

Warszawa, 15.11.2019r.

Dofinansowano ze środków funduszu leśnego przekazanych przez Lasy Państwowe



Raport końcowy z realizacji badania naukowego

„Określenie występowania niebezpiecznych dla ludzi pasożytów jelitowych u dzikich psowatych na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego”.

Umowa na wykonanie pracy naukowo-badawczej Nr ZP/454/2019 zawarta pomiędzy Tatrzańskim Parkiem Narodowym, a Instytutem Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN. Okres realizacji projektu: 03.08.2019-15.11.2019.

Wykonawcy:

dr hab. Jakub Gawor

dr hab. Zdzisław Laskowski

dr Anna Myczka

dr Witold Jeżewski

Badania prowadzono w ramach następujących zadań:

- Określenie występowania u lisów (*Vulpes vulpes*) i wilków (*Canis lupus*) niebezpiecznych dla ludzi tasiemców z rodzaju *Echinococcus*
- Lisy i wilki jako żywicieli pasożytniczych nicieni o potencjalnie zoonotycznym (*Toxocara canis*)

Materiał badawczy stanowiły próbki kału wymienionych drapieżników powierzone przez TPN. Było to ogółem 110 próbek, w tym 91 próbek od lisów oraz 19 próbek od wilków.

Przeprowadzone badania laboratoryjne polegały na analizach mikroskopowych i genetycznych (badania molekularne PCR).

Badania przeprowadzono według założonego planu z wykonaniem następujących czynności i metod przy wykorzystaniu własnego specjalistycznego sprzętu technicznego:

- Wykrycie form dyspersyjnych (jaj) tasiemców i nicieni metodami flotacji oraz sedymentacji
- Izolacja jaj pasożytów metodą mikromanipulacji mikroskopowej w celu identyfikacji morfologicznej oraz do badań molekularnych
- Izolacja pasożytniczego DNA bezpośrednio z próbek kału (z zastosowaniem komercyjnych zestawów) do badań molekularnych (PCR)
- Badania molekularne (PCR) materiału pasożytniczego
- Sekwencjonowanie markerów jądrowego i mitochondrialnego DNA

Przed rozpoczęciem badań próbki kału poddano głębokiemu mrożeniu (-80°C) w ciągu 14 dni w celu zlikwidowania zdolności inwazyjnej jaj pasożytów, przede wszystkim tasiemców z rodzaju *Echinococcus*.

Badania flotacyjne - wykrycie form dyspersyjnych (jaj) pasożytów

Badania flotacyjne prowadzono z zastosowaniem dwóch roztworów o gęstości 1,2 g/cm³ (nasycony roztwór NaCl) i 1,34 (nasyc. roztwór NaCl i nasyc. roztwór sacharozy), co umożliwiło uzyskanie maksymalnej wykrywalności jaj tasiemców i nicieni. Miało to duże znaczenie z uwagi na trudności izolowania jaj pasożytów z próbek kału drapieżników zawierających fragmenty kostne i sierść ofiar.

Technika sedymentacji służyła izolacji jaj pozyskiwanych we flotacji na szkiełkach przedmiotowych do identyfikacji mikroskopowej oraz do badań molekularnych. Pozyskano w ten sposób jaja wymienionych poniżej grup/gatunków pasożytów.

Wyniki:

Badania flotacyjne próbek od lisów wykazały występowanie tasiemców z rodziny Taeniidae w prewalencji 12,1% oraz nicieni: włosogłówki *Trichuris vulpis* (69,2%), tęgoryjców *Uncinaria stenocephala* (12,1%) i nicienia układu oddechowego *Capillaria aerophila* (1,1%).

W próbkach pochodzących od wilków stwierdzono występowanie jaj tasiemców z rodziny Taeniidae w ekstensywności 10,5% oraz włosogłówki *Trichuris vulpis* (5,3%).

Oceniono liczbę stwierdzonych jaj pasożytów, wśród których najliczniejsze były jaja *Trichuris vulpis* u lisów (w zakresie 1-212 w 1g kału). Taeniidae stwierdzono u lisów i wilków w liczbie 1-50/1g. W przypadkach pozostałych pasożytów stwierdzano w próbkach pojedyncze jaja.

Jaja tasiemców z rodziny Tenidae są nierozróżnialne pod względem morfologicznym. Do tej grupy zalicza się niebezpiecznego dla ludzi bąblowca wielojamowego *Echinococcus multilocularis* (pasożyt lisów, potencjalnie psów) oraz tasiemca bąblowcowego *E. granulosus* (pasożyt wilków i psów). Każdy przypadek stwierdzenia jaj Taeniidae w próbkach kału psowatych wskazuje na potencjalne zagrożenie dla ludzi, dlatego istotne jest określenie przynależności gatunkowej jaj metodami genetycznymi (molekularnymi).

Analiza molekularna (PCR)

Zgodnie z założeniami projektu zaprojektowano i przebadano zestaw metod/testów molekularnych do wykrywania potencjalnie niebezpiecznych dla ludzi (*Echinococcus multilocularis* i *Toxocara canis*) i zwierząt (*Trichuris vulpis*) pasożytów lisów i wilków. Zastosowano komercyjny zestaw do izolacji DNA z kału firmy EUREX. Dla wszystkich przewidzianych do badań gatunków zostały zaprojektowane i przetestowane startery reakcji PCR pozwalające amplifikować fragmenty genów (cox1mtDNA) kodujących 1 podjednostkę cytochromu C (cox1). Do badań czułości i specyficzności testów pozyskano jaja pasożytów: *Toxocara canis*, *Trichuris vulpis* z kału psów oraz okazy *Echinococcus multilocularis* pochodzące z kolekcji Instytutu Parazytologii PAN. Materiał do badań został wstępnie oznaczony na podstawie cech morfologicznych, a następnie uzyskany z nich DNA został użyty do amplifikacji i sekwencjonowania uzyskanych sekwencji. Uzyskane w testach fragmenty cox1 helmintów po sekwencjonowaniu pozwalają na potwierdzenie gatunku pasożyta.

IZOLACJA DNA

Do wykonania izolacji DNA wykorzystano komercyjne zestawy do izolacji DNA z kału/gleby: Stool DNA Purification Kit – EURx.

Podstawową zasadą działania kitów do izolacji DNA z kału jest zastosowanie materiału „ściernego” w postaci szklanych kulek do rozbicia występujących w badanym materiale form rozwojowych pasożytów: jaj i/lub cyst.

Testy wykazały konieczność wstępnego nawilżenia badanego materiału. Bezpośrednie użycie wysuszonych próbek kału powoduje powstanie zbitych brył substancji co uniemożliwia przeprowadzenie mechanicznego rozbijania materiału (5-10 min worteksowania=wytrząsania). Wstępne nawilżenie wysuszonych próbek w sterylnych „szkiełkach zegarkowych” przez około 5 min jest wystarczający do przygotowania badanej próbki do izolacji DNA. Do każdej izolacji używano 0,2g kału (zgodnie z zaleceniami producenta)

OPRACOWANIE TESTÓW DIAGNOSTYCZNYCH

Startery reakcji testu PCR do wykrywania DNA *Taenia solium*, *T. saginata* oraz *Echinococcus multilocularis*, *E. granulosus*, *Trichuris vulpis* i *Toxocara canis* zostały opracowane na podstawie analizy sekwencji genów kodujących I podjednostkę oksydazy cytochromu c (cox1). Do analizy sekwencji i projektowania starterów reakcji wykorzystano sekwencje *Echinococcus multilocularis* mitochondrial cox1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1 (GenBank: AB461413.1), KX020396 *Echinococcus granulosus* haplotype EgA76 cytochrome c oxidase subunit 1(GenBank: KX020396), *Trichuris vulpis* mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit 1, isolate *Canis lupus familiaris*, clone 4 (GenBank:HE653138.1) i *Toxocara canis* mitochondrial genome, complete sequence (GenBank: AM411108).

Startery reakcji PCR:

Echinococcus multilocularis i *Echinococcus granulosus*

EmrF590, Egr1027 i EmR1066

dla

E. multilocularis product = 475 bp

E. granulosus product =435 bp

Trichuris vulpis

TrvF700 i TrvR1070 , product = 370 bp

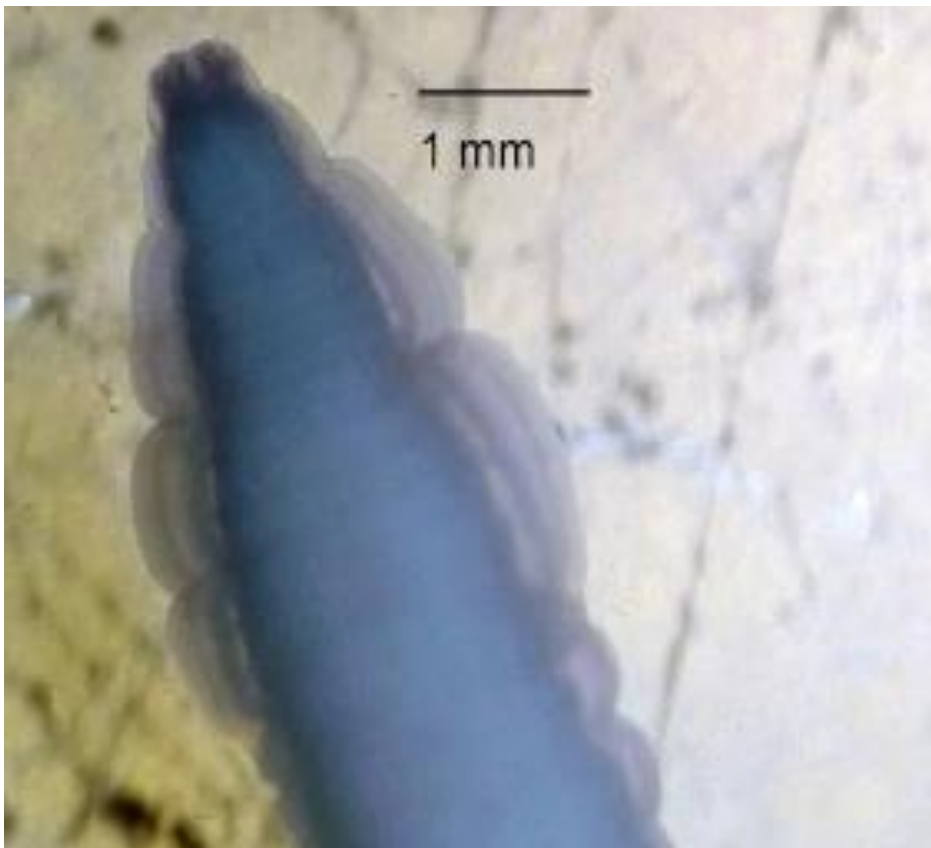
ANALIZA UZYSKANYCH WYNIKÓW

1. Przesuszone próbki kału można poddać procedurze izolacji DNA dopiero po

wcześniejszym przygotowaniu. Krótkie nawilżanie umożliwia przeprowadzenie procedury izolacji DNA.

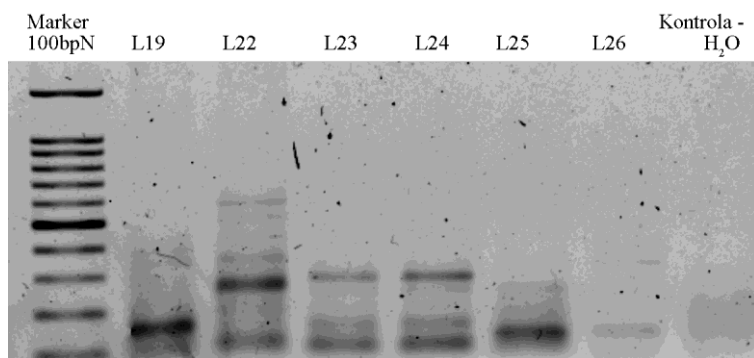
2. DNA z kału (resztki pokarmowe) nie reaguje (brak produktów PCR) z żadną z badanych par starterów reakcji i nie inhibuje reakcji PCR.

Do badań czułości i specyficzności testów pozyskano materiał (jaja *Toxocara canis* i *Trichuris vulpis* z kału psa, dorosłe osobniki *Toxocara canis* i *Echinococcus multilocularis* od lisów), który został wstępnie oznaczony na podstawie cech morfologicznych, a następnie uzyskany z nich DNA został użyty do amplifikacji i sekwencjonowania uzyskanych sekwencji.

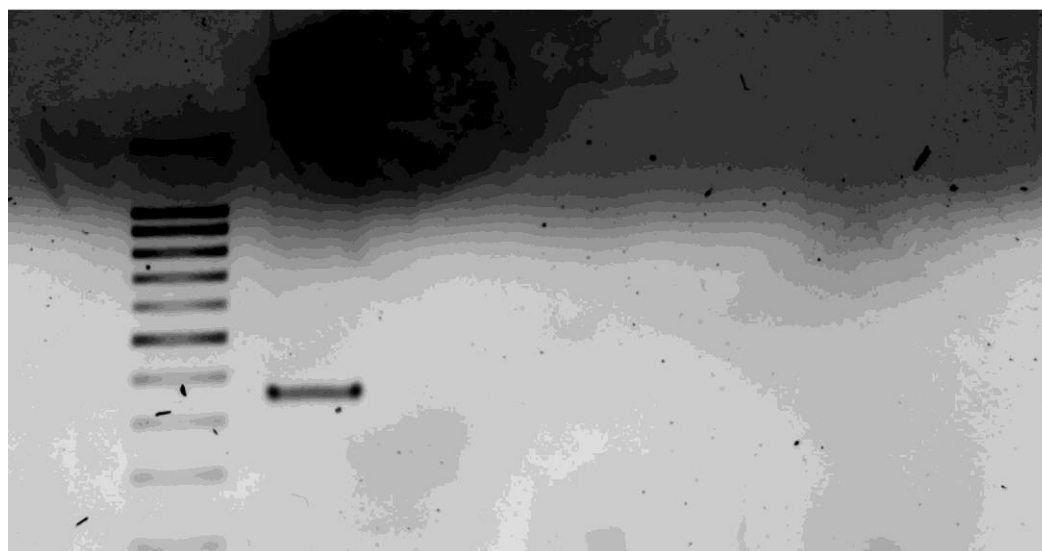
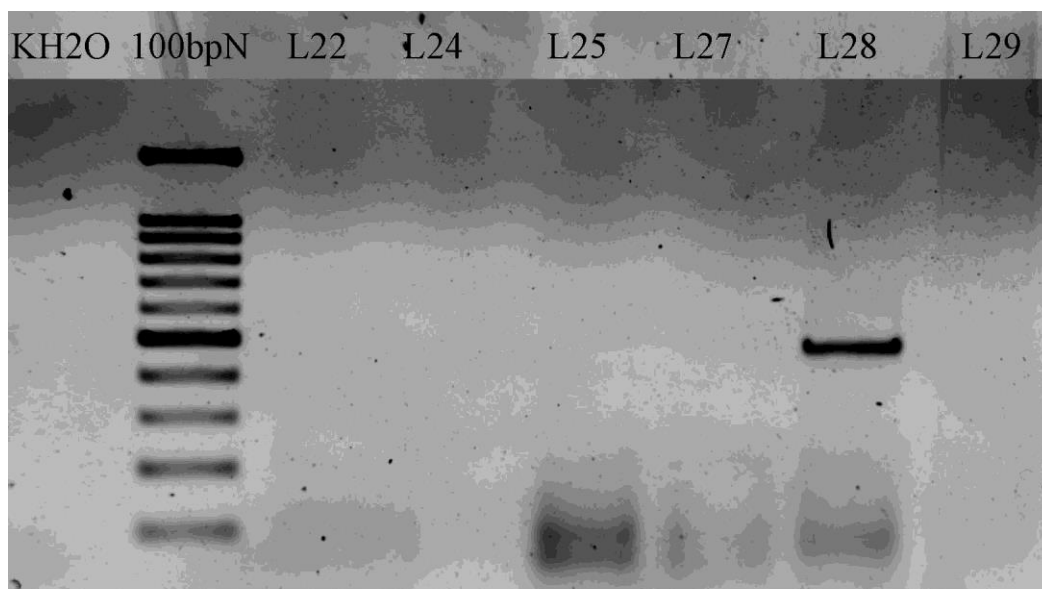


Toxocara canis z jelita lisa (*Vulpes vulpes*)

Przetestowano wszystkie zaprojektowane startery. W „zestawie” *Echinococcus* występuje reakcja z innymi gatunkami tasiemców (Taeniidae) objawiająca się powstaniem drabinki produktów reakcji PCR (bez właściwego 475 lub 435 bp).



Zdjęcie z wyników testu „*Echinococcus*”



Zdjęcie górne: test „*Echinococcus*” . Reakcja PCR przeprowadzona w bardziej restrykcyjnych warunkach (zwiększenie specyficzności testu), zdjęcie dolne: test „*Trichuris*”

W przebadanych próbach od wilków potwierdzono jedynie 3 przypadki zarażenia *Trichuris vulpis*. Nie potwierdzono zarażenia *Echinococcus multilocularis*/*E. granulosus* oraz *Toxocara canis*. Zaobserwowane niespecyficzne drabinki w kilku próbkach sugerują obecność w odchodach jaj innych tasiemców (Taeniidae).

W przypadku lisów obecność *Echinococcus multilocularis* potwierdzono w 2 próbkach:

- 1- (28.03.19) Jaworzynka
- 2- (4.04.19) szlak na Polanę Uptaz

Potwierdzono również 6 przypadków zarażenia *Trichuris vulpis*.

U lisów oraz wilków nie stwierdzono występowania nicienia *Toxocara canis*.

Przeprowadzone badania są bardzo istotne z epidemiologicznego punktu widzenia, tj. potencjalnego zagrożenia ludzi pasożytami odzwierzęcymi. Badania przeprowadzono na obszarze, z którego brak było jakichkolwiek danych o występowaniu najbardziej niebezpiecznych dla ludzi pasożytów, tj. tasiemców z rodzaju *Echinococcus*.

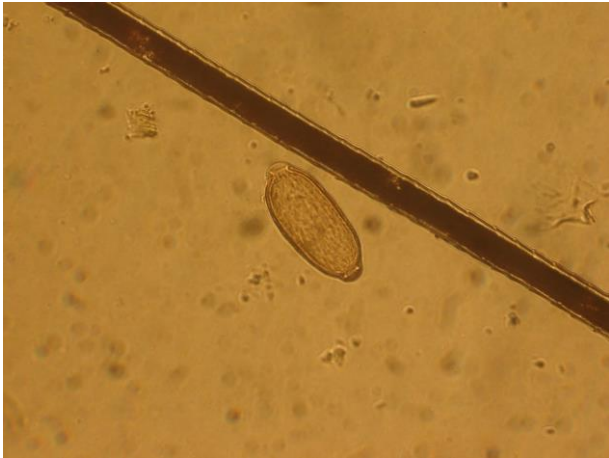
Na obecnym etapie przygotowywane są materiały do publikacji naukowej.

Raport przygotowali: dr hab. Jakub Gawor i dr hab. Zbigniew Laskowski

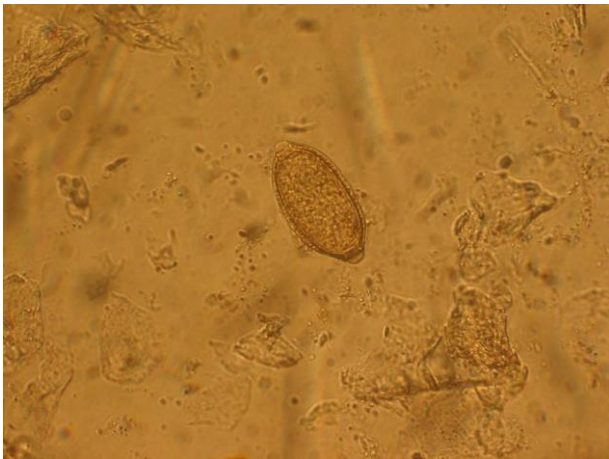
Odpowiedzialny za badania
dr hab. Jakub Gawor



Fotografie jaj pasożytów wyizolowanych z próbek kału od lisów i wilków



Jajo nicienia płucnego *Capillaria aerophila* z kału lisa



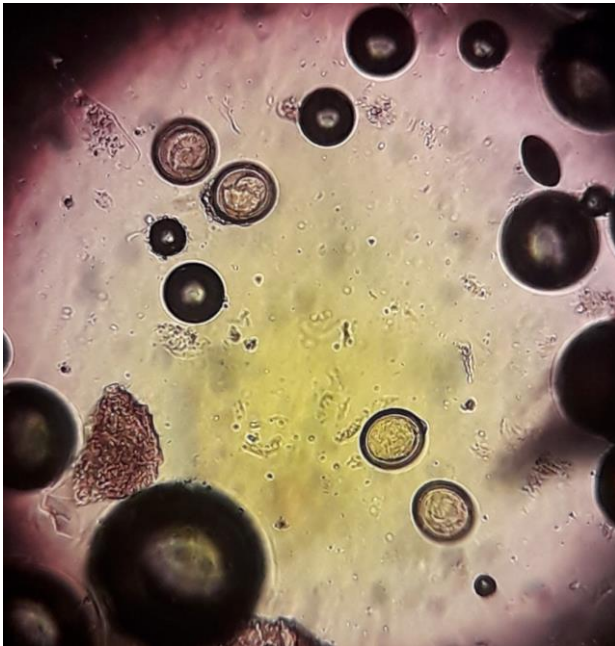
Jajo nicienia - włosogłówki (*Trichuris vulpis*) z kału lisa



Inwazja u lisa - jaja włosogłówki (*Trichuris vulpis*) i Taeniidae (pęcherzyk powietrza wewnątrz jaj).



Jajo Taeniidae z kału lisa - widoczne wewnątrz zawiązki haków. Drugie jajo z pęcherzykiem powietrza.



Jaja Taeniidae z kału wilka - widoczna zniszczona struktura wewnętrzna jaj. W takich przypadkach badania molekularne mogą dawać wynik ujemny - uszkodzenie DNA pasożyta.