

ПОРІВНЯННЯ ТРЬОХ МЕТОДІВ ІЗОЛЯЦІЇ ДНК ІЗ ІКСОДОВИХ КЛІЩІВ

Левицька Вікторія Андріївнакандидат ветеринарних наук, асистент кафедри інфекційних та інвазійних хвороб
Подільський державний аграрно-технічний університет, (м Кам'янець-Подільський, Україна)

ORCID: 0000-0003-3100-009X

levytska28@gmail.com**Мушинський Андрій Броніславович,**кандидат біологічних наук, доцент кафедри інфекційних та інвазійних хвороб
Подільський державний аграрно-технічний університет, (м Кам'янець-Подільський, Україна)

ORCID: 0000-0003-2850-2355

Двужник Дорота,

магістр біологічних наук, кафедра екоепідеміології паразитарних хвороб

Інститут біології розвитку та біомедичних наук

біологічний факультет Варшавського університету (м.Варшава, Польща)

ORCID: 0000-0002-4432-3712

Міжесвська Ева-Юлія,

кандидат біологічних наук, кафедра екоепідеміології паразитарних хвороб

Інститут біології розвитку та біомедичних наук,

біологічний факультет Варшавського університету (м.Варшава, Польща)

ORCID: 0000-0002-1334-6110

Байєр Анна

доктор біологічних наук, кафедра екоепідеміології паразитарних хвороб

Інститут біології розвитку та біомедичних наук

біологічний факультет Варшавського університету (м.Варшава, Польща)

ORCID: 0000-0002-9631-0761

Іксодові кліщі – це членистоногі ектопаразити тварин і людини, які переносять велике різноманіття патогенних мікроорганізмів. Кліщі можуть спричиняти патологічні стани, такі як паралічі, лихоманки, токсикози та алергії, а також велику кількість інфекційних та інвазійних захворювань. Метою нашого дослідження було порівняння трьох методів ізоляції ДНК, перевірка їх ефективності та практичності у отриманні матеріалу з кліщів і визначення їх впливу на результативність ПЛР-досліджень. Протягом 2018 року кліщі були зібрані з рослинності методом «на прапор», а також від тварин в Хмельницькій та Чернівецькій областях. Для ізоляції ДНК використовували три різні методи: подрібнення кліщів ножицями та лізис в гідроксиді амонію, подрібнення ножицями з подальшою екстракцією ДНК з комерційним набором Genomic Mini AX Tissue Spin (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), гомогенізація кліщів за допомогою програмованого криогенного гомогенізатора SPEX Sample Prep Freezer Mill 6875 з подальшою екстракцією ДНК з комерційним набором Genomic Mini AX Tissue Spin.

Всього за допомогою ПЛР було досліджено 72 кліщі (60 *D. reticulatus* і 12 *I. ricinus*) з рослинності на наявність збудників *Babesia* spp, *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp. Отже, при першому способі виділення ДНК було виявлено 4,2 % кліщів позитивних на *Babesia* spp.. При дослідженні на *Rickettsia* spp. було виявлено три позитивних кліща (12,5%), на *Borrelia* spp – 8 кліщів (33,3%). При другому способі виділення ДНК було встановлено, що позитивними на *Babesia* spp. є 4,2 % кліщів. Що стосується *Rickettsia* spp. було виявлено 13 позитивних кліщів, що становило 54,2%. При дослідженні на *Borrelia* spp було виявлено 33,3% кліщів з ДНК збудника. При третьому способі досліджень також було виявлено 4,2% кліщів з ДНК *Babesia* spp.. ДНК рикетсії було виявлено у 7 кліщів *D. reticulatus* та 2 кліщів *I. ricinus*, що разом становило 37,5%. ДНК *Borrelia* spp. були виявлені також серед 37,5% кліщів. Таким чином, комбінований метод механічної гомогенізації кліщів в комбінації з комерційним набором для ізоляції ДНК, пропонує максимальну ефективність з точки зору швидкості, кількості та розміру зразків, що підлягають дослідженню.

Ключові слова: кліщі, ізоляція ДНК, *Babesia* spp, *Rickettsia* spp, *Borrelia* sppDOI:<https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2020.1.2>

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Трансмісивні хвороби становлять понад 17% усіх інфекційних захворювань зареєстрованих у світі і спричиняють понад 700 000 смертей щороку (WHO, 2020). Іксодові кліщі – це членистоногі ектопаразити тварин і людини, які переносять велике різноманіття трансмісивних захворювань. Вони

можуть передавати різні патогени, починаючи від вірусів та бактерій до найпростіших. Хвороби, спричинені бактеріальними патогенами, можуть спричинити інфекції, які несуть потенційну загрозу для життя, такі як рикетсіози, анаплазмози, до потенційно хронічних інфекцій, таких як хвороба Лайма. Кліщі беруть участь у передачі численних зоонозів, оскільки

один і той же кліщ може житись на різних видах тварин на різних етапах свого життєвого циклу. Крім того, вони можуть спричиняти патологічні стани, такі як паралічі, лихоманки, токсікози та алергії (Elston, 2010; Briciu et al., 2011; Pangrácová et al., 2013; Levytska & Mushinsky, 2019). Їх значення як переносників патогенів людини вимагає досліджень, які передбачають успішне виділення генетичного матеріалу, необхідного для досліджень як самого переносника, так і широкого кола патогенів, які вони переносять.

Dermacentor reticulatus один із найпоширеніших кліщів в Україні та Європі. Під час досліджень було виявлено, що він є переносником ДНК 40 мікроорганізмів (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp., *Borrelia* spp., *Coxiella* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., *Gordonia sputi*, *Microbacterium floriorum*, *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter oxydans*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Salmonella typhimurium*, *Hepatozoon canis*, *Toxoplasma gondii*, *Nosema slovaca* та ряду вірусів), хоча для деяких з них не встановлена його роль як вектора. Слід зазначити, що молекулярні методи досліджень мають слабкі сторони, включаючи неможливість ідентифікувати живих мікроорганізмів від неживих, і існує ризик забруднення або ПЛР-артефактів з різних джерел. Тому для кліщів виду *D. reticulatus* також важливо встановити здатність до передачі цих патогенних мікроорганізмів (Földvári et al., 2016).

Молекулярне виявлення патогенних мікроорганізмів у кліщах в основному базується на ампліфікації ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Етап виділення ДНК кліща та патогенів, яких вони переносять часто є складним, оскільки іксодові кліщі мають хітиновий екзоскелет, який повинен бути зруйнований перед екстракцією. Крім того, як насичені, так і голодні кліщі містять інгібітори термостабільної ДНК-полімерази, а геномна ДНК дуже чутлива до деградації. Крім того, було встановлено, що полісахариди, спільно очищені з ДНК, обмежують використання екстрагованої ДНК (Sparagano et al., 1999). Дані фактори можуть також мати вплив на рівень інвазованості кліщів, про який повідомлялося в попередніх дослідженнях. Тому виникає необхідність у стандартизованих, ефективних та надійних методах ізоляції ДНК із кліщів (Hill & Gutierrez, 2003; Schrader et al., 2012).

Існують різноманітні методи ізоляції ДНК із кліщів та збудників, яких вони переносять. В даний час екстракція за допомогою гідроксиду амонію широко використовується і описана у багатьох дослідженнях, оскільки вона має такі переваги як простота, швидкість і є недорогим методом. Цей метод часто використовують для дослідження кліщів зібраних з рослинності, але цей спосіб може привести до хибних результатів ПЛР, якщо кліщі були зібрані із тварин (Rauter & Hartung, 2005). Інші методи вимагають попередніх етапів перед екстракцією ДНК, оскільки вони включають подрібнення кліщів, заморожування та розщеплення ферментних білків. Наприклад, метод із фенол-хлороформом використовують для будь-якої стадії розвитку та походження кліщів, але він передбачає дорогі та працеємкі дії, а також використання потенційно небезпечних для здоров'я хімічних речовин (Halos et al., 2004). Комерційні методи простіші у виконанні, безпечніші та швидші, хоча існують незначні відмінності у їх практичному використанні, але вони часто є високовартісними (Mahittikorn et al., 2005).

Хоча ізоляція ДНК із кліщів як для виділення патогенів, так і для генетичних та геномних досліджень кліщів проводиться регулярно дослідниками, єдиної думки щодо найбільш ефективного методу виділення ДНК з будь-якого виду кліща немає. Було проведено ряд досліджень та оглядів, однак вони обмежені декількома методами екстракції, а також бракує кількісних даних про концентрацію ДНК (Sparagano et al., 1999; Hill & Gutierrez, 2003; Halos et al., Mtambo et al., 2006; 2004; Crowder et al., 2010).

Мета дослідження – порівняння трьох методів ізоляції ДНК, перевірка їх ефективності та практичності у отриманні матеріалу з кліщів і визначення їх впливу на результати ПЛР-досліджень. **Завдання дослідження:** провести збори іксодових кліщів, виділити ДНК для ПЛР-досліджень трьома різними методами, провести ПЛР-дослідження на *Babesia* spp, *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp. та проаналізувати одержані результати.

Матеріали і методи дослідження. Протягом 2018 року кліщі були зібрані з рослинності методом «на прапор», а також від тварин в Хмельницькій області. Після цього кліщів зберігали у 70% етанолі при температурі 4 ° С до подальших досліджень. Кліщів ідентифікували за видом, статтю, стадією розвитку на кафедрі інфекційних та інвазійних хвороб Подільського ДАТУ. Подальші дослідження з виділення ДНК та ПЛР проводили на базі кафедри паразитології Варшавського університету (Польща).

Кожного кліща перед початком досліджень промивали тричі стерильною водою, а потім сушили на повітрі і поміщали у стерильні мікропробірки. Для ізоляції ДНК використовували три різні методи: подрібнення кліщів ножицями та лізис в гідроксиді амонію (Guy & Stanek, 1991), подрібнення ножицями з подальшою екстракцією ДНК з комерційним набором Genomic Mini AX Tissue Spin (A&A Biotechnology, Польща), гомогенізація кліщів за допомогою програмованого криогенного гомогенізатора SPEX Sample Prep Freezer Mill 6875 з подальшою екстракцією ДНК з комерційним набором Genomic Mini AX Tissue Spin (A&A Biotechnology, Польща).

Перший метод. Кліщів занурювали кожного окремо в 150 мкл 0,7 М гідроксиду амонію і подрібнювали ножицями. Суспензію нагрівали при 100° С протягом 15-20 хв у термостаті в герметично закритих пробірках Епендорфа. Потім нагрівання продовжували приблизно ще 50 хв з відкритими ковпачками для видалення аміаку і додавали 100 мкл стерильної води. Зразки ДНК зберігали при – 20°С до подальших досліджень.

Другий метод. Кліщів подрібноли ножицями, кожного окремо, в пробірках Епендорфа. Додавали 400 мкл буферного розчину (LSU) і 20 мкл протеїнази К, змішували у приладі вортексі, потім центрифугували і поміщали в термостат при 50° С на 1,5 години. Після цього зразки кілька разів перемішували у вортексі, потім центрифугували протягом 5 хв при 8000 об/хв. Наносили супернатант на колонки Mini AX Spin, розміщені всередині пробірок об'ємом 2 мл. Центрифугували протягом 30-60 с при 8000 об/хв. Колонки Mini AX Spin переносили в нові пробірки об'ємом 2 мл. Додавали 600 мкл W1 розчину для першого промивання. Центрифугували протягом 30-60 с при 8000 об/хв. Колонки Mini AX Spin переносили в нові пробірки об'ємом 2 мл. Додавали 500 мкл другого розчину W2 для промивання. Центрифугували протягом 30-60 с при 8000 об/хв. Підготували 1,5 мл пробірки для елюції ДНК

та додавали 5 мкл нейтралізуючого буфера на дно кожної пробірки. Колонки Mini AX Spin переносили в підготовлені пробірки для елюції. Елюювали ДНК, додаючи 75 мкл буфера для елюції на колонки Mini AX Spin і чекали 2 хв. Центрифугували протягом 30-60 с при 8000 об/хв. Ще раз додавали 75 мкл буфера для елюції. Ще раз центрифугували протягом 30-60 с при 8000 об/хв. Видаляли колонки Mini AX Spin і отримували пробірки з очищеною ДНК. Зразки ДНК зберігали при -20°C до подальших досліджень.

Третій метод. Кліщів заморожували рідким азотом і подрібнювали за допомогою програмованого криогенного гомогенізатора SPEX SamplePrep з подальшою екстракцією ДНК з комерційним набором Genomic Mini AX Tissue Spin як описано вище.

ПЛР-дослідження проводили на наявність *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp. Ампліфікацію проводили за допомогою термоциклера C1000 (BioRad, США). Кожну реакцію ПЛР проводили в 20 мкл об'єму, що містив 2 мкл Thermo Scientific 10x DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific, Литва), 1 мкл кожного праймера, 0,4 мкл dNTP, 0,1 мкл полімерази, 2 мкл матричної ДНК (зразок) та 14 мкл стерильної води для PCR Master Mix. У кожній ПЛР як позитивні контролю використовували попередньо досліджені зразки ДНК. В якості негативного контролю використовували стерильну воду.

Для молекулярного виявлення *Rickettsia* spp. використовували праймери CS409, Rp1258 [12]. Реакції проводили в наступних умовах: початкова денатурація при 95°C протягом 5 хвилин, потім 40 циклів з денатурацією при 95°C протягом 45 секунд, відпал при 59°C протягом 45 секунд, подовження при 65°C протягом 60 секунд, і остаточне подовження при 72°C протягом 7 хвилин.

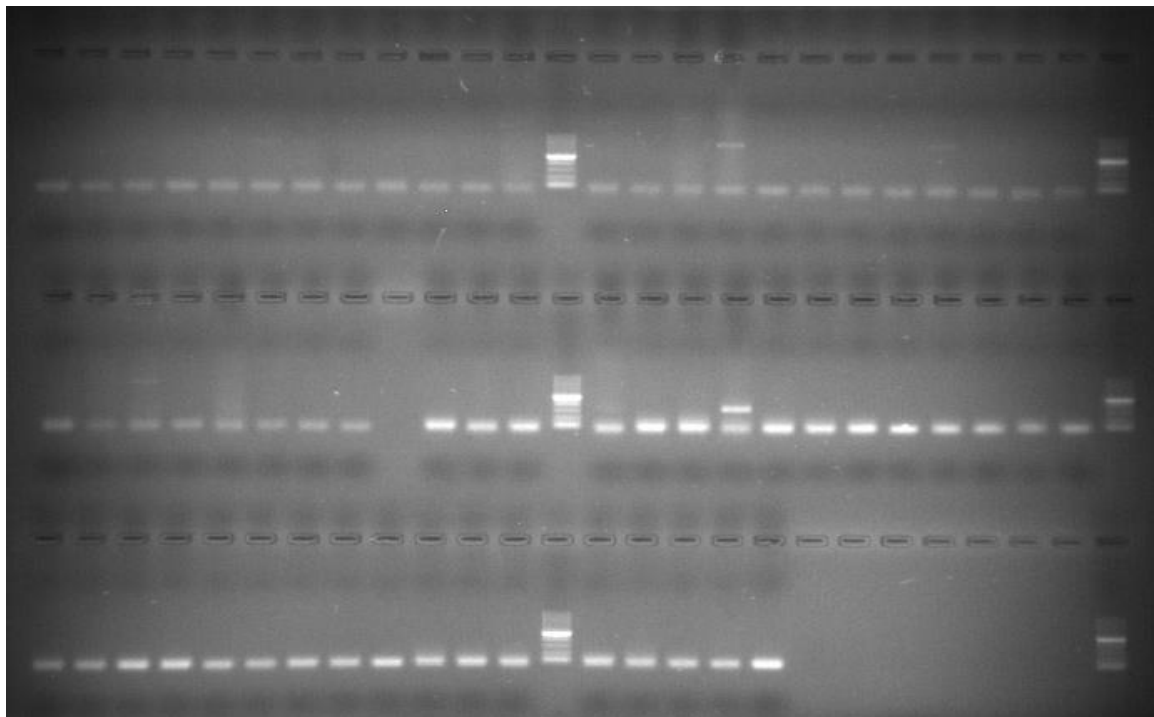
Для молекулярного виявлення *Borrelia* spp. використовували наступні праймери BcCOX1R, BcCOX1F [13]. Реакції проводили за таких умов: початкова денатурація при 94°C протягом 5 хвилин, потім 40 циклів з денатурацією при 94°C протягом 20 секунд, відпал при 57°C протягом 30 секунд, подовження при 68°C протягом 45 секунд, і остаточне подовження при 72°C протягом 7 хвилин.

Для молекулярного виявлення *Borrelia* spp. використовували праймери SC1F, SC1R (Marconi & Garon, 1992). Реакції проводили в наступних умовах: початкова денатурація при 94°C протягом 4 хвилин, потім 40 циклів з денатурацією при 94°C протягом 30 секунд, відпал при 50°C протягом 30 секунд, подовження при 72°C протягом 30 секунд, і остаточне подовження при 72°C протягом 3 хвилин.

Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофору у 1,5% агарозному гелі, забарвленому Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Німеччина) та візуалізували ультрафіолетовим світлом.

Результати дослідження та обговорення. Всього за допомогою ПЛР було досліджено 72 кліщі (60 *D. reticulatus* і 12 *I. ricinus*) з рослинності на наявність збудників *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp.

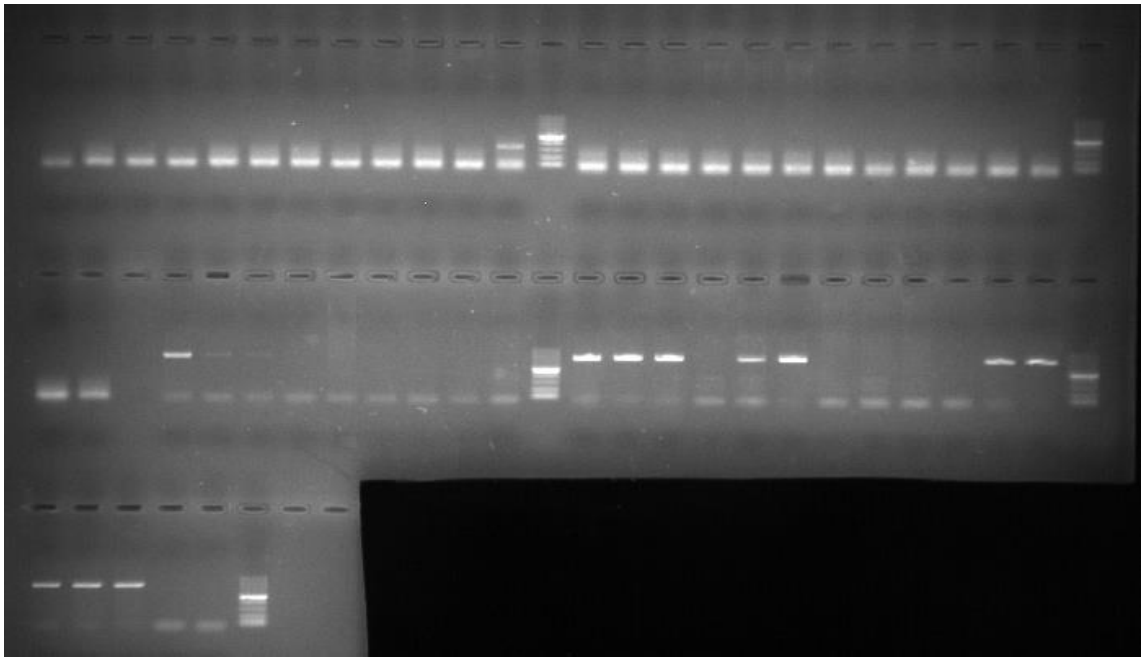
Отже, при лізисі кліщів в гідроксиді амонію для виділення ДНК було виявлено одного кліща *D. reticulatus* позитивного на *Babesia* spp., що становило 4,2%. При дослідженні на *Rickettsia* spp. було виявлено три позитивних кліща (12,5%), на *Borrelia* spp. – 8 кліщів (33,3%) (Мал. 1).



Мал. 1. Електрофорез продуктів ПЛР у 1,5% агарозному гелі із застосуванням праймерів *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp. при подрібненні кліщів ножицями та лізисі в гідроксиді амонію

При другому способі виділення ДНК було встановлено, що один кліщ *D. reticulatus* позитивний на *Babesia* spp., що становило 4,2%. Що стосується *Rickettsia* spp. було вияв-

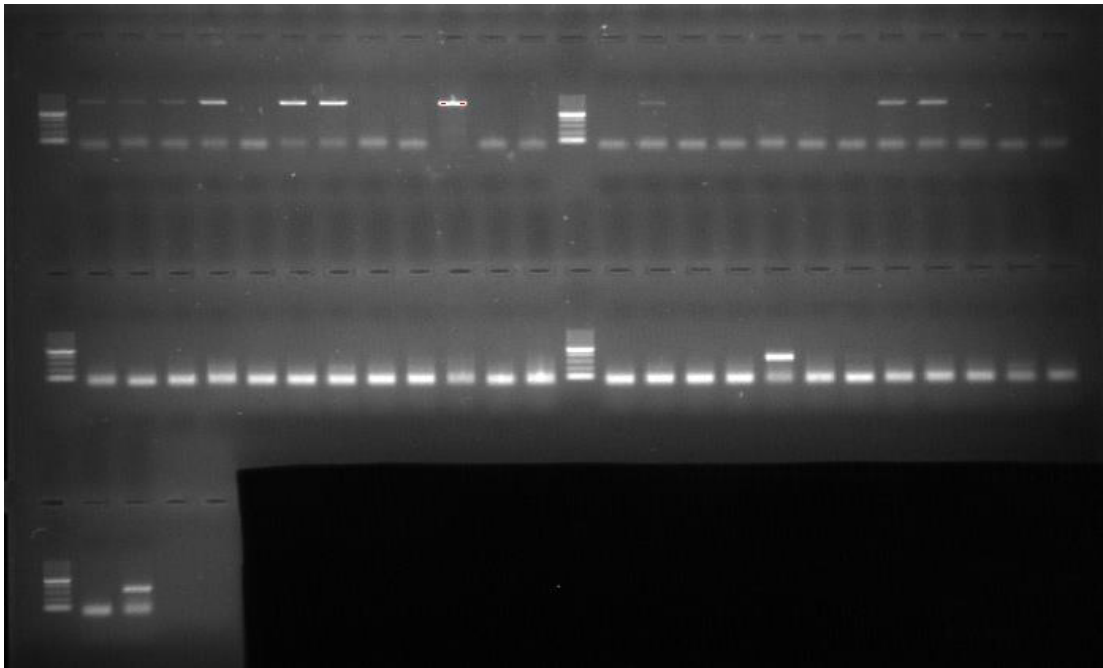
лено позитивних 13 кліщів, що становило 54,2%. При дослідженні на *Borrelia* spp. було виявлено 33,3% кліщів з ДНК збудника. Серед кліщів *I. ricinus* жодного з досліджених ДНК збудників виявлено не було (Мал. 2).



Мал. 2. Електрофорез продуктів ПЛР у 1,5% агарозному гелі із застосуванням праймерів *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp. при подрібненні кліщів ножицями з подальшою екстракцією ДНК з комерційним набором

При механічній гомогенізації кліщів з подальшим використанням комерційного набору також було виявлено 4,2% кліщів з ДНК *Babesia* spp., а саме – одного кліща *D. reticulatus*.

ДНК рикетсій було виявлено у 7 кліщів *D. reticulatus* та 2 кліщів *I. ricinus*, що разом становило 37,5%. ДНК *Borrelia* spp. були виявлені серед 37,5% кліщів (Мал. 3).



Мал. 3 Електрофорез продуктів ПЛР у 1,5% агарозному гелі із застосуванням праймерів *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp. при криогенній гомогенізації кліщів з подальшою екстракцією ДНК з комерційним набором

Мікст-інвазія при першому способі складала 3,3 %, при другому – 16,7%, третьому – 20,8%.

Аналізуючи одержані результати, варто відзначити, що при першому способі візуалізація продуктів ПЛР була найгіршою і інтерпретація результатів складала труднощі, що може бути пояснено найнижчою якістю отриманого ДНК-матеріалу. При другому і третьому способі даної проблеми не спостерігалось.

В результаті цього дослідження можна зробити висновок, що машинна криогенна гомогенізація кліщів з подальшою ізоляцією ДНК за допомогою комерційних наборів є ефективним методом, який сприяє найкращому виявленню генетичного матеріалу збудників в кліщах.

Якісна ізоляція ДНК з іксодових кліщів є важливою як для генетичних, так і для геномних досліджень самих кліщів, а також для досліджень, спрямованих на виявлення присут-

ності патогенів у кліщах. У нашому дослідженні було проведено визначення та порівняння найбільш надійного та ефективного методу, залежно від бюджету, часу, патогену та мети дослідження.

Промивання кліщів є першим кроком для отримання якісного зразка нуклеїнової кислоти, в зв'язку з тим, що ДНК, отримана від нецільових організмів, що знаходяться на поверхах кліщів, може вступати в реакції з деякими праймерами, що спричинює забруднення і помилково позитивний результат ПЛР. Для цього можна використовувати йод, гіпохлорит натрію або перекис водню (Sparagano et al., 1999). При використанні методів екстракції нуклеїнової кислоти, за яких проводять ферментативне розщеплення білків необхідне попереднє подрібнення кліща з метою механічного руйнування полісахаридних ланцюгів хітину екзоскелету (Halos et al., 2004).

Нами було досліджено методи виділення ДНК, які поєднували механічне подрібнення з протеїновим розщепленням та використанням комерційних наборів, що дозволило ізолювати ДНК із 100% ефективністю від кліщів.

У минулому для гомогенізації кліщів використовували ступку та пестик, але цей метод є дуже копітким. Крім того, він вимагає ще одного етапу ферментативного лізису клітин, який є повільним і може бути неефективним для дослідження мікроорганізмів, що важко лізуються. Застосування механічних гомогенізаторів забезпечує дуже швидке подрібнення кліщів і може призвести до отримання більш якісних нуклеїнових кислот, ніж ті, що отримують при використанні тривалої ферментативної інкубації, за якої нуклеази можуть розкласти нуклеїнові кислоти.

Метод екстракції з гідроксидом амонію є недорогим альтернативним комерційним набором і дає можливість досліджувати дорослих самок, хоча виділення ДНК, як правило, є нижчим, ніж у комерційних наборів (Ammazzalorso et al., 2015), що і було підтверджено у нашому дослідженні. Крім того, окремі автори вказують що цей метод є неефективним при виділенні ДНК з німф кліщів, незважаючи на часте вико-

ристання цього методу для дослідження німф *I. ricinus* у Європі (Guy & Stanek, 1991, Mierzejewska et al., 2020).

Порівняно з другим методом та іншими ефективними вже описаними методиками, третій метод особливо зручний для використання при великій кількості досліджуваних зразків, а також для зразків невеликого розміру, таких як німфи, а також личинки кліщів (Mtambo et al., 2006; Rodríguez et al., 2014).

Ферментативна руйнація білка перед екстракцією ДНК є недостатньою для максимальної ізоляції ДНК. Ймовірно це пов'язано з початковим етапом подрібнення кліщів і вказує на необхідність механічного руйнування полісахаридних ланцюгів хітину екзоскелету кліща (Mtambo et al., 2006; Crowder et al., 2010). Подрібнення ножицями кліщів в комбінації з комерційним набором є ефективним методом ізоляції ДНК кліща, однак це працездатний спосіб і його важко застосовувати до невеликих зразків, на зразок німф. Механічне машинне криогенне подрібнення кліщів забезпечує найкращі та найнадійніші результати при подальшому дослідженні іксодових кліщів як імагінальних, так і преімагінальних стадій.

Після подрібнення кліщів та білкового розщеплення можна використовувати різні методи екстракції ДНК, включаючи комерційні набори. Наші результати підтверджують, що якість отриманої ДНК відрізняється залежно від різних наборів і методів екстракції, що може мати важливий вплив на успіх досліджень на основі ПЛР (Crowder et al., 2010; Mahittikorn et al., 2005). Таким чином, комбінований метод механічної криогенної гомогенізації кліщів в комбінації з комерційним набором для ізоляції ДНК, пропонує максимальну ефективність з точки зору швидкості, кількості та розміру зразків, що підлягають дослідженню.

Висновки

1. Лізис кліщів за допомогою гідроксиду амонію є працездатним методом і не рекомендований для ізоляції ДНК.
2. Механічна криогенна гомогенізація кліщів рекомендована для використання при великій кількості досліджуваних зразків, а також для зразків невеликого розміру (німфи, личинки кліщів).

References:

1. Ammazalorso, A. D., Zolnik, C. P., Daniels, T. J., & Kolokotronis, S. O. (2015). To beat or not to beat a tick: comparison of DNA extraction methods for ticks (*Ixodes scapularis*). *PeerJ*, 3, e1147. <https://doi.org/10.7717/peerj.1147>
2. Briciu, V. T., Titilincu, A., Tăulescu, D. F., Cârșina, D., Lefkaditis, M., & Mihalca, A. D. (2011). First survey on hard ticks (*Ixodidae*) collected from humans in Romania: possible risks for tick-borne diseases. *Experimental & applied acarology*, 54(2), 199–204. <https://doi.org/10.1007/s10493-010-9418-0>
3. Crowder, C. D., Rounds, M. A., Phillipson, C. A., Picuri, J. M., Matthews, H. E., Halverson, J., Schutzer, S. E., Ecker, D. J., & Eshoo, M. W. (2010). Extraction of total nucleic acids from ticks for the detection of bacterial and viral pathogens. *Journal of medical entomology*, 47(1), 89–94. <https://doi.org/10.1603/033.047.0112>
4. Elston D. M. (2010). Tick bites and skin rashes. *Current opinion in infectious diseases*, 23(2), 132–138. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328335b09b>
5. Földvári, G., Široký, P., Szekeres, S., Majoros, G., & Sprong, H. (2016). *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasites & vectors*, 9(1), 314. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1599-x>
6. Guy, E. C., & Stanek, G. (1991). Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *Journal of clinical pathology*, 44(7), 610–611. <https://doi.org/10.1136/jcp.44.7.610>
7. Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillard, R., Suau, A., Le Menach, A., Boulouis, H. J., & Vayssier-Taussat, M. (2004). Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Veterinary research*, 35(6), 709–713. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004038>
8. Hill, C. A., & Gutierrez, J. A. (2003). A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. *Medical and veterinary entomology*, 17(2), 224–227. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00425.x>
9. Hubbard, M. J., Cann, K. J., & Wright, D. J. (1995). Validation and rapid extraction of nucleic acids from alcohol-preserved ticks. *Experimental & applied acarology*, 19(8), 473–478. <https://doi.org/10.1007/BF00048266>

10. Levytska, V.A., & Mushinsky, A.B. (2019). Monitoring of vector-borne diseases in the west part of Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*, 21(96), 14–18. doi: 10.32718/nvlvet9603 [In Ukrainian]
11. Mahittikorn, A., Wickert, H., & Sukthana, Y. (2005). Comparison of five DNA extraction methods and optimization of a b1 gene nested PCR (nPCR) for detection of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in mouse brain. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 36(6), 1377–1382.
12. Mahittikorn, A., Wickert, H., & Sukthana, Y. (2005). Comparison of five DNA extraction methods and optimization of a b1 gene nested PCR (nPCR) for detection of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in mouse brain. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 36(6), 1377–1382.
13. Marconi, R. T., & Garon, C. F. (1992). Development of polymerase chain reaction primer sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *Journal of clinical microbiology*, 30(11), 2830–2834. <https://doi.org/10.1128/JCM.30.11.2830-2834.1992>
14. Mierzejewska, E. J., Dwuznik, D., Koczwarska, J., Stańczak, Ł., Opalińska, P., Krokowska-Paluszak, M., Wierzbicka, A., Górecki, G., Bajer, A. (2020) The red fox (*Vulpes vulpes*), a possible reservoir of *Babesia vulpes*, *B. canis* and *Hepatozoon canis* and its association with the tick *Dermacentor reticulatus* occurrence, *Ticks and Tick-borne Diseases*, 101551, ISSN 1877-959X, <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101551>.
15. Mtambo, J., Van Bortel, W., Madder, M., Roelants, P., & Backeljau, T. (2006). Comparison of preservation methods of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) for reliable DNA amplification by PCR. *Experimental & applied acarology*, 38(2-3), 189–199. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-0004-4>
16. Pangráčová, L., Derdáková, M., Pekárik, L., Hviščová, I., Vichová, B., Stanko, M., Hlavatá, H., & Peňko, B. (2013). Ixodes ricinus abundance and its infection with the tick-borne pathogens in urban and suburban areas of Eastern Slovakia. *Parasites & vectors*, 6(1), 238. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-238>
17. Rauter, C., & Hartung, T. (2005). Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7203–7216. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7203-7216.2005>
18. Rodríguez, I., Fraga, J., Noda, A. A., Mayet, M., Duarte, Y., Echevarria, E., & Fernández, C.. (2014). An Alternative and Rapid Method for the Extraction of Nucleic Acids from Ixodid Ticks by Potassium Acetate Procedure. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(4), 542–547. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402005>
19. Roux, V., Rydkina, E., Ereemeeva, M., & Raoult, D. (1997). Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *International journal of systematic bacteriology*, 47(2), 252–261. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-252>
20. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & John, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
21. Sparagano, O. A., Allsopp, M. T., Mank, R. A., Rijpkema, S. G., Figueroa, J. V., & Jongejan, F. (1999). Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): a review. *Experimental & applied acarology*, 23(12), 929–960. <https://doi.org/10.1023/a:1006313803979>
22. WHO, 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>

Viktoriya Levytska, State Agrarian and Engineering University in Podilya (Kamianets-Podilskyi, Ukraine)

Andriy Mushinsky, State Agrarian and Engineering University in Podilya (Kamianets-Podilskyi, Ukraine)

Dorota Dwuznik Department of Eco-Epidemiology of Parasitic Diseases, Institute of Developmental Biology and Biomedical Sciences, Faculty of Biology, University of Warsaw (Warsaw, Poland)

Ewa J. Mierzejewska, Department of Eco-Epidemiology of Parasitic Diseases, Institute of Developmental Biology and Biomedical Sciences, Faculty of Biology, University of Warsaw (Warsaw, Poland)

Anna Bajer, Department of Eco-Epidemiology of Parasitic Diseases, Institute of Developmental Biology and Biomedical Sciences, Faculty of Biology, University of Warsaw (Warsaw, Poland)

Comparison of methods of DNA extraction from ixodid ticks

Ixodid ticks are ectoparasites of animals and humans that carry a wide variety of pathogenic microorganisms. Ticks can cause pathological conditions such as paralysis, fever, toxicosis and allergies, as well as a large number of infectious and invasive diseases. The aim of our study was to compare three methods of DNA extraction, to test their effectiveness and practicality in obtaining material from ticks and to determine their effect on the results of PCR-based studies. During 2018, questing ticks were collected from vegetation in Khmelnytsky region. Three different methods were used for DNA extraction: crushing of ticks with scissors and lysis in ammonium hydroxide, crushing with scissors followed by DNA extraction with a commercial kit Genomic Mini AX Tissue Spin (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), homogenization of ticks with programmable cryogenic grinder SPEX Sample Prep Freezer Mill 6875 followed by extraction of DNA with Genomic Mini AX Tissue Spin.

*A total of 72 ticks (60 *D. reticulatus* and 12 *I. ricinus*) from vegetation were examined by PCR for the presence of pathogens from genera/complex *Babesia*, *Rickettsia* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.).*

*Following the first method of DNA extraction, 4.2% of ticks tested positive for *Babesia* spp., and DNA of *Rickettsia* spp. and *Borrelia burgdorferi* s.l. was detected in 12.5% and 33.3% of ticks, respectively. Following the second method of DNA extraction, 4.2% of ticks tested positive for *Babesia* spp., and DNA of *Rickettsia* spp. and *Borrelia burgdorferi* s.l. was detected in 54.2% (13 positive specimens) and 33.3% of ticks, respectively. The third method also revealed 4.2% of ticks positive for DNA of *Babesia* spp. *Rickettsia**

DNA was detected in 7 D. reticulatus and 2 I. ricinus ticks, (37.5%). DNA of Borrelia spp. was identified in 37.5% of ticks. Thus, the combined method of mechanical homogenization of ticks in combination with a commercial kit for DNA isolation, offers maximum efficiency in terms of speed, number and size of samples to be studied.

Key words: ticks, DNA extraction, Babesia spp, Rickettsia spp, Borrelia spp

Дата надходження до редакції: 20.01.2020 р.