

Metody różnicowania gatunków nicieni z rodzaju *Trichinella*

Methods and tools for parasite differentiation within the genus *Trichinella*

Katarzyna Pastusiak

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego, Polska Akademia Nauk, 00-818 Warszawa, ul. Twarda 51/55, E-mail:kasiap@twarda.pan.pl

ABSTRACT. This review summarizes the major biological, biochemical and molecular methods which have been developed during last 20 years to distinguish parasites of the genus *Trichinella*.

From the time of the discovery of *Trichinella* in 1835 until the 1970, it was assumed that trichinellosis was caused by a single species of parasite, *Trichinella spiralis*. Many biological parameters have been compared to differentiate the parasite, such as host specificity, geographical distribution, reproductive abilities, nurse cell development and resistance to freezing. Now, investigators realize that the genus *Trichinella* is a much more complex group of parasites and simple biological methods are insufficient. In order to identify and better characterize the species and genotypes of *Trichinella* it was necessary to develop more sensitive techniques.

First, for detecting *Trichinella* infection immunological methods have been used, such as detection of antibodies in host blood and antigens of parasites using monoclonal antibodies against immunodominant proteins. Later, biochemical techniques have been used such as isoenzyme analysis.

The main goal of these methods is to provide a simple, rapid and reproducible techniques to differentiate *Trichinella* parasites. For this purpose DNA-based methods appeared the best ones. Beginning with the use restriction enzymes, repetitive DNA probes for detection of parasite DNA, and later techniques based on the polymerase chain reaction (PCR), give results at the high level of sensitivity.

All of this information has been used to construct a new taxonomy of the genus *Trichinella*. To date, 11 taxa have been recognized in the genus: 8 species (*Trichinella spiralis* T1, *Trichinella nativa* T2, *Trichinella britovi* T3, *Trichinella pseudospiralis* T4, *Trichinella murrelli* T5, *Trichinella nelsoni* T7, *Trichinella papuae* T10, *Trichinella zimbabwensis* T11) and additionally three genotypes whose taxonomic status is yet uncertain (T6, T8, T9).

Based upon morphology, epidemiology of trichinellosis, geographical distribution and host range of the parasite, two main groups are recognized in the genus *Trichinella*. The first group comprises species that encapsulate in host muscle tissue, while the species of the second group do not encapsulate. The species and genotypes of the first group infect only mammals (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, T6, T8 and T9), whereas of the three species from the second group, one parasitises mammals and birds (*T. pseudospiralis*) and the other two infect mammals and reptiles (*T. papuae* and *T. zimbabwensis*).

Due to the big genetic differences between *Trichinella* isolates, investigators predict that the number of species and genotypes found within *Trichinella* will be increased.

Key words: differentiation, genotypes, multiplex PCR, PCR, random amplified polymorphic DNA, RFLP, *Trichinella*.

Wstęp

Włosień kręty *Trichinella spiralis* jest pasożytem należącym do typu Nematoda, gromady Adenophorea, rodziny Trichinellidae i rodzaju *Trichinella* [1]. Nicienie z tego rodzaju są przyczyną trychinellozy,

zoonozy rozpowszechnionej na całym świecie u zwierząt domowych i wolno żyjących oraz człowieka [2, 3].

Od momentu odkrycia i opisanego pasożyta przez Owena w 1835 roku [4], do lat 70. XX wieku uważano, że rodzaj *Trichinella* to jednorodna grupa pa-

sożytów. W 1972 r. opisano trzy nowe gatunki: *T. britovi*, *T. nativa* i *T. pseudospiralis* występujące u zwierząt mięsożernych, wszystkożernych i ptaków [5, 6].

Na początku lat 90. XX wieku, biorąc pod uwagę budowę morfologiczną oraz właściwości biologiczne i biochemiczne około 300 izolatów, dokonano rewizji i przeszerogowania taksonomicznego w obrębie rodzaju. Zaproponowano wtedy wpisanie do rodzaju 5 nowych, siostrzanych gatunków *Trichinella spiralis* [4] sensu stricto: *Trichinella nativa* [5], *Trichinella pseudospiralis* [6], *Trichinella nelsoni* [5] oraz *Trichinella britovi*. Przynależność gatunkową włośni ustalono na podstawie niewielkich różnic morfologicznych form dorosłych i larwalnych, rozprzestrzenienia geograficznego, obecności lub braku torebek wokół larw mięśniowych oraz ich budowy, inwazyjności i patogenności dla żywiciela. Duże znaczenie miał również wskaźnik reprodukcyjności RCI (stosunek liczby larw mięśniowych do podanej dawki), indeks płodności samic (liczba larw urodzonych przez jedną samicę w ciągu jednej godziny hodowli), czas potrzebny do wytworzenia komórki piastunki (nurse cell), odporność larw mięśniowych na zamrażanie oraz możliwość krzyżowego zapłodnienia [7].

Obecnie w rodzaju *Trichinella* wyróżnia się dwie grupy; pierwsza to gatunki i genotypy, których larwy mięśniowe otarbiają się w mięśniach żywiciela, a druga grupa to gatunki, których larwy mięśniowe nie wytwarzają torebek. Do pierwszej grupy należą gatunki występujące jedynie u ssaków; są to *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murrelli*, *T. nelsoni* oraz genotypy *Trichinella* T6, T8, T9. Do drugiej grupy należą gatunki *T. pseudospiralis* występujący u ssaków i ptaków oraz *T. papuae* i *T. zimbabwensis* występujące u ssaków i gadów [8].

Na terenie Europy występują cztery gatunki *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis* [9, 10], a spośród nich w Polsce tylko dwa: *T. spiralis* i *T. britovi* [11, 12].

Ponieważ wszystkie gatunki i genotypy z rodzaju *Trichinella* są niemal identyczne pod względem morfologicznym, niezależnie od stadium rozwojowego pasożyta, są praktycznie niemożliwe do rozróżnienia klasycznymi metodami mikroskopowymi. Dlatego poszukiwano innych metod, które mogłyby być przydatne do identyfikacji gatunkowej włośni.

Metody immunologiczne (np. ELISA i Western blot) w sposób pośredni i przyżyciowo potwierdzają obecność pasożyta w organizmie żywiciela poprzez wykazanie obecności specyficznych przeciw-

ciał przeciw jego antygenom. Nie są one jednak wystarczające aby określić przynależność gatunkową pasożyta.

W ostatnich latach na szeroką skalę stosuje się metody biochemiczne (np. analiza izoenzymów) oraz metody biologii molekularnej, z których najbardziej rozpowszechnione są metody oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR).

Analiza izoenzymów

Izoenzymy są to enzymy różniące się sekwencją aminokwasową ale katalizujące tę samą reakcję chemiczną, różnią się też właściwościami chemicznymi i fizycznymi (np. punktem izoelektrycznym, ruchliwością elektroforetyczną) i często kodowane są przez homologiczne geny.

W analizie izoenzymów, białka enzymatyczne różniące się składem aminokwasów wykazują różnice podczas rozdzielania elektroforetycznego. Różnice w rozdziale elektroforetycznym białek są markerami zmienności na poziomie DNA pomiędzy genotypami pasożyta. Zaletą tej metody jest możliwość analizy różnych odcinków genomu, które ewoluowały niezależnie od siebie. Jeśli analizie została poddana wystarczająco duża grupa izoenzymów, to różnice w migracji zaobserwowane po rozdziale elektroforetycznym są skorelowane z różnicami genetycznymi pomiędzy populacjami pasożytów poddanych analizie. Porównywanie polimorfizmu enzymów okazało się przydatną metodą do identyfikacji i charakterystyki pasożytów oraz w badaniu heterogeniczności wewnątrz populacji.

Do identyfikacji włośni izoenzymy zostały użyte już na początku lat 80. XX wieku. W 1982 r. Flockhart i wsp. [13] wykazali różnice we wzorze rozdzielania izoenzymów pomiędzy izolatami *Trichinella*. Mimo, że identyfikacji poddano wtedy małą liczbę izolatów, wyniki były obiecujące i stanowiły podstawę do dalszych, bardziej wnikliwych badań, a metoda została zaakceptowana przez Międzynarodowe Centrum Referencyjne (TRC) do identyfikacji włośni. Dane uzyskane w późniejszym okresie w oparciu o wyniki elektroforezy izoenzymów otrzymane dla większej liczby izolatów (152) i 27 enzymów [14], w połączeniu z danymi biologicznymi i biochemicznymi, były podstawą do zaproponowania nowej struktury taksonomicznej rodzaju *Trichinella* [7].

Na początku lat 90. metoda analizy izoenzymów znalazła szerokie zastosowanie w badaniach izola-

tow włośni pochodzących z różnych części świata. Przy użyciu tej techniki izolaty pochodzące z Chorwacji zidentyfikowano jako *T. spiralis* i *T. britovi*, a izolaty z Kazachstanu i Tasmanii jako *T. pseudospiralis* [15].

Metoda analizy izoenzymów została poddana wielu modyfikacjom i jest metodą biochemiczną stosowaną do dziś. Technika MLEE (ang. multilocus enzyme electrophoresis) jest niezwykle czułą odmianą standardowej metody rozdziału elektroforetycznego izoenzymów, jednakże nośnikiem w tym przypadku jest żel celulozowy a nie skrobiowy [16]. Zastosowanie tej techniki umożliwiło jednoczesne zbadanie 28 izolatów włośni, należących do ośmiu gatunków i sześciu genotypów i scharakteryzowanie loci dla 12 enzymów. Na tej podstawie wyodrębniono 19 różnych fenotypów. W oparciu o te dane izolaty zaszeregowano do dwóch głównych grup *Trichinella*: wytwarzających otoczki wokół larw w mięśniach i nieotabiających się. Dane te pokrywały się z wynikami badań biologicznych, epidemiologicznych i molekularnych i ukazywały dużą zmienność genetyczną wewnątrz rodzaju, a także wykazały przydatność metody.

Metoda ta jest często wykorzystywana w analizie biochemicznej do badania zmienności genetycznej pomiędzy osobnikami w poszczególnych populacjach i na poziomie gatunku oraz w badaniach z zakresu genetyki ewolucyjnej. Zaletą metody jest możliwość ustalenia pokrewieństwa pomiędzy poszczególnymi gatunkami czy genotypami. Jednak metoda ta nie może być wykorzystywana do badania małych próbek materiału (pojedynczych larw *Trichinella*).

Metody biologii molekularnej

Następnym krokiem w udoskonalaniu metod pomocnych w identyfikacji pasożytów było zaadaptowanie technologii opartych na badaniu DNA. Już proste trawienie DNA pasożyta enzymami restrykcyjnymi i rozdział otrzymanych fragmentów na żelu, okazało się przydatne do zaobserwowania różnic pomiędzy gatunkami *Trichinella*.

RFLP (ang. restriction fragment length polymorphism), czyli badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych, opiera się na trawieniu wyizolowanego DNA jednym lub kilkoma enzymami restrykcyjnymi. Enzymy restrykcyjne, inaczej endonukleazy restrykcyjne, tną cząsteczkę DNA w miejscach o określonych sekwencjach. Taka specyficzność sekwencyjna oznacza, że trawienie czą-

steczki DNA danym enzymem restrykcyjnym powinno zawsze dawać ten sam zestaw fragmentów. Jednak w przypadku genomowego DNA niektóre miejsca restrykcyjne są polimorficzne i występują jako dwa allele. Jeden allel, mający prawidłową sekwencję dla miejsca restrykcyjnego, jest cięty podczas trawienia, natomiast zmieniona sekwencja DNA w drugim allelu powoduje, że miejsce restrykcyjne nie jest rozpoznawane. W tym drugim przypadku dwa graniczące fragmenty restrykcyjne po traktowaniu enzymem pozostają ze sobą połączone, co prowadzi do polimorfizmu długości fragmentów. W celu odczytania wyniku, produkty trawienia poddaje się elektroforezie w żelu agarozowym.

Po raz pierwszy technika RFLP została użyta do wskazania różnic pomiędzy *T. spiralis* i *T. pseudospiralis*, a następnie wykorzystano ją do zilustrowania różnic pomiędzy innymi izolatami *Trichinella* [15].

Metoda dostarczyła dowodów na istnienie zmienności genetycznej wewnątrz rodzaju, lecz duża liczba prążków powstała po trawieniu DNA, pojawiająca się po rozdziale elektroforetycznym na żelu, nastręczała trudności w interpretacji wyników. W celu oznaczenia RFLP niezbędne jest określenie wielkości tylko jednego lub dwóch pojedynczych fragmentów restrykcyjnych na tle wielu nieistotnych fragmentów. Nie jest to łatwe, ale istnieją techniki umożliwiające wykrycie pojedynczych fragmentów.

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych i znakowanie DNA

Hybrydyzacja cząsteczek DNA polega na łączeniu się dwóch nici DNA na podstawie komplementarności zasad. Zjawisko to zostało wykorzystane do opracowania wielu przydatnych w biologii molekularnej narzędzi. Jednym z nich jest hybrydyzacja metodą Southerna. W metodzie tej wykrywa się określone fragmenty restrykcyjne na tle wielu innych. Możliwe jest wykrycie nawet pojedynczych fragmentów DNA. Zestaw fragmentów restrykcyjnych otrzymanych po trawieniu enzymami poddaje się elektroforezie w żelu agarozowym, następnie przenosi się na błonę nylonową i badany fragment wykrywa się przez hybrydyzację z sondą. Sondą do hybrydyzacji jest wyznakowana cząsteczka DNA, komplementarna do docelowego DNA, który chcemy wykryć. Pozycję docelowego fragmentu restrykcyjnego na filtrze identyfikuje się przez wykrycie sygnału znacznika dołączonego do sondy. Po-

czątkowo stosowano sondy molekularne wyznakowane radioaktywnie, jednakże w ostatnich latach odchodzi się od stosowania radioaktywnych izotopów i coraz częściej do detekcji wykorzystuje się sondy wyznakowane enzymatycznie lub fluorochromami.

Technikę znakowania radioaktywnego DNA wykorzystano przy badaniu całkowitego DNA genomowego *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni* i *T. pseudospiralis*. Wyznakowane DNA wykorzystano w metodzie dot blot do przeszukiwania genomów tych właśnie gatunków. Metoda dot blot (lub inaczej slot blot) jest uproszczoną wersją Southern blot; nie przeprowadza się elektroforezy w żelu agarozowym, próbki są nakraplane bezpośrednio na bibułę, a następnie łączone z sondami DNA. Wyniki otrzymane w reakcji hybrydyzacji DNA tych czterech gatunków z sondami, wykazały brak reakcji krzyżowych pomiędzy DNA *T. spiralis* i *T. nativa* a *T. nelsoni* i *T. pseudospiralis* [15].

Wykorzystanie sond molekularnych znacznie poprawiło czułość, specyficzność i skuteczność testów. Poprawiło też czułość standardowej metody RFLP oraz pozwoliło na zastąpienie metody Southern blot metodą dot blot co znacznie skróciło i uprościło procedurę.

W kolejnych latach opracowano wiele innych gatunkowo specyficznych sond, np. pPRA i pBP2 (sondy *T. spiralis* — specyficzne). Przy pomocy tych sond wyróżniono kolejny genotyp — *Trichinella* T5 — nazwany później *Trichinella murrelli*. Stosując metodę dot-blot z wykorzystaniem sondy pUPB3.7 potwierdzono również, że izolaty włośni pochodzące z Indiany i Illinois (USA) od zwierząt wolno żyjących to *T. murrelli*. Wykazano także, że *T. spiralis* nie jest gatunkiem dominującym w środowisku leśnym w tym rejonie, jak wcześniej sądzono [17].

Przez kolejną dekadę techniki biologii molekularnej były udoskonalane, a wprowadzenie do metodyki reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, ang. polymerase chain reaction) pozwoliło na badanie różnic pomiędzy grupami organizmów, a także badanie zmienności genetycznej na poziomie pojedynczych robaków. Początkowo w PCR wykorzystywano startery uniwersalne (technika RAPD-PCR). Kolejnym etapem udoskonalania metody było projektowanie specyficznych oligonukleotydów komplementarnych do poszukiwanego odcinka DNA. Często heterogeniczność/zmienność na poziomie homologicznej pary zasad w DNA jest wystarczająca do zaprojektowania specyficznych starterów, pozwala-

jących na rozróżnianie pasożytów *Trichinella* co do gatunku [18].

Do przeprowadzenia klasycznej reakcji amplifikacji niezbędne są: cząsteczki DNA stanowiące matrycę, która może być obecna w bardzo niewielkich ilościach, nukleotydy, termostabilna polimeraza DNA, odporna na denaturację pod wpływem wysokiej temperatury oraz syntetyczne oligonukleotydy czyli startery. Jak wcześniej wspomniano, startery można podzielić na dwie grupy; jedna to uniwersalne startery o krótkich sekwencjach — najczęściej 9–11 pz (par zasad) — przyłączające się do matrycy DNA w sposób nie spełni komplementarny zależny od warunków reakcji. Każdy taki starter zapoczątkowuje reakcję amplifikacji w kilku miejscach genomu jednocześnie. Liczba i długość namnożonych dzięki nim fragmentów badanego DNA zależy od sekwencji nukleotydowej matrycy oraz warunków reakcji. Druga grupa starterów to specyficzne startery o określonych sekwencjach komplementarne do końców sekwencji poszukiwanej w genomie pasożyta. Reakcja przebiega w trzech etapach: (i) denaturacja DNA w wysokiej temperaturze (95°C) czyli rozdzielanie podwójnej nici na pojedyncze, (ii) aniling, czyli przyłączanie się do matrycy DNA starterów, krótkich odcinków DNA inicjujących reakcję amplifikacji (reakcja przebiega w obniżonej temperaturze: 45–60°C) oraz (iii) elongacja czyli synteza odcinka poszukiwanego DNA, która zachodzi w temperaturze 72°C, optymalnej dla działania enzymu, polimerazy DNA. Ponieważ polimeraza jest termostabilna, mieszaninę reakcyjną można ponownie podgrzać bez niszczenia aktywności enzymu. Podwójne nici DNA znowu oddzielią się od siebie i po obniżeniu temperatury startery ponownie będą mogły przyłączyć się do matrycy, a także do nowo zsintetyzowanych nici. Kolejne cykle prowadzą do logarytmicznego wzrostu ilości produktu. PCR można kontynuować przez 30–40 cykli, w czasie których pojedynczą cząsteczkę wyjściową można namnożyć do dziesiątek milionów identycznych fragmentów, co stanowi kilka mikrogramów DNA. Wynik PCR odczytuje się po przeprowadzeniu elektroforezy, czyli rozdzieleniu cząsteczek DNA w żelu agarozowym.

Metodę PCR oraz jej odmiany zaczęto wykorzystywać do różnicowania gatunków *Trichinella* na początku lat 90. XX wieku.

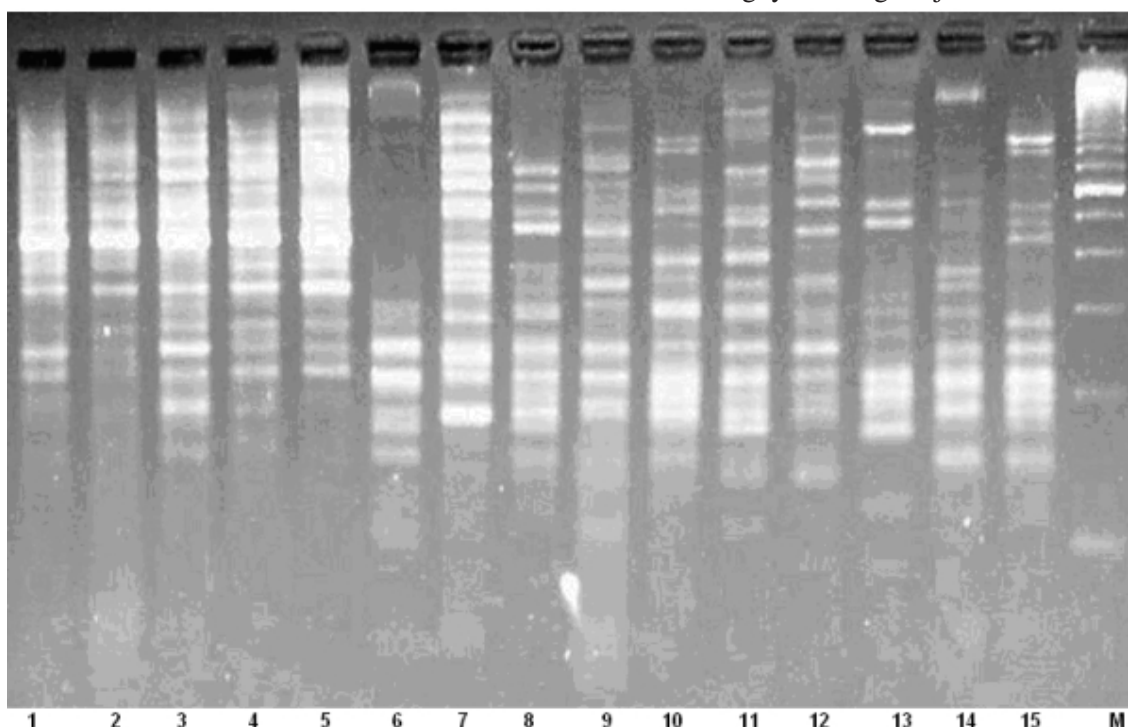
RAPD PCR

Jako pierwszą do namnażania odcinków geno-

owego DNA zaczęto stosować technikę RAPD-PCR (ang. random amplified polymorphic DNA), z wykorzystaniem krótkich, uniwersalnych starterów oraz przy niskich temperaturach anilingu. W ten sposób otrzymano zestaw produktów amplifikacji, który po rozdziale elektroforetycznym w żelu agarozowym daje charakterystyczny dla danego genotypu wzór prążków na żelu. Technika ta okazała się być szybką i wydajną metodą, dającą dobre rezultaty w identyfikacji genotypów *Trichinella*. Metoda ta jest szybsza, wydajniejsza i mniej pracochłonna niż np. RFLP lub Southern blot. Dodatkowo wymagane są znacznie mniejsze ilości materiału, ponieważ DNA powielane jest w kolejnych etapach reakcji amplifikacji (PCR). Stosowano ją z powodzeniem wykorzystując jako matrycę DNA wyizolowane z pojedynczych larw. Wykazano także jej użyteczność w identyfikacji prób ze świeżego materiału jak również utrwalonego w alkoholu [19, 20]. RAPD-PCR wykorzystano w badaniach epidemiologicznych do identyfikacji izolatów pochodzących z Hiszpanii, Estonii i Chin, przy jej pomocy wykazano mieszaną inwazję *T. spiralis*/*T. britovi* u naturalnie zarażonego jenota (*Nyctereutes procyonoides*).

Jednak i ta metoda posiada pewne wady, zawodzi szczególnie przy uzyskiwaniu powtarzalności wyników. Może to być spowodowane różną jakością DNA użytego jako matrycy, gdyż DNA pasożyta łatwo ulega degradacji podczas niewłaściwego przechowywania i transportu próbek [15] (Rys. 1).

Inna odmiana metody PCR to PCR SSCP (ang. single strand conformation polymorphism), czyli badanie polimorfizmu konformacji jednoniciowej. Pierwszym etapem jest standardowa reakcja amplifikacji. Następnie w metodzie wykorzystuje się wysoką temperaturę do rozdzielenia podwójnych nici DNA powstałych podczas PCR. Pojedyncze odcinki jednoniciowe poddawane są rozdzielaniu w żelu w warunkach nieredukujących. Cząsteczki jednoniciowe DNA tworzą drugo- i trzeciorzędowe struktury powstające w wyniku łączenia się zasad w obrębie nici. Ich wielkość zależy od długości cząsteczki i sekwencji. Podczas elektroforezy zostaną wychwycone nawet niewielkie różnice w mobilności cząsteczki (ruchliwości cząsteczek w nośniku) a co za tym idzie, zmiany w układzie prążków na żelu, spowodowane zmianą konformacji cząsteczek. Możliwe jest uwidocznienie różnic w sekwencji produktów PCR nawet gdy ich długość jest taka sama.



Rys. 1. Rozdział w żelu agarozowym produktów RAPD PCR otrzymanych z pojedynczych larw mięśniowych (fotografia własna). Linie 1-15 to odpowiednio: 1-5 — *T. britovi*, 6-11 — próby badane, 12-15 — *T. spiralis*, M — wzorzec wielkości

Fig. 1. Random amplified polymorphic DNA patterns (RAPD) obtained from single muscle larvae. Lines: 1-5 — refer to *T. britovi*, 6-11 — PCR products obtained from field collected larvae, 12-15 — *T. spiralis*, M — molecular weight marker

Metoda ta została użyta do charakterystyki regionu ESV (expansion segment V) dużej podjednostki rybosomalnego DNA (1srDNA) siedmiu izolatów *Trichinella*. Otrzymane wyniki ujawniły wysoki poziom zmienności sekwencji w tym rejonie u poszczególnych gatunków i genotypów. Późniejsze badania wykazały, że metoda jest niezwykle czuła, a wybrana do badań sekwencja DNA na tyle zmienna i specyficzna, iż pozwalała na wykazanie różnic pomiędzy izolatami [21]. Niestety była to niezwykle trudna i żmudna metoda, a dodatkową jej wadą było stosowanie markerów radioaktywnych do końcowej wizualizacji. Zmodyfikowaną standardową metodę SSCP, w której wyeliminowano izotopy radioaktywne, nazwano „cold” SSCP. Posłużyła ona do wykazania zmienności w regionie ESV w jądrowym rDNA pomiędzy poszczególnymi genotypami *Trichinella* [22].

W dalszym ciągu trwały próby zaprojektowania takich starterów, które pozwoliłyby precyzyjnie i jednoznacznie określić przynależność gatunkową/genotypową badanych izolatów włośni. W tym celu doszukiwano się charakterystycznych różnic w sekwencjach wśród różnych genów, zarówno w genomie jądrowym jak i mitochondrialnym pasożyta, pozwalających zaprojektować gatunkowo specyficzne startery lub otrzymać unikalny wzór po

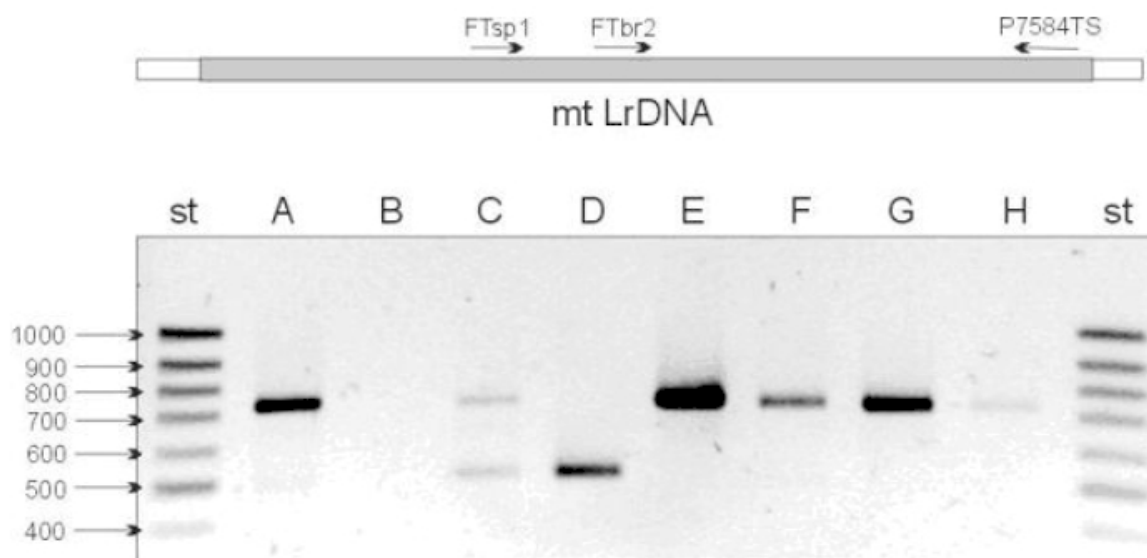
trawieniu produktów PCR enzymami restrykcyjnymi.

PCR oparte na sekwencji mitochondrialnego DNA

DNA mitochondrialne występuje w komórkach organizmów eukariotycznych w postaci dodatkowych łańcuchów DNA obok genomu jądrowego. Genom mitochondrialny to kolista cząsteczka DNA, jest bardzo zwarty, brak w nim niefunkcyjnych sekwencji międzygenowych, jest względnie stały, nie podlega rekombinacji i często ewoluuje szybciej niż genom jądrowy. DNA mitochondrialne koduje wyłącznie białka potrzebne do funkcjonowania mitochondrium, rybosomalne DNA, odmienne od jądrowego odpowiednika, transportujący RNA oraz liczne białka łańcucha oddechowego. Ze względu na swoje unikalne właściwości mitochondrialne DNA jest często wykorzystywane w badaniach ewolucyjnych oraz w systematyce organizmów jako wiarygodny miernik pokrewieństw.

Sekwencje genomu mitochondrialnego są chętnie wykorzystane do projektowania starterów gatunkowo specyficznych pozwalających na identyfikację włośni.

Metoda PCR-RFLP to połączenie standardowej



Rys. 2. Rozdział produktów PCR przy użyciu pary starterów (SET 1) w żelu agarozowym, (fotografia własna).

A — *T. spiralis*, (izolat ISS571), B — kontrola negatywna, C — inwazja mieszana *T. spiralis/T. britovi*, D — *T. britovi*, (izolat ISS569), E-H — próby badane, st — wzorzec wielkości

Fig. 2. Diagnostic amplification of the *T. spiralis* and *T. britovi* large mitochondrial rRNA (mt LrDNA). Line A — *T. spiralis*, (isolate code number ISS571), B — negative control, C — mixed infection *T. spiralis/T. britovi*, D — *T. britovi* (isolate code number ISS569), E-H — PCR products obtained from field collected single muscle larvae, st — molecular weight standard

metody PCR z analizą restrykcyjną, w której produkty amplifikacji poddaje się działaniu enzymów restrykcyjnych i porównuje wzór powstałych prążków. W metodzie wykorzystano sekwencję mitochondrialnego DNA kodującego podjednostkę 1 oksydazy cytochromu (COX1) do zaprojektowania specyficznych starterów niezbędnych do przeprowadzenia reakcji PCR. Następnie produkty reakcji PCR zostały dodatkowo pocięte enzymami restrykcyjnymi w celu wykazania różnic pomiędzy poszczególnymi izolatami. Tę technikę wykorzystano do identyfikacji gatunkowej włośni i okazała się być na tyle precyzyjna, że zaowocowało to wyróżnieniem kolejnego genotypu *Trichinella* T9 [23].

W Zakładzie Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego przy współpracy z Instytutem Parazytologii PAN opracowano metodę PCR, która pozwala na identyfikację larw włośni występujących na terenie Polski: *T. spiralis* i *T. britovi* [24]. W metodzie tej jako marker genetyczny wykorzystuje się sekwencję kodującą dużą podjednostkę mitochondrialnego rDNA (mt LrDNA). Zaprojektowano dwa zestawy starterów umożliwiające identyfikowanie izolatów włośni. W procesie amplifikacji powstają pojedyncze produkty o wielkości charakterystycznej dla danego gatunku. Metoda jest czuła, gdyż możliwe jest zidentyfikowanie nawet pojedynczej larwy i daje powtarzalne wyniki. Pozwala określić przynależność gatunkową włośni występujących na terenie Polski oraz umożliwia wykrycie inwazji mieszanych *T. spiralis*/*T. britovi* występujących niekiedy u zwierząt domowych i wolno żyjących (Fig. 2).

PCR oparte na sekwencji jądrowego DNA

Genom jądrowy organizmów eukariotycznych jest liniowy i obejmuje zarówno wszystkie geny jak i odcinki międzygenowe. Występują w nim sekwencje DNA zawierające informacje kodujące białka, czyli geny, oddzielone sekwencjami niekodującymi, tzw. intronami, oraz duża część DNA pozagenowego, tzw. sekwencje powtarzające się rozproszone w genomie lub powtarzające się tandemowo.

Obszary kodujące i niekodujące genomu różnią się od siebie stopniem zmienności, obszary kodujące funkcjonalne białka należą do sekwencji wysoce konserwatywnych, czyli mało zmiennych, natomiast sekwencje niekodujące cechuje duża zmienność. Te cechy genomu jądrowego wykorzystano do projektowania specyficznych starterów w zależności od potrzeb badań.

Chętnie wykorzystywanym obszarem DNA są

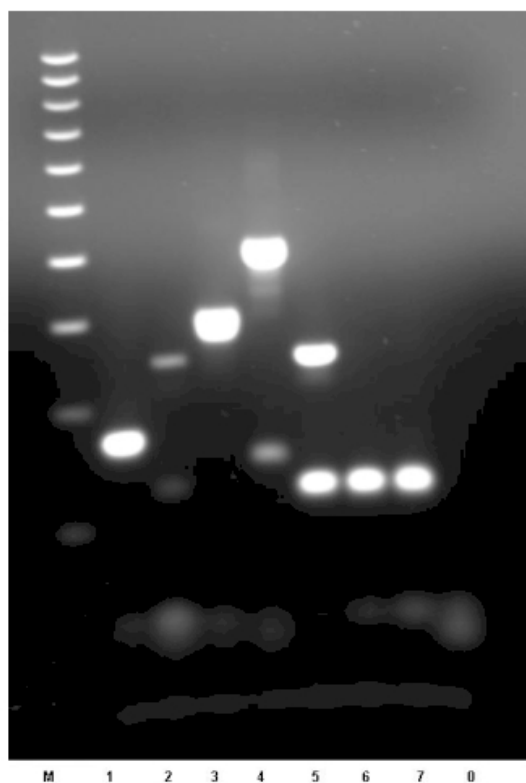
sekwencje kodujące podjednostki rRNA wraz z rozdzielającymi zewnętrznymi i wewnętrznymi sekwencjami transkrybowanymi, tzw. ITS i ETS. Zaletą tego obszaru jest występowanie blisko siebie sekwencji zmiennych (ITS) oraz silnie konserwatywnych genów kodujących podjednostki rRNA. Innymi obszarami chętnie wykorzystywanymi do badań taksonomicznych są sekwencje wysoce konserwatywne, kodujące funkcjonalne białka.

Multiplex PCR jest techniką opracowaną stosunkowo niedawno i wykorzystywaną do identyfikacji włośni. Podczas wykonania jednej reakcji multiplex PCR możliwe jest jednoczesne zidentyfikowanie wszystkich obecnie znanych gatunków i genotypów włośni. Do zaprojektowania specyficznych starterów wykorzystano sekwencje ITS1 i ITS2 oraz powtórzone sekwencje ESV rDNA. W oparciu o te sekwencje stworzono pięć zestawów starterów, które razem, podczas jednego testu PCR, wykonanego w jednej próbówce i na DNA wyizolowanym z pojedynczej larwy mięśniowej *Trichinella*, pozwalają określić przynależność gatunkową lub genotypową badanych włośni. W reakcji multiplex PCR dla poszczególnych gatunków i genotypów otrzymuje się jeden lub co najwyżej dwa produkty amplifikacji o różnych wielkościach, co daje charakterystyczny obraz na żelu po rozdziale elektroforetycznym.

Metoda ta jest zaakceptowana przez Międzynarodowe Centrum Referencyjne (TRC) i jest obecnie najczęściej stosowana do identyfikacji włośni. Jest prosta w wykonaniu i daje powtarzalne, łatwe do interpretacji wyniki. Ogromną zaletą metody jest możliwość użycia jej do identyfikacji pojedynczej larwy włośni, co ma duże znaczenie w przypadku ograniczonego dostępu do materiału badanego [18, 25] (Fig. 3).

Różnorodność opracowanych metod biologii molekularnej daje ogromne możliwości badawcze umożliwiając identyfikowanie gatunków pasożytów przy jednocześnie minimalnym nakładzie pracy i środków. Pozwoliło w ostatnich latach na zweryfikowanie panujących poglądów i uzupełnienie danych dotyczących rodzaju *Trichinella*.

Na podstawie badań biochemicznych i molekularnych wyodrębniono 11 genotypów *Trichinella*, w tym 8 o ustalonej już nazwie gatunkowej: *T. spiralis* (T1), *T. nativa* (T2), *T. britovi* (T3), *T. pseudospiralis* (T4), *T. murrelli* (T5), *T. nelsoni* (T7), *T. papuae* (T10) oraz *T. zimbabwensis* (T11) oraz 3 genotypy o nieustalonej jeszcze pozycji taksonomicznej i przynależności gatunkowej: *Trichinella* T6, T8 i T9.



Rys. 3. Rozdział na żelu agarozowym produktów multiplex PCR. Linie 1-7 to odpowiednio: 1 — *T. spiralis*, 2 — *T. britovi*, 3 — *T. pseudospiralis*, 4 — *T. nelsoni*, 5 — *T. britovi*, 6, 7 — *T. murrelli*, 0 — kontrola negatywna (fotografia własna), M — wzorzec wielkości

Fig. 3. Multiplex PCR products from *Trichinella* genotypes: lines: 1 — *T. spiralis*, 2 — *T. britovi*, 3 — *T. pseudospiralis*, 4 — *T. nelsoni*, 5 — *T. britovi*, 6, 7 — *T. murrelli*, line 0 — negative control, M — molecular weight marker.

Biorąc pod uwagę dodatkowo wyniki badań morfologicznych, epidemiologicznych oraz dane o środowisku z którego pochodzą izolaty w rodzaju *Trichinella* wyróżniono dwie główne grupy [8]:

1. gatunki/genotypy wytwarzające torebkę wokół larwy mięśniowej, pasożytujące wyłącznie u ssaków

2. gatunki/genotypy nie wytwarzające torebki wokół larwy mięśniowej, pasożytujące u ssaków, ptaków i gadów

Do pierwszej grupy zalicza się:

— gatunek kosmopolityczny: *T. spiralis*,

— gatunki i genotypy strefy umiarkowanej: *T. britovi*, *T. murrelli*, *Trichinella T8* i *Trichinella T9*,

— gatunek i genotyp regionu arktycznego: *T. nativa* i *Trichinella T6*,

— gatunek strefy równikowej: *T. nelsoni*.

Do drugiej grupy zalicza się:

— gatunek pasożytujący u ssaków i ptaków: *T. pseudospiralis*,

— gatunki pasożytujące u ssaków i gadów: *T. papuae* i *T. zimbabwensis*.

To przeszeregowanie w rodzaju *Trichinella* pokazuje niezwykle różnorodność genetyczną włośni i uwidacznia, że liczba organizmów przynależących do tego rodzaju stale wzrasta.

Podsumowanie

Wyniki badań mikroskopowych nie zawsze potwierdzają obecność włośni w mięśniach żywiciela, szczególnie w przypadkach inwazji wywołanych niewielką liczbą larw. Metody mikroskopowe są przydatne w badaniach morfologii pasożyta, ale nie do określenia gatunku.

Metody immunologiczne/serologiczne pozwalały na wykrycie przeciwciał przeciw pasożytowi we krwi żywiciela lub wykrycie antygenów pasożyta w badanym materiale, co wskazywało na obecność pasożyta. Biorąc jednak pod uwagę różnorodność stadiów rozwojowych włośni, a co za tym idzie zmienność antygenów, należało uznać te metody za mało dokładne w identyfikacji gatunku.

Do pełnego poznania różnorodności pasożytów należących do rodzaju *Trichinella*, posłużono się najnowszymi technikami z zakresu biochemii i biologii molekularnej. Opracowane w ostatnich latach techniki opierające się na reakcji amplifikacji DNA (PCR), okazały się być stosunkowo proste w wykonaniu i niewymagające użycia dużej ilości matrycy DNA (DNA wyizolowane z pojedynczej larwy), a jednocześnie są niezwykle czułe, precyzyjne i specyficzne.

Literatura:

- [1] Mehlhorn H. 2001. Encyclopedic Reference of Parasitology, Wydanie 2, Springer, Berlin.
- [2] Pozio E. 2005. The broad spectrum of *Trichinella* host: from cold- to warm-blooded animals. *Veterinary Parasitology* 132: 3–11.
- [3] Kapel C.M. 2000. Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Veterinary Parasitology* 93: 263–278.
- [4] Owen R. 1835. Description of a microscopic entozoon infesting the muscles of a human body. *Transactions of the Zoological Society of London* 1: 315–323.
- [5] Britov V.A., Boev S.N. 1972. Taxonomic rank of various strains of *Trichinella* and their circulation in nature. *Vestnik Akademii Nauk Kazachskoj SSR* 28:

- 27–32 [in Russian].
- [6] Garkavi B.L. 1972. The species of *Trichinella* isolated from wild carnivores. *Veterinariia* 10: 90–91 [in Russian].
- [7] Pozio E., La Rosa G., Murrell K.D., Lichtenfels J.R. 1992. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *Journal of Parasitology* 78: 654–659.
- [8] Pozio E., Zarlenga D.S. 2005. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology* 35: 1191–1204.
- [9] Pozio E. 2001. New patterns of *Trichinella* infections. *Veterinary Parasitology* 98: 133–148.
- [10] Hurnikova Z., Snabel V., Pozio E., Reiterova K., Hrcckova G., Halasova D., Dubinsky P. 2005. First record of *Trichinella pseudospiralis* in the Slovak Republic found in domestic focus. *Veterinary Parasitology* 128: 91–98.
- [11] Nowosad P., Pozio E. 1998. First report of *Trichinella britovi* in wildlife from Poland. *Acta Parasitologica* 43: 236–237.
- [12] Cabaj W., Pozio E., Moskwa B., Malczewski A. 2000. *Trichinella britovi* and *T. spiralis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Poland. *Acta Parasitologica* 45: 340–344.
- [13] Flockhart H.A., Harrison S.E., Dobinson A.R., James E.R. 1982. Enzyme polymorphism in *Trichinella*. *Transactions of the Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene* 76: 541–545.
- [14] La Rosa G., Pozio E., Rossi P., Murrell K.D. 1992. Allozyme analysis of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *Journal of Parasitology* 78:641–646.
- [15] Zarlenga D.S., La Rosa G. 2000. Molecular and biochemical methods for parasite differentiation within the genus *Trichinella*. *Veterinary Parasitology* 93: 279–292.
- [16] La Rosa G., Marucci G., Pozio E. 2003. Biochemical analysis of encapsulated and non-encapsulated species of *Trichinella* (Nematoda, Trichinellidae) from cold- and warm-blooded animals reveals a high genetic divergence in the genus. *Parasitology Research* 91: 462–466.
- [17] Minchella D.J., Branstetter B.A., Kazacos K.R. 1989. Molecular characterisation of sylvatic isolates of *Trichinella spiralis*. *Journal of Parasitology* 75: 388–392.
- [18] Zarlenga D.S., Chute M.B., Martin A., Kapel C.M.O. 1999. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology* 29: 1859–1867.
- [19] Bandi C., La Rosa G., Bardin M.G., Damiani G., Comincini S., Tasciotti L., Pozio E. 1995. Random amplified polymorphic DNA fingerprints of the eight taxa of *Trichinella* and their comparison with allozyme analysis. *Parasitology* 110: 401–407.
- [20] Bandi C., La Rosa G., Comincini S., Damiani G., Pozio E. 1993. Technique for the identification of *Trichinella* species. *Parasitology* 107: 419–424.
- [21] Gasser R.B., Zhu X.Q., Monti J.R., Dou L., Cai X., Pozio E. 1998. PCR-SSCP of rDNA for the identification of *Trichinella* isolates from mainland China. *Molecular Cell Probes* 12: 27–34.
- [22] Gasser R.B., Hu M., EL-Osta Y.A., Zarlenga D.S., Pozio E. 2005. Genetic analysis of *Trichinella* population by "cold" single-strand conformation polymorphism analysis. *Veterinary Parasitology* 132: 23–26.
- [23] Nagano I., Wu Z., Matsuo I., Pozio E., Takahashi Y. 1999. Identification of *Trichinella* genotypes by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *International Journal for Parasitology* 29: 1113–1120.
- [24] Borsuk P., Moskwa B., Pastusiak K., Cabaj W. 2003. Molecular identification of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* by diagnostic multiprimer large mitochondrial rRNA amplification. *Parasitology Research* 91: 374–377.
- [25] Zarlenga D.S., Chute M.B., Martin A., Kapel C.M. 2001. A single, multiplex PCR for differentiating all species of *Trichinella*. *Parasite* 8: S24–26.

Wpłynęło 21 lipca 2006

Zaakceptowano 28 lipca 2006