

## Techniki molekularne stosowane w identyfikacji gatunków *Toxocara*

## Molecular techniques applied in species identification of *Toxocara*

Renata Fogt

Zakład Biologii i Ochrony Przyrody, Akademia Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego, ul. Królowej Jadwigi 27/39, 61-871 Poznań

**ABSTRACT.** Toxocarosis is still an important and actual problem in human medicine. It can manifest as visceral (VLM), ocular (OLM) or covert (CT) *larva migrans* syndroms. Complicated life cycle of *Toxocara*, lack of easy and practical methods of species differentiation of the adult nematode and embarrassing in recognition of the infection in definitive hosts create difficulties in fighting with the infection. Although studies on human toxocarosis have been continued for over 50 years there is no conclusive answer, which of species — *T. canis* or *T. cati* constitutes a greater risk of transmission of the nematode to man. Neither blood serological examinations nor microscopic observations of the morphological features of the nematode give the satisfied answer on the question. Since the 90-ths molecular methods were developed for species identification and became useful tools being widely applied in parasitological diagnosis. This paper cover the survey of methods of DNA analyses used for identification of *Toxocara* species. The review may be helpful for researchers focused on *Toxocara* and toxocarosis as well as on detection of new species. The following techniques are described: PCR (Polymerase Chain Reaction), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).

**Key words:** PCR, RAPD, RFLP, SSCP, *Toxocara canis*, *T. cati*.

Rodzaj *Toxocara* obejmuje ubikwistyczne nicie nie pasożytnicze, do których należą powszechnie występujące gatunki: glista psia *T. canis* pasożytująca u psa i glista kocia *T. cati* pasożytująca u kota, jak również mniej znane: *T. pteropodis* (u nietoperzy), *T. tanuki* (u psowatych), *T. apodemi* i *T. mackerrasae* (u gryzoni), *T. paradoxura* i *T. sprenti* (u łaszowatych) oraz *T. vajrasthirae* (u łasicowatych) [1]. Gatunki *T. canis* i *T. cati* zwracają od lat dużą uwagę parazytologów z uwagi na możliwość przenoszenia ich na ludzi i wywołanie inwazji zoonotycznej — toksokarozy. Człowiek zaraża się *Toxocara* poprzez przypadkowe połknięcie inwazyjnych jaj, których liczba w glebie jest znaczna z powodu powszechności występowania na świecie żywicieli ostatecznych — psów i kotów. W konsekwencji toksokaroza jest u ludzi stosunkowo częstą inwazją; występuje w skali globalnej u 7–23% ba-

danych, a w tropiku nawet u ponad 80% [2]. W ustroju człowieka uwolniona z jaja larwa wędruje z krwią do różnych narządów, co może być przyczyną choroby ujawniającej się w postaci: zespołu larwy wędrującej trzewnej (VLM), toksokarozy ocznej (OLM) lub toksokarozy ukrytej (CT) [3]. Złożony cykl życiowy *Toxocara*, trudności w diagnozowaniu inwazji u żywicieli, jak również brak metod umożliwiających różnicowanie gatunków tego nicienia gdy występuje w postaci larwy lub jaja sprawiają, że zwalczanie toksokarozy jest ciągle mało skuteczne.

Przez długie lata podstawą określania odrębności gatunkowej *Toxocara* były obserwacje biologii pasożyta oraz cech morfologicznych poszczególnych jego stadiów rozwojowych. Jednakże po roku 1990 nastąpił przełom w tej dziedzinie. W parazytologii, zwłaszcza w systematyce i diagnostyce, zaczęto sto-

sować z coraz lepszym powodzeniem metody molekularne oparte na badaniach DNA. Okazały się one skutecznym narzędziem badawczym, ze względu na czułość i powtarzalność wyników. Wśród tych metod opracowano kilka technik. Jedną z nich była analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP — Restriction Fragment Length Polymorphism) w połączeniu z hybrydyzacją DNA, Southern blot. Technika ta posłużyła m.in. do identyfikacji larw *Anisakis* i *Contracaecum*, a w odniesieniu do *Toxocara* okazała się użyteczna do rozróżnienia *T. canis* od *T. cati* [4–6]. Jednakże ta metoda nie zawsze jest możliwa do zastosowania, choćby z uwagi na konieczność dysponowania stosunkowo dużą ilością materiału badawczego.

Ogromnym postępem w badaniach genetycznych, w tym również w odniesieniu do pasożytów, było opracowanie techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Jest ona szczególnie przydatna kiedy dysponuje się małą ilością materiału do analiz, ponieważ umożliwia uzyskanie licznych kopii fragmentów DNA w bardzo krótkim czasie [7]. Przystępując do identyfikacji pasożytów metodami PCR ważny jest wybór odpowiedniego fragmentu DNA. Amplifikowane DNA powinno zawierać wystarczającą zmienność sekwencji pozwalającą identyfikować pasożyty w obrębie taksonów możliwie niskiego szczebla. Do identyfikowania gatunków i izolatów pasożytów wykorzystuje się różne regiony DNA, takie jak satelitarne DNA (satDNA) [8], mitochondrialne DNA (mt DNA) [9, 10] i rybosomalne DNA (rDNA) [6, 11–14]. Spośród wymienionych regionów DNA, w diagnostyce molekularnej pasożytów najczęściej wykorzystuje się sekwencje komplementarne do DNA kodującego rybosomalny RNA (rDNA), gdyż te rejony eukariotycznego DNA zawierają wielokrotnie powtórzone sekwencje, co ułatwia ich wykrycie nawet przy niewielkiej ilości badanego materiału, i to zapewnia wysoką czułość testu. Natomiast w celu podwyższenia swoistości testu wykorzystuje się najczęściej zewnętrzne lub wewnętrzne transkrybowane sekwencje rozdzielające (ETS oraz ITS) [7]. Najnowsze badania zgodnie pokazują, że wewnętrzne transkrybowane sekwencje rozdzielające — ITS1 i ITS2 rDNA dostarczają solidnych genetycznych markerów do identyfikacji szerokiego spektrum nicieni pasożytniczych [15]. Wiąże się to z faktem, że sekwencje te wykazują duże zróżnicowanie międzygatunkowe oraz wysoką stabilność wewnątrzgatunkową [7]. Warto podkreślić, że wewnątrzgatunkowa zmienność w sekwencjach ITS-1 i ITS-2 jest zwykle mała, choć u przed-

stawicieli niektórych grup pasożytów te rejony rDNA mogą charakteryzować się heterogennością, warunkującą zmienność populacyjną. Startery komplementarne do sekwencji ITS1 i ITS2 zostały między innymi z powodzeniem wykorzystane do zidentyfikowania spokrewnionych i morfologicznie bardzo podobnych gatunków pasożytów. Podobieństwa i różnice w sekwencjach ITS1 i ITS2 w odniesieniu do 15 taksonów *Ascaridida*, w tym dla rodzaju *Toxocara* wykazali Zhu i wsp. [16], a wcześniej Epe i wsp. [17] dowiedli, że sekwencja ITS2 DNA wyizolowanego z *T. canis* bytującego w jelicie lisa rudego, jest identyczna z ITS2 *T. canis* pochodzącego od psa. Na tej podstawie zasugerowali, że lisy mogą stanowić rezerwuar tych nicieni dla psów, a także dla ludzi. Jacobs i wsp. [12] udowodnili na podstawie różnic w sekwencji ITS2, że może ona posłużyć za gatunkowo specyficzny, genetyczny marker dla identyfikacji *T. canis*, *T. cati* i *Toxascaris leonina*. W reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do sekwencji ITS2 *T. canis* otrzymano produkt wielkości 380 bp, w przypadku *T. cati* — 370 bp, a *Toxascaris leonina* 300 bp. Konstruowanie starterów komplementarnych do unikalnych regionów sekwencji ITS2 może znaleźć szerokie zastosowanie w praktyce medycznej i weterynaryjnej oraz w epidemiologii. Warto też wspomnieć, że nie wiadomo, który z nicieni, *T. canis* czy *T. cati*, ma większy udział w wywoływaniu inwazji u ludzi. W badaniach serologicznych polegających na wykrywaniu swoistych przeciwciał anti-*Toxocara* w krwi obwodowej żywiciela, tego problemu nie rozstrzygnięto. Podjęto więc badania pośrednie mające na celu określenie stopnia skażenia gleby jajami każdego z gatunków. Może to mieć istotne znaczenie dla wdrażania właściwych działań na rzecz poprawy warunków sanitarnych gleby. Działania takie winny uwzględniać odmienny behavior psów i kotów — żywicieli ostatecznych. Ostatnio opracowano metodę pozwalającą różnicować techniką PCR gatunki *Toxocara* poprzez badanie DNA zarodka zamkniętego w osłonkach jajowych (Fogt i współ. praca w opracowaniu). W tym celu jaja pasożyta miażdży się mechanicznie na szkiełku mikroskopowym, splukuje na sączek nitrocelulozowy, który rozpuszcza się w acetonie, a następnie izoluje DNA. Każda próba jest identyfikowana reakcją PCR z użyciem starterów specyficznych gatunkowo dla *T. canis* i *T. cati*.

Jednakże należy zwrócić uwagę, że przeprowadzając PCR na matrycy DNA pasożytów wyizolowanych z gleby można spotkać się z problemem

blokowania reakcji przez naturalne inhibitory glebowe [18]. Obecnie można temu zapobiec stosując zestawy do izolacji DNA zawierające odpowiednie antyinhibitory.

Dla potrzeb diagnostyki medycznej opracowano cały szereg modyfikacji reakcji PCR. Taką modyfikacją podnoszącą swoistość i specyficzność testu jest PCR-RFLP. Polega ona na tym, że produkt reakcji PCR jest poddawany działaniu endonukleaz restrykcyjnych, a następnie analizowany elektroforetycznie. Jacobs i wsp. [12] zastosowali ją do odróżniania niektórych gatunków Ascaridoidea — pasożytów psowatych i kotowatych, w tym do identyfikacji *T. canis* i *T. cati*. Powielone fragmenty DNA tych pasożytów trawili enzymami Hinf I i Rsa I. Okazało się, że zamplifikowany fragment DNA *T. canis* i *T. cati* nie ma sekwencji rozpoznawanych przez Hinf I i nie jest cięty przez ten enzym. Natomiast fragmenty DNA spokrewnionych nicieni *Toxascaris leonina*, *Baylisascaris procyonis*, *Ascaris suum* i *A. lumbricoides* ulegają pod wpływem tego enzymu fragmentacji. W ten sposób wykazali, że trawienie enzymem Hinf I rozróżnia *Toxocara* spp. od innych gatunków Ascaridoidea, które mogą występować w ludzkich tkankach. Natomiast enzym Rsa I przecina zamplifikowane fragmenty DNA *T. canis* i *T. cati* w różnych miejscach, co umożliwia jednoznaczny identyfikację gatunków. W przypadku trawienia amplikonów *T. canis* otrzymuje się 2 fragmenty (250 i 290 bp), a *T. cati* 3 fragmenty (110, 160 i 280 bp). Warto dodać, że reakcja PCR przeprowadzona przy użyciu starterów komplementarnych do sekwencji ITS2 tych pasożytów nie amplifikuje DNA ludzkiego, psiego ani kociego, co sprawia, że larwy Ascaridoidea, jak np. *Toxocara*, mogą być wykrywane w materiale biopsyjnym pobranym od ludzi i zwierząt bez konieczności izolacji pasożyta z tkanek. Specyficzny PCR może być wykonywany bezpośrednio na homogenacie tkanki [12]. Tą techniką, na podstawie różnych fragmentów uzyskanych po trawieniu enzymami Hae III i Rsa I, stwierdzono, że wyizolowany w Malezji z organizmu kota nicienia, zaliczany na podstawie cech morfologicznych do gatunku *T. canis*, różni się od *T. canis* czy *T. cati* i określono go jako *Toxocara* sp. cf. *canis* [1]. Produkt amplifikacji *Toxocara* sp. cf. *canis* był trawiony enzymem Hae III na 4 fragmenty (720, 140, 120 i 70 bp), *T. canis* na 2 fragmenty (860 i 200 bp) i *T. cati* na 4 fragmenty (630, 210, 160 i 70 bp). Natomiast enzym Rsa I trawił amplikon *Toxocara* sp. cf. *canis* na 3 fragmenty (670, 280 i 120 bp), *T. canis* na 3 dobrze widoczne (510, 300

i 270 bp) oraz 2 mniej widoczne fragmenty (770 i 400 bp), a *T. cati* na 3 dobrze widoczne (700, 300 i 100 bp) oraz jeden mniej widoczny fragment (360 bp).

Inną modyfikacją PCR jest opracowana przez Williamsa i wsp. [19] losowa amplifikacja polimorficznego DNA (RAPD-PCR, random amplification of polymorphic DNA), która umożliwia wykorzystanie metod molekularnych do wykrywania organizmów w sytuacjach, gdy nie dysponuje się danymi o sekwencjach gatunkowo swoistych genów. Jest to reakcja PCR, w której wykorzystywane są krótkie, przypadkowo dobrane startery, a diagnozy dokonuje się na podstawie wzoru elektroforetycznego produktu [7]. Tę metodę wykorzystali Wu i wsp. [20] konstruując startery, które wykrywały obecność *Toxocara canis* i *cati* nie rozróżniając gatunków nicieni. W przypadku obu nicieni uzyskano jeden fragment wielkości 293 bp. Jednocześnie startery te nie były komplementarne do DNA *Parascaris equorum*, *Ascaris lumbricoides*, *A. lumbricoides suum*, *Anisakis simplex*, *Dirofilaria immitis*, *Trichinella spiralis*, *T. pseudospiralis*, *Cryptosporidium parvum* i *C. muris*. Metodę tę zastosowali Epe i wsp. [17] do porównania genotypu *T. canis* wyizolowanych z jelita lisa oraz psa i stwierdzili brak różnic genetycznych między tymi nicieniami. Technika RAPD-PCR, chociaż jest często wykorzystywana w diagnostyce parazytologicznej, nie jest doskonała, ponieważ ze względu na użycie w niej niespecyficznych, przypadkowych starterów istnieje możliwość koamplifikacji DNA badanego obiektu z DNA pochodzącym z zanieczyszczeń, co może mieć miejsce np. w przypadku izolacji pasożyta z gleby lub organizmu żywiciela.

Techniki genetyczne są ciągle doskonalone i służą nie tylko do identyfikacji gatunkowej ale są także wykorzystywane do wykazania zmienności w obrębie gatunku. Wykrycie indywidualnych zmienności wśród pojedynczych osobników, w tym pasożytniczych nicieni, jest możliwe dzięki określeniu polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego DNA (SSCP — Single Strand Conformation Polymorphism). W tej metodzie wykorzystuje się zależność elektroforetycznej mobilności jednoniciowego DNA w niezdenaturowanym żelu, od jego wielkości i struktury. W roztworach jednoniciowego DNA przyjmuje konformację drugo- i trzeciorzędową poprzez parowanie się komplementarnych zasad między nukleotydami. Te konformacje zależą od długości nici, lokalizacji i liczby miejsc sparowanych, jak również od pierwszorzędowej sekwencji.

Tak więc zmiana nukleotydu w określonym miejscu DNA może zasadniczo zmienić jego całą konformację. W konsekwencji, różnice tak małe jak zmiana jednego nukleotydu w nici DNA, mogą być widoczne w niezdenaturowanym żelu poliakrylamidowym z uwagi na istotną różnicę w mobilności [21].

Techniką SSCP porównano sekwencję ITS2 siedmiu gatunków Ascaridoidea: *Toxocara vitulorum*, *T. cati*, *T. canis*, *Toxascaris leonina*, *Baylisascaris procyonis*, *A. suum* i *Parascaris equorum* i ustalono, że metoda ta może stanowić wiarygodne narzędzie do identyfikacji badanych gatunków oraz ich zmienności populacyjnej. Wykryto różnice w sekwencji ITS 2 z pojedynczych okazów *T. cati* pochodzących z Australii czyli genetyczną zmienność wewnątrzgatunkową tego nicienia [13]. Zhu i Gasser [13] wykazali różnice między gatunkami *T. canis*, *T. cati* oraz *Toxocara* sp. cf. *canis*, który ostatecznie otrzymał nazwę *T. malaysiensis* [22].

Analiza postępu prac nad wykorzystaniem techniki biologii molekularnej w diagnostyce medycznej, weterynaryjnej oraz w epidemiologii wskazuje, że stanowią one cenne i coraz szerzej stosowane narzędzie badawcze w parazytologii. Dostarczają one wartościowych informacji poznawczych i użytkowych, wykorzystywanych w praktyce do zwalczania pasożytów. W odniesieniu do nicienia z rodzaju *Toxocara* przeprowadzone badania molekularne mogą stanowić cenne źródło informacji o geograficznym rozmieszczeniu poszczególnych gatunków tego rodzaju, o udziale poszczególnych gatunków w biologicznym skażeniu gleby, a w konsekwencji może to przyczynić się do skutecznego zwalczania toksokarozy u zwierząt i ludzi.

## Literatura

- [1] Zhu X.Q., Jacobs D.E., Chilton N.B., Sani R.A., Cheng N.A.B.Y. 1998. Molecular characterization of a *Toxocara* variant from cats in Kuala Lumpur, Malaysia. *Parasitology* 117: 155–164.
- [2] Mizgajska H. 2001. Eggs of *Toxocara* spp. in the environment and their public health implications. *Journal of Helminthology* 75: 147–151.
- [3] Pawłowski Z.S., Mizgajska H. 2002. Toksokaroza w Wielkopolsce w latach 1990–2000. *Przegląd Epidemiologiczny* 56: 559–565.
- [4] Sugane K., Qing L., Matsuura T. 1989. Restriction fragment length polymorphisms of Anisakinae larvae. *Journal of Helminthology* 63: 269–274.
- [5] Matsuura T., Sun S., Sugane K. 1992. The identity of *Anisakis* type II larvae with *Anisakis physeteris* confirmed by restriction fragment length polymorphism analysis of genomic DNA. *Journal of Helminthology* 66: 33–37.
- [6] Turčeková L., Dubinský P. 1996. Differentiation between *Toxocara canis* and *T. cati* using restriction profiles and ribosomal gene probe. *Helminthologia* 33: 223–225.
- [7] Wędrychowicz H. 2000. Przydatność metody PCR i jej modyfikacji do diagnozowania inwazji pasożytniczych u przeżuwaczy. *Wiadomości Parazytologiczne* 46: 295–304.
- [8] Grenier E., Castagnone-Sereno P., Abad P. 1997. Satellite DNA sequences as taxonomic markers in nematodes of agronomic interest. *Parasitology Today* 13: 398–401.
- [9] Bowles J., Blair D., McManus D.P. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54: 165–174.
- [10] Bowles J., Hope M., Tiu W.U., Liu X., McManus D.P. 1993. Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. *Acta Tropica* 55: 217–229.
- [11] Gasser R.B., Chilton N.B., Hoste H., Beveridge I. 1993. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Research* 21: 2525–2526.
- [12] Jacobs D.E., Zhu X., Gasser R.B., Chilton N.B. 1997. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Tropica* 68: 191–200.
- [13] Zhu X.Q., Gasser R.B. 1998. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) — based mutation scanning approaches to fingerprint sequence variation in ribosomal DNA of ascaridoid nematodes. *Electrophoresis* 19: 1366–1373.
- [14] Zhu X., Chilton N.B., Jacobs D.E., Boes J., Gasser R.B. 1999. Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology* 29: 469–478.
- [15] Gasser R.B., Chilton N.B., Hoste H., Stevenson L.A. 1994. Species identification of trichostrongyle nematodes by PCR-linked RFLP. *International Journal for Parasitology* 24: 291–293.
- [16] Zhu X., Gasser R.B., Jacobs D.E., Hung G.Ch., Chilton N.B. 2000. Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitology Research* 86: 738–744.
- [17] Epe C., Meuwissen M., Stoye M., Schnieder T. 1999. Transmission trials, ITS2-PCR and RAPD-PCR show identity of *Toxocara canis* isolates from red fox and dog. *Veterinary Parasitology* 84: 101–112.
- [18] Krämer F., Vollrath T., Schnieder T., Epe C. 2002. Improved detection of endoparasite DNA in soil sample PCR by the use of anti-inhibitory substances. *Veterinary Parasitology* 108: 217–226.

- [19] Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535.
- [20] Wu Z., Nagano I., Xu D., Takahashi Y. 1997. Primers for polymerase chain reaction to detect genomic DNA of *Toxocara canis* and *T. cati*. *Journal of Helminthology* 71: 77–78.
- [21] Zhu X.Q., Gasser R.B., Chilton N.B., Jacobs D.E. 2001. Molecular approaches for studying ascaridoid nematodes with zoonotic potential, with an emphasis on *Toxocara* species. *Journal of Helminthology* 75: 101–108.
- [22] Gibbons L.M., Jacobs D.E., Sani R.A. 2001. *Toxocara malaysiensis* n. sp. (Nematoda: Ascaridoidea) from the domestic cat (*Felis catus* Linnaeus, 1758). *Journal of Parasitology* 87: 660–665.

Wpłynęło 26 września 2005

Zaakceptowano 5 stycznia 2006