

Keskkonnateabe Keskus

MTÜ Naturalia

Ehhinokoosi tekitajate *Echinococcus granulosus* ja *E. multilocularis* esinemine rebase, hundi ja kährikkoera populatsioonides Eestis

Lõpparuanne

Töö teostaja: MTÜ Naturalia

Reg. kood 80155975

Vanemuise 46, 51014 Tartu

Leping 3-3/61 (10.08.2010)

Tartu 2011

Uuring on finantseeritud SA Keskkonnainvesteeringute Keskuse poolt

Sisukord

1. Sissejuhatus.....	3
1.1. Eestis esinevad ehhinokokiliigid	3
1.2. Ülevaade peamistest ehhinokokkide ja nende lõpp-peremeeste identifitseerimis- meetoditest	4
1.2.1. Loputus- ja soolekaapemeetod.....	4
1.2.2. Flotatsioonimeetod.....	4
1.2.3. Uuemad meetodid	5
1.2.3.1 CA-ELISA	5
1.2.3.2 Kopro-PCR	5
1.3 Lõpp-peremehe identifitseerimine	5
1.4 Millist meetodit rakendada?.....	6
1.5 Rakendusuuuringu eesmärk	6
1.6 Tegevused ja ajakava rakendusuuuringu teostamisel	6
2. Materjal ja metoodika	7
2.1. Roojaproovid.....	7
2.2. Roojaproovide flotatsioon.....	7
2.3. DNA eraldamine	7
2.4. DNA amplifitseerimine	7
2.5. Elektroforees	10
3. Tulemused.....	11
4. Arutelu	19
5. Kokkuvõte.....	21
Kasutatud kirjandus	22

1. Sissejuhatus

Seoses väga efektiivse marutaudivastase vaktsineerimisega on rebase ja kährikkoera arvukus jõudsalt tõusnud ning rebased on laiendanud oma elupaiku järjest enam inimasustuste lähistele, sh. linnadesse. Paraku kaasneb sellega inimeste ja koduloomade jaoks järjest kasvav oht nakatuda ehhinokokkoosi, mis on inimese jaoks sageli väga tüsilik ja isegi letaalne.

1.1. Eestis esinevad ehhinokokiliigid

Eestis on tuvastatud kaks liiki ehhinokokk-paelusse, nii põistang-paeluss (*Echinococcus granulosus*) kui alveokokk (*E. multilocularis*). Põistang-paelussi leidudest on teated alates 1950-ndatest, mil need tuvastati esmalt kodusigadelt (Lesinš 1955 artiklis Moks et al. 2008). Järgmine kord leti see parasiit aga alles 2004. aastal ühelt hundilt (Moks et al. 2006) ja hiljem ka põtradel – uuritud 2038-st loomast oli nakatunud 16 (0,8%) (Moks et al. 2008). Põistang-paelussi üldine levik metsloomade seas tundub olevat madal ning parasiidi genotüüpidest esineb siinsetel aladel nii G8 kui ka G10 (Moks et al. 2008). Alveokokk-paelussi esinemine siinsetel aladel tehti esmakordselt kindlaks 2003. aastal (Moks et al. 2005), aga erinevalt põistang-paelussist tundub alveokoki esinemissagedus tema põhiliselt peremehel, rebasel, üsna kõrge – kuigi analüüsitud rebaste arv polnud kuigi suur, selgus, et alveokokk-paelussi esines 29,4%-l uuritud rebastest (17-st rebasest 5-el). Viimastel andmetel võib ehhinokokke esineda ka metskitsedel (I. Jõgisalu, avaldamata andmed).

Lähiriikidest on ehhinokokke diagnoositud Läti, Leedu, Soome, Poola ja Rootsi metsloomadel. Venemaa kohta uuemad andmed puuduvad, kuid Venemaa Euroopa osas on levinud mõlemad parasiidi liigid (Bessonov 2002). Soomes pole küll alveokokk-paelussi siiani leitud, kuid sealsetel huntidel, põhjapõtradel ja põtradel esineb põistang-paelussi genotüüp G10 (Lavikainen et al. 2003). Läti huntidelt on leitud nii põistang- kui ka alveokokk-paelussi (Bagraade et al. 2009). Üle terve riigi kogutud Läti rebastest esines alveokokk-paeluss koguni 35,6%-l (Bagraade et al. 2008). Leedus läbiviidud uuringud näitasid, et sealsed maapiirkondade koerad on nakatunud nii alveokokk- kui ka põistang-paelussiga, viimase puhul oli tegemist genotüübiga G6/7 (Bružinskaite et al. 2009). Poolas on alveokokk-paelussi lõpp-peremeheks lisaks rebasele ka kährikkoer (Machnicka-Rowinska et al. 2002). Varasemalt on teada põistang-paelussi genotüübi G10 esinemine

Rootsis (Lavikainen et al. 2006), kuid alles hiljuti leiti sealt esmakordselt ka alveokokk-paeluss (Lind et al. 2011).

1.2. Ülevaade peamistest ehhinokokkide ja nende lõpp-peremeeste identifitseerimis-meetoditest

Ehchinokokkide identifitseerimismeetodid jagunevad kaheks: vanemad ehk klassikalised meetodid nagu loputusmeetod, soolekaapemeetod ja flotatsioonimeetod ning uuemad meetodid, mis põhinevad immunoloogilistel testidel ja polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) (Deplazes et al. 2003).

1.2.1. Loputus- ja soolekaapemeetod

Loputusmeetod (*sedimentation and counting technique*, SCT) põhineb lõpp-peremehe lahkamisel ja peensoole sisu uurimisel. Selleks lõigatakse peensool pikisuunas lahti, soole sisu pestakse füsioloogilise lahusega anumasse. Tahketel osakestel lastakse settida umbes 15 minutit ning seejärel valatakse vesi sette pealt ära. Seda korratakse kuni vesi sette peal jääb selgeks. Setet uuritakse mikroskoobi all (Eckert 2003).

Soolekaapemeetodi (*intestinal scrping technique*, IST) puhul lõigatakse peensool samuti pikisuunas lahti ning kasutades alusklaase, võetakse soole limaskestast vähemalt 15 kaabet. Alusklaasile kinnitunud materjal surutakse vastu Petri tassi põhja ja uuritakse mikroskoobi all.

SCT ja IST meetodite puuduseks on töömahukus. Teiseks suureks puuduseks nende meetodite puhul on see, et loomad peavad olema eelnevalt surmatud. Tänapäeval püüeldakse aga selles suunas, et võimalikult vähe uuritavaid loomi häirida ja kahjustada. Samas on IST ja SCT väga head meetodid intestinaalse nakkuse põhjustaja identifitseerimiseks morfoloogia alusel (Deplazes et al. 2004). Kuigi mitte-endeemsetel aladel, kus on vaja usaldusväärsete tulemuste saamiseks läbi uurida palju proove, ei tuleks nii suures hulgas loomade lahkamine kõne alla.

1.2.2. Flotatsioonimeetod

Flotatsioonimeetod võimaldab koproproovidest leida paelusside mune. Meetod seisneb kõrge erikaaluga flotatsioonivedeliku kasutamisel. Selleks segatakse roojaproov flotatsioonivedelikuga ning aja jooksul tõusevad madalama erikaaluga parasiidi munad vedeliku pinnale. Seejärel võetakse pindkilelt proov, mida uuritakse edasi mikroskoobi all.

Kuna sugukonna *Taeniidae* paelusside munad on üksteisest morfoloogiliselt eristamatud, ei suuda see meetod liike eristada.

1.2.3 Uuemad meetodid

1.2.3.1 CA-ELISA

CA-ELISA (*Coproantigen-Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ehk koproantigeenide immuunosorptsioonanalüüs on immunoloogiline test, mis põhineb parasiidi spetsiifiliste koproantigeenide detekteerimisel lõpp-peremehe roojas. Antigeenid on detekteeritavad alates viiendast päevast peale nakatumist (Deplazes et al. 1999). Kuna antigeenid võivad looduslikes tingimustes hoitud roojas säilida väga kaua, kuni 41 kuud (Thevenet et al. 2003), sobib see meetod ka vanemate proovide analüüsiks. CA-ELISA sobib kasutamiseks nii surnud kui ka elusatel loomadel, aga ka pinnaseproovidel. Enamasti on aga CA-ELISA üksnes perekonna ehhinokokk spetsiifiline ega suuda eristada liike (Deplazes et al. 2004).

1.2.3.2 Kopro-PCR

Kopro-DNA PCR on ainuke meetod, mis võimaldab eri liikidest paelusside mune üksteisest eristada. PCRi põhised meetodid sobivad samuti kasutamiseks nii surnud kui ka elusatel loomadel, aga ka pinnaseproovide analüüsil. Kopro-DNA PCR meetod on erinevalt CA-ELISast liigispetsiifiline. Puudusteks on meetodi töömahukus, PCRi inhibiitorite suur sisaldus proovis ning proovi väiksus (Deplazes et al. 2004). Hetkel pole selge, kas parimaks meetodiks oleks PCRi rakendamine ilma või koos flotatsioonimeetodiga ja käesolev uuring seda ka testib.

1.3 Lõpp-peremehe identifitseerimine

Lõpp-peremehe roojaproovi looduses suudab identifitseerida kogenud bioloog selle suurust, kuju, lõhna ja toidujäänuseid uurides. Kuid selline meetod ei ole sageli kuigi täpne. Davison et al. (2002), näitasid et uurijad eksisid oluliselt rebase ja metsnugise väljaheidete määramisel välistunnuste põhjal. Kindla vastuse võib saada kui kasutada peremehe spetsiifilisi praimereid PCRil roojaproovist. Meetod põhineb teadmisel, et defekatsioonil satub rooja pinnale ka peremehe sooleepiteeli rakke, millest on võimalik DNA eraldada ja amplifitseerida.

1.4 Millist meetodit rakendada?

Kõige efektiivsemaks ehinokokkpealusside leviku uurimismeetodiks oleks geneetiline analüüs peremeesorganismi väljaheidetest, mis võimaldaks koguda analüüsitavat materjali üle Eesti. Selline monitooring annaks väga hea ülevaate ehinokokkide esinemisest Eestis ja oleks odavam kui kütitud loomade kogumine ja nende siseorganite analüüs. Samas on ebaselge, kas otse väljaheidetest tehtav DNA analüüs on piisavalt tundlik, et registreerida kõik positiivsed proovid. Probleem seisneb selles, et DNA analüüsi saab võtta korraga vaid väikese osa väljaheidetest ja kui sinna parasiidi mune ei ole sattunud, siis saame valenegatiivse vastuse. Alternatiivvariant oleks kasutada kõigepealt flotatsioonimeetodit, et eraldada parasiitide munad ja alles seejärel eraldada munadest genoomne DNA ning tuvastada parasiidiliik PCRi abil.

1.5 Rakendusüüringu eesmärk

Komplekse meetodi väljatöötamine ulukkoerlaste ekskrementidest põistang-paelussi (*E. granulosus*) ja alveokoki (*E. multilocularis*) esinemise kindlakstegemiseks DNA analüüsiga. Selleks töötatada välja spetsiifiline geneetiline detektsioonisüsteem eraldi mõlemale parasiidile kui ka nende peremeesorganismidele nagu rebased, kährikkoerad ja hundid. Lõpptulemusena peaks valmima geneetiline test, mis võimaldaks eristada nii üksteisest kahte ehinokokiliiki kui ka kindlaks teha, millisest peremeesorganismist oli väljaheide koos parasiidimunadega pärit.

1.6 Tegevused ja ajakava rakendusüüringu teostamisel

Koerlaste (rebase, kährikkoera ja hundi) väljaheidete kogumine ja genoomse DNA eraldamine/puhastamine.

Sobivate liigispetsiifiliste markerite väljatöötamine ning nendel põhineva monitooringumetoodika väljaarendamine.

2. Materjal ja metoodika

2.1. Roojaproovid

Koguti 147 ulukkoerlaste väljaheiteproovi (77 rebase, 65 kährikkoera ja 5 hundi), mis säilitatati -80 kraadi juures vähemalt kolm ööpäeva ehhinokkide inaktiveerimiseks.

Alveokokk-paelussi positiivsete proovide tegemiseks vajalikud ussid saadi peremeesloomade lahangu käigus. Munade kättesaamiseks ussist purustati need mehaaniliselt.

2.2. Roojaproovide flotatsioon

Flotatsiooniks vajalikud roojaproovid saadi alveokokk-paelussi suhtes positiivsetelt rebastelt lahangul või tehti ise negatiivsele roojale mune juurde lisades. Floatsiooniks kaaluti 4 g roojaproovi, millele lisati umbes 50 ml vett ja segati. Segu valati läbi sõela, et eemaldada suuremad osakesed. Filtraat kallati 50 ml suurusesse tsentrifuugi tuubi ja tsentrifuugiti toatemperatuuril 3 min 1500 rpm (280 x g) juures. Peale tsentrifuugimist kallati vedelik sademe pealt ära ning see asendati flotatsioonivedelikuga. Flotatsioonivedelikuna kasutati ZnCl_2 (AppliChem) lahust eritihedusega $1,27 \text{ g/cm}^3$. Proove tsentrifuugiti uuesti samadel tingimustel ning jäeti umbes 15 minutiks seisma. Seejärel võeti lahuse pindkilelt edasisteks analüüsideks proov.

2.3. DNA eraldamine

Roojaproovidest eraldati DNA *QIAamp DNA Stool Mini Kit*'iga (Qiagen) vastavalt protokollile. Flotatsiooniproovidest ja parasiidist või selle munadest DNA eraldamiseks kasutati *QIAamp DNA Mini Kit*'i (Qiagen). Samuti eraldati DNAd nii ussist kui munadest *High Pure PCR Template Preparation Kit*'iga (Roche).

2.4. DNA amplifitseerimine

DNA amplifitseerimiseks disainiti liigispetsiifilised praimerid (Tabel 1). Selleks joondati GenBank andmebaasist võetud parasiidi ja peremeesliikide mitokondriaalse DNA järjestused. Valiti positsioonid, kus järjestustes esines vähemalt paarinukleotiidine varieeruvus. Alveokokk-paelussi praimerid disainiti tRNA-Pro ja tRNA-Ile/tRNA-Lys,

põistang-paelussi praimerid 12S rRNA, rebase ja kährikkoera praimerid samuti 12S rRNA ning koera ja hundi praimerid kontrolljärjestuse põhjal.

Metoodika eesmärk on tuvastada väljaheidetest, kas seal esineb ehhinokokinakkus ning kas peremeheks on rebane, kährikkoer, koer või hunt. Praimereid kontrolliti algselt põistang- ja alveokokk-paelussidest ning rebase, kährikkoera, koera ja hundi koeproovist eraldatud DNAGA. Praimereid testiti algselt eraldi, hiljem koos. DNA põhise testi lihtsustamiseks jagati kuus praimeripaari vaid kahe praimerisegu (MPX1 ja MPX2) vahel nii, et produkti pikkuse (ap - aluspaar) alusel saaks liigi kindlaks määrata (Tabel 2).

Tabel 1. Analüüsil kasutatud praimerid ja nende pikkused aluspaarides.

Praimer	5' → 3'	Praimeri pikkus
EMfor1	TGA TTA ATA GGG CTG CAT G	19
EMrev1	CAC ATT ACT GAG GTA AGA AC	20
EGfor1	GTG TGT TAC ATT AAT AAG GGT G	22
EGrev1	CTT GTT ACG ACT TAC CTC AA	20
F1	CCA TGA AGC ACG CAC ACA	18
RVu	GTT AAT ATG TTT ATG GCC TCA	21
RNy	GTT AAT ATG GTT GTG GCT TTG	21
HW1r	CAA ACC ATT AAT GCA CGA CGT	21
Dog1f	GTA TCT CCA GGT AAA CCC TTC TC	23
Wolf1f	GTA TCT CCA GGT AAA CCC TTC TT	23

Tabel 2. Praimerisegud MPX1 ja MPX2, liigispetsiifiliste produktide pikkused.

Praimerisegu	Praimeripaar	PCR produkti pikkus	Spetsiifilisus
MPX1	EGfor1+EGrev1	149 ap	põistang-paelussi spetsiifiline
	RNy+F1	76 ap	kährikkoera spetsiifiline, eristab hundist ja rebasest
	Dog1f+HW1r	56 ap	koera ja hundi spetsiifiline, eristab kährikkoerast ja rebasest
MPX2	EMfor1+EMrev1	120 ap	alveokokk-paelussi spetsiifiline
	Wolf1f + HW1r	56 ap	hundi ja kährikkoera spetsiifiline, eristab koerast ja rebasest
	RVu+F1	76 ap	rebase spetsiifiline, eristab hundist ja koerast

Ühe 20 µl PCRi reaktsioonisegu jaoks kasutati 14,4 µl milli-Q puhtusega vett, 2 µl 10x Advantage 2 puhvrit (Clontech), 0,4 µl dNTPde segu (10mM, Fermentas), 1 µl vastavat praimerit (5 pmol/ml) ja 0,2 µl 50x Advantage 2 Taq polümeraasi (Clontech). Positiivsele proovile lisati 2 µl eraldatud DNAd, negatiivsele proovile DNAd ei lisatud.

PCRi reaktsioon viidi läbi masinal Biometra® TProfessional ning tingimused olid:

Programm M5H (kokku 45 tsüklit)

<u>95 °C</u>	<u>1 min</u>	
95 °C	20 s	
75 °C	20 s	-1,5 °C iga tsükli kohta, 10 tsüklit
<u>68 °C</u>	<u>30 s</u>	
95 °C	20 s	
60 °C	20 s	35 tsüklit
<u>68 °C</u>	<u>30 s</u>	
68 °C	3 min	
5 °C	paus	

Programm M5R (kokku 34 tsüklit)

<u>95 °C</u>	<u>1 min</u>	
95 °C	20 s	
75 °C	20 s	-1,5 °C iga tsükli kohta, 10 tsüklit
<u>68 °C</u>	<u>30 s</u>	
95 °C	20 s	
60 °C	20 s	24 tsüklit
<u>68 °C</u>	<u>30 s</u>	
68 °C	3 min	
5 °C	paus	

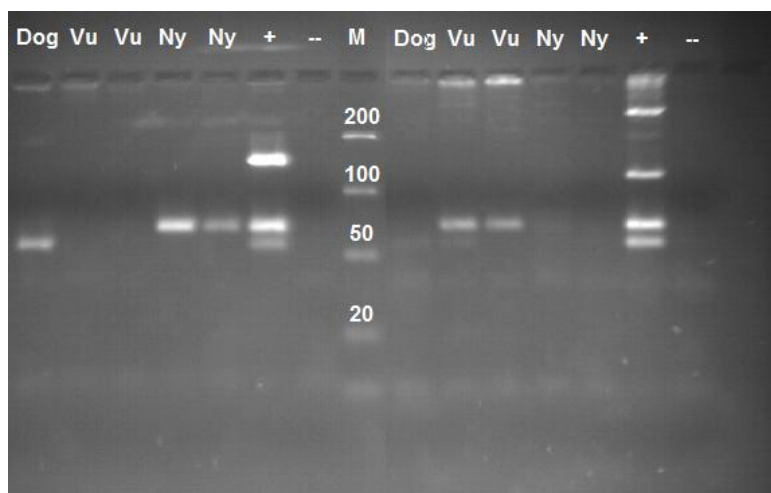
2.5. Elektroforees

Peremeeste PCRi produktid lahutati geelelektroforeesil 1x TBE puhvris. Selleks kasutati spetsiaalset *MetaPhor* (Lonza) kõrglahutavat agarooosi. 3,5% geel valmistati vastavalt tootja juhendile. Produktid koos molekulmassi markeriga *FastRuler™*, *Ultra Low Range DNA Ladder*, 10-200 ap (Fermentas) kanti geelile ja lahutati elektroforeesil 100 V juures 1,5 tundi. Produktid visualiseeriti etiidiumbromiidiga.

Parasiitide PCRi produktid lahutati geelelektroforeesil 1xTAE puhvris. Produktid koos molekulmassi markeriga *FastRuler™*, *Low Range DNA Ladder*, 50-1500 ap (Fermentas) kanti 2,5% agarosgeelile ja lahutati 150 V juures 40 minutit. Produktid visualiseeriti etiidiumbromiidiga.

3. Tulemused

Parima tulemuse peremeeste määramisel andis eespool kirjeldatud PCRi programm M5R (kokku 34 tsüklit). Joonisel 2 on toodud koera, kahe rebase ja kahe kährikoera roojast eraldatud DNA (*QIAamp Stool Mini Kit*) foreesipilt. Vastavalt produktide pikkustele saab peremehed kindlaks määrata (vt. Tabel 3). Koer annab MPX1-ga selgelt produkti pikkusega 56 ap ja MPX2-ga ei anna produkti. Rebase proovid annavad vastavalt tabelile produkti ainult MPX2-ga. Praimeriseguga MPX1 annavad kährikoera proovid produkti pikkusega 76 ap, kuid ei anna produkti MPX2-ga. Kuna kährikoer on ainus liik, mis MPX1-ga annab 76 ap pikkuse produkti, võib väita, et tegemist on tõepoolest kährikoeraga.

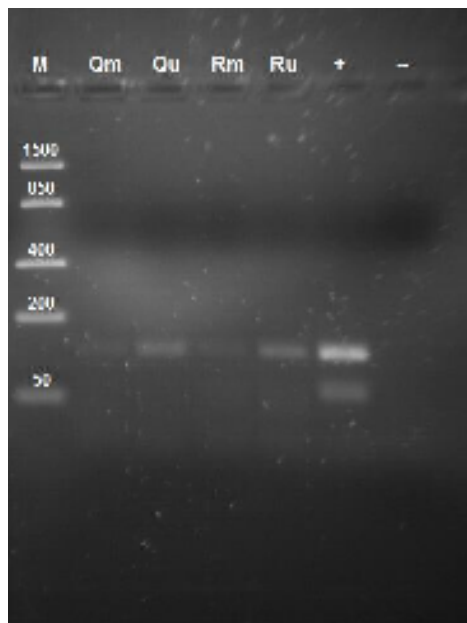


Joonis 1. Programm M5R peremeeste määramiseks, vasakul praimerisegu MPX1 ja paremal praimerisegu MPX2. Geel 3,5% TBE. Dog – koera roojast eraldatud DNA; Vu – rebase roojast eraldatud DNA; Ny – kährikoera roojast eraldatud DNA; + – kõikide liikide DNAd sisaldav positiivne proov; -- – negatiivne proov, kuhu pole DNAd lisatud; M – molekulmassi marker (*Ultra Low Range DNA Ladder*, produktide suurused aluspaarides on tähistatud numbritega).

Tabel 3. PCRi produktide pikkused kahe praimerisegu kohta.

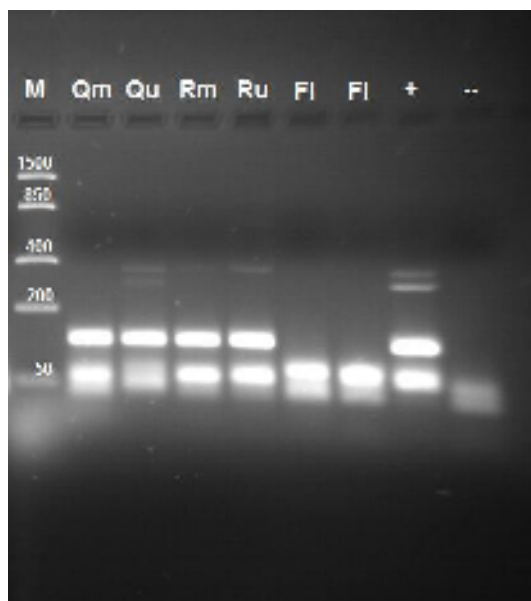
Peremees/ parasiit	PCR produkti pikkus (MPX1)	PCR produkti pikkus (MPX2)
<i>E. granulosus</i>	149	-
<i>E. multilocularis</i>	-	120
kährikoer	76	56
rebase	-	76
koer	56	-
hunt	56	56

Joonise 1 järgi tundus, et analüüs parasiidi DNA detekteerimiseks toimib. Kui sama PCRi programmiga analüüsiti rebaselt pärit alveokokk-paelussi proove, selgus aga, et parasiidi spetsiifiline signaal oli väga nõrk (vt. Joonis 2). Usse või mune sisaldavatest proovidest eraldati DNA kahte *Kit*'i kasutades. Nendeks olid *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) ja *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche). Selleks asetati munad või ussid koos vähese veega 1,5 ml-sse mikrotsentrifuugi tuubi ning eraldati DNA vastavalt protokollile. Kuna tegemist oli alveokokk-paelussi usside ja munadega, kasutati ainult praimerisegu MPX2.



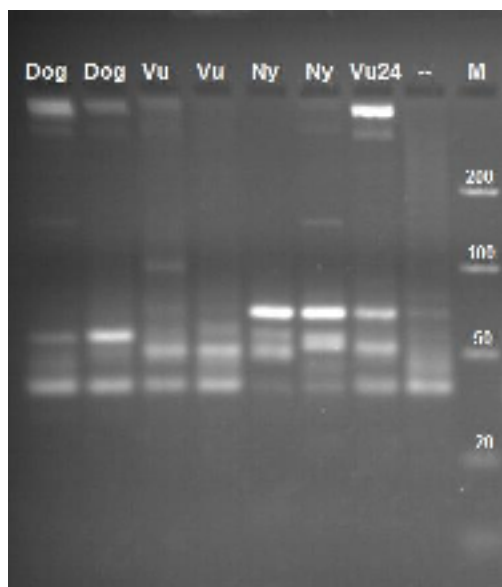
Joonis 2. Programm M5R, praimerisegu MPX2. Geel 2,5% TAE. M – molekulmassi marker (*Low Range DNA Ladder*); Qm – Qiagen *Mini Kit*'iga munadest eraldatud DNA; Qu – Qiagen *Mini Kit*'iga ussist eraldatud DNA; Rm – Roche *Kit*'iga munadest eraldatud DNA; Ru – Roche *Kit*'iga ussist eraldatud DNA; + – positiivne proov varem ussist eraldatud DNAGA; -- – negatiivne proov, kuhu pole DNAd lisatud.

Selgema signaali saamiseks elektroforeesil, tõsteti PCRi tsüklite arvu 45-ni (programm M5H). Saadud foreesipildilt (vt. Joonis 3) on selgelt näha alveokokk-paelussi spetsiifiline 120 ap pikkune produkt. Lisaks ussidest ja munadest eraldatud DNAle (Qiagen *Mini Kit* ja Roche), kanti geelile ka DNAd kahest flotatsiooniproovist (eraldamiseks kasutati Qiagen *Mini Kit*'i). Pildilt selgub, et flotatsiooniproovidest pole parasiidi DNAd üles amplifitseeritud. Samuti selgus, et ei saa eelistada üht DNA eraldamise *kit*'i teisele. Signaal nii munadest kui ka ussist eraldatud DNA puhul on võrdselt tugev mõlema *kit*'iga eraldatud DNAST.

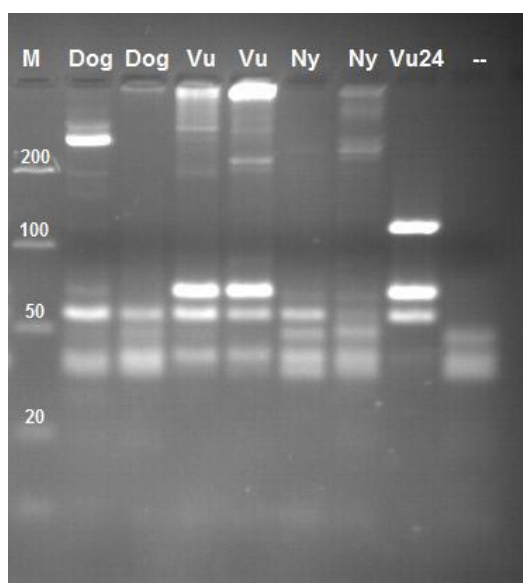


Joonis 3. Programm M5H, praimerisegu MPX2. Geel 2,5% TAE. M – molekumassi marker (*Low Range DNA Ladder*); Qm – Qiagen *Mini Kit*’iga munadest eraldatud DNA; Qu – Qiagen *Mini Kit*’iga ussist eraldatud DNA; Rm – Roche *Kit*’iga munadest eraldatud DNA; Ru – Roche *Kit*’iga ussist eraldatud DNA; Fl – positiivse rebase flotatsiooniproovist eraldatud DNA; + – positiivne proov varem ussist eraldatud DNAGA; -- – negatiivne proov, kuhu pole DNAd lisatud.

Kui peremeeste DNA proovid amplifitseerida PCRi programmiga M5H (kokku 45 tsükli), tekib rohkelt mittespetsiifilisi PCRi produkte (vt. Joonis 4 ja 5). Koeraproovid annavad sellisel juhul produkti ka MPX2-ga, mis tabeli järgi peaks peremeheks andma hundi (vt. Tabel 3). Rebased annavad MPX2-ga topeltprodukti. Kuna 76 ap produkt rebastel on oluliselt intensiivsema signaaliga kui 56 ap produkt, võib väita, et tegemist on rebastega. Kährikkoerad annavad samuti topeltprodukti, kuid praimeriseguga MPX1. MPX2-ga annab üks kährik (6. rada Joonisel 5) ka 56 ap produkti. Kuna MPX1 järgi on intensiivsem 76 ap produkt, on tõenäoliselt tegemist kährikkoertega. *Vu24* rebaseproovist on DNA eraldatud otse roojast, mis võeti lahkamisel jämesoolest. Samuti osutus see rebane rohkearvulise alveokokk-paelussi nakkuse kandjaks. Mõlema praimeriseguga annab *Vu24* peremehe spetsiifilise topeltprodukti.

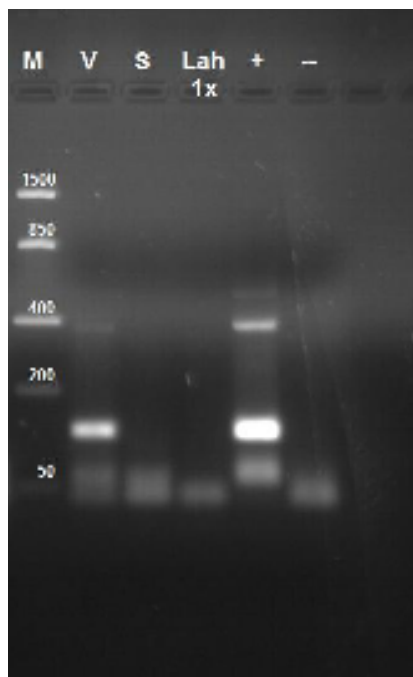


Joonis 4. Programm M5H peremeeste määramiseks, praimerisegu MPX1. Geel 3,5% TBE. Dog – koera roojast eraldatud DNA; Vu – rebase roojast eraldatud DNA; Ny – kährikkoera roojast eraldatud DNA; Vu24 – positiivse rebase roojast eraldatud DNA; -- –negatiivne proov, kuhu pole DNAd lisatud; M – molekulmassi marker (*Ultra Low Range DNA Ladder*).



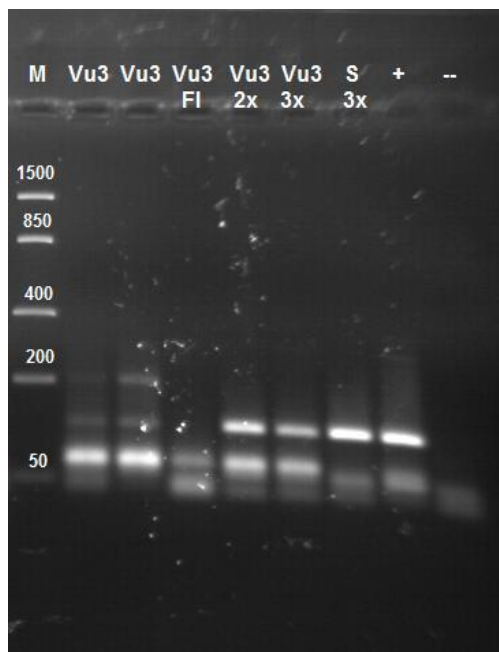
Joonis 5. Programm M5H peremeeste määramiseks, praimerisegu MPX2. Geel 3,5% TBE. M – molekulmassi marker (*Ultra Low Range DNA Ladder*); Dog – koera roojast eraldatud DNA; Vu – rebase roojast eraldatud DNA; Ny – kährikkoera roojast eraldatud DNA; Vu24 – positiivse rebase roojast eraldatud DNA; -- –negatiivne proov, kuhu pole DNAd lisatud.

Üheks põhjuseks miks joonisel 4 näidatud flotatsiooniproovidest parasiidi spetsiifilist signaali ei saadud, võiks olla see, et flotatsioonivedelik inhibeerib PCRi reaktsiooni. Testisime seda oletust ja tulemuse demonstreerimiseks on kaks järgnevat foreesipilti (Joonis 6 ja 7). Kuna parasiidi määramiseks sobib paremini PCRi programm M5H (kokku 45 tsükli), kasutati seda. Kuna oli teada, et tegemist on alveokokk-paelussi munadega, kasutati vaid praimerisegu MPX2. Joonisel 6 on positiivsed proovid ise tehtud. Kõikidest proovidest on DNA eraldatud Qiagen *Mini Kit*'i kasutades. Lahjenduse tegemiseks lisati umbes 200 µl-le munade ja soola lahusele 2 ml suuruse mikrotsentrifuugi tuubi maksimaalse piirini ddH₂O-d, segu tsentrifuugiti 1 min 8000 rpm (4300x g) juures ning pipeteeriti 1,9 ml supernatanti pealt ära. Sel viisil saadi 1 kord lahjendatud proov (~10x lahjendus). Jooniselt 6 on näha, et vees olevatest munadest on DNA edukalt amplifitseeritud, aga soolalahuses ja ka lahjendatud soolalahuses olevatest munadest pole liigispetsiifilist produkti näha.



Joonis 6. Programm M5H, praimerisegu MPX2. Geel 2,5% TAE. M – molekulmassi marker (*Low Range DNA Ladder*); V – vees olevatest munadest eraldatud DNA; S – soolalahuses (ZnCl₂) olevatest munadest eraldatud DNA; Lah1x – mune soolalahuses on lahjendatud 1x ning eraldatud DNA; + – positiivne proov varem ussist eraldatud DNAGA; -- – negatiivne proov, kuhu pole DNAd lisatud.

Katset korraldati lahingul positiivseks osutunud rebase roojast flotatsiooni tegemisega (vt. Joonis 7). Qiagen *Stool Mini Kit*’iga otse rebase roojast eraldatud DNA parasiidi spetsiifiline signaal on detekteeritav, kuid väga nõrk. Analüüsi on kaasatud flotatsioonisegu pindkilelt võetud proovid ning eelpool kirjeldatud meetodil saadud 2 ja 3 korda lahjendatud proovid. Jooniselt 7 järeldub, et flotatsioonimeetod kontsentreerib mune ning annab seega intensiivsema signaali. Samuti võib järeldada, et flotatsioonisegu pindkilelt võetud proovi 2 kordne (100x lahjendus) lahjendamine on piisav, et ZnCl_2 lahuse PCRi ei inhibeeriks.



Joonis 7. Programm M5H, praimerisegu MPX2. Geel 2,5% TAE. M – molekulmassi marker (*Low Range DNA Ladder*); Vu3 – positiivse rebase roojast otse eraldatud DNA; Vu3 FI – positiivse rebase rooja flotatsioonil pindkilelt võetud proovist eraldatud DNA; Vu3 2x – positiivse rebase rooja flotatsioonil pindkilelt võetud proovi 2 korda lahjendatud ja eraldatud DNA; Vu3 3x – positiivse rebase rooja flotatsioonil pindkilelt võetud proovi 3 korda lahjendatud ja eraldatud DNA; S 3x – flotatsioonilahuses olevaid mune 3 korda lahjendatud ja eraldatud DNA; + – positiivne proov varem ussist eraldatud DNAGA; -- – negatiivne proov, kuhu pole DNAd lisatud.

Sooviti teada, kas elektroforeesil nähtav signaal võimendub, kui praimereid on segus vähem. Selleks analüüsiti samu proove nii kolme praimeripaari seguga (MPX2, joonis 8) kui kahe praimeripaari seguga (FOX, joonis 9). Praimerisegu FOX sisaldas alveokokk-paelussi ja rebase spetsiifilisi praimereid (vt. Tabel 2). PCRi programm oli mõlemal juhul sama. Analüüsi võeti kolm rebase ja kolm koera roojaproovi. Oli teada, et rebane *Vu3* on alveokokk-paelussiga nakatunud. Joonisel 8 on näha rohkem mittespetsiifikat kui joonisel 9, kui kasutati vaid kahte praimeripaari. Rebase *Vu3* parasiidi spetsiifiline produkt pole

MPX2 puhul nii selgelt eristunud kui FOX puhul. Seega praimerite arv segus mõjutab produkti spetsiifilisust. Mida vähem praimereid, seda selgemini eristuv on produkt.

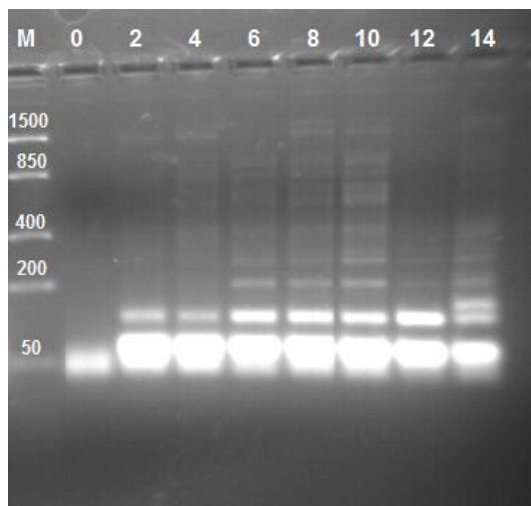


Joonis 8. Programm M5H, praimerisegu MPX2. Geel 2,5% TAE. Vu1 – rebase roojast eraldatud DNA; Vu2 – rebase roojast eraldatud DNA, Vu3 – positiivse rebase roojast eraldatud DNA; Dog – koera roojast eraldatud DNA; M – molekulmassi marker (*Low Range DNA Ladder*); + – positiivne proov varem ussist eraldatud DNAGA; -- – negatiivne proov, kuhu pole DNAd lisatud.



Joonis 9. Programm M5H, praimerisegu FOX. Geel 2,5% TAE. Vu1 – rebase roojast eraldatud DNA; Vu2 – rebase roojast eraldatud DNA, Vu3 – positiivse rebase roojast eraldatud DNA; Dog – koera roojast eraldatud DNA; M – molekulmassi marker (*Low Range DNA Ladder*); + – positiivne proov varem ussist eraldatud DNAGA; -- – negatiivne proov, kuhu pole DNAd lisatud.

Et teada saada PCR testi tundlikus, siis analüüsiti erineva parasiteerituse astmega rebaste proove. Proovid võeti otse jämesoolest ning parasitoloogilisel lahkamisel loendati peensoolest leitud alveokokk-paelussid. Koproproovidest eraldati DNA Qiagen *Stool Mini Kit*’iga. Selgus, et kõikidest proovidest ei tulnud oodatud signaali. Et teada saada, kui palju peaks madala nakkuse korral PCRi reaktsiooni tarvis DNAd võtma, tehti katse, kus reaktsioonisegus DNA koguseid suurendati kahe mikrolitri kaupa vahemikus 0-14 µl (vt. Joonis 10). Kasutati roojaproovi rebaselt, kelle peensooles leiti olevat kolm alveokokk-paelussi. Parasiidi spetsiifiline produkt oli tugevaim, kui ühes reaktsioonisegus oli 12 µl koproproovist eraldatud DNAd. Analüüsi korrati ka prooviga rebaselt, kellel leiti parasiteerimas tuhandeid ehhinokokke. Selles analüüsis suurendati DNA koguseid reaktsioonisegus ühe mikrolitri kaupa vahemikus 0-7 µl. Selgus, et DNA koguse suurendamine 7 µl-le ei inhibeerinud signaali. Edasistes analüüsides võiks DNAd võtta ühe PCRi reaktsiooni jaoks 10 µl, et nakkus märkamata ei jääks.



Joonis 10. Programm M5H, paimerisegu MPX2. Geel 2,5% TAE. M – molekulmassi marker (*Low Range DNA Ladder*); 0 – proovile pole DNAd lisatud; 2 – proovile lisatud 2 µl DNAd; 4 – proovile lisatud 4 µl DNAd; 6 – proovile lisatud 6 µl DNAd; 8 – proovile lisatud 8 µl DNAd; 10 – proovile lisatud 10 µl DNAd; 12 – proovile lisatud 12 µl DNAd; 14 – proovile lisatud 14 µl DNAd.

Kasutades väljatöötatud PCR teste analüüsiti kogutud ulukkoerlaste väljaheiteproove ja leiti, et ~27% rebastest (21 positiivset 77-st) ning 1,5% kährikkoertest (1 positiivne 65-st) osutusid alveokoki kandjateks, samas kui seda parasiiti ei tuvastatud hundil. Samuti ei tuvastatud põistang-paelussi ühelgi analüüsitud loomal.

4. Arutelu

Et madalat nakkust lõpp-peremehel mitte märkamata jätta on PCRi põhistel meetoditel vaheetapiks tavaliselt munade kontsentreerimine näiteks flotatsioonimeetodil. Ajal, mil nakkust lõpp-peremehel on kõige parem diagnoosida (~35 päeva peale nakatumist), sobivad selleks kopro-DNA PCR ja munadest eraldatud DNA PCR meetodid võrdselt hästi (Al-Sabi et al. 2007). Seega kui nakkus on sellises staadiumis, pole vajadust munade eelneva kontsentreerimise järgi. Tulemustest selgus, et flotatsioonivedelik inhibeerib PCRi. Probleemi kõrvaldamiseks lahjendati proove destilleeritud veega. Samuti võis inhibitsiooni põhjuseks olla see, et proovi sattus koos munadega ka palju rooja, mis sisaldab teadaolevalt rohkelt PCRi inhibiitoreid (Nonaka et al. 2009). Flotatsioonimeetodi peamiseks puuduseks on, et väljaheidest flotatsiooni teostamisel jääb lahuse pindmine kiht sageli nii häguseks, et sealt on väga raske mune tuvastada. Seetõttu eelistaksime mitte kasutada flotatsioonimeetodit, vaid teha PCR test otse väljaheidest. Käesolevas töös kirjeldatud meetodi eeliseks ongi flotatsiooni väljajätmine, mis tähendab, et ühe proovi analüüsiks kuluv aeg lüheneb ja testimine on odavam.

Dinkel et al. (1998) väitsid, et kommertsiaalsed *kit*'id pole võimelised paelusside munakesta lõhkuma. Varasemates töödes kasutataksegi laialdaselt ehhinokoki munakesta purustamiseks aluselist lüüsimist KOH-ga (Al-Sabi et al. 2007; Dyachenko et al. 2008). Antud töös kirjeldatud meetod seda tööetappi samuti ei sisalda, sest selgus, et kommertsiaalsed *kit*'id, mis sisaldavad proteinaas K-d ja spetsiaalseid lüüsilahuseid, suudavad edukalt munakesta lüüsida. Ajakulu ja maksumus ühe proovi analüüsiks väheneb veelgi. Samuti on edukalt tehtud töid, kus ehhinokoki munade lüüsimine peale nende kontsentreerimist on ära jäetud ning on kohe DNA eraldatud (Lagapa et al. 2009; Nonaka et al. 2009).

Käesolevas töös kirjeldatud meetodis kasutatakse lühikesiprodukte amplifitseerivaid primereid, et lõpp-peremehe identifitseerimine roojast oleks võimalik ka vanemast proovist. Antud meetodi puuduseks võib lugeda selle, et DNA eraldatakse <0,25 grammist roojast. Kuna analüüsitakse nii väikest proovi, on tõenäoline, et madala nakkuse korral antud tükikesse ehhinokoki mune üldse ei satu. Kuid väike kogus rooja sobib peremeeste identifitseerimiseks hästi. Lahenduseks oleks kahe või kolme lisaanalüüsi tegemine kõigil

negatiivseteks osutunud proovidel, mis muudab aga analüüsid kallimaks ja aeganõudvamaks, samas vähendaks aga valenegatiivsete tulemuste arvu.

Töö käigus konstrueeriti praimerisegu FOX, mis suudab kindlaks teha, kas koproproov kuulub rebasele ning kas seal esineb alveokokk-paelussi DNAd. Selline analüüs on Eesti tingimustes vajalik, kuna rebane on hetkel peamine kiskja (kährikkoeral osutus alveokoki esinemine ülimalt harvaesinevaks, vaid ühel isendil 65-st), kellel alveokokk-paeluss on diagnoositud (Moks et al. 2005; lahkamisel saadud andmed). Selgus, et parasiidi spetsiifiline produkt praimeriseguga FOX oli intensiivsema signaaliga kui praimeriseguga MPX2. Praimerisegu MPX2 sisaldas lisaks rebase ja alveokokk-paelussi spetsiifilistele praimeritele vaid hundi ja kährikkoera spetsiifilist praimeripaari (vt. Tabel 2). Ka ühe praimeripaari välja jätmine segust võimendab foreesil saadud signaali. Kui eesmärgiks on alveokokk-paelussi monitooring rebaste seas, sobib selleks hästi praimerisegu FOX.

Tulevikus on plaanis uut metoodikat kaasata ka ehhinokokkide monitooringul Eestis. Kui metsloomade nakatumine ehhinokokoosi väga kõrgeks osutub, tuleb piirata ehhinokokkide levikut ja teha ennetustööd, et vähendada inimeste haigestumise riski. Eriti alarmeeriv oleks olukord, kui alveokokk-paelussi leitakse siinsetelt kährikkoertelt. Selline olukord eeldaks seda, et keskkonna saastatus ehhinokokkidega oleks väga kõrge. Hetkel on Eestis alveokokk-paelussi intestinaalset nakkust leitud uuritud loomadest pea igal kolmandal rebasel (~27%) ning vaid ühel kährikkoeral. Et vähendada rebaste nakatumist selle parasiidiga, võib sarnaselt marutaudi vaktsiini külvamisele metsloomi ka ehhinokokkide vastu dehelmintiseerida. Tõhus metoodika selleks on välja töötatud König et al. (2008) poolt. Kui enne ravimi külvamist oli uuritava alal 35% nakatunud rebaseid, siis juba nelja kuu möödudes oli nakatunud rebaseid vaid 1%. Et vältida nakkuse sageduse tõusu varasemale tasemele on oluline ravimi külvamist esimeste tulemuste ilmnedes mitte katkestada (Romig et al. 2007).

5. Kokkuvõte

Ehhinokokk-paelussid on Euroopas ja mujal maailmas laialt levinud parasiidid, kes lisaks mets- ja koduloomadele nakatavad ka inimesi, põhjustades neil eluohtlikke zoonoos – ehhinokokoosi. Eriti ohtlikud on liigid põistang-paeluss ja alveokokk-paeluss, mida on leitud ka Eestist.

Ehhinokokkide ja nende peremeeste tuvastamiseks töötati välja metoodika, mis võimaldab lihtsalt vahet teha nii erinevatel peremeesorganismidel kui ka ehhinokokkiliikidel. Geneetiline PCRi-põhine test võimaldab lihtsalt ja kiirelt tuvastada, kas:

1. taeniidide, sh. ehhinokokkide mune väljaheites üldse esineb;
2. kas esineb *E. granulosus* (annab positiivse signaali kui tegemist on *E. granulosusega*, aga mitte *E. multilocularisega*);
3. kas esineb *E. multilocularis* (annab positiivse signaali kui tegemist on *E. multilocularisega*, aga mitte *E. granulosusega*);
4. võimaldab teha kindlaks, kas:
 - a) kas peremees on koerlane;
 - b) kas peremees on rebane;
 - c) kas peremees on kährikkoer;
 - d) kas peremees on hunt või koer.

Edaspidi saaks hakata uut metoodikat ehhinokokkide monitooringul Eestis kasutama. Kui nende paelusside arvukus lõpp-peremeestel peaks tõusma, tuleb inimnakkuste vältimiseks parasiidi levikut oluliselt piirata näiteks dehelmintiseerivate ravimite külvamisega, mis on end tõestanud kui perspektiivne meetod ehhinokokkide elimineerimisel.

Kasutatud kirjandus

- Al-Sabi MNS, Kapel CMO, Deplazes P, Mathis A (2007) Comparative copro-diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes. *Parasitology Research* 101: 731-736.
- Bagrade G, Šnabel V, Romig T, Ozoliņš J, Hüttner M, Miterpakova M, Ševcova D, Dubinsky P (2008) *Echinococcus multilocularis* is a frequent parasite of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Latvia. *Helminthologia* 45: 157-161.
- Bagrade G, Kirjusina M, Vismanis K, Ozolins J (2009) Helminth parasites of the wolf *Canis lupus* from Latvia. *Journal of Helminthology* 83: 63-68.
- Bessonov AS (2002) Echinococcoses of Animals and Humans in the Russian Federation. In: Craig P, Pawlowski ZS, editors. *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis - An Emergent and Global Problem*: IOS Press. pp. 91-98.
- Bružinskaite R, Šarkunas M, Torgerson PR, Mathis A, Deplazes P (2009) Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. *Veterinary Parasitology* 160: 237-241.
- Davison A, Birks JDS, Brookes RC, Braithwaite TC, Messenger JE (2002) On the origin of faeces: morphological versus molecular methods for surveying rare carnivores from their scats. *Journal of Zoology* 257: 141-143.
- Deplazes P, Alther P, Tanner I, Thompson RCA, Eckert J (1999) *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in fox, dog, and cat populations. *Journal of Parasitology* 85: 115-121.
- Deplazes P, Dinkel A, Mathis A (2003) Molecular tools for studies on the transmission biology of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology* 127.
- Deplazes P, Hegglin D, Gloor S, Romig T (2004) Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology* 20: 77-84.
- Dinkel A, von Nickisch-Rosenegk M, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T (1998) Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: Coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1871-1876.
- Dyachenko V, Pantchev N, Gawlowska S, Vrhovec MG, Bauer C (2008) *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. *Veterinary Parasitology* 157: 244-253.
- Eckert J (2003) Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Tropica* 85: 157-163.
- König A, Romig T, Janko C, Hildenbrand R, Holzhofer E, Kotulski Y, Ludt C, Merli M, Eggenhofer S, Thoma D, Vilsmeier J, Zannantonio D (2008) Integrated-baiting concept against *Echinococcus multilocularis* in foxes is successful in southern Bavaria, Germany. *European Journal of Wildlife Research* 54: 439-447.

- Lagapa JTG, Oku Y, Kaneko M, Ganzorig S, Ono T, Nonaka N, Kobayashi F, Kamiya M (2009) Monitoring of environmental contamination by *Echinococcus multilocularis* in an urban fringe forest park in Hokkaido, Japan. *Environmental Health and Preventive Medicine* 14: 299-303.
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V, Meri S (2003) Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127: 207-215.
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Laaksonen S, Agren E, Oksanen A, Meri S (2006) Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology* 133: 565-570.
- Lind EO, Juremalm M, Christensson D, Widgren S, Hallgren G, Agren EO, Uhlhorn H, Lindberg A, Cedersmyg M, Wahlstrom H (2011) First detection of *Echinococcus multilocularis* in Sweden, February to March 2011. *Eurosurveillance* 16: 4-6.
- Machnicka-Rowinska B, Rocki B, Dziemian E, Kolodziej-Sobocinska M (2002) Raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) - the new host of *Echinococcus multilocularis* in Poland. *Wiadomosci Parazytologiczne* 48: 65-68.
- Moks E, Saarma U, Valdmann H (2005) *Echinococcus multilocularis* in Estonia. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1973-1974.
- Moks E, Jõgisalu I, Saarma U, Talvik H, Järvis T, Valdmann H (2006) Helminthologic survey of the wolf (*Canis lupus*) in Estonia, with an emphasis on *Echinococcus granulosus*. *Journal of Wildlife Diseases* 42: 359-365.
- Moks E, Jõgisalu I, Valdmann H, Saarma U (2008) First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology* 135: 647-654.
- Nonaka N, Sano T, Inoue T, Armua MT, Fukui D, Katakura K, Oku Y (2009) Multiplex PCR system for identifying the carnivore origins of faeces for an epidemiological study on *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido, Japan. *Parasitology Research* 106: 75-83.
- Romig T, Bilger B, Dinkel A, Merli M, Thoma D, Will R, Mackenstedt U, Lucius R (2007) Impact of praziquantel baiting on intestinal helminths of foxes in southwestern Germany. *Helminthologia* 44: 137-144.
- Thevenet PS, Jensen O, Mellado I, Torrecillas C, Raso S, Flores ME, Minvielle MC, Basualdo JA (2003) Presence and persistence of intestinal parasites in canine fecal material collected from the environment in the Province of Chubut, Argentine Patagonia. *Veterinary Parasitology* 117: 263-269.