

УДК 574.2 : 614.91/449

МОНІТОРИНГ ПАРАЗИТАРНОГО ЗАБРУДНЕННЯ ДОВКІЛЛЯ З ВИКОРИСТАННЯМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Волошина Н.О.

Моніторинг паразитарного забруднення довкілля з використанням полімеразної ланцюгової реакції. – Волошина Н.О. – Розроблено метод детекції та ідентифікації яєць паразитичних нематод *Toxocara canis*, *Toxocara cati* і *Toxascaris leonina* в довкіллі з використанням полімеразної ланцюгової реакції. Доведено високий рівень специфічності, чутливості, відтворюваності і ефективності реакції, що перевищує існуючі аналоги на 10,4%.

Ключові слова: токсокари, праймери, полімеразна ланцюгова реакція, чутливість, специфічність, ефективність.

Адреса: Національний педагогічний університет імені М.П. Драгоманова, Інститут природничо-географічної освіти та екології, кафедра екології, вул. Пирогова, 9, м. Київ, 01601, Україна, E-mail: VoloshynaN@rabler.ru

The monitoring of parasitic environmental contamination with use polymerase chain reaction. - Voloshyna N.O. - The method of detection and identifications of the freeexistent stages of parasitic nematodes, *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* in environment with use polymerase chain reaction developed. The high level of specificity, sensitiveness, producibility and efficiency of reaction which exceeds existent analogues on 10,4% is well-proven.

Key words: toxocara, primers, polymerase chain reaction, specificity, sensitiveness, efficiency.

Address: National Pedagogical Dragomanov University, Institute of natural and geographical education and ecology, department of ecology, st. Pirogova, 9, Kiev, 01601, Ukraine, E-mail: VoloshynaN@rabler.ru

Вступ

Останніми роками значне поширення зоонозних хвороб паразитарного походження в Україні стало актуальною екологічною проблемою, що створює небезпеку для життєдіяльності людини і утримання домашніх тварин [3, 9].

На особливу увагу заслуговує питання профілактики соціально небезпечних геогельмінтозів домашніх хижаків, яким належить чільне місце у структурі паразитарного забруднення урбосистеми і агроландшафтів. Серед них важливе місце займають геогельмінтози домашніх хижаків, збудниками яких є *Toxocara canis* Werner, 1782, *Toxocara cati* Schrank, 1788 та *Toxascaris leonina* von Linstow, 1902 [1, 4, 9].

Екологічна стійкість аскаридозів тварин до абіотичних факторів середовища обумовлює їх здатність до тривалого збереження пропагативних стадій в компонентах довкілля (грунт, вода, продукти харчування, побутові та виробничі предмети), через які збудники хвороб можуть бути занесені в організми різних хазяїв, в тому числі й людини. Так, при інвазуванні токсокарами можливий розвиток, так званого, синдрому «visceral larva migrans», іншими видами аскаридів

тварин - еколого-паразитичного явища «паратенічний паразитизм», які зумовлюють патологічні зміни в організмі людини, важко діагностуються і лікуються [4, 5].

В умовах антропогенно змінених територій активна циркуляція зоогельмінтів пов'язана з рядом екологічних чинників, а саме: 1) стрімке та некероване зростання чисельності специфічних (домашніх хижаків) і неспецифічних (людина) хазяїв та механічних переносників; 2) соціально-економічні чинники: погіршення санітарних умов проживання людей і утримання тварин; 3) соціально-психологічні чинники: відсутність спеціально відведених територій для вигулу домашніх улюбленців, культури прибирання тваринних екскрементів, доступ собак та котів до смітників, місць торгівлі продуктами харчування, неідеальність соціальних програм типу «Тварина в місті», недостатня кількість і низька ефективність функціонування притулків для бездомних тварин.

Профілактика паразитарного забруднення може бути суттєво вирішена шляхом знищення паразитів на різних стадіях їх розвитку [7, 10]. Водночас, на практиці недостатньої уваги надається питанням розриву епізоотичних ланцюгів при гельмінтозах, зокрема, шляхом детекції та елімінації пропагативних стадій

паразитів. У зв'язку з цим перспективним напрямом досліджень є розробка експрес-методів одномоментного виявлення у навколишньому середовищі гельмінтів з різних таксономічних груп (яйця та личинки нематод, цисти найпростіших тощо). Одним із них є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яка знайшла широке застосування у діагностиці інфекційних та інвазійних хвороб [2, 8, 11, 12].

Метою дослідження було розробити та вивчити аналітичні характеристики праймерів для виявлення та ідентифікації актуальних в соціальному аспекті геогельмінтів домашніх

хижаків у різних зразках об'єктів довкілля з використанням полімеразної ланцюгової реакції.

Матеріали та методи

Підготовчу частину експерименту здійснювали в лабораторії фізіології, патофізіології та імунології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Молекулярно-генетичні дослідження проводили у лабораторії молекулярної біології Інституту ветеринарної медицини УААН (м. Київ) за схемою (рис. 1).



Рис. 1. Схема розробки способу детекції у довкіллі нематод з ряду *Ascaridida* з використанням полімеразної ланцюгової реакції

Fig. 1. A chart of development of method of detection in the environment of eggs of nematodes series *Ascaridida* with the use of polymerase chain reaction

Теоретичну розробку олігонуклеотидних праймерів проводили за допомогою електронних баз даних GenBank, EMBL, Entrez та DDBJ; комп'ютерних програм Vector NTI Suite, Align X, FASTA та BLASTA on line. Синтез олігонуклеотидів на наше замовлення здійснювала Науково-виробнича фірма «Литех» м. Москва.

Матеріалом для позитивного контролю були статевозрілі нематоди видів *T. canis*, *T. leonina* та суспензії яєць *T. cati* на різних стадіях ембріонального розвитку, негативного – деіонізована автоклававана вода.

Виділення ДНК проводили використовуючи комплект реагентів «ДНК-сорб-В». Ампліфікацію здійснювали за допомогою чотиріканального ампліфікатора «Терцик». Результати реакції визначали за допомогою електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації у 2%-вому агарозному гелі з додаванням бромистого етидію та подальшим переглядом гелю на ультрафіолетовому (УФ) транслюмінаторі. Позитивною вважали пробу при наявності смужки жовтогарячого кольору розміром 394 нуклеотидних залишків (н. з.).

Для перевірки таксономічної специфічності розроблених праймерів було проаналізовано

зразки ДНК від 12 видів паразитів тварин, п'яти штамів бактерій, генетичний матеріал великої рогатої худоби, свині, kota, собаки і курки. Чутливість методу перевіряли на зразках, що містили 1000, 100, 10 та 2 яєць *T. cati* в 0,1 см³. Відтворюваність методу визначали шляхом триразового повторення постановки реакції з позитивними і негативними зразками в п'яти варіантах. Можливість інгібування реакції речовинами, що входять до складу ґрунту, води природних водойм, рослинності та тваринних екскрементів вивчали на експериментальних моделях шляхом їх комбінування з яйцями *T. cati*.

Еколого-паразитологічні дослідження території помешкання домашніх і бездомних хижих тварин здійснювали впродовж літньо-осіннього періоду 2010–2011 років у місцях, потенційно значимих щодо забруднення екскрементами тварин (дитячі та спортивні майданчики, сквери, парки, прибудинкові території житлових мікрорайонів м. Кисва). Для лабораторних досліджень відбирали проби ґрунту, піску, води, трави. Еколого-паразитологічні дослідження проводили за традиційними методиками [6] та ПЛР.

Результати досліджень та їх обговорення

Ключовим етапом у створенні високоспецифічного методу на основі ПЛР для ідентифікації та детекції зоонозних гельмінтів тварин є вибір послідовностей для олігонуклеотидних праймерів. За літературними даними [11, 12, 13], було визначено декілька маркерних послідовностей, придатних для розробки специфічних праймерів, серед яких для подальшої роботи було відібрано консервативну ділянку сох 1 мітохондріальної ДНК, яка є спільною для нематод ряду *Ascaridida* (*T. leonina*, *T. canis* і *T. cati*). Такий вибір був обумовлений тим, що ген сох 1 є спільним для більшості

представників паразитичних організмів типу *Nematoda*, в тому числі тих, які мають найбільше епідемічне значення в сучасних умовах.

Найвдалішою виявилася пара праймерів, що мають послідовність:

АТ 1 5' TTTGGGCATCCTGAGGTTTATA 3' (forward);

АТ 2 5'CATGCAAGATAAATATCCAGACTAG 3' (reverse).

Розроблені праймери є специфічними для зв'язування з ділянками матричної ДНК та теоретично не мають гомології з нуклеотидними послідовностями інших організмів (бактерії, віруси та еукаріоти). Винятком є лише близькоспоріднені види – *Ascaris lumbricoides* – паразит людини та *Ascaris suum* – гельмінт свині. Зважаючи на небезпечність для людини усіх видів паразитів з ряду *Ascaridida*, а також універсальність методів та способів боротьби з ними у докільлі, вважаємо властивість праймерів виявляти близькоспоріднені види аскаридід додатковою універсальною перевагою праймерів.

Теоретично розраховано і експериментальним шляхом визначено найкращий режим ампліфікації та склад ПЛР-суміші, за яких синтетичні олігонуклеотидні праймери здатні приєднуватись до консервативної ділянки ДНК нематод з ряду *Ascaridida*, множинно копіюватись і виявляти класичними методами детекції.

Оптимальним був склад ампліфікаційної суміші об'ємом 0,025 см³, що вміщував: ПЛР-буфера – 0,012 см³, dNTP – 0,004 см³, праймерів АТ 1 та АТ 2 – по 0,0025 см³ та очищену ДНК – 0,004 см³. У кожену пробу нашаровували 0,03 см³ мінерального масла.

Програма ампліфікації включає 35 циклів, кожний з яких складається з денатурації ДНК, гібридизації праймерів і елонгації (табл. 1).

Таблиця. Програма ампліфікації

Table. Program of amplification

№ циклу	Назва циклу та їх стадій	Температура, °С	Час, хв	Кількість циклів
1	Гарячий старт	95	5,0	1
2	Денатурація ДНК	95	0,3	35
	Гібридизація праймерів	53	1,0	
	Елонгація	72	1,0	
3	Фінальна елонгація	72	5,0	1
4	Зберігання			

В результаті проведеного дослідження, після електрофоретичного розділу ампліконів в агарозному гелі відмічали світіння смужок жовтогарячого кольору на теоретично розрахованому рівні (394 н. з.), що свідчить про позитивний результат ПЛР.

Наступним кроком оптимізації ПЛР-протоколу було визначення специфічності розроблених праймерів. З цією метою провели виділення ДНК із паразитичних організмів таких видів: *Ascaris suum* Goeze, 1782; *Echinococcus granulosus* Batsch, 1786; *Taenia hydatigena* Pallas, 1766; *Ancylostoma*

caninum Ercolani, 1859; *Dipylidium caninum* Linnaeus, 1758; *Trichostrongylus instabilis* Railliet, 1893; *Trichuris vulpis* Frolich, 1789; *Parascaris equorum* Goese, 1782; *Uncinaria stenocephala* Railliet, 1884; *Demodex canis* Bergerin, 1846; *Oesophagostomum dentatum* Rudolphi, 1803; *Eimeria suis* Joen, 1971; штамів бактерій: *Escherichia coli* Escherich, 1885; *Salmonella dublin* Salmon and Smit, 1885; *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884; *Streptococcus faecalis* Paterson, 1933; *Pasteurella multocida* Lehmann and Neumann, 1899 і тканин від тварин. Постановку реакції проводили згідно з оптимізованим протоколом. У жодному випадку не було зареєстровано

позитивного результату, що свідчить про високу специфічність розроблених праймерів.

Мінімальна чутливість реакції становила два яйця нематоди в 1 см³ субстрату, що вважається достатньо чутливим показником.

При перевірці відтворюваності методу в усіх випадках були зафіксовані ідентичні результати. В позитивних зразках інтенсивність світіння смужки і довжина ампліфікованих продуктів були однаковими.

В пробах об'єктів докільця, штучно контамінованих яйцями *T. cati*, реєстрували позитивний результат. Дещо розмитію була смужка в зразку з екскрементами (рис. 2).

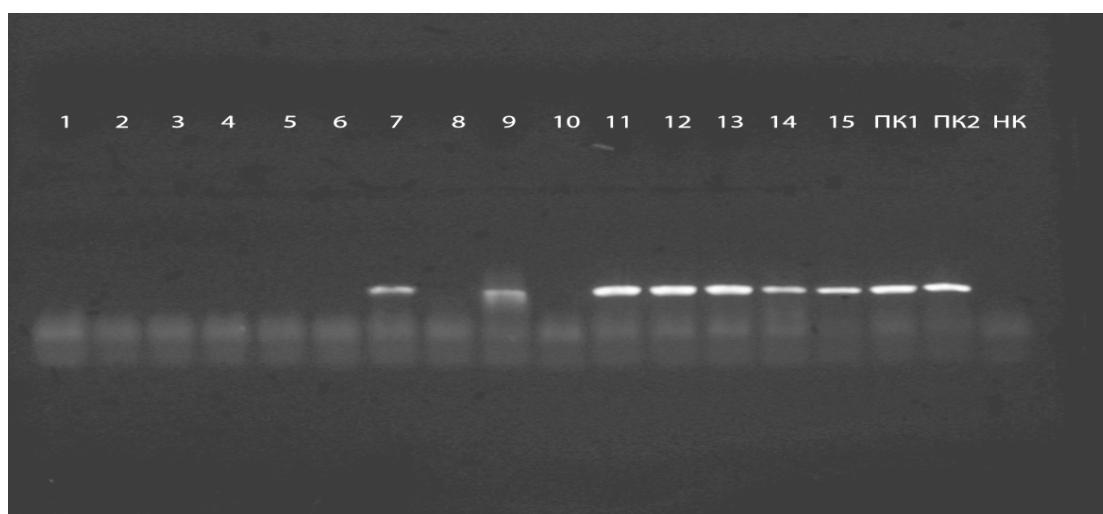


Рис. 2. Електрофореграма продуктів полімеразної ланцюгової реакції

Примітка: 1–5 – ДНК тварин; 6 – трава; 7 – трава, контамінована яйцями токсокар; 8 – ґрунт; 9 – ґрунт, контамінований яйцями *T. canis*; 10 – вода; 11 – вода, контамінована яйцями *T. canis*; 12–15 – зразки з вмістом 1000, 100, 10 і 2 яйця *T. canis*; ПК1 – позитивний контроль (100 яєць *T. cati*); ПК2 – позитивний контроль (м'язова тканина нематоди *T. canis*); НК – негативний контроль

Fig.2. Electrophorogramme of products of polymerase chain reaction

Note: 1–5 is DNA of animal; 6 - a grass; 7 - a grass, contamination the eggs of *T. canis*; 8 - a soil; 9 - a soil, contamination the eggs of *T. canis*; 10 - a water; 11 - a water, contamination the eggs of *T. canis*; 12–15 are standards with content 1000, 100, 10 and 2 eggs of *T. canis*; ПК1 - positive control (100 eggs of *T. cati*); ПК2 - positive control (muscular fabric of eelworm of *T. canis*); НК - negative control

Такий результат можна пояснити високим вмістом у ньому біологічно активних речовин, які, можливо, інгібують реакцію.

Модифіковано методики підготовки зразків об'єктів докільця (ґрунт, зішкребки, змиви, екскременти) до вилучення та екстракції нуклеїнових кислот інвазійних агентів. Доведено доцільність застосування флотажного розчину на основі хлориду натрію з подальшим двократним відмиванням у дистильованій воді вилучених із проб яєць нематод.

В результаті дослідження 58-и проб об'єктів докільця (ґрунт, пісок, трава, вода) традиційним

еколого-паразитологічним методом діагностики і ПЛР позитивні результати реєстрували у 14-и зразках, досліджених ПЛР, що свідчить про присутність в них нуклеїнових кислот, комплементарних визначеній у праймерах послідовності нуклеотидів аскарідід. Водночас, у зразках, досліджених класичним методом, яйця аскарідід собак та кішок реєстрували лише у 8-ми пробах, які були підтвержені ПЛР. Виявлені ПЛР позитивні проби перевищують показник виявлення зародків аскарідід стандартизованими загальноприйнятими методами на (6 проб) –

10,4%. Із них 4 – проби ґрунту, 1 - води та 1 – піску.

Отже, розроблені праймери виявилися придатними для застосування з метою виявлення нуклеїнових кислот паразитів, *T. leonina*, *T. canis* і *T. cati* методом ПЛР. Експериментальні дослідження та перевірка у виробничих умовах показали позитивні результати і доцільність застосування методу на основі ПЛР для еколого-гельмінтологічних обстежень, що може забезпечити надійне прогнозування змін паразитологічної ситуації на урбанізованих територіях та своєчасну профілактику паразитарного забруднення.

Результати проведеного дослідження дозволяють визначити переваги застосування методу ПЛР для контролю еколого-паразитологічної ситуації, серед яких слід відзначити його високу ефективність, суттєву економію часу для постановки реакції (8 год проти 30–35 год), можливість одночасного дослідження мінімум 36-и проб різного біологічного походження (продукти харчування, ґрунт, трава, вода, екскременти тощо) та здатність ідентифікувати ДНК нематод ряду *Ascaridida* в присутності мільйонів інших. Здатність розроблених праймерів ідентифікувати гельмінта свині (*A. suum*) дозволяє говорити про їх універсальність та широку можливість застосування методу, наприклад, для проведення еколого-паразитологічного обстеження продуктів харчування рослинного походження, при виробництві яких часто використовують

незезараженні стоки від сільськогосподарських тварин, в тому числі і свиней. Крім того, впровадження в практику ПЛР-методів індикації збудників паразитозів дозволить частково вирішити проблему дефіциту кадрів паразитологічної ланки за рахунок універсальності підходів та автоматизації процесу дослідження.

Висновки

Розроблений метод детекції та ідентифікації зоогельмінтів з ряду *Ascaridida* може бути ефективно застосований для моніторингу забруднення компонентів довкілля їх пропативними стадіями та діагностики нематодозу.

Результати проведених досліджень дозволили теоретично розрахувати і практично оптимізувати умови роботи синтетичних олігонуклеотидних праймерів для ідентифікації генетичного матеріалу нематод (*T. leonina*, *T. canis* і *T. cati*). Доведено високий рівень специфічності, чутливості та відтворюваності розроблених праймерів.

Порівняльний аналіз традиційних еколого-паразитологічних методів і полімеразної ланцюгової реакції на лабораторних моделях та у виробничих умовах показав вищу (на 10,4%) рентабельність застосування полімеразної ланцюгової реакції для виявлення паразитарного забруднення різних об'єктів довкілля.

1. Актуальність вивчення не властивих людині інвазій : матеріали наук.–практ. конф. і пленуму Асоціації інфекціоністів України, (Тернопіль, 25 травня 2007 р.) / Тернопіль : Укрмеднига, 2007. — С. 159–160.
2. Баранов В. С. Молекулярная медицина : молекулярная диагностика, превентивная медицина и генная терапия / В. С. Баранов // Молекулярная биология. — 2000. — № 4. — С. 684–695.
3. Бодня Е.И. Проблема паразитарных болезней в современных условиях / Е.И. Бодня // Сучасні інфекції. — 2009. — № 1. — С. 4–11.
4. Гасасова Т.А. Токсокароз: распространение и влияние на репродуктивное здоровье / Т.А. Гасасова // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2003. - № 4. - С. 11–15.
5. Захачук О.І. Епідеміологічна небезпека паразитарного забруднення токсосоарами на Буковині / О.І. Захачук // Клінічна та експериментальна паразитологія. - 2010. - Т. IX, № 2 (32). - С. 141–145.
6. Пішак В.П. Лабораторна діагностика паразитарних інвазій : [підруч. для студ. вищ. навч. мед. закл.] / Пішак В.П., Булик Р.Є., Захарчук О.І. — Чернівці: Медуніверситет, 2007. — 284 с.
7. Пояганов Г.Б. Экологические, экономические и биоэтические проблемы регулирования численности

- безнадзорных животных в мегаполисах / Г.Б. Пояганов // Ветеринарная патология. — 2006. — № 2. — С. 7–12.
8. Пути улучшения качества лабораторной диагностики гельминтозов / Д.А. Долбин, Л.Р. Смирнова, Е.В. Агафонова [и др.] // Казанский медицинский журнал. — 2007. — Т. 88, № 4. — С. 398–401.
9. Туйнов В.А. Токсокароз и дирофиляриоз – реальные паразитарные болезни в действующих городских очагах / В.А. Туйнов, Е.А. Челабина // Сучасні інфекції. – К. 2010. – №3. – С. 81-86.
10. Черепанов А.А. Профилактика социально опасных болезней в системе экологических мероприятий / А.А. Черепанов, Н.Л. Новиков // Труды Всерос. ин-та гельминтологии. — 2003. — Т. 39. — С. 268–287.
11. Borecka A. Modification of DNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with *Toxocara* spp. eggs / A. Borecka, J. Gawor // J. Helminthol. — 2007. — № 6. — P. 1–4.
12. PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats / M.W. Li, R.Q. Lin, H. H. Chen [et al.] // Mol. Cell. Probes. — 2007. — № 21. — P. 349–354.
13. The complete mitochondrial genomes for three *Toxocara* species of human and animal health significance / M.W. Li, R.Q. Lin, H.Q. Song [et al.] // BMC Genomics. — 2008. — Vol. 16. — P. 224.

Отримано: 11 червня 2012 р.

Прийнято до друку: 12 листопада 2012 р.