.; трек № 4 – *T. circumcincta* – 284, 189 и 182 п.н.; трек № 6 – *T. colubriformis* – 390, 180 и 100 п.н.

[**Fig.** Restriction patterns obtained for three species of the Trichostrongylidae family:

tracks 1, 3, 5 – sequences of amplified fragments Pn3-Pn4 (820 bp) of the species *H. contortus, T. circumcincta* and *T. colubriformis* respectively; track 2 – *H. contortus* – 440, 190 and 140 bp; track 4 – *T. circumcincta* – 284, 189 and 182 bp; track 6 – *T. colubriformis* – 390, 180 and 100 bp]

Анализ рестрикционной карты последовательности Pn3–Pn4 показал, что для идентификации каждого из трех видов трихостронгилид оптимальным ферментом, обеспечивающим специфический профиль рестрикции, является эндонуклеаза RsaI [21].

Анализ молекулярной массы полученных в результате расщепления ампликонов ДНК эндонуклеазой RsaI проводили с использованием метода электрофореза в 2,5%-ном агарозном геле (рис.). Размеры ресрикционных фрагментов ДНК *H. contortus* приведены на треке № 2, молекулярная масса которых составила 440, 190 и 140 н.п. На треке № 4 приведены рестрикционные фрагменты размерами 284, 189 и 182 н.п., характерные для генотипа нематод, при-

надлежащих к виду *T. circumcincta*. Фрагменты размерами 390, 180 и 100 н.п., приведенные на треке № 6, подтверждают принадлежность исследуемого объекта к виду *T. colubriformis*.

Полученные размеры рестрикционных фрагментов соотносили с ранее проведённой по морфологическим критериям таксономической идентификацией единичных личиночных стадий исследуемых гельминтов: *H. contortus, T. colubriformis, T. circumcincta*.

Необходимо отметить, что полное совпадение результатов таксономической идентификации личинок трихостронгилид двумя методами: морфологическим (световой микроскопии) и молекулярным (ПЦР-ПДРФ) было получено менее чем в 60% случаев.

На наличие аналогичной проблемы при определении родовой/видовой принадлежности личинок стронгилят указывали многие зарубежные исследователи [15, 21, 26, 27]. В частности, размер личинки и длина каудального отдела STE могут меняться в зависимости от количества влаги в культуральной среде [22]. Кроме того, отмечено, что у недавно развившихся из яиц личинок форма кишечных клеток меняется, что осложняет их морфологическую идентификацию.

Отмечены сложности дифференциальной таксономической идентификации смешанной культуры личинок *Teladorsagia* spp. и *Trichostrongylus* spp., в связи с перекрывающимися морфометрическими показателями у представителей вышеуказанных родов трихостронгилид [18, 19, 26].

Заключение

Точная видовая идентификация паразитических нематод у сельскохозяйственных жвачных животных важна для диагностики инвазии в ветеринарной паразитологии, популяционных эпизоотических исследований, изучения эпидемиологии паразитов и разработке мер борьбы с гельминтозами. Для уточнения полученных ранее результатов таксономической идентификации состава популяции паразитических нематод по морфологическим критериям желательно проводить молекулярно-генетические исследования, в том числе и методом «вложенной» ПЦР-ПДРФ. Данный метод предоставляет возможность определять видовую принадлежность представителей сем. Trichostrongylidae на любой стадии жизненного цикла гельминта, что не всегда возможно при изучении морфологии методом световой микроскопии.

Данные о видовой принадлежности нематод лежат в основе исследований по выявлению восприимчивых и устойчивых аллелей генов к воздействию различных видов антигельминтных препаратов у паразитических нематод [4, 5, 8, 9, 12, 14, 16]. Возможность одновременной обработки большого числа образцов делает эту стратегию на основе «вложенной» ПЦР-ПДРФ, востребованной для проведения широких эпизоотологических исследований фауны паразитических нематод сельскохозяйственных животных на территории РФ.

Список источников

1. *Ивашкин В. М., Орипов А. О., Сонин М. Д.* Определитель гельминтов мелкого рогатого скота. М.: Наука, 1989. 255 с.
2. *Никитин В. Ф., Павласек И.* Авторское свидетельство СССР № 1095908, кп. А 61 В 10/10, 1981. SU 1 391 625 A1
3. *Пименов И. А., Кузнецов Д. Н., Одоевская И. М., Афанасьев А. Д., Варламова А. И., Архипов И. А.* К фауне нематод пищеварительного тракта овец в Европейской части России // Российский паразитологический журнал. 2023. Т. 17. № 2. С. 206–213. https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-2-206-213
4. *Álvarez-Sánchez M. A., Pérez-García J., Cruz-Rojo M. A., Rojo-Vázquez F. A.* Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. Veterinary Parasitology. 2005; 129 (3–4): 291-298. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.02.004
5. *Baltrušis A., Claude L. Halvarsson P., Mikko S., Höglund J.* Using droplet digital PCR for the detection of hco-acr-8b levamisole resistance marker in *H. contortus*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2021; 15. 168-176. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.03.002
6. *Baltrušis A., Halvarsson P., Höglund J.* Exploring benzimidazole resistance in Haemonchus contortus by next generation sequencing and droplet digital PCR. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2018; 8 (3): 411-419. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.09.003
7. *Charlier J., Rinaldi L., Musella V., Ploeger H. W., Chartier C., Vineer H. R., Hinney B., Samson-Himmelstjerna G., Ba˘cescu B., Mickiewicz M.* Initial assessment of the economic burden

of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. Preventive Veterinary Medicine. 2020; 182. 105103. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105103

8. *Coles G. C., Jackson F., Pomroy W. E., Prichard R. K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M. A., Vercruysse J.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Veterinary Parasitology. 2006; 31; 136 (3-4): 167-185. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.019
9. *Dilks C. M., Hahnel S. R., Sheng Q., Long L., McGrath P. T., Andersen E. C.* Quantitative benzimidazole resistance and fitness effects of parasitic nematode beta- tubulin alleles. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2020; 14. 28–36. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.08.003
10. *Dobson R. J., Hosking B. C., Jacobson C. L., Cotter J. L., Besier R. B., Stein P. A., Reid S. A.* Preserving new anthelmintics: a simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. Veterinary Parasitology. 2012; 186. 79–92. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.049
11. *Gasser R. B.* PCR-based technology in veterinary parasitology. Veterinary Parasitology. 1999. 84. 229–258. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00036-9
12. *Hinney B., Wiedermann S., Bosco A., Rinaldi L., Hofer M., Joachim A., Krücken J., Steinborn R.* Development of a three-colour digital PCR for early and quantitative detection of benzimidazole resistance-associated single nucleotide polymorphisms in Haemonchus contortus. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2023; 22. 88-95. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2023.06.001
13. *Humbert J. F., Elard L.* A simple PCR method for rapidly detecting defined point mutations. Journal: Technical Tips Online. 1997; ISSN: 1366-2120.
14. *Kaplan R. M.* Biology, epidemiology, diagnosis, and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. Veterinary Clinics: Food Animal Practice. 2020; 36 (1): 17–30. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.001
15. *Kaplan R. M., Denwood M. J., Nielsen M. K., Thamsborg S. M., Torgerson P. R., Gilleard J. S., Dobson R. J., Vercruysse J., Levecke B.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. Veterinary Parasitology. 2023; 318. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109936
16. *Kotze A. C., Gilleard J. S., Doyle S. R., Prichard R. K.* Challenges and opportunities for the adoption of molecular diagnostics for anthelmintic resistance. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2020; 14. 264–273. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.11.005
17. *Kotze A. C., Prichard R.* Anthelmintic resistance in Haemonchus contortus: history, mechanisms and diagnosis. Advances in Parasitology. 2016; 93. 397–428. https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012
18. *Lancaster M. B., Hong C.* Differentiation of third stage larvae of "ovine Ostertagia" type and Trichostrongylus species. The Veterinary Record. 1987; 120. 503. http://doi.org/10.1136/vr.120.21.503, PMid:3604011
19. *O'Callaghan M. G.* Observations on the sheath extension of the third stage, infective larvae of Trichostrongylus rugatus. Veterinary Parasitology. 2004; 126. 397–402. http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.027
20. *Prichard R.* Application of molecular biology in veterinary parasitology. Veterinary Parasitology. 1997; 71. 155–175. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00029-0
21. *Rajagopal A., Sabu L., Radhika R., Devada K., Jain Jose K., Thomas N., Aravindakshan T. V.* Development of PCR-RFLP for the detection of benzimidazole resistance polymorphisms in isotype 1 β-tubulin gene of Trichostrongylus colubriformis. Small Ruminant Research. 2023. 222. 106954. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2023.106954.
22. *Rossanigo C. E., Gruner L.* The length of strongylid nematode infective larvae as a reflection of developmental conditions in faeces and consequence on their viability. Parasitology Research. 1996; 82. 304–311. http://doi.org/10.1007/ s004360050118, PMid:8740545
23. *Santos J. M. L., Vasconcelos J. F., Frota G. A., Freitas E. P., Teixeira M., Vieira L. S., Bevilaqua C. M. L., Monteiro J. P.* Quantitative molecular diagnosis of levamisole resistance in populations of Haemonchus contortus. Experimental Parasitology. 2019; 205. 107734. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107734
24. *Silvestre A., Humbert J.-F.* A Molecular Tool for Species Identification and Benzimidazole Resistance Diagnosis in Larval Communities of Small Ruminant Parasites. Experimental Parasitology. 2000; 95 (4): 271–276. https://doi.org/10.1006/expr.2000.4542
25. *Smits H. L., Hartskeerl R. A.* PCR amplification reactions in parasitology. Journal of Microbiological Methods. 1995; 23. 41–54.
26. *Van Wyk J. A., Cabaret J., Michael L. M.* Morphological identification of nematodes of

small ruminants and cattle simplified. Veterinary Parasitology. 2004; 119. 277–306. http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012

27. *Van Wyk J. A., Mayhew E.* Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 2013; 80 (1): 14. http:// doi.org/10.4102/ojvr. v80i1.539

28. *Weiss J. B.* DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clinical Microbiology Reviews. 1995; 8. 113–130. https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.113

Статья поступила в редакцию 05.04.2024; принята к публикации 15.07.2024

Об авторах:

Пименов Илья Александрович, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218 Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, аспирант, mr.pimenov123@yandex.ru

Одоевская Ирина Михайловна, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218 Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, кандидат биологических наук, ORCID ID: 0000-0002-3644-5592, odoevskayaim@rambler.ru

Плиева Айшет Магомедовна, Ингушский государственный университет (386001, Республика Ингушетия, Россия, г. Магас, пр-кт И. Б. Зязикова, 7), г. Магас, Россия, доктор биологических наук, член-корреспондент МАНЭБ, aishet57@mail.ru

Варламова Анастасия Ивановна, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218 Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, доктор биологических наук, ORCID ID: 0000-0001-8364-5055, arsphoeb@mail.ru

Вклад соавторов:

Пименов Илья Александрович – гельминтологическое вскрытие, сбор гельминтов, выделение ДНК, постановка вложенной ПЦР-ПДРФ, электрофоретическое разделение продуктов амплификации, подготовка статьи.

Одоевская Ирина Михайловна – научное руководство, подбор праймеров, разработка дизайна исследований, ресурсное обеспечение НИР, анализ и интерпретация полученных результатов, обзор литературы, подготовка рукописи.

Плиева Айшет Магомедовна – гельминтологическое вскрытие, сбор гельминтов, таксономическая идентификация паразитических нематод, подготовка статьи.

Варламова Анастасия Ивановна – сбор гельминтов, таксономическая идентификация паразитических нематод, критический анализ и интерпретация полученных данных, оформление рукописи.

Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

References

1. Ivashkin V. M., Oripov A. O., Sonin M. D. Identification guide to helminths of small ruminants. M.: Science, 1989; 255. (In Russ.)

2. Nikitin V. F., Pavlasek I., Copyright certificate of the USSR No. 1095908, pc. A 61 B 10/10, 1981. SU 1 391 625 A1

3. Pimenov I. A., Kuznetsov D. N., Odoevskaya I. M., Afanasyev A. D., Varlamova A. I., Arkhipov I. A. To the fauna of gastrointestinal nematodes of sheep in the European part of Russia. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2023; 17 (2): 206–213. (In Russ.) https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-2-206-213

4. Álvarez-Sánchez M. A., Pérez-García J., Cruz-Rojo M. A., Rojo-Vázquez F. A. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. *Veterinary Parasitology.* 2005; 129 (3–4): 291-298. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.02.004

5. Baltrušis A., Claude L. Halvarsson P., Mikko S., Höglund J. Using droplet digital PCR for the detection of hco-acr-8b levamisole resistance marker in *H. contortus. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.* 2021; 15. 168-176. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.03.002

6. Baltrušis A., Halvarsson P., Höglund J., Exploring benzimidazole resistance in Haemonchus contortus by next generation sequencing and droplet digital PCR. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2018; 8 (3): 411-419. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.09.003

7. Charlier J., Rinaldi L., Musella V., Ploeger H. W., Chartier C., Vineer H. R., Hinney B., Samson-Himmelstjerna G., Ba ̆cescu B., Mickiewicz M. Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Preventive Veterinary Medicine.* 2020; 182. 105103. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105103

8. Coles G. C., Jackson F., Pomroy W. E., Prichard R. K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M. A., Vercruysse J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance.

Veterinary Parasitology. 2006; 31; 136 (3-4): 167-185. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.019

9. Dilks C. M., Hahnel S. R., Sheng Q., Long L., McGrath P. T., Andersen E. C. Quantitative benzimidazole resistance and fitness effects of parasitic nematode beta- tubulin alleles. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.* 2020; 14. 28–36. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.08.003
10. Dobson R. J., Hosking B. C., Jacobson C. L., Cotter J. L., Besier R. B., Stein P. A., Reid S. A. Preserving new anthelmintics: a simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. *Veterinary Parasitology.* 2012; 186. 79–92. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.049
11. Gasser R. B. PCR-based technology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*. 1999. 84. 229–258. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00036-9
12. Hinney B., Wiedermann S., Bosco A., Rinaldi L., Hofer M., Joachim A., Krücken J., Steinborn R. Development of a three-colour digital PCR for early and quantitative detection of benzimidazole resistance-associated single nucleotide polymorphisms in Haemonchus contortus. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.* 2023; 22. 88-95. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2023.06.001
13. Humbert J. F., Elard L. A simple PCR method for rapidly detecting defined point mutations. *Journal: Technical Tips Online.* 1997; ISSN: 1366-2120.
14. Kaplan R. M. Biology, epidemiology, diagnosis, and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 2020; 36 (1): 17–30. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.001
15. Kaplan R. M., Denwood M. J., Nielsen M. K., Thamsborg S. M., Torgerson P. R., Gilleard J. S., Dobson R. J., Vercruysse J., Levecke B. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. *Veterinary Parasitology*. 2023; 318. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109936
16. Kotze A. C., Gilleard J. S., Doyle S. R., Prichard R. K. Challenges and opportunities for the adoption of molecular diagnostics for anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2020; 14. 264–273. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.11.005
17. Kotze A. C., Prichard R. Anthelmintic resistance in Haemonchus contortus: history, mechanisms and diagnosis. *Advances in Parasitology.* 2016; 93. 397–428. https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012
18. Lancaster M. B., Hong C. Differentiation of third stage larvae of "ovine Ostertagia" type and Trichostrongylus species. *The Veterinary Record.* 1987; 120. 503. http://doi.org/10.1136/vr.120.21.503, PMid:3604011
19. O'Callaghan M. G. Observations on the sheath extension of the third stage, infective larvae of Trichostrongylus rugatus. V*eterinary Parasitology.* 2004; 126. 397–402. http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.027
20. Prichard R. Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology.* 1997; 71. 155–175. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00029-0
21. Rajagopal A., Sabu L., Radhika R., Devada K., Jain Jose K., Thomas N., Aravindakshan T. V. Development of PCR-RFLP for the detection of benzimidazole resistance polymorphisms in isotype 1 β-tubulin gene of Trichostrongylus colubriformis. *Small Ruminant Research.* 2023. 222. 106954. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2023.106954.
22. Rossanigo C. E., Gruner L. The length of strongylid nematode infective larvae as a reflection of developmental conditions in faeces and consequence on their viability. *Parasitology Research*. 1996; 82. 304–311. http://doi.org/10.1007/ s004360050118, PMid:8740545
23. Santos J. M. L., Vasconcelos J. F., Frota G. A., Freitas E. P., Teixeira M., Vieira L. S., Bevilaqua C. M. L., Monteiro J. P. Quantitative molecular diagnosis of levamisole resistance in populations of Haemonchus contortus. *Experimental Parasitology.* 2019; 205. 107734. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107734
24. Silvestre A., Humbert J.-F. A Molecular Tool for Species Identification and Benzimidazole Resistance Diagnosis in Larval Communities of Small Ruminant Parasites. E*xperimental Parasitology.* 2000; 95 (4): 271–276. https://doi.org/10.1006/expr.2000.4542
25. Smits H. L., Hartskeerl R. A. PCR amplification reactions in parasitology. *Journal of Microbiological Methods*. 1995; 23. 41–54.
26. Van Wyk J. A., Cabaret J., Michael L. M. Morphological identification of nematodes of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary*

Parasitology. 2004; 119. 277–306. http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012

27. Van Wyk J. A., Mayhew E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2013; 80 (1): 14. http:// doi.org/10.4102/ojvr. v80i1.539

28. Weiss J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995; 8. 113–130. https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.113

The article was submitted 05.04.2024; accepted for publication 15.07.2024

About the authors:

Pimenov Ilya A., VNIIP – FSC VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia), Moscow, Russia, Postgraduate Student, mr.pimenov123@yandex.ru

Odoevskaya Irina M., VNIIP – FSC VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia), Moscow, Russia, Candidate of Biological Sciences, ORCID ID: 0000-0002-3644-5592, odoevskayaim@rambler.ru

Plieva Aishet M., Ingush State University (7 I. B. Zyazikova Ave., Magas, Republic of Ingushetia, 386001, Russia), Magas, Russia, Doctor of Biological Sciences, Corresponding Member of the International Academy of Ecology & Life Protection Sciences, aishet57@mail.ru

Varlamova Anastasiya I., VNIIP – FSC VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia), Moscow, Russia, Doctor of Biological Sciences, ORCID ID: 0000-0001-8364-5055, arsphoeb@mail.ru

Contribution of co-authors:

Pimenov Ilya A. – helminthological necropsy, collection of helminths, DNA isolation, nested PCR-RFLP, electrophoretic separation of amplification products, article preparation.

Odoevskaya Irina M. – academic supervision, selection of primers, study design development, resource support for research work, analysis and interpretation of obtained results, literature review, manuscript preparation.

Plieva Aishet M. – helminthological necropsy, collection of helminths, taxonomic identification of parasitic nematodes, article preparation.

Varlamova Anastasiya I. – collection of helminths, taxonomic identification of parasitic nematodes, obtained data critical analysis and interpretation, manuscript drafting.

All authors have read and approved the final manuscript.