

MONIKA KOZAK-CIĘSZCZYK

*Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN
Twarda 51/55, 00-818 Warszawa
e-mail: mkozak@twarda.pan.pl*

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA W PARAZYTOLOGII

WSTĘP

Metody diagnostyczne wykorzystujące kwasy nukleinowe do identyfikacji pasożytów zostały opracowane w okresie ostatnich dwudziestu kilku lat, odpowiadających okresowi największego rozwoju technik biologii molekularnej. Udoskonalanie tych metod postępuje nadal prowadząc do coraz większej czułości oraz możliwości badania olbrzymiej ilości prób w stosunkowo niedługim czasie. W chwili obecnej do dyspozycji parazytologa jest szerokie spektrum narzędzi diagnostycznych umożliwiających prowadzenie badań na wielu różnych płaszczyznach co pozwala precyzyjnie dobrać metodę do poszukiwanej odpowiedzi.

Choć kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) wykryto już w 1869 r., jego rolę jako przekaznika informacji genetycznej potwierdzono dopiero w 1944 r. Natomiast rozwój biologii molekularnej i biotechnologii był możliwy dopiero po odkryciu jego struktury przez Watsona i Cricka w 1953 r. Poznanie naturalnych procesów związanych z odczytywaniem i przekazywaniem informacji genetycznej, a więc transkrypcji, translacji i replikacji, umożliwiło naśladowanie tych procesów *in vitro*, co dało początek wielu metodom diagnostycznym i biotechnologicznym.

Identyfikacji organizmu na podstawie jego materiału genetycznego ma pewne zalety nad metodami wcześniejszymi, opartymi na morfologii lub serologii. Znalezienie DNA pasożyta jest bezpośrednim dowodem jego obecności. Często gatunki pasożytów

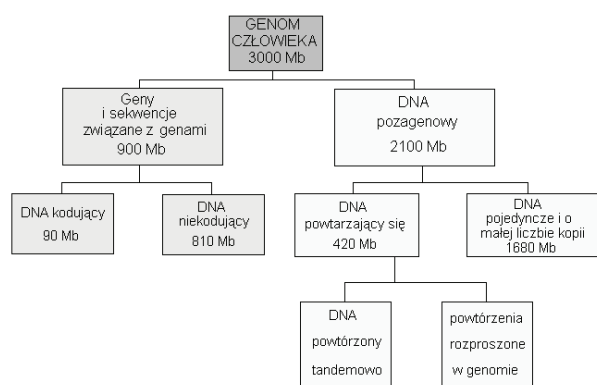
pasożytów w obrębie jednego rodzaju są morfologicznie trudne do odróżnienia lub tylko niektóre stadia rozwojowe umożliwiają różnicowanie gatunku. Metody mikroskopowe często wymuszają oglądanie dużej liczby prób, mogą być mało obiektywne, uzależnione od wprawy oglądającego. Metody serologiczne, poszukują specyficznych antygenów lub przeciwciał. Tu problemem może być specyficzność stadialna niektórych antygenów pasożytniczych, a częsta zmiana właściwości antygenowych jest chętnie wykorzystywaną przez pasożyty strategią unikania ataku ze strony układu immunologicznego żywiciela. Przeciwciała, natomiast, mają tę wadę, że są pośrednim dowodem obecności patogenu, a właściwie są śladem kontaktu żywiciela z pasożytem i mogą pozostawać długo po jego usunięciu. Metody biologii molekularnej cechuje bardzo duża czułość, a specyficzność może być dobrana w zależności od potrzeb, na różnych poziomach taksonomicznych (McKEAND 1998). Metody molekularne nie są też pozbawione wad. Przede wszystkim ich wysoka czułość stwarza możliwość powstawania wyników fałszywie dodatnich, co wymusza szczególną ostrożność przy ich stosowaniu, a uzyskane wyniki muszą być weryfikowane (ALTWEG 1995).

Celem tego artykułu jest przedstawienie najistotniejszych metod molekularnych stosowanych w parazytologii, możliwe ich zastosowania oraz korzyści z tego wynikające.

METODYKA

POSZUKIWANE SEKWENCJE

Większość metod diagnostycznych polega na poszukiwaniu specyficznej sekwencji w genomie pasożyta. Genom, a więc całość informacji genetycznej organizmu, jest niejednorodny, podzielony na obszary zróżnicowane funkcjonalnie. Podział ten jest przedstawiony na Ryc. 1, z której wyraźnie wynika, że zasób kodujący funkcjonalne geny jest bardzo skromny. W obrębie genomu istnieją obszary o różnych stopniach zmienności: od wysoce konserwatywnych do wysoce zmiennych. Zmienność informacji genetycznej jest podstawą zmienności organizmów i ewolucji, a wynika ze zmian w sekwencji nukleotydowej powstających w skutek błędów aparatu replikacyjnego. Każda zmiana choćby pojedynczego nukleotydu w genie może prowadzić do powstawania odmiennego białka. Niektóre mutacje są letalne – powstaje wadliwa cząsteczka uniemożliwiająca życie, inne prowadzą do chorób o różnym nasileniu, jeszcze inne zwiększają przystosowanie organizmu. W obrębie obszarów niekodujących skutki mutacji nie są tak poważne, a więc częściej są utrwalane. Stąd geny kodujące funkcjonalne białka należą do sekwencji konserwatywnych, a sekwencje niekodujące cechuje dużo większa zmienność. Możliwy jest zatem dobór sekwencji do poziomu taksonomicznego, który chcemy badać. Do różnicowania szczepów czy osobników pomocne są obszary wysoce zmienne, np. mini- czy mikrosatelity. Do identyfikacji gatunku wy-



Ryc. 1. Genom człowieka (wg. BROWNA 2001). Mb – milion par zasad.

korzystywane są sekwencje umiarkowanie zmienne, np. transkrybowalne sekwencje rozdzielające zespół genów rybosomalnych czy niektóre geny mitochondrialne. Badania na wyższych poziomach taksonomicznych opierają się na sekwencjach konserwatywnych, np. DNA kodujący małą podjednostkę rybosomalnego RNA lub genach kodujących białka (THOMPSON i współaut. 1998).

GENY RYBOSOMALNEGO RNA

Najchętniej wykorzystywanym obszarem do badań jest zespół kodujący 3 podjednostki rRNA wraz z zewnętrznymi i wewnętrznymi transkrybowanymi sekwencjami rozdzielającymi (Ryc. 2). Zaletą tego zespołu jest współlistnienie sekwencji umiarkowanie zmiennych (ITS-1, ITS-2) obok bardziej konserwatywnych – geny podjednostek rRNA. ITS-1 oraz ITS-2 są często przydatne do identyfikacji gatunkowej, a sąsiadujące geny są „punktem zaczepienia”, ponieważ wykorzystując informacje o sekwencji od jednego gatunku możemy badać gatunek spokrewniony (MCMANUS i BOWLES 1996).



Ryc. 2 Schemat układu genów rybosomalnych.

ETS-1 i 2 – zewnętrzne sekwencje transkrybowane; ITS-1 i 2 – wewnętrzne sekwencje transkrybowane; 18S, 5.8S, 28S – geny podjednostek rRNA.

MITOCHONDRIALNE DNA

Genom mitochondrialny jest często wykorzystywany w badaniach ewolucyjnych, ponieważ jest dziedziczony wyłącznie po matce, nie podlega rekombinacji, a często ewoluuje szybciej niż genom jądrowy. Zawiera głównie obszary kodujące: geny enzymów mitochondrialnych, podjednostek tRNA i rRNA. Do celów identyfikacji gatunkowej z powodzeniem wykorzystywano podjednostkę 1 oksydazy cytochromu c (CO1) i podjednostkę 1 dehydrogenazy nukleotydu adeninowego (ND1). Również mitochondrialne regiony mikrosatelitarne były eksploatowane do wykrywania pasożytów (MORGAN i BLAIR 1998, ZHAN i współaut. 2001).

DNA POWTÓRZONE

Powtórzone sekwencje gatunkowo-specyficzne zostały wykryte w genomach wielu pasożytów. Zostały one z powodzeniem zastosowane do identyfikacji gatunku (KOZAK-CIĘSZCZYK i WĘDRYCHOWICZ 2003). Czę-

sto ich ułożenie jest tandemowe w wielu kopiach. Zaletami tych sekwencji są, mnogość powtórzeń, co zwiększa czułość metod opartych na nich, oraz długość nie przekraczająca na ogół tysiąc par zasad, co ułatwia pracę z nimi.

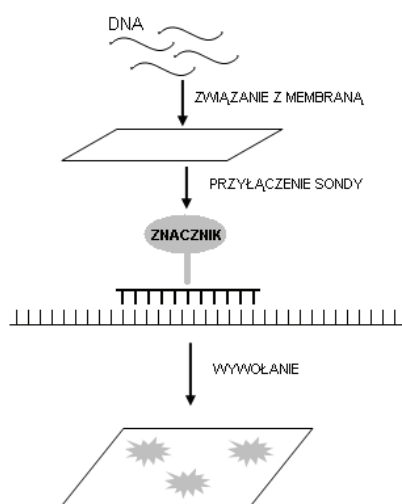
TECHNIKI

HYBRYDYZACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych to proces łączenia 2 obcych nici DNA lub RNA-DNA na podstawie komplementarności zasad. Metody oparte na tym zjawisku to najwcześniej opracowane narzędzia w biologii molekularnej. Podstawą jest sonda DNA, a więc jednoniciowy DNA komplementarny do poszukiwanej przez nas sekwencji, wyznakowany w sposób umożliwiający detekcję miejsc, w których doszło do połączenia. Początkowo sondy znakowane były radioaktywnie, co stwarzało ryzyko dla ich użytkowników i konieczność posiadania laboratorium przystosowanego do pracy z radioizotopami. Następnie zaczęto stosować znakowanie enzymatyczne oraz fluorochromami. To zwiększyło bezpieczeństwo tej metody i uczyniło ją ogólnie dostępną. Istnieje kilka wariacji hybrydyzacji cechą wspólną jest to, że ba-

dana próba musi zostać utrwalona na podłożu (najczęściej membranie nylonowej lub celulozowej), wolne miejsca muszą zostać zablokowane a potem następuje inkubacja z sondą i odpłukanie niezwiązanych cząstek. Ostatnim etapem jest wywołanie, czyli uwidocznienie miejsc, w których doszło do związania sondy i próby badanej (SINGH 1997). Schematyczne przedstawienie tej techniki przedstawia Ryc. 3. Najprostsza odmiana tej metody to dot-blot, gdzie badane próby nanoszone są punktowo na membranę, wynik otrzymuje się w postaci barwnych kropek. Bardziej złożone są Southern-blot do wykrywania DNA oraz Northern-blot – RNA. W obu przypadkach kwasy nukleinowe rozdzielane są na żelu, potem następuje transfer z żelu na membranę i ciąg dalszy procesu. Kolejną odmianą jest FISH (ang. fluorescent *in-situ* hybridisation), gdzie sondę wyznakowaną fluorochromem dodaje się bezpośrednio do próbki, bez konieczności uprzedniego izolowania DNA czy RNA, a wynik obserwuje pod mikroskopem fluorescencyjnym lub wykorzystując inne systemy detekcji przystosowane do rejestrowania fluorescencji, np. cytometr przepływowy.

Dowodem na to, że miniaturyzacja postępujące nie tylko w technice, ale także w biotechnologii są mikromacierze DNA (ang. chip DNA). Są to szkiełka mikroskopowe, na których znajdują się tysiące sond molekularnych, a więc możliwe jest wykonywanie bardzo wielu oznaczeń równocześnie. Precyzyjne usytuowanie sondy na szkiełku osiąga się syntetyzując ją bezpośrednio na nim metodą fotolitografii (LOCKHART i współaut. 1996) lub wykorzystując bardzo precyzyjne urządzenia nanoszące. Na taką mikromacierz nakłada się badane DNA, i to ono jest wyznakowane fluorescencyjnie. Odczyt odbywa się w mikroskopie konfokalnym, a uzyskany wzór jest analizowany komputerowo. Najczęściej stosuje się tę technologię do badania ekspresji białek, poprzez analizę obecnego w komórce mRNA bezpośrednio lub po przepisaniu



Ryc. 3. Schemat metody hybrydyzacji typu dot-blot.

DNA badane wiąże się z membraną, po wysyceniu miejsc wolnych dodaje się sondę ze znacznikiem; następnie opłukuje się niezwiązaną sondę i wywołuje. Miejsca w których wynik jest pozytywny widoczne są na membranie jako barwne plamy.

na cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji. W ten sposób możliwe jest badanie zarówno aktywności genów pasożyta, jak i żywiciela w ich wzajemnym oddziaływaniu, sprawdzenie jakie geny są odpowiedzialne za zjadliwość i rozwój objawów chorobowych, a które warunkują odporność. Są to informacje niezwykle istotne w opracowywaniu nowych strategii walki z patogenami (BOOTHROYD i współaut. 2003).

AMPLIFIKACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH

Wydarzeniem przełomowym w rozwoju biotechnologii było opracowanie w 1985 r. metody amplifikacji DNA *in vitro*. Technika ta, zwana reakcją łańcuchową polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR) naśladuje proces transkrypcji DNA zachodzący w komórkach, z pewnymi modyfikacjami niezbędnymi do jego przeprowadzenia w warunkach laboratoryjnych. Namnożeniu ulega wybrany odcinek DNA, w cyklach prowadzących do logarytmicznego wzrostu ilości produktu (po 30 cyklach z jednej cząsteczki DNA matrycowego powstaje ok. 1 miliard kopii produktu). Każdy cykl składa się z 3 etapów:

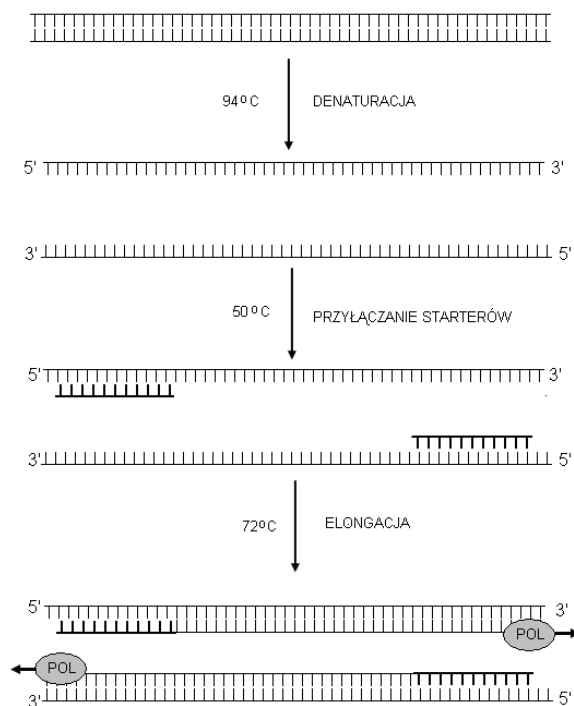
1. denaturacja, czyli rozdzielania dwuniciowej struktury na pojedyncze nici; w komórce odbywa się to przy udziale całego zespołu enzymów, a rozpleceniu ulega tylko fragment transkrybowany, *in vitro* wykorzystuje się wysoką temperaturę (94°C), pod wpływem której nici ulegają samoistnemu rozdzielaniu (tzw. topnienie DNA);

2. przyłączanie starterów; startery (inaczej primery), to krótkie odcinki DNA (kilkanaście do dwudziestu kilku nukleotydów) komplementarne do końców 5' odcinka amplifikowanego na nici sensownej i antysensownej. W naturze inicjacja transkrypcji wymaga obecności krótkich fragmentów RNA, aby enzym odpowiedzialny za tworzenie nici RNA (polimeraza RNA) mógł podjąć pracę, w PCR tę rolę spełniają startery, niezbędne polimerazie DNA do rozpoczęcia syntezy; temperatura reakcji musi zostać obniżona do optymalnej, która jest inna dla każdej pary starterów (ok. 50–60°C);

3. elongacja, a więc synteza odcinka poszukiwanego, komplementarnego do matrycy DNA; w tym celu wykorzystywane są obecnie termostabilne polimerazy DNA pochodzące od bakterii ciepłolubnych, tj. *Thermus aquaticus*, od których uzyskuje się najpopularniejszą polimerazę Taq. Optymalna temperatura pracy tego enzymu to 72°C. Wytrzy-

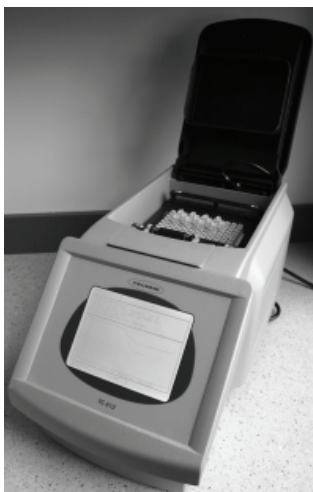
małość na wysokie temperatury eliminuje konieczność dodawania nowych porcji enzymu po każdym etapie denaturacji, co było konieczne w początkowych fazach tworzenia metody, kiedy stosowano enzymy termolabilne.

Produkty powstające w jednym cyklu stają się dodatkową matrycą do amplifikacji w kolejnych cyklach, stąd ilość produktu wzrasta logarymicznie. Schemat metody jest przedstawiony na Ryc. 4. Cała reakcja zachodzi w mieszaninie reagentów objętości od 25–100 µl, w urządzeniu zwanym termocyklem (Ryc. 5), mającym bardzo wydajny blok grzejny (zmiana temperatury rzędu 3–4°C/s). Olbrzymia wydajność PCR sprawia, że jest to metoda bardzo czuła; nawet pojedynczej cząsteczki matrycowego DNA można uzyskać wynik pozytywny. Najprostszym sposobem odczytu wyniku jest elektroforeza żelowa, gdzie mieszaninę poreakcyjną nakłada się na żel i wymusza migrację polem elektrycznym, porównując powstały po wybarwieniu wzór prążkowania ze wzorcem masowym (przykła-



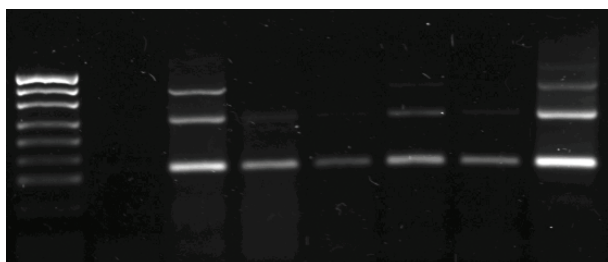
Ryc. 4. Schemat metody PCR.

W pierwszym etapie dochodzi do rozdzielania nici DNA (TTTTTTT) pod wpływem temperatury 94°C; następnie przyłączają się startery (TTTTTT) w temperaturze optymalnej; ostatni etap to synteza nici DNA przez polimerazę (POL). W kolejnych cyklach te nowopowstałe produkty również ulegają denaturacji i służą jako matryca.



Ryc. 5. Termocycler gradientowy z pokrywą grzejną. Widoczny blok grzejny z probówkami do reakcji PCR.

dowy żel na Ryc. 6). Jeśli otrzymujemy prążek wielkości odpowiadającej naszej poszukiwanej sekwencji to uznajemy to za wynik dodatni. Obecnie istnieją też systemy elektroforezy kapilarnej, gdzie barwnikiem jest fluorochrom, a żel zastąpiony zostaje przez kapilarę. Próbkki przemieszczające się przez nią są analizowane przez system lasera i detektora, a wynik otrzymujemy w postaci wykresu. Olbrzymia zaleta metody PCR, choć jest dużą zaletą, stanowi też problem, ponieważ może prowadzić do wyników fałszywie dodatnich, jakkolwiek kontaminacja w mieszaninie reakcyjnej może zafałszować wynik. Stąd bardzo ważne jest stosowanie kontroli negatywnych, tzn. dołączenie probówek zawierających wszystkie reagenty z wyjątkiem matrycy DNA. Jeśli w takiej kontroli pojawi się prążek, świadczy to o niewystarczającej

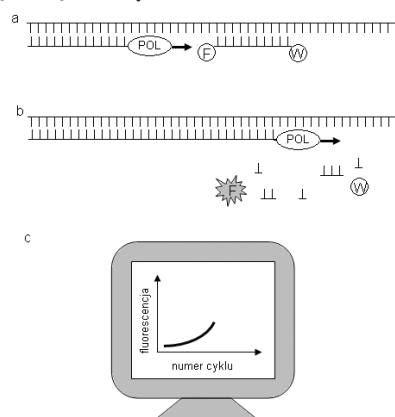


Ryc. 6. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego DNA wybarwionego bromkiem etydydny uwidocznionego w świetle UV, sfotografowanego w systemie do dokumentacji i analizy żeli Kodak Gel Logic 200.

Od lewej: wzorzec masowy (100–700, co 100 par zasad), kontrola negatywna, kolejne próbki badane (5) i kontrola pozytywna (fot. M. Kozak-Cięszczyk).

ostrożności przy przygotowywaniu prób. Natomiast wysoka wrażliwość na warunki fizyko-chemiczne oraz mała stabilność niektórych reagentów może prowadzić do wyników fałszywie ujemnych. Aby wyeliminować to zagrożenie należy stosować kontrole pozytywne. Taka ostrożność pozwala otrzymywać wiarygodne wyniki (ALTWEGG 1995).

Istnieje wiele modyfikacji PCR, których przykłady znajdują się w Tabeli 1. Jedną z najnowszych odmian, a zarazem należącą do nielicznych ilościowych jest PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR), w którym powstawanie kolejnych produktów reakcji jest rejestrowane na bieżąco przez detektor w pokrywie termocyklera. Jest to możliwe ze względu na obecność dodatkowego elementu w mieszaninie reakcyjnej – sondy komplementarnej do poszukiwanej sekwencji wyznaczonej fluorochromem oraz wygaszaczem. Istnieje kilka rodzajów sond, zasada metody zostanie omówiona na podstawie tzw. sond hydrolitycznych (Ryc. 7). Gdy sonda taka przyłącza się do nici DNA, fluorescencja jest pochłaniana przez wygaszacz, detektor nie rejestruje sygnału. Gdy zachodzi synteza odcinka poszukiwanego, polimeraza usuwa sondę niszcząc ją, przez co wygaszacz nie hamuje fluorescencji i detektor odbiera sygnał. Im więcej powstaje produktu, tym silniejszy jest sygnał. W efekcie powstaje krzywa narastania produktów, przebieg krzywej jest uzależniony od ilości DNA wyjściowego. Wykonuje się więc krzywe wzorcowe, ze znanymi



Ryc. 7. Schemat metody real-time PCR z udziałem sondy hydrolitycznej.

a) sonda jest przyłączona, wygaszacz pochłania fluorescencję i detektor nie wykrywa sygnału; b) polimeraza syntetyzując nić DNA rozkłada sondę i fluorescencja nie jest już wygaszana, c) detektor odbiera sygnał, co widoczne jest w postaci wykresu na monitorze komputera.

Tabela 1. Modyfikacje reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

Nazwa	Charakterystyka metody
RT-PCR (reverse transcriptase PCR)	Matrycą wyjściową jest RNA, które w procesie odwrotnej transkrypcji jest przepisywane na komplementarne DNA (ang. complementary DNA, cDNA). Następnie cDNA ulega amplifikacji, jak w zwykłym PCR.
nested-PCR (PCR gniazdowe)	Stosowane są 2 pary starterów: zewnętrzna (komplementarna do końców poszukiwanej sekwencji) i wewnętrzna (przyłącza się przyśrodkowo w stosunku do pierwszej pary starterów). Produkt powstały po amplifikacji z pierwszą parą poddaje się kolejnej rundzie z 2 parą. Zapewnia to większą specyficzność metody.
RAPD (random amplified polymorphic DNA)	Wykorzystywana, gdy nieznane są sekwencje specyficzne, stosuje się krótkie uniwersalne startery, którymi amplifikuje się zbiór produktów, a ich liczba i długości są zależne od sekwencji nukleotydowej matrycy oraz warunków reakcji.
RACE (rapid amplification of cDNA ends)	Technika umożliwiająca otrzymanie pełnej długości sekwencji gdy znany jest tylko fragment.
multiplex-PCR	Równoczesne zastosowanie kilku par starterów w mieszaninie reakcyjnej umożliwia diagnozowanie kilku patogenów jednocześnie. Produkty muszą się różnić długością, tak aby obecność każdego mogła zostać zauważona.
PCR-RFLP	Połączenie PCR z analizą restrykcyjną. Produkty amplifikacji poddaje się działaniu restryktazy (1 lub więcej) i porównuje wzór powstałych prążków.
competitive-PCR (PCR konkurujący)	Metoda ilościowa. W mieszaninie reakcyjnej umieszcza się DNA badane oraz DNA kontrolne o znanym stężeniu. W wyniku konkurowania o reagenty ilość produktu DNA kontrolnego będzie odwrotnie proporcjonalna do ilości DNA badanego w próbówce.
Real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym)	Metoda ilościowa pozwalająca na obserwowanie amplifikacji w czasie rzeczywistym. Wraz z przybywaniem produktów PCR wzrasta intensywność fluorescencji rejestrowanej przez detektor. Odzwierciedlone jest to w postaci wykresu na monitorze komputera.

ilościami DNA matrycowego, a krzywą próby badanej porównuje z nimi, wskutek czego możliwe jest wyliczenie ilości materiału wyjściowego w próbce badanej. W przypadku tego systemu do PCR eliminowana jest konieczność manipulacji mieszaniną poreakcyjną, co zmniejsza również możliwość błędów (BELL i RANFORD-CARTWRIGHT 2002).

ANALIZA CAŁYCH CZĄSTECZEK DNA

Istnieją sytuacje, w których do badania organizmu nie mamy specyficznej sekwencji świadczącej o statusie taksonomicznym czy

innych badanych cechach. Wówczas pozostają metody porównujące całe cząsteczki DNA. Różnice w składzie nukleotydowym skutkują różnicami fizyko-chemicznymi cząstek DNA – tę zasadę wykorzystuje metoda SSCP (ang. single strand conformation polymorphism – poliformizm konformacji jednoniciowej). W metodzie tej przeprowadza się elektroforezę w żelu niedenaturującym i porównuje się mobilność badanych cząstek. Cząsteczki jednoniciowe tworzą drugo- i trzeciorzędowe struktury w wyniku łączenia się zasad w obrębie nici. Zależą one od długości cząstecz-

ki, sekwencji i składu nukleotydowego. Nawet pojedyncza mutacja może spowodować zmiany w konformacji, co będzie skutkowało zmianą w mobilności elektroforetycznej. Analogiczną metodą jest DGGE (ang. denaturing gradient gel electrophoresis – elektroforeza w gradiencie denaturującym), tu dodatkowym elementem jest czynnik denaturujący tworzący gradient. Cząsteczki w czasie migracji w różnym punkcie gradientu denaturują i zwiększają swoją mobilność. Możliwe jest porównywanie organizmów blisko spokrewnionych i uchwycenie bardzo subtelnych różnic genetycznych. Obie metody mogą być również stosowane do analizy produktów reakcji, PCR umożliwiając uwidocznienie różnic w sekwencji, gdy długość jest ta sama (GASSER 1999).

Kolejną metodą analizującą różnice w sekwencjach różnej wielkości obszarów DNA jest polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragment length polymorphism, RFLP). Wykorzystuje ona restryktazy – enzymy bakteryjne mające zdolność przecinania nici DNA po napotka-

niu ściśle określonej sekwencji – najczęściej cztero- lub sześci nukleotydowej. Liczba i wielkość powstałych po trawieniu takim enzymem fragmentów zależy od liczby i umiejscowienia sekwencji przez niego rozpoznawanych. Porównując wzór prążków powstały po rozdziale elektroforetycznym możemy wykryć zmianę nawet pojedynczych zasad (mutacje punktowe) skutkujące brakiem lub dodatkowym miejscem restrykcyjnym, co wpłynie na ilość i długość otrzymanych prążków. RFLP jest również często wykorzystywany w połączeniu z PCR (PCR-RFLP), gdy produkty amplifikacji analizuje się po dodatkowym etapie trawienia enzymem restrykcyjnym, wówczas liczba prążków jest mniejsza i przez to prostsza w analizie (McMANUS i BOWLES 1996).

Diagnostyka molekularna znajduje zastosowanie w identyfikowaniu pasożytów w wielu dziedzinach badań. Precyzyjne rozpoznanie patogenu może być istotne dla dalszego postępowania lub być niezbędna do ustalenia źródła zagrożenia chorobą.

ZASTOSOWANIE DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ W PARAZYTOLOGII

DIAGNOSTYKA CHOROÓB LUDZI I ZWIERZĄT

Metody molekularne są coraz częściej wykorzystywanym narzędziem w diagnozowaniu parazytoz u ludzi i zwierząt. Tradycyjne metody często nie pozwalają na postawienie odpowiednio wczesnej bądź precyzyjnej diagnozy. Zostały opracowane metody izolacji DNA z bardzo wielu prób klinicznych: krwi, kału, płynów ustrojowych, biopłatów.

Pierwotniaki

W przypadku organizmów jednokomórkowych często stosowana jest metoda real-time PCR ze względu na możliwość precyzyjnej oceny poziomu inwazji. Możliwe jest wykrycie tą metodą *Toxoplasma gondii* zarówno we krwi, jak i płynie owodniowym czy mózgowo-rdzeniowym. Czułość tej metody sięga DNA 0,05 komórki pasożyta/mieszaninę reakcyjną, a precyzyjne określenie ilości DNA pasożytniczego jest możliwe w obrębie 6-7 rzędów wielkości. Liczba pasożytów wpływa znacząco na stan kliniczny, leczenie i rokowanie (LIN i współaut. 2000). Metoda ta okazała się również przydatna do oceny liczby tachyzoitów *Neospora caninum*, powodującego ronięcia u krów, koni oraz porażenia u psów.

Podobieństwo morfologiczne i antygenowe *N. caninum* i *T. gondii* sprawiało trudność w ich rozróżnianiu metodami konwencjonalnymi (MORGAN i THOMPSON 1998). Real-time PCR pozwala określić liczbę tachyzoitów *N. caninum* w tkankach żywicieli, próg detekcji to 0,1 tachyzoita (co odpowiada 10 fg DNA pasożyta) w mieszaninie reakcyjnej (COLLANTES-FERNANDEZ i współaut. 2002).

Rodzaj *Giardia* to grupa pierwotniaków jelitowych występujących u wielu żywicieli, również człowieka. Wykrycie obecności pasożyta metodą mikroskopową wymaga wielokrotnych prób ze względu na okresowość pojawiania się jego cyst w kale żywiciela. Zastosowanie PCR znacznie zwiększa czułość detekcji. Wiele sekwencji okazało się przydatnych do identyfikacji *Giardia*, w tym 18SrDNA za pomocą nested-PCR czy gen dehydrogenazy glutaminianowej oraz ETS w PCR-RFLP (HOPKINS i współaut. 1999, MONIS i współaut. 1996, McGLADE i współaut. 2003).

Tasiemce

Pośród tasiemczyc u ludzi obecnie największe zagrożenie stwarza *Echinococcus multilocularis* – bąblowiec wieloławowy,

dla którego człowiek jest żywicielem pośrednim. Metodą PCR możliwe jest wykrycie obecności pasożyta w biopsatach na podstawie genu *U1* małego jądrowego RNA (RNA uczestniczące w procesie wycinania intronów w trakcie dojrzewania mRNA). Bardzo istotne jest odróżnienie *E. multilocularis* od blisko spokrewnionego *E. granulosus*, ze względu na diametralnie różne skutki kliniczne tych dwóch inwazji. Możliwe jest również wykorzystanie tej reakcji do diagnozowania echinokokozy u żywicieli ostatecznych – w Polsce głównie lisów. W tym przypadku wykrywa się obecność jaj tasiemca w kale (MONNIER 1996).

Inwazje tasiemca uzbrojonego i nieuzbrojonego (*Taenia solium*, *T. saginata*) są również możliwe do rozróżnienia za pomocą PCR – odmiany multiplex. Zaprojektowano gatunkowo-specyficzne startery umożliwiające amplifikację genu podjednostki 1 oksydazy cytochromowej z DNA wyizolowanego z kału chorych. Obecność każdego z gatunków powoduje powstanie innej długości prążka, obecność obydwu skutkuje powstaniem 2 prążków. Możliwe jest zatem wykrycie każdego z gatunków lub obydwu za pomocą pojedynczej reakcji. Próg wykrywalności to 5 jaj/gram kału dla wiarygodnego rozróżnienia gatunków (YAMASAKI i współaut. 2004).

Przywry

Przywrami z rodzaju *Schistosoma* zarażonych jest 200 milionów ludzi na świecie (WHO 1985). *S. masoni* jest przykładem pasożyta, u którego wykryto specyficzną gatunkowo sekwencję należącą do powtórzeń tandemowych, o długości 121 par zasad. Amplifikacja tej sekwencji metodą PCR pozwala na zdiagnozowanie obecności pasożyta. Możliwe jest wykrycie nawet 1 fg DNA przywry w kale żywiciela, ze względu na mnogość powtórzeń owej sekwencji. W próbach klinicznych, ta metoda umożliwia wykrycie 2 jaj w gramie kału (PONTES i współaut. 2003). W genomie *S. haematobium* również wykryto 121 – zasadową sekwencję powtórzoną, jednak różniącą się od tej u *S. masoni*. Umożliwia ona wykrycie metodą PCR poniżej 10 fg DNA pasożyta (HAMBURGER i współaut. 2001).

Opisthorchis viverrini jest przywrą pasyżującą u człowieka, której wykrycie jest również możliwe za pomocą amplifikacji sekwencji powtórzonej o długości 330 par zasad. Około 9 milionów osób jest zarażonych, głównie w Azji, a źródłem są niewłaściwie ugotowane ryby. PCR pozwala na detekcję

200 jaj/gram kału (albo 200 pg DNA), podczas gdy czułość tradycyjnych metod koproskopowych pozwala na wykrycie dopiero 1000 jaj/gram kału (WONGRATANACHEEWIN i współaut. 2002).

Nicienie

Tęgoryjce występujące u ludzi – *Ancylostoma duodenale* i *Necator americanus*, stanowią wyzwanie diagnostyczne, ponieważ formy dyspersyjne – jaja, są trudne do rozróżnienia, a gatunek ma znaczenie przy doborze terapii. Możliwe jest prowadzenie hodowli larw, do stadium L3, rozróżnialnego morfologicznie, ale jest to czasochłonne (około tygodnia). Opracowano zatem metodę opartą na specyficznych gatunkowo startach komplementarnych do genu *CO1*. Możliwe jest uzyskanie wyniku pozytywnego już z pojedynczego jaja, co czyni metodę bardzo czułą (ZHAN i współaut. 2001).

Dużym problemem u przeżuwaczy są tak zwane nicienie żołądkowo-jelitowe. Ponownie pojawia się problem morfologicznego różnicowania jaj, przy znacznych różnicach w patogenności poszczególnych gatunków. Szczególne znaczenie ekonomiczne ma nicień *Ostertagia ostertagii*, pasyżujący w trawieńcu bydła. Z tego powodu opracowano metodę pół-ilościową do oceny zarażenia bydła tym gatunkiem. Wykryto sekwencje powtórzoną w obrębie ITS1 i opracowano warunki jej amplifikacji tak, aby intensywność prążka była skorelowana z ilością materiału wyjściowego. Możliwe okazało się wykrywanie również inwazji mieszanych (ZARLENGA i współaut. 1998).

Podobnie słupkowce (rodzaj *Strongylus*), pasyżyty o bardzo dużym znaczeniu u koni są nieodróżnialne morfologicznie w stadium jaja. Opracowano metodę różnicowania 3 najważniejszych gatunków: *S. edentatus*, *S. equinus* oraz *S. vulgaris* wykorzystującą amplifikację ITS2, a następnie jego analizę restrykcyjną (PCR-RFLP). Po trawieniu powstaje wzór prążkowania charakterystyczny dla danego gatunku (CAMPBELL i współaut. 1995).

BADANIE ŚRODOWISKA

Rozprzestrzenianie się choroby pasyżniczej odbywa się za pomocą form dyspersyjnych (tj. jaj lub cyst, wówczas im wyższe jest nasycenie środowiska tym większa szansa na zarażenie) lub poprzez żywicieli pośrednich czy wektory. Informacje o stopniu zanieczyszczenia środowiska formami inwazyjnymi pasyżytów lub intensywności zarażenia

żywicieli pośrednich czy wektorów są bardzo istotne dla oceny zagrożenia dla zdrowia ludzi i zwierząt zamieszkujących dany teren. Tworzone są niejednokrotnie rozbudowane systemy przewidujące ryzyko rozwoju parazytozy w danym roku, analizujące wiele zmiennych, w tym dane meteorologiczne, geologiczne zebrane satelitarnie. Takie systemy pozwalają zastosować najbardziej odpowiednie środki zapobiegawcze i zmniejszyć ilość używanych leków przeciwpasożytniczych (DE VLAS i współaut. 1996).

Pierwotniaki zarówno z rodzaju *Giardia*, jak i *Cryptosporidium* produkują cysty, które są formami inwazyjnymi dla kolejnych żywicieli. Źródłem zarażenia może być woda, gleba czy żywność. Stąd ważne jest monitorowanie wody pitnej na obecność tych pasożytów. Opracowano w tym celu metodę FISH wykorzystującą sondy zaprojektowane dla podjednostki 18S obydwu pasożytów, wyznakowane fluorochromami (VESEY i współaut. 1998, DORSCH i VAEAL 2001). Dodatkową zaletą wykrywania RNA jest to, że bardzo szybko ulega rozpadowi po śmierci komórki, stąd sondy takie wykrywają żywe cysty, co ma większą wartość dla oceny stopnia narażenia na zarażenie.

Tasiemczyce również stanowią temat badań środowiskowych, szczególnie istotny jest opisany już wyżej bąblowiec wieloławowy (*E. multilocularis*). Prowadzone są regularnie badania w populacjach lisów i innych mięsożernych w celu ustalenia stopnia rozprzestrzeniania się parazytozy w Europie (ECKERT i DEPLAZES 2002).

Wśród przywr przykładem gatunku, do wykrywania którego opracowano cały przekrój metod molekularnych jest motyllica wątrobowa (*Fasciola hepatica*). Są to zarówno sondy oparte na sekwencji rRNA, jak i RT-PCR w oparciu o ssrRNA, a także sondy DNA z wykorzystaniem sekwencji powtórzonych (SHUBKIN i współaut. 1992, HAUSSLER i współaut. 1993, ROGNLIE i współaut. 1994, KAPLAN i współaut. 1995). Obecnie rozwijane są metody diagnostyczne wykorzystujące amplifikację DNA. Przykładem są badania prowadzone w Instytucie Parazytologii PAN, gdzie opracowano warunki amplifikacji sekwencji tandemowo powtórzonych, 124-nukleotydowej, do wykrywania pasożyta u żywicieli pośrednich – ślimaka błotniarki moczarowej. Sekwencja badana występuje w genomie pasożyta w około 300000 kopii, co pozwala uzyskać bardzo wysoką czułość – możliwe jest wykrycie przywry w ciągu 12 godzin od wnik-

nięcia pojedynczego miracidium (orzęsona larwa) do ślimaka (KOZAK-CIEŚCZYK i WĘDRYCHOWICZ 2004).

Badania nad intensywnością zarażenia żywicieli pośrednich, ślimaków, są prowadzone także w przypadku wielu innych gatunków przywr: *Schistosoma* spp., *Opisthorchis* spp. Monitorowana jest również obecność cerkarii przywr z rodzaju *Schistosoma* w wodzie. Opracowana metoda amplifikacji sekwencji powtórzonych, 121-nukleotydowej, została przystosowana do próbek wody, które wcześniej muszą zostać poddane filtracji, a materiał zebrany z filtrów wykorzystuje się do izolacji DNA (HAMBURGER i współaut. 1998).

Cerkarie przywr niespecyficznych dla ludzi również stanowią zagrożenie dla zdrowia. Pasożyty z rodzaju *Trichobilharzia*, właściwe dla kaczek, mogą powodować tzw. świąd pływaków, jako że cerkarie penetrują skórę człowieka i tam kończą wędrówkę, wywołując stan zapalny. Stanowi to przeszkodę w turystyce, ponieważ zbiorniki skażone pasożytem nie nadają się do kąpeli. Do oceny zanieczyszczenia zbiorników wodnych stosowano zarówno hybrydyzację, jak i PCR z wykorzystaniem sekwencji powtórzonych o długości 396 par zasad. Metodą hybrydyzacji możliwe było wykrycie 100 pg DNA, ale bardziej czuła okazała się metoda PCR pozwalająca na detekcję 100 fg DNA, a więc 1 cerkarię w 0,5g planktonu (HERTEL i współaut. 2002).

Glisty psia i kocia – *Toxocara canis* i *T. cati*, powszechnie występujące u domowych czworonogów, stanowią również zagrożenie dla ludzi, zwłaszcza dzieci u których larwy wędrujące pasożyta mogą wywoływać bardzo poważne w skutkach choroby. Stąd zainteresowanie stopniem skażenia środowiska jajami inwazyjnymi tych pasożytów. Różnicowanie tych gatunków, bardzo trudne morfologicznie, jest możliwe przy wykorzystaniu metody PCR-RFLP lub PCR z zastosowaniem starterów specyficznych gatunkowo. Sekwencją wykorzystywaną chętnie w różnicowaniu gatunków w całej nadrodzinie Ascaridoidea jest ITS. W przypadku *T. canis* i *T. cati* różnice w tej sekwencji widoczne są dopiero po analizie restrykcyjnej (JACOBS i współaut. 1997). Jeśli zastosuje się startery specyficzne gatunkowo konieczna jest amplifikacja każdej próby dwukrotnie – z każdą z par starterów (WU i współaut. 1997).

BADANIE ŻYWNOSCI

Żywność również może być źródłem zarażenia parazytozami, zwłaszcza jeśli nie są

przestrzegane prawidłowe procedury obróbki. Warzywa i owoce mogą być skażone formami inwazyjnymi różnych pasożytów, stąd tak istotne jest dokładne ich mycie przed spożyciem. Mięso może być miejscem występowania form inwazyjnych niektórych pasożytów tworzących cysty tkankowe, w których cyklu życiowym przechodzenie z żywiciela do żywiciela odbywa się drogą pokarmową. Unieszkodliwienie tych form wymaga najczęściej starannej obróbki termicznej ponieważ niemożliwe jest ich usunięcie.

T. gondii, pierwotniak przenoszony również przez mięso, może zostać wykryty w tkankach zwierząt rzeźnych za pomocą tych samych metod, które służą do diagnostyki ludzi. Obecnie badania, mięsa na obecność tego pasożyta nie są obowiązkowe, więc istotne jest dokładne gotowanie potraw i unikanie mięsa surowego (GAMBLE i MURELL 1998).

Włosień, *Trichinella* spp., jest nicieniem mogącym bytować w tkance mięśniowej bardzo wielu żywicieli. Jednak najistotniejszym

źródłem włośnicy dla ludzi jest trzoda chlewna, dziki, nutrie i niedźwiedzie – mięso tych gatunków podlega obowiązkowemu badaniu w kierunku obecności larw mięśniowych *Trichinella*. Opracowana została metoda molekularnej identyfikacji 7 gatunków włośnia w jednym teście multiplex-PCR opartym na zespole genów rDNA (ZARLENGA i współaut. 2001). Czułość metody znacznie przekracza możliwości tradycyjnych metod: larwoskopii czy tzw. wytrawiania.

Kilka pasożytów człowieka jest przenoszonych przez ryby, w tkankach których znajdują się ich formy inwazyjne. Przykładem takiego patogenu jest wspomniany już *Opisthorchis viverrini*, przywra, której metacerkarie znajdują się w rybach karpowatych. Opracowano metodę amplifikacji sekwencji powtórzonej gatunkowo specyficznej na matrycy DNA, wyizolowanego z tkanek ryb. Możliwe było wykrycie pojedynczej metacerkarii w płetwie ogonowej ryby (MALEEWONG i współaut. 2003).

PODSUMOWANIE

Obecnie parazytolog dysponuje szerokim wachlarzem metod biologii molekularnej mogących identyfikować pasożyty z bardzo dużą dokładnością i czułością. Głównym ograniczeniem rutynowego stosowania tych metod wciąż pozostaje relatywnie wysoki ich koszt, natomiast dostępność w chwili obecnej jest w zasadzie nieograniczona ze względu na ogromną liczbę firm oferujących sprzęt i odczynniki do biologii molekularnej. Można jednak żywić nadzieję, że w związku z rozwojem przemysłu biotechnologicznego również problemy finansowe będą z czasem

maleły. Przystępując do badań w tej dziedzinie należy w pełni docenić zarówno zalety, jak i ograniczenia tych metod, aby otrzymywać rzetelne wyniki. Należy mieć również świadomość, że stosowanie tak czułych metod nie zawsze jest konieczne, często metody konwencjonalne mogą w pełni odpowiedzieć na nurtujące nas pytania. Metody molekularne i tradycyjne powinny się uzupełniać, a współczesny parazytolog powinien znać morfologię obiektu swoich badań równie dobrze jak jego genetykę.

MOLECULAR DIAGNOSTICS IN PARASITOLOGY

Summary

Molecular biology offers a wide range of tools applicable to the identification of parasites. The development of these methods was possible due to understanding of the DNA structure and natural replication, transcription and expression mechanisms. These techniques are constantly evolving, allowing for their greater sensitivity and high throughput. It is possible to create assays operating on various taxonomic levels. This versatility is another advantage explaining the vivid interest in these methods. In many cases their superiority over conventional

methods is unquestionable since DNA is not subject to stage-related or environmentally induced changes.

The aim of this article was to review the vast possibilities of molecular diagnostics in parasitology. A wide range of methods based on nucleic acid hybridization, amplification or comparison of entire molecules is described, along with information on target sequences, and examples of these methods practical application.

LITERATURA

- ALTWEGG M., 1995. *General problems associated with diagnostic applications of amplification methods*. J. Microbiol. Methods 23, 21–30.
- BELL A. S., RANFORD-CARTWRIGHT L., C., 2002. *Real-time quantitative PCR in Parasitology*. Trends Parasitol. 18, 337–342.
- BOOTHROYD J. C., BLADER I., CLEARY M., SINGH U., 2003. *DNA microarrays in parasitology: strengths and limitations*. Trends Parasitol. 19, 470–476.
- BROWN T. A., 2001. *Genomy*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- CAMPBELL A. J. D., GASSER R. B., CHILTON N. B., 1995. *Difference in a ribosomal DNA sequence of *Strogylus* species allows identification of single eggs*. Int. J. Parasitol. 25, 359–365.
- COLLANTES-FERNANDEZ E., ZABALLOS A., ALVAREZ-GARCIA G., ORTEGA-MORA L. M., 2002. *Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR*. J. Clin. Microbiol. 40, 1194–1198.
- DE VLAS S. J., VAN OORTMARSEN G. J., GRYSEELS B., POLDERMAN A. M., PLAISER A. P., HABBEMA J. D. F., 1996. *SCHISTOSIM: a microsimulation model for the epidemiology and control of schistosomiasis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 55, 170–175.
- DORSCH M. R., VEAL D. A., 2001. *Oligonucleotide probes for specific detection of *Giardia lamblia* cysts by fluorescent in situ hybridization*. J. Appl. Microbiol. 90, 836–842.
- ECKERT J., DEPLAZES P., 2002. *Echinococcus multilocularis in Europe*. [W:] *Zoonozy: problem nadal aktualny*. Materiały Konferencyjne, Warszawa, 20–23.
- GAMBLE H. R., MURELL K. D., 1998. *Detection of parasites in food*. Parasitology 117, 97–111.
- GASSER R. B., 1999. *PCR-based technology in veterinary Parasitology*. Vet. Parasitol. 84, 229–258.
- HAMBURGER J., YU-XIN X., RAMZY R. M., JOURDANE J., RUPPEL A., 1998. *Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestations of water*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 468–473.
- HAMBURGER J., HE-NA, ABBASI I., RAMZY R. M., JOURDANE J., RUPPEL A., 2001. *Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome-infested water*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65, 907–911.
- HERTEL J., HAMBURGER J., HABERL B., HAAS W., 2002. *Detection of bird schistosomes in lakes by PCR and filter-hybridization*. Exp. Parasitol. 101, 57–63.
- HEUSSLER V., KAUFMANN H., TRAHM D., LIZ J., DOBBELAERE D., 1993. *DNA probes for the detection of *Fasciola hepatica* in snails*. Mol. Cell. Probes 7, 261–267.
- HOPKINS R. M., CONSTANTINE C. C., GROTH D. A., WETHERALL J. D., REYNOLDSON J. A., THOMPSON R. C. A., 1999. *PCR-based fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer*. Parasitology 118, 531–539.
- 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.
- KAPLAN R. M., DAME J. B., REDDY G. R., COURTNEY C. H., 1995. *A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails*. Int. J. Parasitol. 25, 601–610.
- KOZAK-CIEŚCZYK M., WĘDRYCHOWICZ H., 2003. *The application of molecular techniques in environmental monitoring of helminth parasites*. Acta Parasitol. 48, 73–82.
- KOZAK-CIEŚCZYK M., WĘDRYCHOWICZ H., 2004. *Detection of *Fasciola hepatica* in the intermediate snail host – *Galba truncatula* by PCR*. [W:] *VIII European Multicollloquium of Parasitology*. Materiały Konferencyjne, Walencja, Hiszpania, 276–277.
- LIN M. H., CHEN T. C., KUO T. T., TSENG C. C., TSENG C. P., 2000. *Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii**. J. Clin. Microbiol. 8, 4121–4125.
- LOCKHART D. J., DONG H., BYRNE M. C., FOLLETTIE M. T., GALLO M. V., CHEE M. S., MITTMANN M., WANG C., KOBAYASHI M., HORTON H., BROWN E. L., 1996. *Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays*. Nature Biotechnol. 14, 1675–1680.
- MALEEWONG W., INTAPAN P. M., WONGKHAM C., WONGSAROJ T., KOWSUWAN T., PUMIDONMING W., PONGSASKULCHOTI P., KITIKOON V., 2003. *Detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected bithynid snails and cyprinoid fishes by a PCR-based method*. Parasitology 126, 63–67.
- MCGLADE T. R., ROBERTSON I. D., ELLIOT A. D., THOMPSON R. C. A., 2003. *High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR*. Vet. Parasitol. 110, 197–205.
- MCKEAND J. B., 1998. *Molecular diagnosis of parasitic nematodes*. Parasitology 117 (Suppl.) 87–96.
- MCMANUS D. P., BOWLES J., 1996. *Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics*. Int. J. Parasitol. 26, 687–704.
- MONIS P. T., MAYRHOFFER G., ANDRWES R. H., HOMAN W. L., LIMPER L., EY P. L., 1996. *Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus*. Parasitology 112, 1–12.
- MONNIER P. H., CLIQUET F., AUBERT M., BRETAGNE S., 1996. *Improvement of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in faecal samples of foxes*. Vet. Parasitol. 7, 185–195.
- MORGAN J. A. T., BLAIR D., 1998. *Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda)*. Parasitology 116, 289–297.
- MORGAN U. M., THOMPSON R. C. A., 1998. *Molecular detection of parasitic protozoa*. Parasitology 117, 73–85.
- PONTES L. A., OLIVEIRA M. C., KATZ N., DIAS-NETO E., RABELLO A., 2003. *Comparison of a polymerase chain reaction and the kato-katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni**. Am. J. Trop. Med. Hyg. 68, 652–656.
- ROGNLIE M. C., DIMKE K. L., KNAPP S. E., 1994. *Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR*. J. Parasitol. 80, 748–755.
- SHUBKIN C. D., WHITE M. W., ABRAHAMSEN M. S., ROGNLIE M. C., KNAPP S. E., 1992. *A nucleic acid-based test for detection of *Fasciola hepatica**. J. Parasitol. 78, 817–821.
- SINGH B., 1997. *Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections*. Int. J. Parasitol. 27, 1135–1145.
- THOMPSON R. C. A., CONSTANTINE C. C., MORGAN U. M., 1998. *Overview and significance of molecular methods: what role for molecular epidemiology?* Parasitology 117 (Suppl.), 161–175.

- VESEY G, ASHBOLT N., FRICKER E. J., DEERE D., WILLIAM K. L., VEAL D. A., DORSCH M., 1998. *The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labelling of viable Cryptosporidium parvum oocysts*. J. Appl. Microbiol. 85, 429-440.
- WHO 1985. *The Control of Schistosomiasis*. Tech. Rep. Ser. 728.4.
- WONGRATANACHEEWIN W., PUMIDONMING R., SERMSWAN W., PIPITGOOL V., MALEEWONG W., 2002. *Detection of Opisthorchis viverrini in Human Stool Specimens by PCR*. J. Clin. Microbiol. 40, 3879-3880.
- WU Z., NAGANO I., XU D., TAKAHASHI Y., 1997. *Primers for polymerase chain reaction to detect genomic DNA of Toxocara canis and T. cati*. J. Helminthol. 71, 77-78.
- YAMASAKI H., ALLAN J. C., SATO O., NAKAO M., SAKO Y., NAKAYA K., QIU D., MAMUTI W., CRAIG P. S., ITO A., 2004. *DNA Differential Diagnosis of Taeniasis and Cysticercosis by Multiplex PCR*. J. Clin. Microbiol. 42, 548-553.
- ZARLENGA D. S., CHUTE M. B., MARTIN A., KAPEL C. M., 2001. *A single, multiplex PCR for differentiating all species of Trichinella*. Parasite 8, S24-6.
- ZARLENGA D. S., GASBARRE L. C., BOYD P., LEIGHTON E., LICHTENFELS J. R., 1998. *Identification and semi-quantitation of Ostertagia ostertagi eggs by enzymatic amplification of ITS-1 sequences*. Vet. Parasitol. 77, 245-257.
- ZHAN B., LI T., XIAO S., ZHENG F., HAWDON J. M., 2001. *Species-specific identification of human hookworms by PCR of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene*. J. Parasitol. 87, 1227-1229.