МРНТИ 34.27.29, 34.23 https://doi.org/10.26577/EJE208831326

А.А. Серикбай[1*], К.Т. Султанкулова[2], С.М. Бармақ[2], Б.М. Хайруллин[2]

[1]Казахский национальный женский педагогический университет, Алматы, Казахстан
[2]ТОО «Научно-исследовательский производственный центр MVA GROUP»
Алматинская область, Казахстан
*e-mail: arai_00.0@mail.ru

КОНСТРУИРОВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *TOXOCARA CANIS* МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Токсокароз опасное зоонозное паразитарное заболевание. Заражение происходит при попадании в организм яиц паразита *Toxocara*, которые могут находиться в загрязнённой почве или при контакте с инфицированными животными. Попадая в организм, личинки мигрируют к различным органам и поражает печень, лёгкие, глаза и другие ткани. Вызывает висцеральный и глазной мигрирующий личиночный синдром, нейротоксокароз и скрытый или обычный токсокароз. *Toxocara canis* имеет важное значение для общественного здравоохранения и экономики. Актуальность диагностики токсокароза связана с его широким распространением, зоонозным характером и проявлением тяжёлых клинических форм у человека. Целью исследования является разработка олигонуклеотидов для выявления паразита *T. canis* с помощью ПЦР в режиме реального времени. В работе проведена оценка эффективности трёх пар праймеров, разработанных для детекции T. *canis*, в целях поиска наилучшего варианта для использования в ПЦР в режиме реального времени. Исследованные олигонуклеотиды локализованы в гене ITS2 и обеспечивают амплификацию специфических фрагментов ожидаемого размера, что подтверждает их высокую специфичность и корректность дизайна. Наиболее высокая эффективность амплификации выявлена для пары праймеров T_can F2/R2 (105 п.о.), что подтверждается интенсивностью полученной полосы. Полученные более слабые ПЦР продукты для пар T_can F1/R1 и T_can F3/R3, вероятно, связаны с особенностями их связывания с матричной ДНК или формированием вторичных структур. Праймеры T_can F2, T_can R2 и зонд T_can Probe2 демонстрируют эффективную и специфичную работу в ПЦР в режиме реального времени, обеспечивая надёжную детекцию *T. canis*. Предложенные олигонуклеотиды будут рекомендованы для разработки диагностических тест-систем на основе ПЦР в режиме реального времени. Это важно для раннего предупреждения распространения паразитов, таким образом снижает риск осложнений и повышает эпидемиологическую безопасность.

Ключевые слова: *Toxocara canis*, ПЦР, ITS2.

A.A. Serikbay[1*], K.T. Sultankulova[2], S.M. Barmak[2], B.M. Khairullin[2]

[1]Kazakh National Women's Teacher Training University, Almaty, Kazakhstan
[2]«MVA GROUP» Research and Production Center LLP, Almaty Region, Kazakhstan
[*]e-mail: arai_00.0@mail.ru

Design of oligonucleotide primers and a probe for the detection of *Toxocara canis* by real-time PCR

Toxocariasis is a dangerous zoonotic parasitic disease. Infection occurs when eggs of the parasite Toxocara enter the body; these eggs may be present in contaminated soil or transmitted through contact with infected animals. Once inside the body, larvae migrate to various organs and affect the liver, lungs, eyes, and other tissues. It causes visceral and ocular larva migrans syndrome, neurotoxocariasis, and covert or common toxocariasis. Toxocara canis is of significant importance for public health and the economy. The relevance of toxocariasis diagnosis is associated with its wide distribution, zoonotic nature, and manifestation of severe clinical forms in humans.

The aim of this study was to develop oligonucleotides for the detection of T. canis using real-time PCR. The efficiency of three primer pairs designed for T. canis detection was evaluated in order to identify the best option for use in real-time PCR. The studied oligonucleotides are located within the ITS2 gene and provide amplification of specific fragments of the expected size, confirming their high specificity and proper design. The highest amplification efficiency was observed for the primer pair T_can F2/

 © 2026 Al-Farabi Kazakh National University

R2 (105 bp), as confirmed by the intensity of the obtained band. The weaker PCR products obtained for T_can F1/R1 and T_can F3/R3 were probably associated with особенностями their binding to template DNA or the formation of secondary structures.

The primers T_can F2, T_can R2, and the probe T_can Probe2 demonstrated efficient and specific performance in real-time PCR, ensuring reliable detection of T. canis. The proposed oligonucleotides are recommended for the development of diagnostic test systems based on real-time PCR. This is important for early prevention of parasite spread, thereby reducing the risk of complications and increasing epidemiological safety.

Key words: *Toxocara canis*, PCR, ITS2.

А.А. Серикбай[1*], К.Т. Султанкулова[2], С.М. Бармақ[2], Б.М. Хайруллин[2]

[1]Қазақ ұлттық қыздар педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан
[2]«MVA GROUP» ғылыми-зерттеу өндірістік орталығы» ЖШС, Алматы облысы, Қазақстан
[*]e-mail: arai_00.0@mail.ru

Toxocara canis-ті нақты уақыттағы ПТР әдісі арқылы анықтауға арналған олигонуклеотидті праймерлер мен зондты құрастыру

Токсокароз – қауіпті зоонозды паразиттік ауру. Жұқтыру Toxocara паразитінің жұмыртқалары ағзаға түскен кезде болады, олар ластанған топырақта болуы немесе зақымданған жануарлармен байланыс кезінде жұғуы мүмкін. Ағзаға түскеннен кейін дернәсілдер әртүрлі мүшелерге миграция жасап, бауырды, өкпені, көзді және басқа тіндерді зақымдайды. Ол висцералды және көздік миграциялық дернәсіл синдромын, нейротоксокарозды, сондай-ақ жасырын немесе кәдімгі токсокарозды тудырады. Toxocara canis қоғамдық денсаулық сақтау мен экономика үшін маңызды мәнге ие. Токсокароз диагностикасының өзектілігі оның кең таралуымен, зооноздық сипатымен және адамда ауыр клиникалық түрлерінің байқалуымен байланысты.

Зерттеудің мақсаты – T. canis паразитін нақты уақыт режиміндегі ПТР көмегімен анықтауға арналған олигонуклеотидтерді әзірлеу. Жұмыста T. canis-ті детекциялауға арналған үш жұп праймердің тиімділігі бағаланып, нақты уақыт режиміндегі ПТР үшін ең тиімді нұсқасы таңдалды. Зерттелген олигонуклеотидтер ITS2 генінде орналасқан және күтілетін мөлшердегі спецификалық фрагменттердің амплификациясын қамтамасыз етеді, бұл олардың жоғары спецификалығын және дұрыс дизайнын дәлелдейді. Амплификацияның ең жоғары тиімділігі T_can F2/R2 праймер жұбында (105 ж.н.) анықталды, бұл алынған жолақтың қарқындылығымен расталады. T_can F1/R1 және T_can F3/R3 жұптары үшін алынған әлсіздеу ПТР өнімдері, ықтимал, олардың матрицалық ДНҚ-мен байланысу ерекшеліктеріне немесе екіншілік құрылымдардың түзілуіне байланысты.

T_can F2, T_can R2 праймерлері және T_can Probe2 зонды нақты уақыт режиміндегі ПТР-де тиімді әрі спецификалық жұмыс көрсетіп, T. canis-ті сенімді анықтауды қамтамасыз етеді. Ұсынылған олигонуклеотидтер нақты уақыт режиміндегі ПТР негізіндегі диагностикалық тест-жүйелерді әзірлеу үшін ұсынылады. Бұл паразиттердің таралуын ерте кезеңде алдын алуға, асқынулар қаупін төмендетуге және эпидемиологиялық қауіпсіздікті арттыруға маңызды.

Түйін сөздер: *Toxocara canis*, ПТР, ITS2.

Введение

Токсокароз является одной из наиболее значимых зоонозных паразитарных инфекций, представляющих серьёзную угрозу для здоровья человека. Возбудителями заболевания являются нематоды рода Toxocara, основными хозяевами которых служат собаки и кошки (Macpherson, 2013, Chen et al., 2018, Strube et al., 2013). Человек заражается при случайном проглатывании инвазионных яиц паразита, содержащихся в загрязнённой почве (Macpherson, 2013), воде, на овощах, фруктах (Kozan et al., 2005, Magnaval et al., 2001), или через контакт с шерстью инфицированных животных (Oge et al., 2013). Попадая в организм человека, личинки токсокар мигрируют по различным органам и тканям, вызывая развитие висцеральной, глазной и кожной форм токсокароза. Заболевание может сопровождаться поражением печени, лёгких, центральной нервной системы и органов зрения, что в ряде случаев приводит к тяжёлым клиническим осложнениям и снижению качества жизни пациентов (Alkhafaji, 2024). Особую группу риска составляют дети, которые чаще контактируют с почвой и домашними животными, что повышает вероятность инфицирования. В связи с этим токсокароз рассматривается как важная медико-ветеринарная и социально значимая проблема во многих странах мира.

В Республике Казахстан токсокароз собак, вызываемый *Toxocara canis*, широко распространён и рассматривается как важный источник зоонозной инвазии. По данным паразитологических исследований, заражённость городских собак может достигать 38,6 %, что свидетельствует о значительном загрязнении городской среды яйцами паразита. При этом наибольшая интенсивность инвазии отмечается у молодых животных, которые играют ключевую роль в поддержании циркуляции возбудителя и контаминации почвы инвазионными яйцами (Valieva et al., 2024).

В отдельных исследованиях, проведённых в Казахстане, *Toxocara canis* выявлялась у 17 % обследованных собак, что подтверждает её высокую распространённость среди кишечных паразитов плотоядных животных (Kushmukhanov et al., 2025).

Дополнительно показано, что максимальная заражённость регистрируется у собак в возрасте 6–12 месяцев, что связано с особенностями жизненного цикла паразита и повышенной восприимчивостью молодых животных (Rustemova, 2012).

Собаки играют ключевую роль в эпидемиологии зоонозного паразита (Macpherson, 2013; Strube et al., 2013). После эмбрионации яйца становятся источником инфекции не только для окончательных и промежуточных хозяев, как различные виды мелких грызунов, другие млекопитающие, птицы и беспозвоночные, но и для человека (Strube et al., 2013). Считается, что при оптимальных условиях яйца *Toxocara spp.* способны сохраняться в окружающей среде до 4 лет (Macpherson, 2013).

Сообщаемая распространённость *Toxocara spp.* в Германии в период с 2003 по 2012 годы варьировала от 0,9% до 6,1% у собак на основании результатов исследований нерепрезентативно отобранных фекальных образцов, поступивших в диагностические лаборатории (Kushmukhanov et al., 2025). Кроме того, в другом исследовании была зарегистрирована средняя распространённость *Toxocara spp.* на уровне 4,6% у собак в 2004–2006 годах (Vrhovec et al., 2022). В 2015–2017 годах *Toxocara spp.* была выявлена в 3,8% – 5,9% фекальных образцах собак (Vrhovec et al., 2022, Rostami et al., 2020).

Согласно крупному систематическому обзору и мета-анализу, охватившему 250 исследований из 71 страны с общей выборкой более 265 000 человек, глобальная серопревалентность антител к *Toxocara* spp. у людей составляет примерно 19 % (95 % CI 16,6–21,4 %), что эквивалентно примерно 1,4 млрд человек во всём мире. Это свидетельствует о том, что примерно каждый пятый человек на планете контактировал с инфекцией *Toxocara* или имел с ней иммунологический ответ (Rostami et al., 2019).

Традиционные методы диагностики токсокароза у людей чаще всего основаны на серологических тестах (ELISA), однако они имеют ограничения в чувствительности и специфичности и часто не позволяют отличить активную или недавно перенесённую инфекцию от прошлых контактов с паразитом. Это особенно актуально в контексте раннего выявления и диагностики, особенно у пациентов с бессимптомным или легким течением болезни. Эффективная диагностика также затрудняется тем, что паразиты редко продуцируют яйца в организме человека, и обнаружение их в фекалиях маловероятно (Pinelli et al., 2013).

Молекулярная диагностика токсокароза основана на применении ПЦР в режиме реального времени, которая позволяет выявлять ДНК *Toxocara canis* с высокой чувствительностью и специфичностью. Важным этапом разработки ПЦР в режиме реального времени является конструирование специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда, направленных на консервативные участки генома паразита. Правильно подобранные праймеры и зонд обеспечивают селективную амплификацию целевой ДНК и точную детекцию возбудителя в исследуемом материале, что повышает эффективность лабораторной диагностики.

ПЦР в режиме реального времени позволяет обнаруживать и количественно определять ДНК *Toxocara* spp. прямо в клинических образцах. Это критически важно для раннего выявления инфекции, мониторинга эффективности лечения и эпидемиологических исследований.

Целью настоящего исследования является конструирование и биоинформатический анализ специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда для разработки высокочувствительного и специфичного метода ПЦР в режиме реального времени, предназначенного для молекулярного выявления *Toxocara canis*.

Материалы и методы

Биоматериалы

В качестве объекта исследования в работе использовали ДНК *Toxocara canis,* выделенные из образцов кала собак.

Выделение ДНК Toxocara canis

Геномную ДНК из яиц *Toxocara* spp. выделяли с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) в соответствии с инструкцией производителя. Образцы предварительно подвергали трем циклам замораживания-оттаивания, а обработку протеиназой К проводили в течение ночи (<16 ч) (Borecka&Gawor, 2008, Khademvatan et al., 2013).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей

Для анализа и сравнения нуклеотидных последовательностей использовалась программа MEGA версии 11.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura K.et al., 2021). Нуклеотидные последовательности целевых генов были получены из базы данных GenBank (NCBI) в формате FASTA и импортированы в MEGA 11 через модуль Align→Edit/Build Alignment. Выравнивание последовательностей проводилось с использованием встроенного алгоритма ClustalW, обеспечивающего оптимальное сопоставление гомологичных нуклеотидов.

Подбор и анализ праймеров в Vector NTI Advance™

Для конструирования пар праймеров использовалась программа Vector NTI Advance™ (Thermo Fisher Scientific, США) – интегрированная биоинформационная платформа для молекулярно-биологических расчетов и визуализации последовательностей. В «Primer Design» проводился автоматический подбор праймеров для амплификации и клонирования целевых генов. Нуклеотидная последовательность гена в формате FASTA была импортирована в модуль Vector NTI→Tools→Primer Design. (Invitrogen™ Vector NTI Advance™ 11 User Guide. Thermo Fisher Scientific). Параметры подбора устанавливали следующим образом: длина праймера 18-25 нуклеотидов; содержание GC 40–60 %; температура плавления 55–69 °C; отсутствие вторичных структур (димеров, шпилек, гомополимеров); отсутствие комплементарности между праймерами (Rozen& Skaletsky, 2000).

Постановка ПЦР и ПЦР в режиме реального времени

Для проведения ПЦР использовали амплификатор SimplyAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). ПЦР в режиме реального времени проводилась на термоциклере Rotor-Gene Q (Qiagen). Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Смесь для амплификации ДНК состоит из следующих компонентов: Taq ДНК полимераза – 0,5 мкл (5 ед/мкл); 10х ПЦР-буфер – 2,5 мкл; специфические праймеры (20 пМ) прямой и обратный праймер – по 0,5 мкл каждого (в случае проведения ПЦР в режиме реального времени используется дополнительно зонд 0,5 мкл /10 пМ); смесь дНТФ (10 мМ) – 1 мкл; 25 мМ раствор $MgCl_2$ – 1 мкл; ДНК – 5 мкл; деионизированная вода – до 25 мкл.

Температурно-временные параметры амплификации: предварительная денатурация при 94^0C – 2 мин, 30 циклов, состоящих из денатурации при 94^0C – 30 с, отжига праймеров при 58^0C – 20 с., элонгации 72^0C – 20 с; финальный синтез 72^0C – 7 мин.

Электрофоретический анализ ПЦР продуктов

Анализ продуктов ПЦР проведен при помощи электрофореза в 2 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1 мкг/мл). Электрофорез проводят при напряжении 6 В/см2 на электрофоретическом аппарате (Biobase), в качестве электродного буфера использовали 1xTAE-буфер.

Результаты электрофореза учитывают в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на гель документирующем приборе (Biobase). Размеры молекул анализируемых образцов ДНК определяли путем сопоставления их электрофоретической подвижности маркеров – фрагмента ДНК известной молекулярной массы. В качестве маркера молекулярных масс использовали 50 bp DNA Ladder (Biolabs). Положительными считаются пробы, в которых полосы в геле располагаются точно на таком же расстоянии от старта, что и полосы положительных контролей. При выявлении ДНК *Toxocara canis* наблюдаются полосы ДНК размером 125, 105, 98 п.о. В отрицательном контроле не должно выявляться никакие полосы.

Результаты и их обсуждение

Проведен выбор целевых генов, разработка праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для ПЦР тест-системы в режиме реального времени для диагностики *Toxocara canis*

Ген рибосомной РНК, в частности внутренний транскрибируемый спейсер – ITS2, был ис-

пользован для быстрой и специфической идентификации *Toxocara canis* в образцах фекалий и почвы (Durant et al., 2012).

Для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей из генетической базы данных GenBank отобраны геномы изолятов из рода *Toxocara* spp. Из рода *Toxocara* spp анализировали гены ITS2 видов *Toxocara canis, Toxocara cati, Toxocara leonina, Toxocara vitulorum и Toxocara malaysiensis* (таблица 1).

Таблица 1

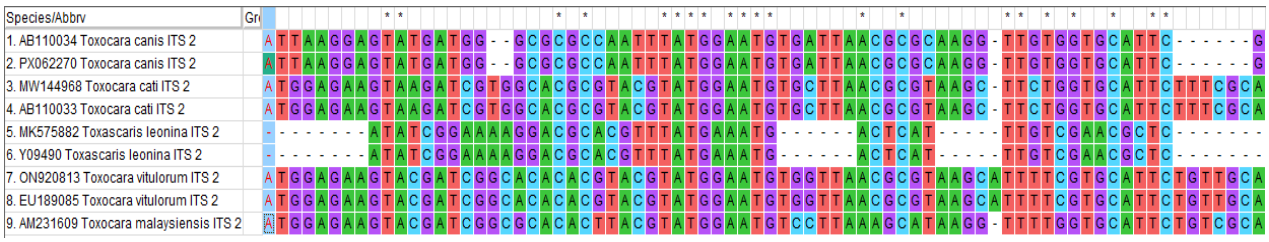
Номера регистрации в базе данных GenBank изолятов рода Toxocara spp

Наименование рода паразита	Идентификационные номера изолятов в базе данных GenBank
1	2
Toxocara spp	*Toxocara cati* [Genbank: AB110033], *Toxocara cati* [Genbank: MW144968], *Toxocara leonina* [Genbank:Y09490], *Toxocara leonina* [Genbank: MK575882], *Toxocara vitulorum* [Genbank:EU189085], *Toxocara vitulorum* [Genbank: ON920813], *Toxocara malaysiensis* [Genbank:AM231609], Toxocara canis [Genbank: AB110034], *Toxocara canis* [Genbank: PX062270], *Toxocara canis* [Genbank: MG214150], *Toxocara canis* [Genbank: KJ7771561], *Toxocara canis* [Genbank: LC133352], *Toxocara canis* [Genbank: KJ7771551], *Toxocara canis* [Genbank: LC762621], *Toxocara canis* [Genbank: AB110032], *Toxocara canis* [Genbank: MK728991]

Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы Mega v.11 по алгоритму ClustalW. На основе результатов множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей определены участки гена внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2, которые специфичны к *Toxocara canis* (рисунок 1).

Рисунок 1

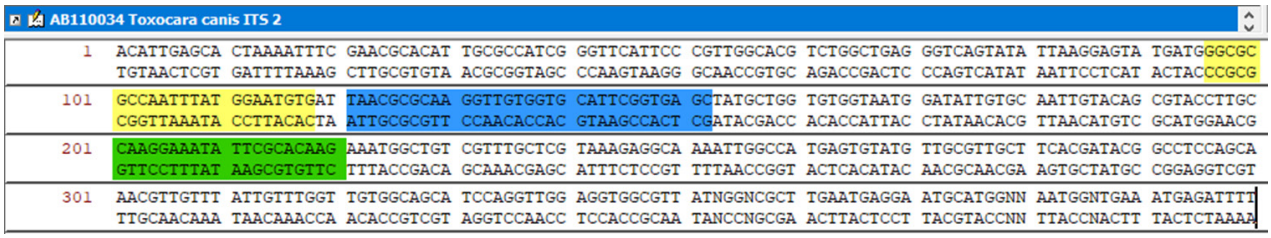
Фрагмент множественного выравнивания последовательностей нуклеотидов внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 рибосомной РНК рода Toxocara spp. в программе Mega 11



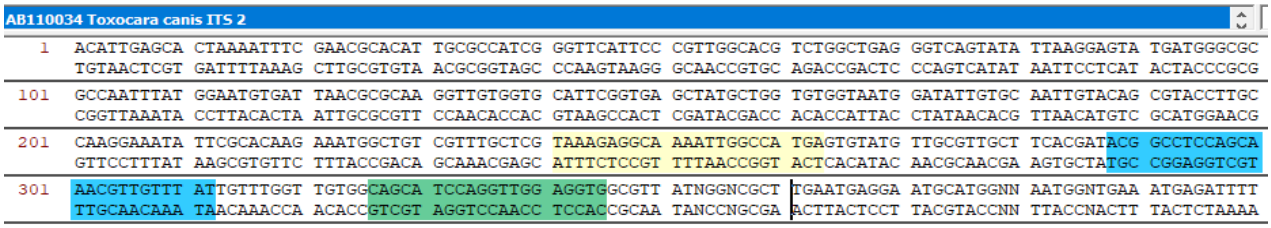
В наших исследованиях по подбору специфических праймеров и зондов, исследовали ген ITS2, поскольку в данном участке генома имеются специфические высококонсервативные сайты для идентификации *Toxocara canis*. Выравнивание демонстрирует как высококонсервативные, так и вариабельные участки исследуемого региона. Наиболее высокая степень сходства наблюдается между последовательностями *Toxocara canis*, что свидетельствует о низком уровне внутривидовой вариабельности ITS2. Последовательности *Toxocara cati* также характеризуются значительной гомологией с *Toxocara canis*, однако содержат ряд нуклеотидных замен, позволяющих дифференцировать данные виды. Нуклеотидные последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 рибосомной РНК рода *Toxocara* spp (виды *Toxocara canis, Toxocara cati, Toxocara leonina, Toxocara vitulorum и Toxocara malaysiensis*) отличаются друг от друга, включая нуклеотидные замены, вставки и делеции в выравнивании.

После множественного выравнивания последовательностей ITS2 различных видов *Toxocara* с использованием программы Vector NTI были разработаны праймеры и зонды для специфичной идентификации *T. canis* (рисунок 2).

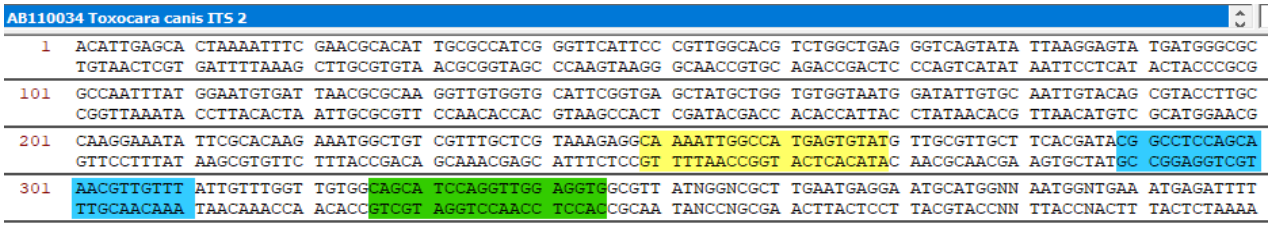
Рисунок 2
Подбор праймеров и зонда к ITS2 для выявления Toxocara canis с использованием программы Vector NTI



Олигонуклеотиды T_can F1, T_can R1, T_can Probe1



Олигонуклеотиды T_can F2, T_can R2, T_can Probe2



Олигонуклеотиды T_can F3, T_can R3, T_can Probe3

Выбранные олигонуклеотиды были протестированы in silico со всеми общедоступными базами данных нуклеотидных последовательностей с помощью BLASTN на сайте https://blast.ncbi.nlm.nih.gov

При конструировании праймеров и зондов соблюдали важные параметры, такие как: длина праймера; температура плавления, специфичность, комплементарная последовательность праймер, G/C содержание и полипиримидиновые или полипуриновые протяженные участки, вторичная структура сайта-мишени, вторичная структура праймера, гомо- и гетеродимеризация праймеров.

Для дальнейших работ были выбраны олигонуклеотиды, показывающие 100% специфичность с *Toxocara canis* (таблица 2).

Таблица 2
Параметры праймеров и зондов, специфичных к Toxocara canis по гену ITS2

Название праймера/зонда	Праймер/зонд (5′→3′)	Длина	Позиция	GC%	Tm, °C	Размер п.н.
T_can F1	GGCGCGCCAATTTATGGAATGTG	23	96–108	50,0	58,0	125
T_can R1	CTTGTGCGAATATTTCCTTG	20	201–220	40,0	56,0	
T_can Probe1	FAM-TAACGCGCAAGGTTGTGGTGCATTCGGTGAGC-BHQ1	32	221-153	56,25	69,0	

Продолжение таблицы

Название праймера/ зонда	Праймер/зонд (5′→3′)	Длина	Позиция	GC%	Tm, °C	Размер п.н.
T_can F2	TAAAGAGGCAAAATTGGCCATGA	23	241–263	39	58	105
T_can R2	CACCTCCAACCTGGATGCTG	20	326–345	60	57	
T_can Probe2	FAM-ACGGCCTCCAGCAAACGTTGTTTAT-BHQ1	25	288–312	48	67	
T_can F3	GCAAAATTGGCCATGAGTGTAT	22	248–269	40	55	98
T_can R3	CACCTCCAACCTGGATGCTG	20	326–345	60	57	
T_can Probe3	FAM-ACGGCCTCCAGCAAACGTTGTTT-BHQ1	23	288–310	52	64	

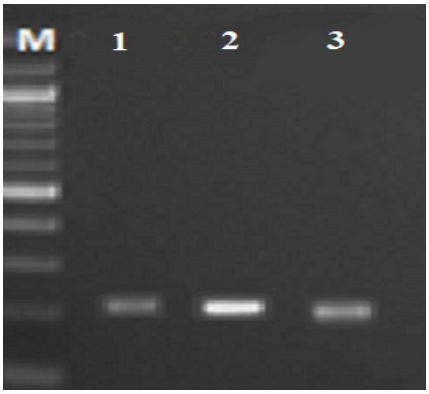
Анализ результатов ПЦР и ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК Toxocara canis

По результатам ПЦР получены специфические ампликоны для всех трёх пар праймеров. В дорожках наблюдаются фрагменты ожидаемого размера – 125 п.о. с праймерами T_can F1/R1, 105 п.о. с праймерами T_can F2/R2, 98 п.о. с праймерами T_can F3/R3. На рисунке 3А наиболее интенсивная полоса амплификации наблюдается с праймерами T_can F2/R2, что свидетельствует о более высокой эффективности амплификации данной пары праймеров.

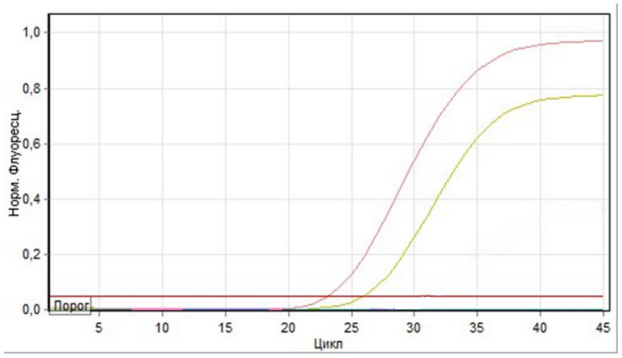
Для пар праймеров T_can F1/R1 и T_can F3/R3 также получены специфические продукты, однако интенсивность полос ниже, что может указывать на менее эффективную амплификацию или более низкую чувствительность (рисунок 3).

Рисунок 3

Результаты проведения ПЦР (3А) и ПЦР в режиме реального времени (3Б) с использованием олигонуклеотидов на Toxocara canis



А: Электрофореграмма ПЦР продуктов, полученных с использованием трех пар праймеров: 1 – T_canF1/R1 (125 п.о.); 2 – T_canF2/R2 (105 п.о.); 3 – T_canF3/R3 (98 п.о.); M – 50 bp DNA Ladder (Biolabs)



Б: Результаты выявления ДНК Toxocara canis в ПЦР в режиме реального времени с пороговыми значениями Ct23 и Ct26 с использованием праймеров T_can F2, T_can R2 и зонда T_can Probe2

На рисунке 3Б при ПЦР амплификации в режиме реального времени наблюдаются характерные кривые накопления флуоресцентного сигнала для исследуемых образцов *Toxocara canis*. Ct23 и Ct26 показывают о высокой концентрации целевой ДНК в образце. Обе кривые демонстрируют экспоненциальную фазу с последующим выходом на плато, что подтверждает корректное протекание ПЦР в режиме реального времени. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о специфической и эффективной амплификации целевого фрагмента гена ITS2 *Toxocara canis*.

Диагностика токсокароза остаётся актуальной проблемой паразитологии в связи с распространением паразитов и трудностями раннего выявления гельминтов у человека. Традиционные паразитологические методы для обнаружения яиц или личинок, применяются ограниченно, поскольку у человека *Toxocara canis* не достигает зрелой стадии и это существенно снижает диагностическую ценность копрологических исследований (Nikopoulou et al., 2025). В клинической практике наибольшее распространение получили серологические методы, прежде всего иммуноферментный анализ (ИФА), направленный на выявление антител к антигенам *Toxocara* (Jin et al., 2013). К другим диагностическим методам относятся иммуноблоттинг и непрямой флуоресцентный тест с антителами Однако из-за перекрестных реакций и автофлуоресценции эти методы могут быть ненадежными (Ebrahimi et al., 2025). В связи с этим большее значение имеют молекулярно-генетические методы, в частности ПЦР в режиме реального времени, обеспечивающая высокую специфичность за счёт детекции уникальных участков генома паразита, таких как ITS-регион (Cobzaru et al., 2025). Использование ПЦР в режиме реального времени повышает чувствительность анализа, позволяет проводить количественную оценку ДНК и снижает риск контаминации благодаря закрытому формату реакции (Thornton&Basu, 2011). Это приводит ПЦР в режиме реального времени к перспективному инструменту для ранней и точной диагностики токсокароза, особенно в сложных клинических случаях и при низкой паразитарной нагрузке.

Нами проведена оценка эффективности трёх пар праймеров, разработанных для детекции *Toxocara canis*, с целью выбора оптимального варианта для дальнейшего использования в ПЦР тест-системе.

В ПЦР анализе все исследованные пары праймеров обеспечивают амплификацию специфических фрагментов ожидаемого размера, что свидетельствует о корректности их дизайна и высокой специфичности к целевым участкам гена ITS2 ДНК *Toxocara canis*. Отсутствие неспецифических продуктов амплификации и праймер-димеров подтверждает соответствие разработанных праймеров общепринятым требованиям к дизайну олигонуклеотидов (Valieva et al., 2024). Наиболее интенсивная полоса наблюдалась для пары праймеров T_can F2/R2 (ампликон 105 п.о.), что указывает на её преимущество по сравнению с другими парами праймеров. Эффективность амплификации напрямую зависит от таких параметров, как длина праймеров, GC-состав, температура плавления и отсутствие вторичных структур, влияющих на стабильность гибридизации (Valieva et al., 2024). Слабые полосы для пар T_can F1/R1 и T_can F3/R3 могут быть связаны с условиями связывания праймеров с матрицей или частичным образованием вторичных структур, что снижает эффективность реакции.

Праймеры T_can F2/R2 обладает хорошими характеристиками и может быть рекомендованы для дальнейшего использования, в том числе при разработке диагностических ПЦР тест-систем. Анализ кривых амплификации ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров T_can F2, T_can R2 и зонда T_can Probe2 показал, что, кривые демонстрируют типичную сигмоидальную форму с выраженной экспоненциальной фазой и последующим выходом на плато, что подтверждает корректность протекания ПЦР в режиме реального времени. Таким образом, проведённый анализ позволил выбрать оптимальную пару праймеров и зонда для детекции *T_canis,* что является важным этапом в создании надежной и чувствительной молекулярно-диагностической системы.

Заключение

Разработанные праймеры обеспечивают специфичную амплификацию ДНК *Toxocara canis* в классической ПЦР, что подтверждает корректность их дизайна и пригодность для молекулярной диагностики. При этом наилучшие результаты получены праймерами T_can F2/R2, обеспечивающими наилучшее накопление ампликона. Таким образом, праймеры T_can F2, T_can R2 и зонд T_can Probe2 успешно функционируют в ПЦР в режиме реального времени, где осуществлена чувствительная и количественная детекция целевой ДНК *Toxocara canis*. Таким образом, предложенные олигонуклеотиды рекомендованы для разработки высокочувствительных диагностических тест-систем на основе ПЦР в режиме реального времени.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке научно-технической программы Республики Казахстан на 2025–2027 годы. Финансирование предоставлено в рамках НТП «Научно-технологическое обеспечение биологической безопасности Республики Казахстан в области медицинской паразитологии», №270/25-27 от 26.09.2025 г.

Вклад авторов

Серикбай А.А.: разработка концепции, методологии, редактирование и доработка рукописи; Султанкулова К.Т.: разработка концепции, научное руководство, управление проектом, редактирование и доработка рукописи; Бармақ С.М.: проведение исследования, сбор и обработка данных, валидация данных, редактирование и доработка рукописи; Хайруллин Б.М.: разработка концепции, научное руководство, редактирование и доработка рукописи.

References

Alkhafaji, I. (2024) Investigation of the distribution of some gastrointestinal helminths and protozoa in free-ranging dogs in Karbala province. Journal of Kerbala for Agricultural Sciences, vol. 11, no. 1, pp. 57–64.

Borecka, A., Gawor, J. (2008) Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with Toxocara spp. eggs. Journal of Helminthology, vol. 82, no. 2, pp. 119–122.

Chen, J., Liu, Q., Liu, G.-H., Zheng, W.-B., Hong, S.-J., Sugiyama, H., et al. (2018) Toxocariasis: A silent threat with a progressive public health impact. Infectious Diseases of Poverty, vol. 7, article 59. https://doi.org/10.1186/s40249-018-0437-0

Cobzaru, R.G., Ripa, C.V., Ursu, R.G., Damian, C., Iancu, L.S. (2025) Toxocara Seroprevalence in Europe and Considerations for Future Research. Pathogens, vol. 14, no. 11, article 1117. https://doi.org/10.3390/pathogens14111117

Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., Dveksler, G.S. (1993) General concepts for PCR primer design. PCR Methods and Applications, vol. 3, no. 3, pp. S30–S37.

Durant, J.-F., Irenge, L.M., Fogt-Wyrwas, R., Mizgajska-Wiktor, H., Gala, J.-L. (2012) Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of Toxocara canis and Toxocara cati (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples. Parasites & Vectors, vol. 5, article 288. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-288

Ebrahimi, M., Sadjjadi, S.M., Tahvildar Bidroni, F., Javadi Mamaghani, A., Mohammadzadeh, T., Heydarifard, Z., Seyyed Tabaei, S.J. (2025) Developing a serological test for the diagnosis of toxocarasis using a novel recombinant multi-epitope. Microbial Pathogenesis, vol. 204, article 107576. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107576

Jin, Y., Shen, C., Huh, S., Sohn, W.M., Choi, M.H., Hong, S.T. (2013) Serodiagnosis of toxocariasis by ELISA using crude antigen of Toxocara canis larvae. Korean Journal of Parasitology, vol. 51, no. 4, pp. 433–439. https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.4.433

Khademvatan, S., Rahim, F., Tavalla, M., Abdizadeh, R., Hashemitabar, M. (2013) PCR-Based Molecular Characterization of Toxocara spp. Using Feces of Stray Cats: A Study from Southwest Iran. PLoS ONE, vol. 8, no. 6, e65293. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065293

Kozan, E., Gonenc, B., Sarimehmetoglu, O., Aycicek, H. (2005) Prevalence of helminth eggs on raw vegetables used for salads. Food Control, vol. 16, no. 3, pp. 239–242. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.02.005

Kushmukhanov, Z., Sarybaeva, D., Yessenguloova, N., Zhumabaev, A. (2025) Prevalence and species diversity of helminth invasions in dogs from Oral city and surrounding areas. Green Biology Journal, vol. 1, no. 2, pp. 40–45.

Macpherson, C.N.L. (2013) The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. International Journal for Parasitology, vol. 43, pp. 999–1008. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.004

Magnaval, J.F., Glickman, L.T., Dorchies, P., Morassin, B. (2001) Highlights of human toxocariasis. Korean Journal of Parasitology, vol. 39, no. 1, pp. 1–11. https://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.1.1

Nikopoulou, A., Sideras, L., Peristeri, A.M., Ligda, P., Akritidou, O., Sotiraki, S. (2025) Human Toxocariasis: Presenting a Case Report of Eosinophilic Myocarditis Associated with Toxocara canis Infection and a Literature Review. Microbiology Research, vol. 16, no. 3, article 58. https://doi.org/10.3390/microbiolres16030058

Oge, H., Oge, S., Ozbakis, G., Gurcan, I.S. (2013) Presence of Toxocara eggs on the hair of dogs and cats. Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, vol. 60, pp. 171–176. https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002573

Pinelli, E., Roelfsema, J.H., Brandes, S., Kortbeek, T. (2013) Detection and identification of Toxocara canis DNA in bronchoalveolar lavage of infected mice using a novel real-time PCR. Veterinary Parasitology, vol. 193, no. 4, pp. 337–341. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.029

Raue, K., Heuer, L., Bohm, C., Wolken, S., Epe, C., Strube, C. (2017) 10-year parasitological examination results (2003–2012) of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, rabbits and hedgehogs. Parasitology Research, vol. 116, pp. 3315–3330. https://doi.org/10.1007/s00436-017-5646-0

Rostami, A., Riahi, S.M., Holland, C.V., Taghipour, A., Khalili-Fomeshi, M., Fakhri, Y., et al. (2019) Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 13, no. 12, e0007809. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007809

Rostami, A., Riahi, S.M., Hofmann, A., Ma, G., Wang, T., Behniafar, H., et al. (2020) Global prevalence of Toxocara infection in dogs. Advances in Parasitology, vol. 109, pp. 561–583. https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.017

Rozen, S., Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. Methods in Molecular Biology, vol. 132, pp. 365–386. https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:365

Rustemova, A.Sh. (2012) Rasprostranennost' toksokaroza sredi sel'skogo i gorodskogo naseleniya Respubliki Kazakhstan [Prevalence of toxocariasis among rural and urban populations of the Republic of Kazakhstan]. Vestnik Kazakhskogo Natsional'nogo Meditsinskogo Universiteta [Bulletin of the Kazakh National Medical University], no. 4, pp. 25–27.

Strube, C., Heuer, L., Janecek, E. (2013) Toxocara spp. infections in paratenic hosts. Veterinary Parasitology, vol. 193, pp. 375–389. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033

Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120

Thornton, B., Basu, C. (2011) Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. Biochemistry and Molecular Biology Education, vol. 39, no. 2, pp. 145–154.

Valieva, Zh., Abekeshev, N., Sidikhov, B., Shalmenov, M., Svotina, M. (2024) Gel'minty tonkogo otdela kishechnika sobak [Helminths of the small intestine of dogs]. Green Biology Journal, vol. 1, no. 2 (75), pp. 31–39.

Vrhovec, M.G., Alnassan, A.A., Pantchev, N., Bauer, C. (2022) Is there any change in the prevalence of intestinal or cardiopulmonary parasite infections in companion animals (dogs and cats) in Germany between 2004–2006 and 2015–2017? An assessment of the impact of the first ESCCAP guidelines. Veterinary Parasitology, vol. 312, article 109836. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109836

Сведения об авторах:

Серикбай Арай Арманкызы (автор-корреспондент) – докторант Казахского национального университета имени аль-Фараби, преподаватель факультета естествознания Казахского национального женского педагогического университета (Алматы, Казахстан, e-mail: arai_00.0@mail.ru).

Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна – главный научный сотрудник ТОО НИПЦ «MVA Group» (Алматы, Казахстан, e-mail: sultankul70@mail.ru).

Бармақ Сабырхан Мухитұлы – старший научный сотрудник ТОО НИПЦ «MVA Group» (Алматы, Казахстан, e-mail: sabyr95@mail.ru).

Хайруллин Берик Мухитович – главный научный сотрудник ТОО НИПЦ «MVA Group» (Алматы, Казахстан, e-mail: khirullin@mail.ru).

Information about the authors:

Serikbay Aray Armankyzy (Corresponding Author) – PhD student at Al-Farabi Kazakh National University, Lecturer at the Faculty of Natural Sciences, Kazakh National Women's Teacher Training University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: arai_00.0@mail.ru).

Sultankulova Kulyaisan Turlybayevna – Chief Researcher at MVA Group Research and Production Center LLP (Almaty, Kazakhstan, e-mail: sultankul70@mail.ru).

Barmak Sabyrkhan Mukhituly – Senior Researcher at MVA Group Research and Production Center LLP (Almaty, Kazakhstan, e-mail: sabyr95@mail.ru).

Khairullin Berik Mukhitovich – Chief Researcher at MVA Group Research and Production Center LLP (Almaty, Kazakhstan, e-mail: khirullin@mail.ru).

Авторлар туралы мәлімет:

Серикбай Арай Арманкызы (корреспонденттік автор) – әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің докторанты, Қазақ ұлттық қыздар педагогикалық университетінің Жаратылыстану факультетінің оқытушысы (Алматы, Қазақстан, e-mail: arai_00.0@mail.ru).

Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна – «MVA Group» ҒЗӨО ЖШС-нің бас ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан, e-mail: sultankul70@mail.ru).

Бармақ Сабырхан Мухитұлы – «MVA Group» ҒЗӨО ЖШС-нің аға ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан, e-mail: sabyr95@mail.ru).

Хайруллин Берик Мухитович – «MVA Group» ҒЗӨО ЖШС-нің бас ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан, e-mail: khirullin@mail.ru).

Поступила 03 июня 2026 года
Принята 29 сентября 2026 года