

Symposium „Zastosowanie technik molekularnych w monitorowaniu pasożytów w środowisku”

Pierwotnie Symposium miało się odbyć podczas XX Jubileuszowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego w dniu 3 września 2004r. Jednakże ze względu na dużą liczbę referatów zgłoszonych na Zjazd, organizatorzy zdecydowali o przesunięciu terminu. Symposium odbyło się 6 listopada 2004 r. w Warszawie. Miejszem obrad był gmach Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (ul. Miecznikowa 1). Organizatorami Symposium byli: Komitet Parazytologii PAN, Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Parazytologii Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego oraz Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego. W konferencji uczestniczyło 55 osób. Obrady przebiegały w języku polskim i angielskim.

Pierwotnie planowana tematyka Symposium została poszerzona o zagadnienia dotyczące wpływu czynników środowiskowych na układ immunologiczny żywicieli (ludzi i zwierząt zarażonych pasożytami). Odbyły się dwie sesje naukowe.

W sesji pierwszej pt.: **The host-parasite relationship under influence of environmental factors** wygłoszono 3 referaty w języku angielskim:

- Light as an essential environment cue: possible role of the pineal gland in the host-parasite interrelationships – prof. Krystyna Skwarło-Sońta; Zakład Fizjologii Kręgowców, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.
- Quantifying nematode contamination with grazing sheep – prof. Mike J. Stear; Institute of Comparative Medicine, University of Glasgow Veterinary School, Glasgow G61 1QH (Scotland).
- Environmental xenobiotics influence the reactivity of the immune system – dr Nadzieja Drela; Zakład Immunologii; Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

W pierwszym referacie prof. Skwarło-Sońta poruszyła zagadnienia dotyczące mechanizmów oddziaływania światła na receptory odpowiadające za stan hormonalny żywiciela. Jako przykład do analizy tych zagadnień posłużyły pasożyty z rodzaju *Trypansoma* stanowiące ogromny problem epidemio-

logiczny w krajach afrykańskich. Prof. Stear przedstawił wzajemne relacje między warunkami środowiska a stanem zarażenia owiec nicieniami żołądkowo-jelitowymi. Zapoznał również słuchaczy z najnowszymi badaniami nad uzyskaniem linii owiec opornych na zarażenie oraz z genetycznymi wyznacznikami tej oporności. Dr Drela omówiła szczegółowo wpływ „ksenobiotyków” (pyłów zbieranych w rejonach o podwyższonej emisji metali ciężkich), m.in. na rozwój odczynów alergicznych i autoimmunizacyjnych oraz na zaburzenie procesu homeostazy organizmu. Nietypowe reakcje immunologiczne żywiciela w wielu przypadkach uniemożliwiają postawienie prawidłowej diagnozy. Wystąpieniem referatów towarzyszyła żywa dyskusja, która pozwoliła na poszerzenie wiadomości i lepsze zrozumienie zagadnień poruszanych w drugiej sesji tematycznej.

W sesji drugiej zatytułowanej: **Identyfikowanie pasożytów metodami molekularnymi** wygłoszono 6 referatów:

- Zastosowanie techniki FISH (fluorescent hybridization *in situ*) do wykrywania *Giardia*, *Cryptosporidium* i mikrosporydiów. – prof. dr hab. Anna C. Majewska (Poznań)
- Zastosowanie techniki PCR w badaniu skażenia gleby jajami *Toxocara canis* i *Toxocara cati* – dr Renata Fogt, mgr Wojciech Jarosz, prof. dr hab. Hanna Mizgajska-Wiktor (Poznań)
- Zastosowanie technik molekularnych opartych na PCR w oznaczaniu nicieni z nadrodziny Ascaridoidea – dr Agnieszka Kijewska, prof. dr hab. Jerzy Rokicki (Gdynia)
- Gatunki rodzaju *Gyrodactylus* w świetle badań molekularnych – dr Marek Ziętara (Gdańsk)
- Metody molekularne przydatne do wykrywania form rozwojowych helmintów w środowisku – lek. wet. Monika Kozak-Cięszczyk, prof. dr hab. Halina Wędrychowicz (Warszawa)
- Konstrukcja systemu ekspresji i oczyszczania rekombinantowego antygeny p35 *Toxoplasma gondii* – mgr Magdalena Rokicka, dr Elżbieta Hiszczyńska-Sawicka (Gdynia).

Pierwszy referat zwrócił szczególną uwagę na

zarażenia wywołane przez pasożytnicze pierwotniaki takie jak *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis*, i inwazyjne dla człowieka gatunki mikrosporydiów, m.in. *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *E. hellem* i *E. cuniculi*. Stadia dyspersyjne tych pierwotniaków są wydalane, często w dużej liczbie, wraz z wydzielinami lub wydaliniami różnych gatunków żywicieli i są odporne na działanie czynników środowiska zewnętrznego i konwencjonalne dawki środków dezynfekujących. Toteż spory, cysty i oocysty pasożytniczych pierwotniaków są niemal wszechobecne w otaczającym środowisku i stanowią poważne zagrożenie zdrowia publicznego. Prof. Majewska przedstawiła przegląd metod powszechnie stosowanych do wykrywania stadiów dyspersyjnych tych pierwotniaków, a następnie w sposób szczegółowy omówiła technikę FISH (fluorescencyjna hybrydizacja *in situ*) umożliwiającą precyzyjną identyfikację gatunku przy jednoczesnym określeniu żywotności stadiów dyspersyjnych pierwotniaków. Technika FISH oparta jest na wykorzystaniu fluorescencyjnie znakowanych sond molekularnych (oligonukleotydów), które hybrydują z gatunkowo specyficznym fragmentem 18S rRNA pasożyta. Wykorzystanie tej techniki pozwoliło po raz pierwszy na świecie na wykrycie form rozwojowych pierwotniaków jelitowych w kale wielu ptaków i ssaków, wskazując na ogromny rezeruar pasożytów w środowisku.

Drugi referat, przygotowany przez zespół z Poznania, dotyczył możliwości wykorzystania technik biologii molekularnej do różnicowania w próbach środowiskowych (gleba, piasek) jaj glisty psiej i kociej stanowiących zagrożenie dla zdrowia człowieka. Pasożyty te stanowią szczególne zagrożenia dla dzieci, a ich zróżnicowanie jest podstawą prawidłowego, specjalistycznego leczenia. Dotychczasowe metody nie dawały takich możliwości.

Metody oznaczania gatunków nicieni z nadrodziny Ascaridoidea w oparciu o technikę PCR zostały przedstawione w kolejnym referacie. W badaniach wykorzystywano rejon rybosomalnego DNA amplifikowany metodą PCR, który obejmował dwa odcinki niekodujące oraz gen 5.8S (ITS1 – 5.8S – ITS2). Do trawienia użyto endonukleaz *Taq I*, *Alu I*, *Bsu RI* i *Rsa I*. Wzory restrykcyjne uzyskane za pomocą poszczególnych endonukleaz były charakterystyczne i niezmiennie dla każdego gatunku. Wykazano, że metoda może być z powodzeniem używana do celów identyfikacji niezależnie od stadium rozwojowego i regionu geograficznego,

z którego pochodzą próby. Jest to szczególnie istotne w przypadku gatunków siostrzanych *Anisakis* i *Contracaecum*, które niekiedy współwystępują na danym obszarze.

Referat pt.: „Gatunki rodzaju *Gyrodactylus* w świetle badań molekularnych” dotyczył trudności diagnostycznych w przypadku opierania się jedynie na morfologii pasożytów. Wszystkie gatunki *Gyrodactylus* mają znacznie uproszczony ogólny plan budowy ciała, co utrudnia ich bezbłędną identyfikację. W metodach molekularnych wykorzystuje się region ITS rDNA z tandemu genów kodujących podjednostki rybosomalnego RNA (rRNA). Region ten składa się z dwóch łączników podlegających transkrypcji (ITS1 i ITS2) oraz znajdującego się pomiędzy nimi genu kodującego podjednostkę 5.8S rRNA. W rodzaju *Gyrodactylus* charakteryzuje się on minimalną zmiennością wewnątrzgatunkową przy bardzo wysokiej zmienności międzygatunkowej, co umożliwia identyfikację nawet tak morfologicznie podobnych gatunków.

Zespół z Instytutu Parazytologii PAN z Warszawy zaprezentował referat pt.: „Metody molekularne przydatne do wykrywania form rozwojowych helmintów w środowisku”, w którym w sposób niezwykle klarowny zawarto przegląd wszystkich metod opartych na technikach molekularnych (od najprostszych, najmniej specyficznych, do bardziej złożonych lecz wysoce specyficznych i czułych). Omówiono również rodzaje DNA wykorzystywanego w tego typu badaniach zwracając uwagę na zalety użycia mtDNA lub rDNA w zależności od stawianego celu badawczego. Wykorzystywanie technik molekularnych znajduje szerokie zastosowanie m.in. do diagnozowania *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Paramphistomum liorchis*, *Echinococcus multilocularis*, *E. granulosus* i wielu innych pasożytów.

Ostatni referat dotyczył możliwości wykorzystania technik molekularnych do uzyskania wysoce specyficznego antygeny *Toxoplasma gondii*, pierwotniaka szczególnie niebezpiecznego dla kobiet w ciąży (gdyż może powodować ronięcia) i niemowląt (gdyż może powodować zmiany neurologiczne). Mimo wielu lat badań diagnozowanie pasożyta nastręcza wiele trudności, a antygen przygotowany zgodnie z metodyką zaprezentowaną przez zespół z Gdyni może być niezwykle przydatny do dalszych badań.