

## **Екологія**

УДК: 619:616.995.132-085:636.2

### **Порівняльна ефективність методів еколого-паразитологічних досліджень продуктів харчування**

**Н. Волошина**

*Національний педагогічний університет імені М.П. Драгоманова*

*вул. Пирогова, 9, Київ 01601, Україна*

*E-mail: VoloshynaN@rabler.ru*

У статті викладені результати досліджень харчових продуктів рослинного походження з метою встановлення факту їх контамінації зоонозними збудниками паразитарних хвороб класичним еколого-паразитологічним методом та з використанням полімеразної ланцюгової реакції.

*Ключові слова:* полімеразна ланцюгова реакція, гельмінти, продукти харчування.

З'ясуванню ролі харчових продуктів в розповсюдженні гельмінтозів серед населення приділяється мало уваги, як з боку практиків, так і науковців. Переважна більшість дослідників, які займалися з'ясуванням питань епідеміології гельмінтозів, важливу роль в поширенні паразитів серед людей відводять ґрунту, овочам, фруктам, ягодам і, частково, воді. Поряд з цим, значна кількість продуктів харчування та кормів для тварин, завдяки своєму хімічному складу і способам зберігання, є сприятливим середовищем для виживання, зберігання, розвитку та поширення більшості геогельмінтів [3].

До організму людини збудники інвазійних хвороб, в тому числі зоонозів, потрапляють аліментарним шляхом. Контамінація сировини чи продуктів харчування яйцями або личинками гельмінтів відбувається через персонал, що працює на тваринницьких фермах, у сфері переробки, транспортування, розфасовки та збуту продукції [2].

Результати еколого-паразитологічного (санітарно-паразитологічного) обстеження продуктів харчування, проведені у різних країнах, підтверджують їх значущість, як фактора передачі зоопаразитів. Високу ступінь контамінації харчових продуктів рослинного походження яйцями і личинками паразитів тварин реєструють у країнах Африки, Азії та Південної Америки [5, 8].

В різних регіонах України реєструються факти обсіменіння зародками паразитів овочів, фруктів, їстівної зелені та ягід, що реалізуються у роздрібній торгівлі у 1,5–29 % випадків [4, 7].

Пропагативні стадії паразитів переважно локалізуються на поверхні продуктів харчування, особливо тих, які контактують із ґрунтом або з людьми під час збору, фасування і продажу врожаю. Тому вилучення яєць та личинок гельмінтів здійснюють шляхом змиву з поверхні харчових продуктів або їх замочування у воді, з подальшою мікроскопією осаду. Ефективність традиційних еколого-паразитологічних методів сягає близько 70–80% [6].

Широке застосування в діагностиці інфекційних та інвазійних хвороб і виявлені їх збудників в об'єктах довкілля знайшли молекулярно-генетичні методи, зокрема - полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [1].

Метою нашого дослідження було порівняти ефективність виявлення яєць та личинок паразитів у змивах із поверхні овочів, фруктів і харчової зелені традиційним еколого-паразитологічним методом та методом на основі ПЛР.

**Матеріали та методи.** Експериментальна частина роботи і виробнича перевірка результатів досліджень виконана в лабораторіях ветеринарної медицини військової частини А 3466 (центр ветеринарного забезпечення Збройних Сил України) та молекулярної біології Інституту ветеринарної медицини УААН.

Модифікацію об'єктів дослідження здійснювали наступним чином. Фекальну культуру яєць нематод отримували, відмиваючи яйця *A. suum* із екскрементів спонтанно інвазованих свиней. При цьому використовували флотаційно-центрифужний метод.

Овочі, фрукти і зелень штучно контамінували яйцями аскариди та залишали на 48–72 год.

Кожний вид дослідного матеріалу ділили на дві частини. Одна з них слугувала контролем (її обстежували стандартним методом), а іншу (дослідну) – методом ПЛР.

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

Екстракцію нуклеїнових кислот проводили, використовуючи набір реагентів для виділення ДНК «ДНК-сорб-В». Отриману чисту ДНК об'ємом 0,003–0,005 см<sup>3</sup> використовували для ампліфікації.

Оптимальним виявився склад ампліфікаційної суміші об'ємом 0,025 см<sup>3</sup>, що вміщує: ПЛР-буфера – 0,012 см<sup>3</sup>, dNTP – 0,004 см<sup>3</sup>, праймерів АТ 1 і АТ 2 – по 0,0025 см<sup>3</sup> та очищену ДНК – 0,004 см<sup>3</sup>. У кожную пробу нашаровували 0,03 см<sup>3</sup> мінерального масла.

Ампліфікацію проводили за допомогою чотириканального ампліфікатора «Терцик» НВФ «ДНК-Технологія». Режим ампліфікації включав 35 циклів, кожний з яких складався з денатурації ДНК при 95°C – 30 секунд, відпалу праймерів при 53°C – 1 хвилина, синтезу компліментарних ланцюгів при 72°C – 1 хвилина.

Детекцію продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофореза в 2%-у агарозному гелі. Результати електрофорезу оцінювали при перегляді гелю на УФ-трансліюмінаторі.

**Результати та їх обговорення.** Нами розроблені праймери, які є специфічними для зв'язування із ділянками матричної ДНК найбільш поширених зоонозних гельмінтів з ряду *Ascaridida*: *Ascaris suum* (Goeze, 1782) – нематода свиней; *Toxocara canis* (Werner, 1782), *Toxocara cati* (Schrank, 1788) і *Toxascaris leonina* (von Linstow, 1902) – паразити домашніх хижаків. Оптимізовано ПЛР-протокол та практично перевірена їх специфічність, чутливість і відтворюваність.

Методи екстракції ДНК при підготовці матеріалу до ампліфікації у переважній більшості універсальні. Як правило, використовують один і той же варіант для будь-яких зразків, незалежно від виду збудників та складу і походження субстрату, у якому вони знаходяться. Такий підхід є некоректним, оскільки локалізація збудників та (можливо) вміст у них інгібіторів можуть значно відрізнятися.

Тому, нами запропонований модифікований метод пробопідготовки для проведення ПЛР, який включає виявлення збудників паразитарних хвороб тварин у змивах із продукції рослинного походження.

Підготовка проби для екстракції нуклеїнових кислот аскаридід полягала у наступному. В чисті широкогорлі скляні банки або емальовані чи пластикові ємкості (каструлі, миски, кювети) закладали по 5–10 плодів чи 0,3–0,5 кг зелені. Їх заливали 1,5–2,0 л води (з таким розрахунком, щоб досліджуваний матеріал був повністю занурений у воду) і залишали на 2 години.

Протягом цього часу заповнену ємність періодично струшували вручну або на апаратах для струшування (шейкерах) упродовж 5–10 хв.

Через 2 години плоди обмивали щітками або пензликами (залежно від розміру об'єкту і його поверхні). Плоди та овочі з шорсткою поверхнею обмивали особливо ретельно. Їстівну зелень прополіскували.

Потім обстежувані плоди, овочі, ягоди та зелень видаляли з води. Промивну воду відстоювали 60 хв.

Надосадову рідину обережно зливали, переносили у центрифужні пробірки і центрифугували. Осад, отриманий в результаті центрифугування надосадової рідини, та

осад, що залишився на дні ємності після відстоювання, змішували. Від загального об'єму відбирали 1 см<sup>3</sup> дослідного матеріалу і зливали у пластикову пробірку ємністю 1,5 см<sup>3</sup>. Отриманий матеріал слугував для виділення нуклеїнових кислот.

Позитивним аспектом у запропонованому способі є те, що ми не використовували хімічні миючі засоби, оскільки при подальшому дослідженні методом ПЛР вони могли виступати в якості інгібіторів.

Візуалізація отриманих результатів показала наявність смужок жовтогарячого кольору на рівні позитивного контролю у 100% випадків. При застосуванні традиційних методик (мікроскопія змивів із контрольних зразків продукції) реєстрували позитивний результат лише у 67% випадків. Тобто, ефективність виявлення ДНК збудника паразита на поверхні продуктів рослинного походження і харчової зелені методом ПЛР виявилась на 33% вищою у порівнянні зі стандартним методом.

Дану методику було застосовано при порівнянні методів еколого-паразитологічного обстеження продуктів харчування у виробничих умовах. Для дослідів відібрали по 1 кг харчових продуктів, які реалізуються у супермаркетах і агропродовольчих ринках м. Києва. Після попередньої підготовки було отримано 30 проб змивів із коренеплодів, томатів, їстівної зелені, цитрусових, полуниці та яблук. Частина змивів була досліджена стандартним методом, а інша – ПЛР.

Змиви із дослідних зразків використовували для виділення нуклеїнових кислот з подальшою їх ампліфікацією і електрофоретичною детекцією продуктів ампліфікації.

Із 30-и обстежених стандартними методами зразків, у п'яти (16,67%) виявили незначну кількість яєць токсокар та аскарид. При застосуванні методу ПЛР були отримані повніші результати (23,33%) за рахунок двох зразків, у яких наявність паразитів не була підтверджена стандартним методом - мікроскопією осаду (таблиця).

Результати порівняння класичного еколого-паразитологічного методу і методу ПЛР на прикладі обстеження 30-и зразків змивів із поверхні харчових продуктів свідчать про вищу чутливість та ефективність методу ПЛР.

Застосування ПЛР має не лише переваги, а й недоліки. До недоліків слід віднести високу собівартість досліджень, а до переваг – достовірність, можливість одночасного обстеження різних видів продуктів та відчутне заощадження часу на дослідженнях.

Зокрема, постановка проби традиційним методом потребує замочування овочів, фруктів і їстівної зелені у воді протягом 16–24 год., з подальшим фільтруванням та іншими маніпуляціями, що передують мікроскопії осаду. Загалом ці дослідження тривають 30–35 год. ПЛР дозволяє отримати більш точний результат протягом восьми годин.

Водночас є можливість одночасного дослідження не однієї, а мінімум 36 проб, різного біологічного походження (продукти харчування, ґрунт, трава, вода, екскременти тощо).

Таблиця

**Результати еколого-паразитологічних досліджень  
продуктів харчування стандартним методом та ПЛР**

№ проби	Вид матеріалу	Результати стандартного методу	Результати ПЛР	№ проби	Вид дослідного матеріалу	Результати Стандартного методу	Результати ПЛР
1	Картопля	–	–	16	Цитруси	–	–
2	Картопля	–	–	17	Цитруси	+	+
3	Картопля	+	+	18	Цитруси	–	–
4	Картопля	–	–	19	Цитруси	–	–
5	Картопля	–	–	20	Цитруси	–	–
6	Томати	–	–	21	Полуниця	+	+
7	Томати	–	–	22	Полуниця	+	+
8	Томати	–	–	23	Полуниця	–	–
9	Томати	–	–	24	Полуниця	–	+
10	Томати	–	–	25	Полуниця	–	–
11	Зелень	–	+	26	Яблука	–	–
12	Зелень	–	–	27	Яблука	–	–
13	Зелень	–	–	28	Яблука	–	–
14	Зелень	+	+	29	Яблука	–	–
15	Зелень	–	–	30	Яблука	–	–

Примітка: «+» – паразити виявлені; «—» – паразити не виявлені

Таким чином, порівняння ефективності еколого-паразитологічних досліджень продуктів харчування рослинного походження традиційним методом і методом ПЛР показало переваги останнього. Високий відсоток достовірності ПЛР, що перевищує існуючі аналоги (до 33%), обумовлений його специфічністю та чутливістю, що дозволяє виявляти ДНК інвазійного збудника у дослідному зразку при наявності мінімальної кількості матричної ДНК, а також здатність ідентифікувати генетичний матеріал нематод з ряду *Ascaridida* в присутності ДНК інших організмів.

**Напрями подальших досліджень.** Перспективним є використання у практиці лабораторних досліджень діагностичних методів на основі полімеразної ланцюгової реакції для виявлення яєць паразитичних нематод у доквіллі. Запропонований метод може забезпечити надійне прогнозування змін паразитологічної ситуації на урбанізованих територія і своєчасну профілактику паразитарного забруднення, компонентом якого найчастіше є угруповання соціально небезпечних зоогельмінтів з ряду *Ascaridida*. Крім того, впровадження в практику ПЛР-методів індикації збудників паразитозів дозволяє частково вирішити проблему дефіциту кадрів паразитологічної ланки за рахунок універсальності підходів і автоматизації процесу досліджень.

---

1. Баранов В. С. Молекулярная медицина : молекулярная диагностика, превентивная медицина и генная терапия / В. С. Баранов // Молекулярная биология. — 2000. — № 4. — С. 684–695.

2. Волошина Н. О., Галат В. Ф. Забезпечення ветеринарного санітарно-паразитологічного контролю у відповідності до сучасних міжнародних вимог // Клінічна та експериментальна патологія, 2007. – Т. VI, №4. – С. 94–96.

3. Волошина Н. О. Ветеринарно-санітарна паразитологія: завдання та перспективи / Н. О. Волошина, Д. А. Засєкін // Науковий вісник НАУ, Київ, 2006. – №98. – С.70–73.

4. Гельмінтози на Буковині. Клімато-географічна залежність розповсюдження / В. П. Пішак, О. І. Захарчук, О. В. Світличний [та ін.] // Клінічна та експериментальна патологія. — 2007. — Т. VI, № 4. — С. 74–91.

5. Мирзоева Р. К. Роль растительной продукции в передаче возбудителей гельминтозов в Республике Таджикистан / Р. К. Мирзоева // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 2007. — № 1. — С. 28–30.

6. Романенко Н. А. Санитарная паразитология : руководство для врачей / Романенко Н. А., Падченко И. К., Чебышев Н. В. – М.: Медицина, 2000. – 342 с.

7. Санитарно-паразитологический мониторинг в Приднепровье : тр. V респуб. науч.-практ. конф. [Достижения и перспективы развития современной паразитологии], (Витебск, 15–18 сентября 2006 г.) // УО «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины». — Витебск, 2006. — 365 с.

8. Amoah P. Pesticide and pathogen contamination of vegetables in Ghana's urban markets / P. Amoah, P. Drechsel, R. C. Abaidoo [et al.] // Arch. Environ Contam. Toxicol. — 2006. — Vol. 50 (1). — P. 1–6.

## **COMPARATIVE EFFICIENCY OF METHODS OF ECOLOGY-PARAZITOLOGY IN FOODSTUFFS**

**N. Voloshyna**

*National Pedagogical Dragomanov University*

*st. Pirogova, 9, Kiev 01601, Ukraine*

In the article the results of researches of food of plant origin with the purpose of exposure of their contaminated stuffs are expounded by the exciters of parasitosis of animals classic methods and method polymerase chain reaction.

*Key words:* polymerase chain reaction, vermin, food.

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДОВ ЭКОЛОГО- ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ**

**Н. Волошина**

*Национальный педагогический университет имени М.П. Драгоманова*

*ул. Пирогова, 9, Киев 01601, Украина*

В статье изложены результаты исследований продуктов питания растительного происхождения с целью выявления факта их контаминации зоонозными возбудителями паразитарных заболеваний с использованием классического эколого-пазитологического метода и полимеразной цепной реакции.

*Ключевые слова:* полимеразная цепная реакция, гельминты,  
пищевые продукты.