

Висновки

Найкращим способом захистити вашу собаку від парвовірусного ентериту є тісна співпраця з ветеринарним лікарем. Лише фахівець зможе розробити індивідуальний графік вакцинації та надати рекомендації щодо догляду за здоров'ям вашого вихованця. Профілактика завжди є ефективнішою за лікування, тому своєчасні консультації та обстеження є невід'ємною частиною відповідального догляду за собакою [2].

Список використаних джерел

1. Парвовірусний ентерит собак. *Ветеринарна клініка Айболіт*. URL: <http://aybolit.rv.ua/infekcionnye-hvorobu/Parvovirus/index.html>
2. Парвовірусний ентерит у собак. URL: <https://karolino-bugazka-gromada.gov.ua/news/73546-parvovirusnii-enterit-u-sobak>.
3. Парвовірусний ентерит у собак. *Центр ветеринарної допомоги «Елітвет»*. URL : <https://elitvet.dp.ua/infekcijnii-zahvorjuvannja/parvovirusnyj-enteryt-u-sobak/>
4. Парвовірусний ентерит. *Ветеринарна лікарня Dr. Buryak*. URL: <https://petclinic.com.ua/disease/parvovirus-enteritis/>
5. Дмитришин О. Клініко-епізоотологічні, патогенетичні і діагностичні аспекти парвовірусної та коронавірусної інфекції собак. *Сільський господар*. 2012. №7-8. С.25-31.

УДК: 543.545:340.64

ПРОБЛЕМИ ПРИ ІНТЕРПРЕТАЦІЇ РЕЗУЛЬТАТІВ КАПІЛЯРНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ЗА ПРОВЕДЕННЯ ГЕНОДІАГНОСТИКИ *HOMO SAPIENS* У КРИМІНАЛІСТИЦІ

Р. Романько, здобувач вищої освіти

М. Гиль, д-р с.-г. наук, проф., акад. НАН ВО України

Миколаївський національний аграрний університет

Розглянуто питання ефективності використання капілярного електрофорезу задля аналізу ДНК в криміналістиці Homo sapiens. Оцінено вплив якості зразку – біоптату, включення статерів, нуклеотиду «А» на точність розпізнавання ДНК в реакції ПЛР в умовах сертифікованої лабораторії обласного центру Миколаєва.

Ключові слова: *біоптат, ледер, нуклеотидна послідовність, фореуз, інгібіція, ДНК.*

Вступ

На сьогоднішній день кожна особа має велику кількість загальних ознак, характерних для виду. У той же час кожен індивідуум відрізняється за певними ознаками. Специфічність особини, її індивідуальність, визначається генотипом, тобто специфічною послідовністю молекули

ДНК. Вміння правильно виділити та оцінити індивідуальність піддослідної молекули ДНК має вирішальне значення для молекулярно-генетичних та селекційних робіт. Існує велика кількість варіацій методів визначення нуклеотидної послідовності ДНК, проте на даний час капілярний електрофорез є більш широко застосовуваним у криміналістиці для визначення особливостей геному, а саме мікросателітних послідовностей [1, 5, 11].

Огляд літератури

Капілярний електрофорез (КЕФ) є методом розділення молекул ДНК, РНК або білків на основі їх розміру та заряду в вузьких капілярах під дією електричного поля. Суть методу полягає в тому, що молекули рухаються через заповнений буфером капіляр (тонка скляна трубка) під впливом електричного поля. У капілярі створюється електроосмотичний потік, який «тягне» молекули в одному напрямку, проте як сила, що діє на іони, відштовхує їх залежно від полярності. Молекули різного розміру та заряду розділяються через різну швидкість міграції, дозволяючи виділити окремі фрагменти навіть у складних сумішах. Сучасні системи капілярного електрофорезу оснащені детекторами, що реєструють флуоресцентні мітки на ДНК-маркерах. Це дозволяє не тільки відокремити, але й ідентифікувати фрагменти на основі їх довжини та інтенсивності сигналу [3, 9, 12].

Основні переваги КЕФ включають високу роздільну здатність, швидкість аналізу, автоматизацію процесу та можливість використовувати мінімальні об'єми зразків. Крім того, флуоресцентне мічення забезпечує високочутливу детекцію та дозволяє проводити мультиплексний аналіз — одночасне визначення декількох маркерів у зразку. Але, незважаючи на високу точність, капілярний електрофорез може давати результати (виникнення «артефактних» ділянок), що потребують ретельної інтерпретації, зокрема у випадках, коли аналізу піддаються змішані або деградовані зразки:

- Статери;
- Позаматричний нуклеотидний додаток;
- Мікроваріанти;
- Нехарактерні алелі;
- Мутації;
- Пригнічення реакції ампліфікації, інгібування [7, 10, 16].

Матеріал та методики

Дослідження проводили шляхом опрацювання методик та інструкцій, фахової літератури [1-16] та її аналізу з наступною інтерпретацією.

Результати та обговорення

Під час аналізу отриманих результатів враховуються тільки ті алелі,

що розташовані в ділянці більш поширених алелів у загальній популяції (лідерних алелів) та по рівню розташування відповідають алелям ледера. Припустимо відхилення від фрагментів ледера повинно бути не більше ніж 0,5 п.н. Всі фрагменти, що локалізовані вище або нижче крайніх алелів ледера – є неспецифічними та подальшому аналізу не підлягають [4].

Аналіз отриманих результатів починається з вивчення коректності позначень відповідного типу проби, методу аналізу, панелі, розмірного стандарту, перевірки алельного ледера, контрольних зразків та холостих реагентів. Також необхідно враховувати стохастичний поріг, який задається чутливістю апаратури і виражається в одиницях відносної флуоресценції (RFU). Якщо висота алелю буде нижча за порогове значення RFU, то може виникати стохастичний ефект, тобто часткове або повне «випадіння» алеля (Allele drop-out – алель не ампліфікується, але точно відомо, що він є). Найчастіше стохастичний ефект виникає при внесенні малої кількості ДНК у реакцію ампліфікації. Випадіння одного алеля в гетерозиготі може призвести до помилкового встановлення гомозиготності у зразку. Це може призвести до недостовірної інтерпретації результатів та подальшого накопичення помилок [5, 8, 13].

Є два рівня проблем, які перешкоджають правильній інтерпретації результатів генодіагностики. Перші – це ті, що виникають на рівні виділення та ампліфікації ДНК, другі – на рівні проведення форефу.

До першого рівня відносяться такі вища як:

Деградація матричної ДНК. При ампліфікації деградованої ДНК на електрофореграмі спостерігається дисбаланс гетерозиготних піків та ДНК-профілю взагалі. При значній деградації ДНК може виникати часткове або повне «випадіння» алеля, а також можуть з'являтися триалелі та мікроваріанти, що призводить до ускладнення або неможливості інтерпретації результатів. Такі об'єкти необхідно ампліфікувати щонайменш тричі, порівнювати отримані дані з попередніми результатами, інтерпретувати лише тотожні результати [2, 3].

Інгібіція ПЛР. Одним із вагомих труднощів дослідження об'єктів є наявність у розчині ДНК речовин, що інгібують ДНК-полімеразу, тим самим частково або повністю пригнічують полімеразну ланцюгову реакцію. В результаті чого на електрофореграмах виникає дисбаланс гетерозиготних піків, випадіння алелів, часткова або повна втрата профілю. Визначити присутність інгібіторів у пробі можливо за допомогою кількісного та якісного аналізу геномної ДНК, проаналізувавши внутрішній ІРС контроль, що у нормі не повинен перевищувати 28 циклів [6, 16].

Статери (рис. 1). Це артефакти ПЛР, що виникають під час ампліфікації коротких тандемних повторів (STR) і виглядають як невеликі піки перед або після основного піка на відстані, що дорівнює одному повтору STR. Статери виникають через «ковзання» ДНК-полімерази, яка іноді пропускає один із повторів. Зазвичай статери мають нижчу інтенсивність порівняно з основним піком і не перевищують 15% від його

висоти. Для контролю якості електрофореграм важливо відрізнити справжні алелі від статерів, особливо у випадках аналізу змішаних зразків, де наявність статерів може ускладнювати інтерпретацію результатів. Належна оцінка статерів вимагає використання стандартів для кожного маркера, оскільки певні STR-маркери більш схильні до формування статерів [9].

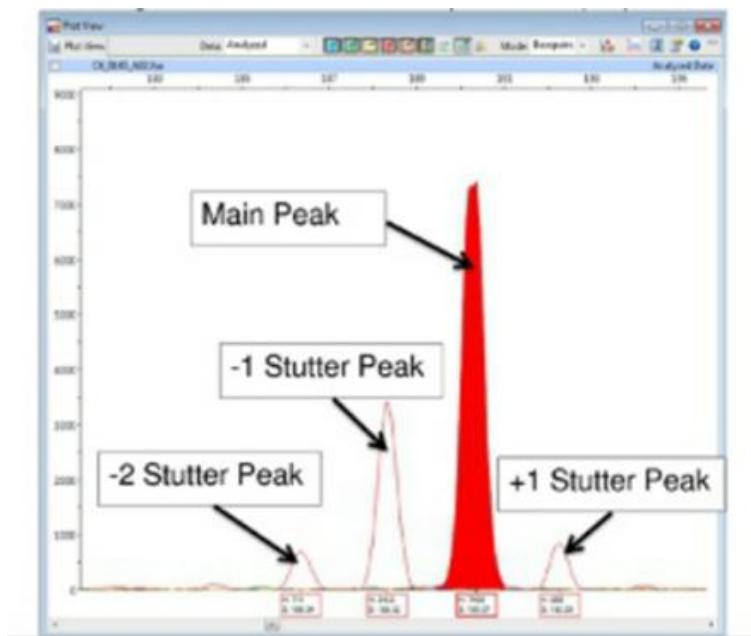


Рис. 1. Статер [7]

Неповне приєднання нуклеотиду «А» на 3' кінці ПЛР фрагменту (рис. 2). Це є поширеним явищем у процесі ампліфікації ДНК, що призводить до формування двох типів продуктів: одних із додатковим аденіном («+А» фрагменти) і інших без нього («-А» фрагменти). Це явище виникає через особливості дії термостабільної ДНК-полімерази (наприклад, *Taq*-полімерази), яка часто додає додатковий нуклеотид «А» до 3'-кінця щойно синтезованого фрагмента ДНК. Додавання є неефективним або відсутнім, якщо умови реакції не оптимальні. Неповне додавання аденіну призводить до того, що на електрофореграмі спостерігаються два близько розташовані піки: один відповідає «+А» продукту, а інший – «-А». Роздвоєння піків ускладнює аналіз, особливо якщо інтенсивність піків близька. Основними причинами неповного додавання аденіну може бути недостатній час дії полімерази. Низька концентрація іонів Mg^{2+} , висока концентрація праймерів та низька кількість ДНК-полімерази. Через неповне додавання аденіну також можуть формуватися «розширені» або нерівномірні піки. Це спостерігається, коли продукти ампліфікації складаються із суміші «+А» і «-А» фрагментів, а сигнал від обох варіантів зливається, створюючи неоднорідний пік. Подібне ускладнює ідентифікацію алелів та може призвести до хибних інтерпретацій, особливо у випадках, коли гетерозиготний баланс уже є порушеним через інші фактори [1, 4].

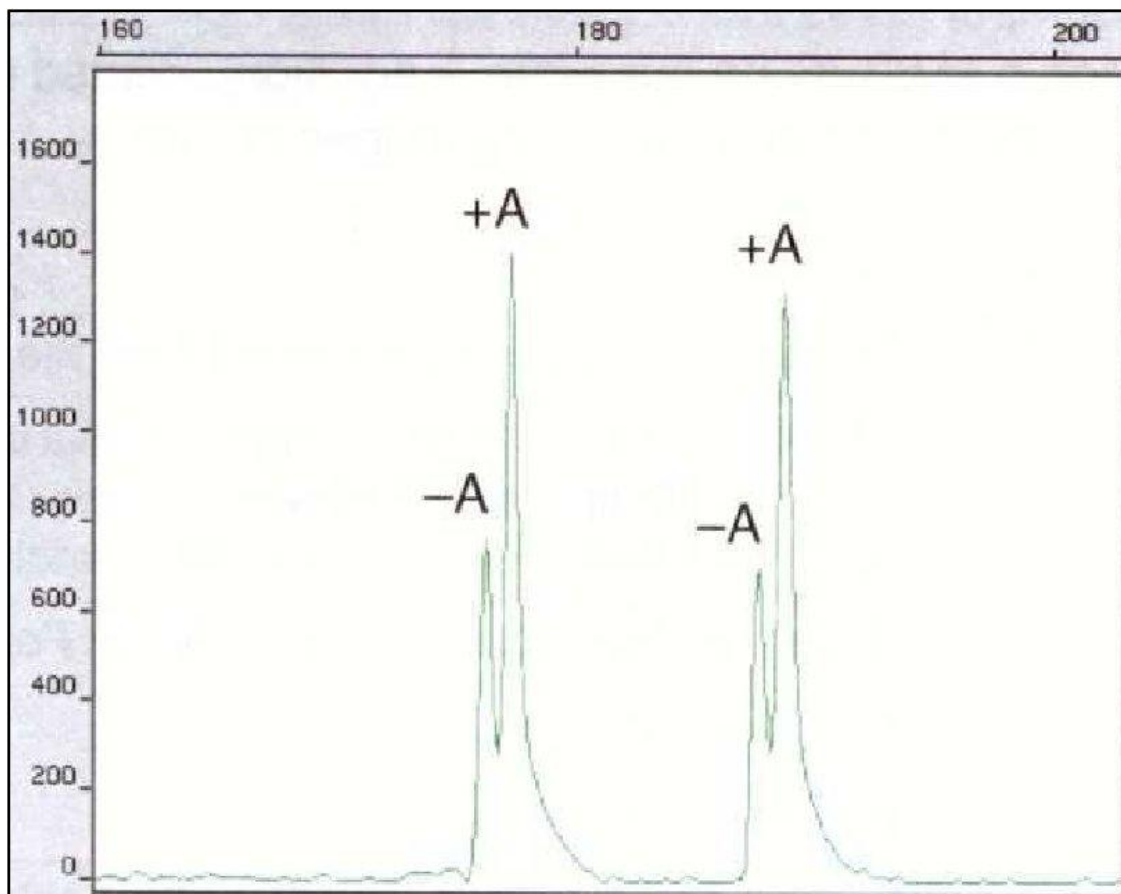


Рис. 2. Приклад неповного приєднання нуклеотиду «А» на 3' кінці ПЛР фрагменту

Мікроваріанти. Нестандартні алельні варіанти коротких тандемних повторів, що відрізняються від основних алелів на частки повтору. Мікроваріанти виникають через невеликі мутації, які змінюють довжину STR-локусу не на цілий повтор, а на часткову його величину. Це вид артефактів зазвичай утворюється внаслідок мутацій під час реплікації ДНК, рекомбінаційних процесів та селекційного тиску або нейтральних мутацій. На електрофореграмі вони з'являються як піки, що розташовані між основними алелями [14].

До другого рівня відносяться такі нехарактерні явища:

Спайк-піки (Spike Peaks, рис. 3). Це неалельні (неспецифічні) піки, що характеризуються загальною морфологією, що відрізняється від справжніх алелів. Як правило присутні у всіх кольорах по одній лінії та можуть бути викликані стрибком напруги, часточками пилу, кристалами полімеру або пухирцями повітря, що проходять через вікно лазерної детекції під час електрофорезу [4].

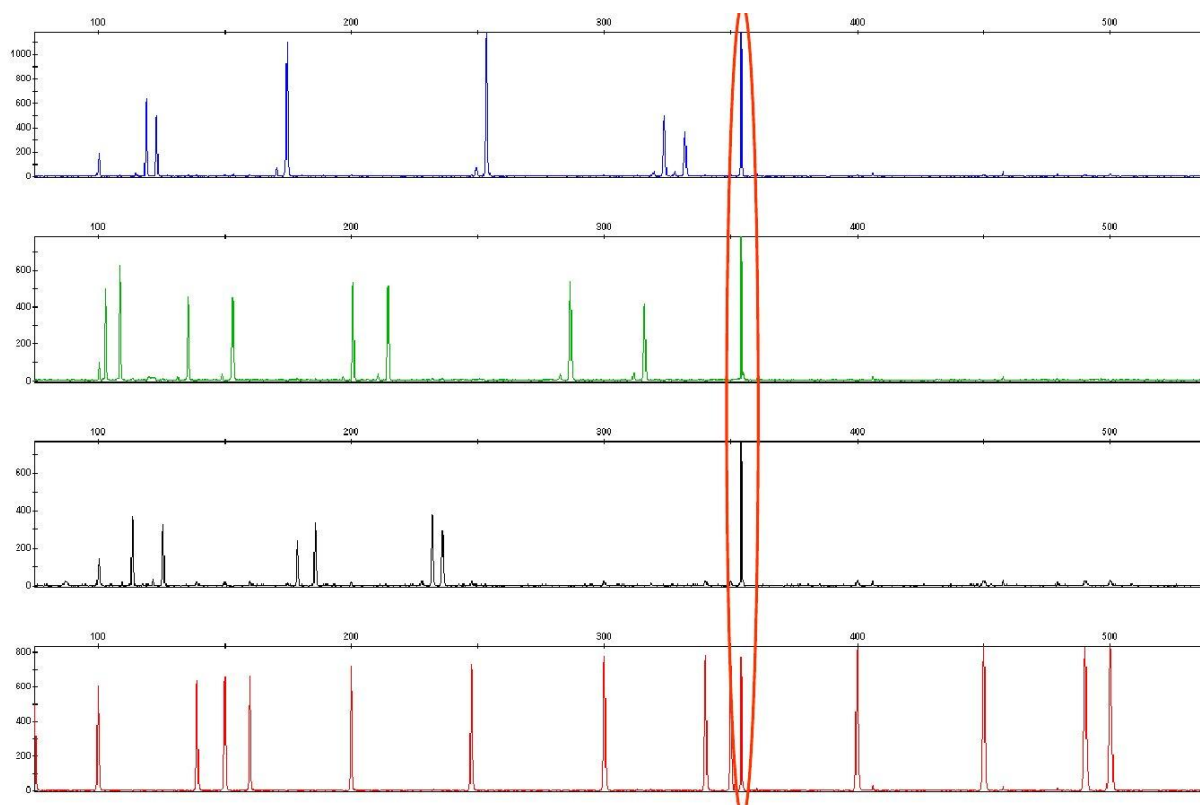


Рис. 3. Spike Peaks

Пуллап (Pull-Up Peaks). Це є появою неалельного (неспецифічного) піку в одному у кольорі, як результату істинного алеля в іншому кольорі. Ці піки виникають, коли флуоресцентний сигнал від сильного піка в одному каналі «перетягується» в інші канали, через що з'являються невеликі піки того ж розташування, але іншого кольору. Pull-up піки зазвичай виникають через перевантаження сигналу або неправильне калібрування детектора [4].

OL-алелі (Off-Ladder Alleles). Це алелі, що не входять у стандартні розміри або не потрапляють у межі калібрувальної шкали. OL-алелі можуть бути результатом мутацій або рідкісних варіантів STR, що відрізняються від поширених алелів. Вони відображаються як піки поза основною шкалою, і в більшості випадків їх слід підтвердити додатковим аналізом, щоб виключити можливість технічної помилки [4].

Висновки

Підсумовуючи вище зазначене можна стверджувати, що капілярний електрофорез є досить ефективним методом аналізу ДНК у криміналістиці завдяки високій точності, чутливості та здатності розділяти навіть складні суміші молекул. Метод супроводжується рядом технічних і аналітичних проблем, що вимагають ретельного розгляду для забезпечення достовірності результатів.

Однією з проблем є інтерпретація артефактів, таких як статери, неповне включення нуклеотиду «А», мікротваріанти та різні типи неспецифічних піків, включаючи спайк-піки, підтягування та OL-алелі.

Процес ампліфікації, якість зразків ДНК і робота обладнання є одними з факторів, які викликають ці явища. Їх присутність може ускладнити ідентифікацію алелів. Важливо звернути увагу на деградовані зразки та зразки з низькою концентрацією ДНК, де існує ймовірність випадання алелей.

Щоб мінімізувати вплив цих проблем, важливо дотримуватися лабораторних протоколів, використовувати високоякісні реагенти та обладнання та впроваджувати автоматизовані системи обробки даних. Повторна ампліфікація проблемних зразків, аналіз контрольних зразків і використання стандартів допомагають підвищити точність і відтворюваність результатів.

Золотим стандартом генодіагностики *Homo sapiens* є капілярний електрофорез. Висока цінність сучасних наукових і прикладних досліджень може бути забезпечена постійним вдосконаленням технологій і методів аналізу.

Список використаних джерел

1. Вороненко, Ю. В., Степаненко, О. В., Соловійов, А. В. Судово-медична ідентифікація особи за допомогою генетичного профілювання. Харків: ХНМУ, 2019. 245 с.
2. Ситник, О. В. Методи ДНК-аналізу у криміналістиці: сучасні аспекти застосування. Криміналістичний вісник. 2020. №2. С. 34–41.
3. Грабовий, М. І., & Лавров, В. С. Генетична ідентифікація в сучасній криміналістиці. Наукові доповіді НУБіП. 2021. Т. 3, №24. С. 56–63.
4. Калюжна, О. С., Міщенко, Р. І. Проблеми інтерпретації результатів ДНК-експертиз. Судова медицина України. 2020. №1. С. 12–20.
5. Попович, С. О. Молекулярна генетика в криміналістиці: основи, методи та перспективи. Київ: Видавництво КНУ, 2018. 310 с.
6. Тарасова, О. М., & Корнієнко, Л. В. Особливості аналізу STR-локусів за умов деградації ДНК. Науковий вісник ЧНУ. 2020. Т. 4, №16. С. 45–51.
7. Jensen, R., Rivest, J., Li, W., & Vissa, V. DNA Fingerprinting of *Mycobacterium leprae* Strains Using Variable Number Tandem Repeat (VNTR). Journal of Visualized Experiments. 2011. № 3104. DOI: 10.3791/3104.
8. Шевченко, І. Г., Мельничук, Н. В. Методологічні аспекти аналізу ДНК у криміналістиці. Судова експертиза. 2019. №3. С. 78–85.
9. Томілін, Ю. А., Вовк, М. І. Капілярний електрофорез: основи та проблеми застосування у генодіагностиці. Вісник ОНУ. 2018. Т. 21, №7. С. 64–71.
10. Butler, J. M. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Amsterdam: Academic Press, 2012. 528 p.
11. Назаренко, О. М. Ідентифікація особи на основі ДНК-профілю. Наукові праці ДДУВС. 2020. №4. С. 32–38.

12. Смирнова, Л. А., & Карпенко, І. Ю. Використання ДНК-аналізу у встановленні родинних зв'язків. Науковий журнал КНТУ. 2021. № 6. С. 58–64.
13. Zhang, Z., & Zhang, C. Challenges in Interpreting Mixed DNA Samples Using STR Analysis. Forensic Science International. 2019. Vol. 302. P. 105–112.
14. Грицак, В. С. Мікроваріанти у генетичному профілюванні: особливості аналізу. Журнал біологічних досліджень. 2020. №2. С. 23–29.
15. Корнійчук, О. В., Кравченко, Ю. М. Інгібування ПЛР: проблеми та шляхи вирішення. Вісник судової медицини. 2019. №5. С. 49–54.
16. Новак, А. О. Сучасні тенденції у використанні флуоресцентного мічення ДНК. Генетичні дослідження. 2020. №3. С. 41–47.

УДК 636.09:616.61-08:636.8

ОСОБЛИВОСТІ ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ СЕЧОКАМ'ЯНОЇ ХВОРОБИ У КОТІВ

Н. Свириденко, здобувачка вищої освіти

А. Іовенко, канд. вет. наук, доцент

Миколаївський національний аграрний університет

У статті наведені оглядові дані щодо особливостей діагностики та лікування сечокам'яної хвороби у котів. Також розглядаються різні методи лікування сечокам'яної хвороби у котів.

Ключові слова: сечокам'яна хвороба, коти, лікування, уроліти

Вступ

Сечокам'яна хвороба визначається як утворення каменів у сечовивідних шляхах. Широкі дослідження спрямовані на краще розуміння промоторів каменеутворення для розробки цілеспрямованих стратегій лікування та профілактики. За наявності сприятливих умов перенасичення сечі іонними компонентами певного типу каменів призводить до утворення кристалів, так званих уролітів, їх агрегації та росту і каменеутворення [1].

Огляд літератури

Уроліти зазвичай виникають у сечовому міхурі та/або уретрі котів і можуть становити загрозу для життя, якщо виникає обструкція уретри. Оксалат кальцію становить 40–50% уроцистолітів, і ці камені не піддаються медикаментозному розчиненню; тому, якщо необхідно