

## Artykuły przeglądowe

# Wykorzystanie sekwencji genu rRNA w molekularnej diagnostyce parazytologicznej

## Molecular diagnostic of parasites using rRNA gene sequence

Ewa Długosz i Marcin Wiśniewski

Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, Polska

Adres do korespondencji: Ewa Długosz, E-mail: ewa\_plock@yahoo.com

**ABSTRACT.** Ribosomal RNA (rRNA) is a component of the ribosomes. Eukaryotic ribosomes contain four different rRNA molecules: 18S, 5,8S, 28S and 5S rRNA. rRNA is the most conserved (least variable) gene in all cells. For this reason, genes that encode the rRNA (rDNA) are sequenced to identify an organism's taxonomic group, calculate related groups, and estimate rates of species divergence. Especially the internal transcribed spacers (ITS) are very useful for molecular diagnostic of parasite. They are noncoding regions of DNA sequence that separate genes coding for the 28S, 5.8S, and 18S ribosomal RNAs. These ribosomal RNA (rRNA) genes are highly conserved across taxa while the spacers between them may be species-specific. In this paper authors describe practical using of rRNA gene to parasite diagnostic.

**Key words:** Internal Transcribed Spacer, ribosomal RNA gene

### Wstęp

rRNA wraz z białkami tworzy strukturę rybosomu. W skład dużej i małej podjednostki rybosomu wchodzi swoiste łańcuchy rRNA. U Eukaryota 18S rRNA wchodzi w skład małej podjednostki, a 5S, 5,8S i 28S rRNA dużej podjednostki. Geny kodujące 5,8S, 18S i 28S rRNA tworzą wspólną jednostkę transkrypcyjną, która jest transkrybowana przez RNA polimerazę I. Powstanie dojrzałych cząsteczek 18S, 5,8S i 28S polega na przetworzeniu długiej (45S RNA o długości 12,5 kb u ssaków) cząsteczki prekursorowej przez serię skomplikowanych reakcji [1–3]. U większości *Eukaryota* jednostka ta jest tandemowo powtórzona w genomie. Pierwotny transkrypt jednostki powtarzającej się zawiera kolejno ułożone geny 18S, 5,8S i 28S rRNA rozdzielone sekwencjami ITS (internal transcribed spacer), ITS1 pomiędzy 18S rRNA i 5,8S rRNA oraz ITS2 pomiędzy 5,8S i 28S rRNA. Końce 5' i 3' pierwotnego transkryptu są przedłużone o dodatkowe se-

kwencje tzw. ETS (external transcribed spacer) [4]. Scharakteryzowano również region IGS (intergenic spacer), który rozdziela rRNA dużej podjednostki rybosomu (LSU) (kodujący 5,8S i 28S rRNA) jednego powtórzenia od rRNA małej podjednostki (SSU) (kodujący 18S rRNA) sąsiedniego powtórzenia. IGS zawiera miejsce inicjacji transkrypcji, które wyznacza początek 5'ETS [3]. Opisano między innymi IGS pierwotniaka *Crithidia fasciculata*, który jest heterogenny pod względem długości, zawiera tandemowo powtórzone kopie 19 nukleotydowej sekwencji i 4 kopie 55 nukleotydowego powtórzenia [3].

Geny kodujące rRNA (18S, 5,8S, 26S) są wysoce homologiczne i wykazują podobieństwo nawet między odległymi ewolucyjnie organizmami. Natomiast regiony ITS ewoluowały znacznie szybciej i wykazują duże zmiany w długości i zawartości zasad GC pomiędzy odległymi Eukaryotami [3, 5]. Długie domeny o bardzo dużej homologii są często przemieszane z regionami o bardzo niskiej bądź ze-

<i>A. caninum</i>	TAGCTTCAGCGATGGATCGGTCGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCTAGCTGCGTTA	60
<i>A. ceylanicum</i>	TAGCTTCAGCGATGGATCGGTCGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCTAGCTGCGTTA	60
<i>A. braziliense</i>	TAGCTTCAGCGATGGATCGGTCGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCTAGCTGCGTTA	60
<i>U. stenocephala</i>	TAGCTTCAGCGATGGATCGGTCGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCTAGCTGCGTTA	60
<i>N. americanus</i>	TAGCTTCAGCGATGGATCGGTCGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCTAGCTGCGTTA	60
	*****	
<i>A. caninum</i>	TTTACCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTGAAATTTTGAACGCATAGCGCCGTTGGGT	120
<i>A. ceylanicum</i>	TTTACCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTGAAATTTTGAACGCATAGCGCCGTTGGGT	120
<i>A. braziliense</i>	TTTACCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTGAAATTTTGAACGCATAGCGCCGTTGGGT	120
<i>U. stenocephala</i>	TTTACCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTGAAATTTTGAACGCATAGCGCCGTTGGGT	120
<i>N. americanus</i>	TTTACCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTGAAATTTTGAACGCATAGCGCCGTTGGGT	120
	*****	
<i>A. caninum</i>	TTTCCCTTCGGCACGTCTGGTTCAGGGTTGT	
<i>A. ceylanicum</i>	TTTCCCTTCGGCACGTCTGGTTCAGGGTTGT	
<i>A. braziliense</i>	TTTCCCTTCGGCACGTCTGGTTCAGGGTTGT	
<i>U. stenocephala</i>	TTTCCCTTCGGCACGTCTGGTTCAGGGTTGT	
<i>N. americanus</i>	TTTCCCTTCGGCACGTCTGGTTCAGGGTTGT	
	*****	

Rys. 1. Porównanie sekwencji nukleotydowych genu 5,8S rRNA dostępnych w bazie danych NCBI wybranych nicieni z rodziny Ancylostomatidae (w nawiasie umieszczono numer dostępu): *Ancylostoma caninum* (Z70739), *Ancylostoma ceylanicum* (Z70740), *Ancylostoma braziliense* (DQ438069), *Uncinaria stenocephala* (AF 217891), *Necator americanus* (AF217891). Gwiazdką oznaczono nukleotydy identyczne w sekwencji. Porównanie wykonano programem ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)

Fig. 1. Alignment of nucleotide sequences of 5.8 rRNA gene of Ancylostomatidae nematodes from NCBI database (accession numbers in brackets): *Ancylostoma caninum* (Z70739), *Ancylostoma ceylanicum* (Z70740), *Ancylostoma braziliense* (DQ438069), *Uncinaria stenocephala* (AF 217891), *Necator americanus* (AF217891). Nucleotides identical in all sequences are marked with asterisks. Alignment was done using ClustalW program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)

rowej homologii (Rys. 1, 2).

Na Rys. 1 można zaobserwować 100% homologię w sekwencji kodującej 5,8S rRNA wybranych nicieni z rodziny Ancylostomatidae. Z kolei zestawienie sekwencji ITS1 tych samych pasożytów, pokazuje wyraźne różnice w zapisie DNA. Stąd też rybosomalny DNA jest bardzo użyteczny do celów diagnostycznych. W diagnostyce molekularnej wykorzystywane są głównie sekwencje ITS, ponieważ regiony te są jednymi z najbardziej zróżnicowanych loci [6]. Istnieje wiele doniesień naukowych potwierdzających użyteczność regionów ITS w diagnostyce molekularnej pasożytów. Uważa się, że zapis sekwencji ITS stanowi pewnego rodzaju odbicie ewolucyjnych zmian zachodzących w organizmie. Każdemu gatunkowi, a często nawet konkretnym szczepom, można przypisać swoisty dla niego zapis sekwencji nukleotydowej tego regionu rDNA, co praktycznie stanowi swoisty dla niego znacznik.

Głównym celem tej pracy jest pokazanie wykorzystania zapisu sekwencji ITS w diagnostyce na przykładzie wybranych inwazji pasożytniczych.

## Wykorzystanie rDNA w diagnostyce parazytologicznej

Inwazje nicienie żołądkowo-jelitowych to najważniejszy problem w hodowli przeżuwaczy na całym świecie. Tylko w Stanach Zjednoczonych straty powodowane przez te pasożyty są szacowane na 2 miliardy dolarów rocznie. Szybka i dokładna identyfikacja gatunków pasożytujących w danym stadzie pozwoli na efektywną kontrolę inwazji, na zahamowanie transmisji pasożytów i zmniejszenie strat hodowców. Również ustalenie odpowiedniego leczenia jest ważne z punktu widzenia konsumentów, którzy obawiają się zbyt dużych pozostałości leków w mięsie oraz z powodu szerzącej się wśród pasożytów lekooporności [7]. Istnieją trudności w dokładnej diagnozie gatunków nicieni żołądkowo-jelitowych na podstawie różnic morfologicznych jaj pasożytów, stąd poszukiwania szybkich i skutecznych molekularnych metod identyfikacji pasożytów. Zarlenga i wsp. [7] opracowali test wykorzystujący multiplex PCR do różnicowania pięciu ważnych nicieni żołądkowo-jelitowych bydła w Sta-

<i>A. ceylanicum</i>	GTCTGAAGCCAAATAATGGTTCCTT-TGATCCTGAGAAACCAACGTGCTAGTCT---TCAC	56
<i>A. braziliense</i>	-----ACGTGCTAGTCT---TCAC	16
<i>A. caninum</i>	-----GGTTCCTT-TGATCCTGAGAAAC-AACGTGCTAGTCT---TCAC	39
<i>U. stenocephala</i>	-----GGTTCCTT-TGATCCTGAGAAACCAACGTGCTAGTCT---TCAC	40
<i>N. americanus</i>	-TCGAAACCTTCTATGGTTTATTTCATGATCTAGAGAAACCAACACGCTAGTGTGATTCAC	59
	* * * * *	
<i>A. ceylanicum</i>	GACTTTGTCGGGAAG---GTTGGGAGTATCGCCC-CCGTTATAGCCCTTCTGTAAGGTGT	112
<i>A. braziliense</i>	GACTTTGTCGGGAAG---GTTGGGAGTATCGCCC-CCGTTATAGCCCTTCTGTAAGGTGT	72
<i>A. caninum</i>	GACTTTGTCGGGAAG---GTTGGGAGTATCGCCCACCGTTACAGCCCTA-TGTAAGGTGT	95
<i>U. stenocephala</i>	GACTTTGTCGGGAAG---GTTGGGAGTATCGCCC-CCCTTTGAGCCCAA-CGTGAGGTGT	95
<i>N. americanus</i>	GACTTTGTCGTGTAATAAGTTGGGAGTATCACCACCTTTTGTAGCCCAA-TGTGAGGTGT	118
	***** * * * * ***** * * * * ***** * * * * *****	
<i>A. ceylanicum</i>	CTATGTACAGCATGAGTCGTTT-----CTGGGTGGCGGCAGTGATTGCTTGTA	160
<i>A. braziliense</i>	CTATGTACAGCATGAGTCGTTT-----CTGGGTGGCGGCAGTGATTGCTTGTA	120
<i>A. caninum</i>	CTATGTGCAGCAAGAGTCGTTA-----CTGGGTGGCGGCAGTGATTGCT-GTG	142
<i>U. stenocephala</i>	CTATGTGCAGCAAGAGCCGTTT-----CTGGGTGGCGGCAGTGATTGCT-GTG	142
<i>N. americanus</i>	CTATGCTTGGCAAGAGTCGTTTACTGTATGTTGGTTGGGTGACGGCTATGATTGCTTG-G	177
	***** *	
<i>A. ceylanicum</i>	CGAAGCTCGCGG-----TTTCGTC-----	180
<i>A. braziliense</i>	CGAAGCTCGCGG-----TTTCGTC-----	140
<i>A. caninum</i>	CGAAGTTCGCG-----TTTCGCT-----	160
<i>U. stenocephala</i>	CGAAGTTCGCG-----TTTCGCT-----	160
<i>N. americanus</i>	CAAAGTTCGCTGTACGTGTGATGTGTCGTGTGCATTGCGTTAACATTGTATACCTGT	237
	* *	
<i>A. ceylanicum</i>	-----GAGCTTTAGACTTGATGAGCATTGCTAGAATGCCGCCTTA	220
<i>A. braziliense</i>	-----GAGCTTTAGACTTGATGAGCATTGCTAGAATGCCGCCTTA	180
<i>A. caninum</i>	-----GAGCTTTAGACTTGATGAGCATTGCATGAATGCCGCCTTA	200
<i>U. stenocephala</i>	-----GAGCTTTAGACTTGATGAGCATTGCTGGAATGCCGCCTTA	200
<i>N. americanus</i>	ACATACGCATGAATACAGTGAAGCTTATGACTTGATGAGCATTGCTGGAATGCCGCCTCA	297
	***** ***** ***** ***** ***** * * * * *	
<i>A. ceylanicum</i>	CSTGCTTGTTGGTGGTTGAGCGCTAGGC--TAAC--GCCTGGTGGCGCACCTGTCT--	274
<i>A. braziliense</i>	CCTGCTTGTTGGTGGTTGAGCGCTAGGC--TAAC--GCCTGGTGGCGCACCTGTCT--	234
<i>A. caninum</i>	C-TGCTTGTTGGTGGTTGAGCATTAGGC--TAAC--GCCTGATGGCGCACCTGTCT--	253
<i>U. stenocephala</i>	C-TGTTTGTTGGTGGTTGGGCATTAGCGGCAAC--GTCTGGTGGCGCACCTGTTT--	255
<i>N. americanus</i>	A-TTTTTGTATTGGTGGTTGGACACACACATAACTTGTGTGGTGGTACCTGTCTT	356
	* *	
<i>A. ceylanicum</i>	---GTCAGGAAACCTTAATGATC-----TGCTAAC-----	301
<i>A. braziliense</i>	---GTCAGGAAACCTTAATGATC-----TGCTAAC-----	261
<i>A. caninum</i>	---GTCAGGAAACCTTAATGATC-----TGCTAAC-----	280
<i>U. stenocephala</i>	---GTCAGGAAACCTTAATGATC-----TGCTAAC-----	282
<i>N. americanus</i>	GTGATCAGGAAACGTTAATGATCCTTCACATGTTAACCAATAATGCGCGCTACGTGTTAT	416
	***** *	
<i>A. ceylanicum</i>	-----GCGGACGCCAGCACAG--CAATAACTTTTAAACGTTTAAATGT	340
<i>A. braziliense</i>	-----GCGGACGCCAGCACAG--CAATAACTTTTAAACGTTTAAATGT	300
<i>A. caninum</i>	-----GCGGACGCCAGTACAG--CAATAACTTTTACGTTTAAATGT	319
<i>U. stenocephala</i>	-----GTGGACGCCAATACAG--CAATAACTTTTACGTTTAAATGT	321
<i>N. americanus</i>	GGTGGATGGGACAATATGTGTGGACGCCAACACAAAATATTAACCTTTTACATTTGATGT	476
	* *	
<i>A. ceylanicum</i>	TTGCAGA--ATCGTGACGTTAT-----GTCACAATCGA-----	371
<i>A. braziliense</i>	TTGCAGA--ATCGTGACGTTAT-----GTCACAATCGA-----	331
<i>A. caninum</i>	TTGCAGA--ATCGTGACTTTAC-----GTCACAATCGA-----	350
<i>U. stenocephala</i>	TTGCAGA--ATCGTGACTTTAT-----GTCACAA-----	348
<i>N. americanus</i>	TTGCAGATGATCGTGACTTCATCTTAGTCGTACATTAGACTCGA	521
	***** *	

Rys. 2. Porównanie sekwencji nukleotydowych ITS1 dostępnych w bazie danych NCBI wybranych nicieni z rodziny Ancylostomatidae (w nawiasie umieszczono numer dostępu): *Ancylostoma ceylanicum* (Z70740), *Ancylostoma braziliense* (DQ438069), *Ancylostoma caninum* (Z70739), *Uncinaria stenocephala* (AF 217891), *Necator americanus* (AF217891). Gwiazdką oznaczono nukleotydy identyczne w sekwencji. Porównanie wykonano programem ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)

Fig. 2. Alignment of nucleotide sequences of ITS1 of Ancylostomatidae nematodes from NCBI database (accession numbers in brackets): *Ancylostoma ceylanicum* (Z70740), *Ancylostoma braziliense* (DQ438069), *Ancylostoma caninum* (Z70739), *Uncinaria stenocephala* (AF 217891), *Necator americanus* (AF217891). Nucleotides identical in all sequences are marked with asterisks. Alignment was done using ClustalW program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)

nach Zjednoczonych. Zaprojektowali pięć par starterów w oparciu o sekwencje wewnętrznych (ITS) i zewnętrznych (ETS) sekwencji transkrybowanych rDNA oraz fragment końca 3' rDNA małej podjednostki rybosomu i końca 5' rDNA dużej podjednostki. Efektem jednoczesnego użycia tych starterów w reakcji PCR na matrycy DNA pochodzącego z jaj pasożytów oczyszczonych z kału bydła było uzyskanie specyficznego układu elektroforetycznego prążków. Każdy z prążków był charakterystyczny dla danego gatunku: *Ostertagia ostertagi* (257 pz), *Haemonchus placei* (176 pz), *Oesophagostomum radiatum* (329 pz), *Trichostrongylus colubriformis* (243 pz) i *Cooperia oncophora* (151 pz).

Opracowano również test pozwalający na identyfikację *Mecistocirrus digitatus*, jednego z najbardziej powszechnych pasożytniczych nicieni bydła w krajach azjatyckich obok *O. ostertagi* i *C. oncophora* [6]. Reakcja PCR ze starterami obejmującymi fragment rDNA pomiędzy ITS1 a ITS2 pozwala również na odróżnienie *M. digitatus* od innych nicieni żołądkowo-jelitowych.

Do analizy rDNA oprócz PCR używane są inne techniki biologii molekularnej, np. SSCP (single-strand conformation polymorphism). Zasada SSCP polega na różnicy w mobilności elektroforetycznej w niedenaturującym żelu jednoniciowej cząsteczki DNA. Jednoniciowa cząsteczka przyjmuje w roztworze wodnym drugo- i trzeciorzędowe konformacje, zależne od jej długości, liczby i położenia miejsc parowania zasad, a więc od jej sekwencji nukleodtydowej. Dzięki temu na żelu rozdzielone mogą zostać cząsteczki różniące się tylko jednym nukleotydem [8]. Analiza sekwencji ITS1 i ITS2 za pomocą techniki SSCP jest z powodzeniem stosowana do identyfikacji gatunków i szczepów pasożytów, które nie mogą być rozróżnione na podstawie cech morfologicznych [8–10]. Gasser i wsp. [9] użyli SSCP do rozróżnienia dwóch pasożytów świń: *Oesophagostomum denatum* i *O. quadrispinulatum* poprzez analizę ITS2. W podobny sposób zidentyfikowano i rozróżniono między sobą siedem gatunków tęgoryjców: *Ancylostoma caninum*, *A. tubaeforme*, *A. ceylanicum*, *A. duodenale*, *Uncinaria stenocephala*, *Bunostomum trigonocephalum* i *Necator americanus* [10].

W oparciu o ewolucyjnie konserwatywną sekwencję genu 18S rRNA zaprojektowano startery do amplifikacji charakterystycznego fragmentu dla *Babesia canis*, przenoszonego przez kleszcze groźnego dla psów pierwotniaka, powodującego babeszjozę [11]. Analiza PCR wykazała obecność pier-

wotniaka w krwi badanych psów z terenu Warszawy. Analiza porównawcza sekwencji uzyskanych produktów z innymi dostępnymi w bazie danych wykazała, że badany pasożyt należy do szczepu *Babesia canis canis*. W podobny sposób potwierdzono obecność *B. canis canis* u psów na Węgrzech [12].

Dzięki różnicom w sekwencji ITS1 można identyfikować dwa gatunki kokcydiów o bardzo podobnej morfologii: *Toxoplasma gondii* i *Hammondia hammondi*. Mimo wielu podobieństw gatunki te różnią się patogennością, *T. gondii* jest ważnym patogenem ludzi i zwierząt, natomiast *H. hammondi* nie jest chorobotwórczy. Sreekumar i wsp. [13] opracowali, w oparciu o sekwencje ITS1, trzy zestawy starterów: pierwszy charakterystyczny dla *T. gondii*, *H. hammondi*, *H. heydorni* i *Neospora caninum*, drugi specyficzny dla *H. hammondi*, oraz trzeci, charakterystyczny dla *T. gondii*. Za pomocą pierwszej pary diagnozowana jest obecność pierwotniaków z rodziny *Toxoplasmatidae* (prążek o długości 400 pz), drugiej pary — inwazja *H. hammondi* (339 pz), a za pomocą trzeciej pary — *T. gondii* (294 pz).

Jednymi z najgroźniejszych pasożytów na ziemi są pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium* wywołujące malarię. Tradycyjne metody diagnozowania malarii — mikroskopia świetlna oraz alternatywne testy serologiczne — są czasochłonne, mniej specyficzne i mniej czułe od technik molekularnych oraz często nie określają dokładnie gatunku pasożyta [14]. Opracowano wiele testów opierających się na sekwencji genu 18S rRNA *Plasmodium* spp. wykorzystujących PCR bądź polimorfizm pojedynczej nici RNA (SSCP) [15–17]. Jednakże testy oparte na technice PCR często wymagają wielu analiz wykonanych na jednej próbce, analizy różnych produktów PCR, a także nie dają informacji na temat intensywności inwazji. Aby wyeliminować te trudności Perandin i wsp. [14] wykorzystali technikę Real-time PCR do diagnostyki malarii. Technika ta oparta jest na znacznikach fluorescencyjnych używanych do monitorowania przyrostu produktu reakcji w czasie rzeczywistym. Zastosowanie starterów komplementarnych do sekwencji genu 18S rRNA umożliwiło skuteczną diagnozę i rozróżnienie trzech gatunków zarodźca: *P. falciparum*, *P. vivax* i *P. ovale*. Zastosowanie Real-time PCR pozwoliło również na szacunkowe oznaczenie liczby pasożytów w krwi badanych pacjentów.

Testy molekularne opierające się na różnicach w rybosomalnym RNA są często wykorzystywane do rozróżniania gatunków o bardzo podobnej mor-

fologii, jak w przypadku dwóch gatunków ameb: *Entamoeba histolytica* i *E. dispar*. Jedynie *E. histolytica* jest patogenem, ale ponieważ gatunki te trudno rozróżnić, stosuje się leki w przypadku obu inwazji, choć tylko 10% to inwazje chorobotwórczego gatunku [18]. Gatunki te można także rozróżnić na podstawie analizy izoenzymów lub z użyciem specyficznych przeciwciał monoklonalnych, ale stosowanie wymienionych metod zajmuje dużo czasu. Gonin i Trudel [18] opracowali test PCR do rozróżnienia *E. histolytica* i *E. dispar*. Wynikiem reakcji z użyciem starterów komplementarnych do RNA małej podjednostki rybosomu (SSU rRNA) były produkty o charakterystycznej długości: 240 pz dla *E. dispar* i 266 pz dla *E. histolytica*.

Testy molekularne są przydatne wtedy, gdy inwazję pasożytów trudno zdiagnozować tradycyjnymi metodami. Czułość mikroskopowego badania kału pod kątem obecności *Giardia intestinalis* wynosi od 50 do 70% z powodu nieregularnego wydalania z kałem cyst lub trofozoitów pierwotniaka oraz niewystarczających umiejętności personelu [19]. Użycie czulej metody molekularnej może wielokrotnie poprawić ten wynik. Gosh i wsp. [19] użyli dwóch par starterów do diagnostyki *G. intestinalis* w kale pacjentów metodą nested PCR. Pierwsza para obejmowała region IGS o długości 552 pz. Następnie w celu zwiększenia czułości reakcję przeprowadzono z drugą parą starterów komplementarnych do wewnętrznej sekwencji pierwszego produktu i uzyskano prążek o długości 320 pz. Autorzy potwierdzili wyższość nested PCR nad mikroskopią i technikami serologicznymi do identyfikacji tego pierwotniaka.

Tasiemce *Taenia solium* i *T. saginata* mają ważne znaczenie w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej. Pierwszy gatunek powoduje cysticerkozę trzody chlewnej, drugi bydła. Żywicielem ostatecznym obu gatunków jest człowiek. Szczególnie groźne dla człowieka jest zarażenie jajami *T. solium*, ponieważ prowadzi ono do wągrzycy ośrodkowego układu nerwowego. Stwierdzone w kale człowieka człony tasiemców *T. solium* i *T. saginata* są do siebie podobne, dlatego szuka się skutecznych metod identyfikacji. Dokładne rozpoznanie nosicieli *T. solium* jest istotne, ponieważ są oni źródłem jaj tasiemca, które dostawszy się do układu pokarmowego ludzi z otoczenia chorego mogą powodować neurocysticerkozę. Również u nosicieli, w wyniku autoinwazji, może dojść do rozwoju wągrzycy. Gonzalez i wsp. [20] badali zastosowanie PCR z użyciem starterów opartych o sekwencje ITS1 i ITS2 tasiem-

ców w celu rozróżnienia członów *Taenia* spp. uzyskanych z kału pacjentów. Metoda ta pozwoliła na szybką i czułą identyfikację gatunkową nawet w przypadku zniszczonych i pofragmentowanych członów pasożyta. Autorzy pracy wykorzystali również sekwencje ITS do zbadania różnic wewnątrzgatunkowych tasiemców izolowanych w odległych rejonach geograficznych. Do tego celu użyli techniki PCR-RFLP (polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych), produkty PCR trawili enzymami czterotnącymi. Nie wykazano różnic wewnątrz gatunku *T. solium*, jedynie izolat *T. saginata* z Kenii różnił się od innych tasiemców tego gatunku pochodzących z Hiszpanii i Meksyku.

Innym groźnym dla ludzi tasiemcem jest *Echinococcus granulosus*. Istnieje wiele szczepów tego tasiemca, które wykazują różnorodność morfologiczną, rozwojową i różnych żywicieli. Różnorodność tę potwierdziły badania molekularne, oparte między innymi na analizie rybosomalnego RNA; rozpoznano 10 szczepów G1-G10 [21, 22]. U ludzi zanotowano w większości inwazje szczepów G1 i kilka przypadków G5 i G6, lecz brakuje ilościowych danych na temat inwazji poszczególnych szczepów [21]. Nie ma również danych na temat ich rozprzestrzenienia geograficznego i znaczenia szczepów z medycznego punktu widzenia. Dinkel i wsp. [22] opracowali test rozróżniający szczepy G1, G5, G6 i G7 *E. granulosus* opierający się na sekwencji mitochondrialnego genu 12S rRNA, który może być przydatny do szybkiej diagnostyki dużej ilości próbek.

Metodami molekularnymi można również wykryć obecność pasożytów w żywicielach pośrednich. Magalhaes i wsp. [23] opracowali multiplex-PCR do wykrywania przywry *Fasciola hepatica* w ślimakach *Lymnaea columella*. Pasożyt ten występuje na całym świecie, atakuje wiele gatunków zwierząt gospodarskich (bydło, owce, kozy), powodując duże straty ekonomiczne. Identyfikacja przywry w żywicielu pośrednim ma znaczenie epidemiologiczne w kontroli rozprzestrzeniania się choroby oraz monitorowania czystości pastwisk. Autorzy testu opracowali trzy pary starterów, pierwsza para komplementarna do fragmentu mitochondrialnego DNA *F. hepatica* zawierającego tandemowe powtórzenie 85 nukleotydowej sekwencji, druga do fragmentu ITS rDNA *F. hepatica* i trzecia do fragmentu ITS ślimaka *L. columella* (produkt ten służył jako kontrola testu).

Powyższe przykłady dowodzą ogromnej przydatności znajomości sekwencji rDNA pasożytów

w opracowywaniu i wykonywaniu testów diagnostycznych inwazji pasożytniczych metodami molekularnymi, które, jak pokazuje rzeczywistość, coraz częściej wypierają, bądź uzupełniają metody klasyczne.

## Literatura

- [1] Perry R.P. 1976. Processing of RNA. *Annual Review of Biochemistry* 45: 605–62.
- [2] Michot B., Bachellerie J.P., Raynal F. 1983. Structure of mouse rRNA precursors. Complete sequence and potential folding of the spacer regions between 18S and 28S rRNA. *Nucleic Acids Research* 11: 3375–3391.
- [3] Schnare N.M., Collings J.C., Spencer D.F., Gray M.W. 2000. The 28S–18S rDNA intergenic spacer from *Crithidia fasciculata*: repeated sequences, length heterogeneity, putative processing sites and potential interactions between U3 small nucleolar RNA and the ribosomal RNA precursors. *Nucleic Acids Research* 28: 3452–3461.
- [4] van Nues R.W., Rientjes J.M.J., van der Sande C.A.F.M., Zerp S.F., Sluiter C., Venema J., Planta R.J., Raue H.A. 1994. Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct the formation of 17S and 26S rRNA. *Nucleic Acids Research* 22: 912–919.
- [5] Veldman G.M., Klootwijk J., Van Heerikhuizen H., Planta R.J. 1981. The nucleotide sequence of the intergenic region between the 5.8S and 26S rRNA genes of the yeast ribosomal RNA operon. Possible implications for the interaction between 5.8S and 26S rRNA and the processing of the primary transcript. *Nucleic Acids Research* 9: 4847–4862.
- [6] Mochizuki R., Endoh D., Onuma M., Fukumoto S. 2006. PCR-based species-specific amplification of ITS of *Mecistocirrus digitatus* and its application in identification of GI nematode eggs in bovine feces. *Journal of Veterinary Medicine Science* 68: 345–351.
- [7] Zarlenga D.S., Chute M.B., Gasbarre L.C., Boyd P.C. 2001. A multiplex PCR assay for differentiating economically important gastrointestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology* 97: 199–209.
- [8] Gasser R.B., Chilton N.B. 2001 Applications of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to taxonomy, diagnosis, population genetics and molecular evolution of parasitic nematodes. *Veterinary Parasitology* 101: 201–213.
- [9] Gasser R.B., Woods W.G., Bjorn H. 1998. PCR-based SSCP to distinguish *Oesophagostomum dentatum* from *O. quadrispinulatum* developmental stages. *International Journal for Parasitology* 28: 1903–1909.
- [10] Gasser R.B., Monti J.R., Qian B.Z., Polderman A.M., Nansen P., Chilton N.B. 1998. A mutation scanning approach for the identification of hookworm species and analysis of population variation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 92: 303–312.
- [11] Sobczyk A.S., Kotomski G., Górski P., Wędrychowicz H. 2005. Usefulness of touch-down PCR assay for the diagnosis of atypical cases of *Babesia canis canis* infections in dogs. *The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 49: 407–410.
- [12] Foldvari G., Hell E., Farkas R. 2005 *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. *Veterinary Parasitology* 127: 221–226.
- [13] Sreekumar C., Vianna M.C.B., Hill D.E., Miska K.B., Lindquist A., Dubey J.P. 2005. Differential detection of *Hammondia hammondi* from *Toxoplasma gondii* using polymerase chain reaction. *Parasitology International* 54: 267–269.
- [14] Perandin F., Manca N., Calderaro A., Piccolo G., Galati L., Ricci L., Medici M.C., Arcangeletti M.C., Snounou G., Dettori G., Chezzi C. 2004. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1214–1219.
- [15] Snounou G., Viryakosol S., Zhu X.P., Jarra W., Pimheiro L., Rosario V.E., Thaithong S. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* 61: 315–320.
- [16] Kawamoto F., Miyake H., Kaneko O., Kimura M., Dung N.T., Liu Q., Zhou M., Duc Dao L., Kawai S., Isomura S., Wataya Y. 1996. Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from Southern Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2287–2289.
- [17] Seesod N., Nopparar P., Hedrum A., Holder A., Thaithong S., Uhlen M., Lundeburg J. 1997. An integrated system using immuno-magnetic separation, polymerase chain reaction, and colorimetric detection for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 56: 322–328.
- [18] Gonin P., Trudel L. 2003. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 237–241.
- [19] Ghosh S., Debnath A., Sil A., De S., Chattopadhyay D.J., Das P. 2000. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. *Molecular and Cellular Probes* 14: 181–189.
- [20] Gonzalez L.M., Montero E., Puente S., Lopez-Velez R., Hernandez M., Sciutto E., Harrison L.J.S., Michael R., Parkhouse E., Garate T. 2002. PCR tools for the differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis from different geogra-

- phical locations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 42: 243–249.
- [21] Eckert J., Thompson R.C.A. 1997. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Tropica* 64: 19–34.
- [22] Dinkel A., Njoroge E.M., Zimmermann A., Walz M., Zeyhle E., Elmahdi I.E., Mackenstedt U., Romig T. 2004. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *International Journal for Parasitology* 34: 645–653.
- [23] Magalhaes K.G., Jannotti Passos L.K., dos Santos Carvalho O. 2004. Detection of *Lymnaea columella* Infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 421–424.

Wpłynęło 10 lipca 2006

Zaakceptowano 23 sierpnia 2006