

L. R. HRYTSAK, O. Yu. Mayorova, M. Z. Prokopiak, N. M. Drobyk
Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, Ukraine

CURRENT CAUSES OF HIGHLAND GENUS *GENTIANA* L. SPECIES HABITAT FRAGMENTATION

Peculiarities of changes in chorology of rare species *Gentiana lutea* L., *Gentiana punctata* L., *Gentiana acaulis* L. in the Ukrainian Carpathians have been analyzed and the reasons which cause fragmentation of these species' populations and destabilization of their habitats have been determined. The existence of 10 natural and 3 introduced populations of *G. lutea*, 6 partial populations of *G. punctata* on Chornohora, Svydovets and Marmarosh massifs, as well as 7 partial populations of *G. acaulis* has been confirmed. Eight populations of *G. lutea* disappeared from the flora of the Ukrainian Carpathians. During the 2nd half of the 20th century, *G. punctata* was extirpated in large open spaces in the mountains of Chornohora, Chyvchyn, and Svydovets. The area of most of the existing populations of *G. acaulis* decreased to 0.3 ha. The lower boundary of species ranges in altitude direction has shifted to 200-250 m (*G. acaulis*), 300-350 m (*G. punctata*), 500 m (*G. lutea*); the optimum of abiotic conditions of *G. lutea* and *G. punctata* moved from southern slopes to north-western and north-eastern slopes, while populations of *G. acaulis* on southern slopes localized at altitudes close to the extreme upper limit of their range. The main factors predetermining structural and functional changes in the intrapopulation and spatial organization include the transformation of motley grass groupings into densely turfed secondary cenoses; determination of reserveogenic successions due to decline in mountain animal husbandry and significant increase (from 1-2 % to 90 %) in the projective cover of shrubs in species growth localities; recreation (especially in case of *G. acaulis*); picking plants for bunches and digging them up.

Keywords: *G. lutea*, *G. punctata*, *G. acaulis*, chorology, habitat destabilization factors.

Надійшла 22.07.2021.

УДК: 591.4:595.42

doi: 10.25128/2078-2357.21.3.5

О. М. МАРЧУК, С. С. ПОДОБІВСЬКИЙ, Л. Я. ФЕДОНЮК

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
Майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001
e-mail: podobivskiy@tdmu.edu.ua

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТРАНСМІСИВНИХ ІНФЕКЦІЙ, ЩО ПЕРЕДАЮТЬСЯ КЛІЩАМИ ТА КОМАРАМИ

У роботі використано уніфіковану, розроблену нами методику, що допомагає швидко отримувати результати щодо зараженості кліщів та комарів. Це допомагає лікарям-клініцистам підтвердити чи спростувати поставлений діагноз та відслідковувати епідеміологічну ситуацію. Використання розробленої методики дозволяє проводити дослідження на визначення збудників та отримувати результат за час, який відведений на повний цикл досліджень. Уперше проведено дослідження комарів на наявність фрагментів ДНК *Babesia species* і РНК вірусу кліщового енцефаліту (ТБЕВ), які дали проміжний позитивний результат.

Ключові слова: полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу, трансмісивні інфекції, рестрикційний аналіз, Nested PCR.

Сучасні аспекти розповсюдження, розмаїття та поширеності на теренах України та Європейського континенту кліщів та комарів спонукають науковців до більш детального вивчення питання щодо визначення найбільш інформативних методів дослідження у розповсюдженні трансмісивних інфекцій. Враховуючи те, що є велика кількість збудників

трансмисивних інфекцій, виникає необхідність у вдосконаленні та оптимізації самих методів дослідження [1, 4].

У багатьох країнах Європи проводяться дослідження на наявність різноманітних збудників трансмісивних інфекцій, що передаються кліщами і комарами різними методами, перш за все шляхом ПЛР. Так в північно-східному регіоні Німеччини були досліджені деякі види спірохет, які спричинюють мультисистемні порушення в організмі людини, що спричинюють відповідні захворювання. Мало знані на той час циркуляція деяких видів *Borrelia species* та TBEV (Ticks Borne Encephalitis Virus).

Були проведені також дослідження різних стадій розвитку кліщів із лісів Мекленбург, що у західній Померанії (Mecklenburg-Western Pomerania). Екстракцію РНК проводили з наступною постановкою зворотної транскрипції, для отримання кДНК, проведення I ампліфікації. Та метод, який додатково застосовувався для проведення II ампліфікації з метою визначення генотипу, – це Nested PCR [2].

Науковцями зі Словенії були проведені дослідження кліщів *Ixodes ricinus* та гризунів на наявність *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Здійснювались також наукові дослідження на вміст ко-інфекцій, де переважна кількість збудників серед кліщів були *B. miyamotoi* (1,7 %), *B. burgdorferi s.l.* (16,9 %) відповідно. Серед гризунів, як контраст, були виявлені *B. burgdorferi sensu lato* (11,9 %). Послідовність фрагмента гена флагеліна (*B. miyamotoi*) glp Q в цих дослідженнях показали високий ступінь ідентичності з послідовностями гена, ампліфікованими від кліщів та пацієнтів людини в Європі [7].

За даними угорських науковців, була досліджена еко-епідеміологія спірохет *B. miyamotoi* та Лайм-бореліоза в популярній мисливсько-рекреаційній лісовій смузі Угорщини [5]. Досліджувалися не лише кліщі, але і їх проміжні хазяї – гризуни. Усі зразки перевіряли на наявність патогенів частини гена флагеліну кількісною мультиплексною полімеразно-ланцюговою реакцією в реальному часі (qPCR). А вже потім класичним методом ПЛР та секвенуванням проводили облік та аналіз отриманих даних.

Поєднання методів дослідження зробили вчені Tomasz Chmielewski, Janusz Fiett, Marek Gniadkowski, Stanislaw Tylewska-Wierzbanowska в рамках вивчення такого мультисистемного та багаторівневого захворювання, як хвороба Лайма [6]. Діагностика включала в себе історію про укуси кліщів, огляд місця укусів та клінічну картину, серологічні тести. Серонегативним пацієнтам були проведені додаткові обстеження. За допомогою ПЛР діагностики були використані нові олігонуклеотидні праймери на основі послідовності гену 16S rRNA *B. burgdorferi s. l.*, які були розроблені для виявлення спірохет у зразках крові, спинномозковій та синовіальних рідинах.

Спочатку екстрагували очищену ДНК, потім ампліфікували на три геновиди наборами праймерів, специфічними для 16S рДНК та/або за поліморфізмом довжини рестрикційного фрагмента 23S (rrl) – 5S (rrf). Рівень вимірювань специфічних антитіл до спірохет *B. burgdorferi* проводили у зразках крові, спинномозковій та синовіальних рідинах методами ІФА (імуноферментний аналіз) та Верстерн блотингу. Зразки крові, спинномозкової та синовіальної рідин культивували в клітинних лініях.

Тож клінічні зразки можуть бути використані для клінічних випробувань на наявність різновидів спірохет з клінічними симптомами на Лайм-бореліоз.

Матеріал і методи досліджень

На базі Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України створений Центр дослідження на Лайм-бореліоз та інших збудників трансмісивних інфекції, де поєднується робота різних фахівців як медичного (клініцисти), так і біологічного (ентомологія) профілів [1, 4].

Матеріалом для досліджень були використані кліщі (від людей та від тварин), плазма крові, спинномозкова та синовіальна рідина. Клініцистами були направлені кров з ЕТДА (Етилендіамінтетраоцтова кислота) K₃ від хворих, які постраждали від укусів кліщів, та тих, які мали в анамнезі такі ситуації. І, як наслідок, можливі ускладнення: неврологічні, кардіологічні,

ортопедичні прояви. При цьому враховується вік, стать, місцевість, професія та місце проживання пацієнтів, уражених кліщами [1].

Сам процес визначення збудників трансмісивних інфекцій проходив в ампліфікаторі «Rotor Gene- 6000», 5-ти каналний («Corbett Research», Австралія), у режимі реального часу наборами, які містять зонди з флюоресцентною детекцією при проходженні кожного циклу.

Використовувались набори для екстракції ДНК/РНК «РеалБест- екстракція 100», фірми ВекторБест (представництво Україна). Набір розрахований на визначення 48 зразків, разом із контролями та набори для ампліфікації кожного збудника зокрема, розрахований на визначення 50 зразків, разом із контролями. А саме: «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.*», «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris/Ehrlichia chaffeensis*», ДНК *Borrelia miyamotoi*, а також «РеалБест ДНК *Babesia species*» та «РеалБест РНК ВКЕ» (представництво Україна).

Результати досліджень та їх обговорення

За даними літератури виникла експансія різних видів кліщів і комарів із південних регіонів на північ. Це, очевидно, зумовлено змінами кліматичних, екологічних, епідеміологічних і біологічних умов на цих територіях. Останні десятиліття розповсюдження кліщів, в силу адаптації до умов існування, урбанізувалися та освоїли нові ареали в населених пунктах різного типу, поблизу людей і тварин. Беручи до уваги те, що є необхідність визначати велику кількість збудників і робити дослідження систематизовано, виникла потреба в оптимізації вивчення патогенів трансмісивних інфекцій, які передаються кліщами та комарами [1, 4].

Нами проводилися дослідження, матеріалом для яких стали кліщі та комарі, кров з ЕДТА, ліквор і синовіальна рідина пацієнтів, які постраждали від укусів цих членистоногих. З кліщів та комарів робили суспензію та здійснювали екстракцію ДНК/РНК залежно від самого збудника і проводили ампліфікацію.

З 150 мкл сумарно виділеної РНК/ ДНК з суспензій кліщів або 150 мкл сумарно виділеної РНК/ДНК з клінічних зразків, отриманих від людей брали по 25 мкл для подальшої роботи. До реакційної суміші додавали відповідну кількість екстрагованої РНК/ДНК. Об'єм реакційної суміші має складати 50 мкл.

Дослідження, які проводилися нами, були спрямовані в основному на виявлення ДНК-вмісних збудників: *B. burgdorferi s. l.*, (комплекс *B. sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garini*), *B. miyamotoi*, *A. phagocytophilum*, *E. muris*, *E. chaffeensis*, *B. species* та РНК-вмісного вірусу кліщового енцефаліту (Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV)) [3].

Використані нами набори для екстракції ДНК/РНК «РеалБест-екстракція 100» фірми ВекторБест (представництво Україна) розраховані на виділення 48–50 зразків разом з контролями та набори для ампліфікації для кожного збудника. А саме: «РеалБест ДНК *B. burgdorferi s.l.*», «РеалБест ДНК *A. phagocytophilum/E. muris, E. chaffeensis*», ДНК *B. miyamotoi*, а також «РеалБест ДНК *Babesia species*» та «РеалБест РНК ВКЕ» (представництво Україна).

Процес програмування включає в себе:

- денатурацію;
- відбір праймерів із комплементарними послідовностями;
- елонгацію нуклеотидних послідовностей праймерів.

У результаті відбувається накопичення флюоресцентних сигналів і наростання S-подібної кривої (гістограма на екрані комп'ютера, під'єданого до ампліфікатора).

Шляхом полімеразно-ланцюгової реакції здійснюється накопичення комплементарних фрагментів РНК/ДНК, яке збільшується в геометричній прогресії. У 5'-3' нуклеазної активності Таq ДНК- полімерази, яка розщеплює зонд з 5'- кінця. Таким чином, виникає відокремлення барвника (флюорофора) і гасника (супресора). Це дозволяє накопичувати продукт реакції та збільшити сигнал флюоресценції.

За результатами досліджень 50 зразків крові дорослих пацієнтів, уражених кліщами, було встановлено 17 випадків зараження *B. species* та 8 випадків зараження *Ticks Borne Encephalitis*

Virus. Зразків із *A. phagocytophilum/E. muris/E. chaffeensis*, *B. burgdorferi s. l.* та *B. miyamotoi* не виявлено.

Із досліджених 64 екземплярів кліщів, знятих з людей, виявлено 4 випадки носійства *A. phagocytophilum*, 8 випадків носійства *B. burgdorferi s. l.*, по одному випадку із носійством *B. miyamotoi*, *B. Species* і TBEV (вірус кліщового енцефаліту).

Додатково досліджувались кліщі, отримані з тварин (26 особин). У них було виявлено: *A. phagocytophilum* (у 2 екземплярів), *B. species* (10 екз.), TBEV (8 екз.).

Також дослідженню підлягали комарі (7 особин, (суспензії)), у яких не визначали збудник вірусу кліщового енцефаліту (TBEV). Із усіх досліджених збудників у комарів виявили лише *B. species* (1 екземпляр).

Для оптимізації методів досліджень використовується одночасне поєднання визначення ДНК-вмісних збудників, що сприяє більш швидкому їх визначенню. Тобто мова йде про скорочення часу для отримання результатів досліджень. Звичайно, що це ще залежить від кількості зразків, разом з контролями. Для ампліфікатора «Rotor Gene- 6000» максимальна кількість зразків разом з контролями є 36. Тому комбінації можуть бути різними: від 9 до 12 одночасно.

Залежно від завдань, які ставимо перед собою, пріоритет у дослідженні ставиться на обстеження максимальної кількості кліщів/комарів або іншого матеріалу.

У наших дослідженнях ми робимо як визначення ДНК-вмісних збудників, так і визначення РНК-вмісного вірусу кліщового енцефаліту (TBEV). РНК-вмісні патогени не підлягають зберіганню через швидке руйнування РНК. Отже, такі дослідження проводимо в першу чергу.

За даними світових джерел, ми не стикались з даними посилення, яким саме чином були проведені дослідження. Дослідження проводились на вказані кілька збудників окремо. Також немає конкретних даних, щоб проводили наукові досліди саме у такій кількості збудників. Їх може бути більше, а менша кількість. Зазвичай виникає потреба визначати максимальну кількість біоматеріалу для досліджень. Отже, проводимо ампліфікацію на визначення 5–7 збудників одночасно. Тобто за проходження 50 циклів ампліфікації, отримуємо результат одночасного визначення ДНК-вмісних патогенів: *B. burgdorferi s. l.*, *B. miyamotoi*, *A. phagocytophilum/E. muris*, *E. chaffeensis* по різних каналах детекції. Це суттєво економить час, затрачений на визначення, електроенергію та здійснює менші навантаження на саме обладнання.

Наступним визначенням є ДНК *Babesia species*. Для проведення ампліфікації можемо використовувати максимальну кількість мікропробірок з реакційною сумішшю – 36.

Аналіз та облік результатів дослідження проводиться за наявності флуоресцентного сигналу, при проходженні порогових значень всіх 50 циклів та наявності Ct ВКЗ кожної проби та Ct контролів по різних каналах визначення. Каналами детекції є Green, Yellow, Orange [7].

Отже, оптимальним та уніфікованим протоколом досліджень є:

1. Ідентифікація кліщів/комарів.
2. Виготовлення суспензій з кліщів/комарів або передпідготовка крові з ЕДТА, шляхом центрифугування при 13000 об./хв. на протязі 5 хвилин, за кімнатної температури (18–25)⁰С в окрему пробірку та окремо клітини крові.
3. Приготування реакційної суміші та розкrapування дослідних зразків на максимальну кількість збудників трансмісивних інфекцій.
4. Облік результатів дослідження.
5. Доцільне використання реактивів.

Висновки

У своїх дослідженнях ми обрали уніфіковану, нами розроблену методику, яка допомагає якнайшвидше давати результати визначень лікарям-клініцистам для підтвердження чи спростування поставленого діагнозу та відслідковування епідеміологічної ситуації щодо зараженості кліщів та комарів.

Використання нашої методики дозволяє проводити дослідження на визначення збудників та отримувати результат за час, який відведений на повний цикл досліджень. Має місце економія часу та електроенергії, зберігається саме обладнання під час його використання.

Уперше були проведені дослідження комарів на наявність фрагментів ДНК *Babesia species* і РНК вірусу кліщового енцефаліту (ТБЕВ), які дали проміжний позитивний результат.

1. Андрейчин М.А. та ін. Частота виявлення Борелій і Анаплазми у кліщів, вилучених від мешканців Тернопільської області. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції інфекціоністів і пленум ГО «Всеукраїнська Асоціація інфекціоністів». Житомир. 2017. С. 9–10.
2. Kjelland V. et al. Tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in *Ixodes ricinus* ticks collected from recreational islands in southern Norway. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018. № 5. P. 1098–1102.
3. Kubiak K, Szczotko M, Dmitryjuk M. *Borrelia miyamotoi*-An Emerging Human Tick-Borne Pathogen in Europe. *Microorganisms.* 2021. № 9 (1). P. 154.
4. Podobivskiy S.S. et al. Comparative characteristic of the morpho-physiological parameters biology and epidemiology of ixodidae (Ixodes and Dermacentor). *Deutscher Wissenschaftsberld.* 2018. № 2. P. 10–12.
5. Sándor Szekeres et al. Eco-epidemiology of *Borrelia miyamotoi* and Lyme borreliosis spirochetes in a popular hunting and recreational forest area in Hungary. *Szekeres et al. Parasites & Vectors.* 2015. № 8. P 309.
6. Tomasz Chmielewski, Janusz Fiett, Marek Gniadkowski, Stanisława Tylewska-Wierzbanska. Improvement in the laboratory recognition of lyme borreliosis with the combination of culture and PCR methods. *Mol Diagn.* 2003. № 7 (3–4). P. 155–62.
7. Zuzana Hamšíková et al. *Borrelia miyamotoi* and Co-Infection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* Ticks and Rodents from Slovakia. *Microb Ecol.* 2017. № 73 (4). P. 1000–1008.

References

1. Andreichyn M.A. et al. Chastota vyavlennia Borelii i Anaplazmy u klishchiv, vyluchenykh vid meshkantsiv Ternopilskoi oblasti. Mat. vseukrainskoi naukovo-praktychnoi konferentsii infektsionistiv i plenum HO «Vseukrainska Asotsiatsiia infektsionistiv». Zhytomyr. 2017. С. 9–10. [in Ukrainian]
2. Kjelland V. et al. Tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in *Ixodes ricinus* ticks collected from recreational islands in southern Norway. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018. № 5. P. 1098–1102.
3. Kubiak K, Szczotko M, Dmitryjuk M. *Borrelia miyamotoi*-An Emerging Human Tick-Borne Pathogen in Europe. *Microorganisms.* 2021. № 9 (1). P. 154.
4. Podobivskiy S. S. et al. Comparative characteristic of the morpho-physiological parameters biology and epidemiology of ixodidae (Ixodes and Dermacentor). *Deutscher Wissenschaftsberld.* 2018. № 2. P. 10–12.
5. Sándor Szekeres et al. Eco-epidemiology of *Borrelia miyamotoi* and Lyme borreliosis spirochetes in a popular hunting and recreational forest area in Hungary. *Szekeres et al. Parasites & Vectors.* 2015. № 8. P 309.
6. Tomasz Chmielewski, Janusz Fiett, Marek Gniadkowski, Stanisława Tylewska-Wierzbanska. Improvement in the laboratory recognition of lyme borreliosis with the combination of culture and PCR methods. *Mol Diagn.* 2003. № 7 (3–4). P. 155–62.
7. Zuzana Hamšíková et al. *Borrelia miyamotoi* and Co-Infection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* Ticks and Rodents from Slovakia. *Microb Ecol.* 2017. № 73 (4). P. 1000–1008.

O. M. Marchuk, S. S. Podobivskiy, L. Ya. Fedoniuk

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ukraine

OPTIMIZATION OF RESEARCH METHODS OF INFECTIONS TRANSMITTED BY TICKS AND MOSQUITOES

In many European countries, research is being conducted on the presence of various pathogens of infections transmitted by ticks and mosquitoes by various methods, primarily by polymerase chain reaction. These include the study of certain species of spirochetes that cause multisystem disorders in the human body, including the little-known circulation of some species of *Borrelia* species and Ticks Borne Encephalitis Virus in northeastern Germany and the study of various stages of mite development in western Pomerania, Slovenia; study of eco-epidemiology of *B. miyamotoi* spirochetes and Lyme borreliosis in the popular hunting and recreational forest belt of Hungary, comprehensive

studies by T. Chmielewski, J. Fiett, M. Gniadkowski, S. Tylewska-Wierzbanowska in the study of such a multisystem and multilevel disease as Lyme disease.

We performed PCR studies based on ticks and mosquitoes, EDTA blood, cerebrospinal fluid and synovial fluid of patients affected by the bites of these arthropods. Ticks and mosquitoes were suspended and DNA/RNA was extracted depending on the pathogen and amplified. They were aimed mainly at detecting DNA-containing pathogens: *B. burgdorferi s. l.*, (*complex B. sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garini*), *B. miyamotoi*, *A. phagocytophilum*, *E. muris*, *E. chaffeensis*, *B. species* and RNA-containing tick-borne encephalitis virus.

To optimize research methods, a simultaneous combination of detection of all DNA-containing pathogens and a separate study of RNA-containing tick-borne encephalitis virus is used, which facilitates their faster detection. This reduces the time to get results.

In our search, we have chosen to use a unified methodology we developed, which helps to give the results of determinations to clinicians as soon as possible to confirm or refute the diagnosis and monitor the epidemiological situation regarding the infection of ticks and mosquitoes.

The use of our methodology allows us to conduct research to identify pathogens and obtain results in the time allotted for the full cycle of research. It saves time and electricity, the equipment itself is stored during its use.

For the first time, mosquito studies were performed for the presence of DNA fragments of *Babesia species* and RNA of tick-borne encephalitis virus, which gave an intermediate positive result.

Keywords: real-time polymerase chain reaction, transmissible infections, restriction analysis, Nested PCR.

Надійшла 20.08.2021.