ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 51, No 1 (2000)

Application of polymerase chain reaction (PCR) in parasitology

S. TRIVIZAKI (Σ. ΤΡΙΒΙΖΑΚΗ), G. THEODOROPOULOS (Γ. ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΣ)

doi: 10.12681/jhvms.15652

Copyright © 2018, S TRIVIZAKI, G THEODOROPOULOS

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

To cite this article:

TRIVIZAKI (Σ. ΤΡΙΒΙΖΑΚΗ) S., & THEODOROPOULOS (Γ. ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΣ) G. (2018). Application of polymerase chain reaction (PCR) in parasitology. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *51*(1), 16–21. https://doi.org/10.12681/jhvms.15652

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 15/02/2026 07:12:35

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2000, 51(1): 16-21

Εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) στην παρασιτολογία

Σ. Τριβιζάκη, Γ. Θεοδωρόπουλος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των παρασίτων, την περιγραφή της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ φύλων, οικογενειών και ειδών παρασίτων, καθώς και για τη διάγνωση και επιδημιολογική μελέτη των παρασιτικών νοσημάτων. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της PCR είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία της έναντι των κλασικών μεθόδων έμμεσης διάγνωσης.

Λέξεις ευρετηρίασης: Παράσιτα, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR

ABSTRACT. Trivizaki S, Theodoropoulos G. Application of polymerase chain reaction (PCR) in parasitology. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 2000, 51(1):16-21.* **The method of polymerase chain reaction (PCR) is applied for parasite identification, for studying genetic diversity between phylums, families and species of parasites, as well as for the diagnosis and epidemiological study of parasitic diseases. The biggest advantage of PCR is its higher sensitivity in comparison to other classical indirect diagnostic methods.**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μοριακή βιολογία αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την παρασιτολογία, ιδιαίτερα στον τομέα της ταυτοποίησης των πιο κοινών παρασίτων[1]. Συγκεκριμένα, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction: PCR) και ο προσδιορισμός πολυμορφίας με τη μέθοδο των τυχαίως ενισχυμένων τμημάτων DNA (random amplification of polymorphic DNA: RAPD) που βασίζεται στην PCR είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για τη διάγνωση και την επιδημιολογική μελέτη των παρασιτικών μολύνσεων[2]. Διάφορες παρασιτικές μολύνσεις προσδιορίζονται μέσω της PCR ή RAPD-PCR με μεγαλύτερη ευαισθησία σε σύγκριση με τις κλασικές μεθόδους. Έτσι, τελευταία εφαρμόζονται αυτές οι νέες μοριακές μέθοδοι που βοηθούν στη μελέτη της επιδημιολογίας των παρασιτικών προσβολών[2].

Αλληλουχίες στόχοι της PCR και RAPD-PCR ανάλυσης αποτελούν τα τμήματα του ριβοσωμικού DNA και RNA[1]. Η PCR χρησιμοποιείται για την περιγραφή της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ οικογενειών, φύλων και ειδών, αλλά και για την ταυτοποίηση των πρωτοζώων και των ελμίνθων[2,3]. Προβλήματα στην εφαρμογή της μεθόδου αποτελούν η ποικιλομορφία των παρασίτων στα διάφορα βιολογικά στάδια και η εξειδίκευση των εκκινητών στην ανίχνευση κάθε είδους[1].

Η χρήση των μεθόδων μοριακής βιολογίας στην κτηνιατρική παρασιτολογία παραμένει σε πειραματικό στάδιο, ενώ μελλοντικός στόχος είναι η χρησιμοποίησή τους σε βάση ρουτίνας για διαγνωστικούς σκοπούς[1]. Για το λόγο αυτό στην εργασία αυτή γίνεται μια αξιολόγηση των μέχρι τώρα εφαρμογών των μεθόδων PCR και RAPD-PCR στην κτηνιατρική παρασιτολογία. Περιγραφή εκτέλεσης των μεθόδων αυτών μπορεί να αναζητηθεί στη βιβλιογραφία[4,5].

ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΖΩΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Entamoeba spp.

Η διάγνωση της αμοιβάδωσης (*Entamoeba*) με μικροσκοπική αναγνώριση του παρασίτου παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία και δεν μπορεί να διαχωρίσει τα είδη *E. histolytica* από το *E. dispair*[6]. Έγινε σύγκριση της ικανότητας αναγνώρισης της *E. histolytica* με PCR ή με ανίχνευση αντιγόνων[6]. Οι δύο μέθοδοι εμφάνισαν το ίδιο ποσοστό ευαισθησίας, κατά την ταυτοποίηση σε πρόσφατες καλλιέργειες της *E. histolytica*. Ωστόσο, η αντιγονική ανίχνευ-

Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Βοτανικός, 118 55 Αθήνα

Department of Anatomy and Physiology of Farm Animals, Faculty of Animal Science, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, Votanikos, Athens 118 55, Greece

Ημερ. Υποβολής: 01.07.99
Ημερ. Εγκρίσεως: 08.10.99

ση της *E. histolytica* πλεονεκτεί ως γρηγορότερη και τεχνικά πιο εύκολη μέθοδος στην εφαρμογή[6].

Trichomonas foetus

Η διάγνωση της προσβολής από την *T. foetus* παρεμποδίζεται κατά την εφαρμογή των συνήθων μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης του παρασίτου εξαιτίας των δευτερογενών μολύνσεων του δείγματος από συγγενή στην *T. foetus* πρωτόζωα, που επιμολύνουν το δείγμα κατά τη λήψη του[7]. Αντιθέτως, η εφαρμογή της PCR δεν παρουσιάζει αυτό το μειονέκτημα και γι' αυτό χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της μόλυνσης από *T. foetus* σε βάση ρουτίνας. Η PCR εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία (η ακρίβεια ανίχνευσης είναι περίπου 50 παράσιτα/ml σε έκπλυμα πόσθης) και συνιστάται κυρίως ως διαδικασία επιβεβαίωσης της διάγνωσης των ευρημάτων από *in vitro* καλλιέργεια ή μικροσκοπική παρατήρηση[7].

Trypanosoma sp.

Χρησιμοποιούνται διάφοροι ανιχνευτές νουκλεϊνικών οξέων για το διαχωρισμό των ειδών του *T. vivax* ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση[8]. Κατά το φυλογενετικό διαχωρισμό διαφόρων ειδών του *Trypanosoma* με PCR, βρέθηκε ότι το *T. brucei* (παράσιτο των θηλαστικών) αποτελεί τον πρόγονο όλων των ειδών του *Trypanosoma*[9]. Το *T. avium* (παράσιτο των πτηνών) κατατάσσεται μαζί με το *T. cruzi* (παράσιτο των θηλαστικών), ενώ το *T. boissoni* (παράσιτο των σπονδυλωτών), *T. triglae* (παράσιτο των υδρόβιων σπονδυλωτών της θάλασσας) και *T. carassi* (παράσιτο των υδρόβιων σπονδυλωτών του γλυκού νερού) μαζί με το *T. rotatorium* (παράσιτο των αμφίβιων ζώων)[9].

Οι συνήθεις παρασιτολογικές τεχνικές έχουν μικρή ευαισθησία στη διάγνωση μολύνσεων από το *Trypanosoma vivax*[10]. Η ευαισθησία και η ακρίβεια ανίχνευσης του παρασίτου με PCR εξαρτάται από την καθαρότητα του DNA που χρησιμοποιείται (με ειδική επεξεργασία καθαρισμού φτάνει τα 2 παράσιτα/ml)[10]. Η PCR είναι ικανή να ανιχνεύσει *T. vivax* από την 5η μέρα μόλυνσης, ενώ με ανοσολογικές μεθόδους, το αντιγόνο βρίσκεται στο αίμα 5-20 μέρες μετά τη μόλυνση[8]. Η PCR είναι εύχρηστη, έχει μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα για κάθε είδος, όμως μερικές φορές είναι δύσκολο να ερμηνευτούν τα προϊόντα της PCR[8,10].

Leishmania infantum

Η μέθοδος της PCR εφαρμόστηκε για την επιβεβαίωση της διάγνωσης της λεϊσμανίασης σε σκύλους που εμφανίζονταν ορολογικά θετικοί ή αρνητικοί[11]. Σε μια ομάδα 124 σκύλων, από τους οποίους 37 είχαν τυπικά κλινικά συμπτώματα της νόσου, βρέθηκαν θετικά κατά την εφαρμογή της PCR 40% των ζώων που δεν εμφάνιζαν τυπικές αλλοιώσεις[11]. Αντίθετα, κατά την εφαρμογή των συνήθων μεθόδων ανοσοφθορισμού 38% από τα ζώα που εμφάνισαν κλινικά συμπτώματα έδωσαν ψευδές αρνητικό αποτέλεσμα. Με εφαρμογή της PCR είναι δυνατό να διακριθούν τα προσβεβλημένα με *Leishmania* ζώα που αποτελούν απειλή για τη δημόσια υγεία και δεν μπορούν να διακριθούν με τις συνήθεις μεθόδους διάγνωσης[11].

Toxoplasma gondii

Η εφαρμογή της PCR για τη διάγνωση της προσβολής των ιστών με ωοκύστεις του *T. gondii* παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία από την ιστολογική εξέταση[12]. Το DNA του παρασίτου ανιχνεύτηκε εντονότερα στα ζώα που δέχτηκαν πειραματικά μεγαλύτερη δόση παρασίτων[12]. Η χρήση εξειδικευμένων εκκινητών επιτρέπει την ανίχνευση λιγότερων από 10 ταχυζωϊτών του *T. gondii* μέσω της PCR[13]. Η εφαρμογή της PCR για την ανίχνευση του *T. gondii* παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι συχνά εμφανίζει ψευδή ένδειξη ύπαρξης του παρασίτου που οφείλεται σε επιμόλυνση του δείγματος με άλλα παράσιτα[14].

Sarcocystis spp.

Η RAPD-PCR χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό 4 ειδών κοκκιδίων: *Sarcocystis tenella*, *S. gigantea*, *S. arieticanis* και *Toxoplasma gondii*. Με πολλαπλασιασμό του DNA με RAPD-PCR, διαχωρίστηκαν τα είδη *S. tenella* και *S. arieticanis* αλλά όχι *S. gigantea* και *T. gondii*[15]. Άρα η εφαρμογή της RAPD-PCR, αποτελεί πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο για τις μολύνσεις από Sarcocystis και ιδιαίτερα για το διαχωρισμό των *S. gigantea* και *T. gondii* από άλλα παθογόνα είδη με μικρότερη σημασία[15].

Eimeria spp.

Οκτώ διαφορετικά είδη του παρασίτου *Eimeria* που προσβάλλει τις όρνιθες μπορεί να διαχωριστούν με εφαρμογή της PCR[16]. Τα είδη που διαχωρίζονται είναι *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. tenella* και *E. hagani*. Η εφαρμογή της PCR και RAPD, χρησιμοποιώντας μεγάλο αριθμό από εκκινητές, παρήγαγε προϊόντα χαρακτηριστικά για κάθε είδος[16]. Από τα προϊόντα της RAPD-PCR με απλές μεθόδους διαχωρίζονται εύκολα τα 8 διαφορετικά είδη της *Eimeria*[16]. Η μέθοδος είναι χρήσιμη για το διαχωρισμό των παρασιτικών ειδών σε περιπτώσεις διάγνωσης ή επιδημιολογικών μελετών της κοκκιδίασης στα πτηνά.

Isospora sp.

Πρόσφατα με τη βοήθεια της PCR ανακαλύφθηκε ότι τρία είδη της *Isospora*, τα *I. felis*, *I. ohioensis* και *I. suis* συνδέονται περισσότερο με το *Toxoplasma gondii* και *Neospora caninum*[17]. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το γένος *Isospora* πρέπει να καταταχθεί στην οικογένεια Sarcocystidae αντί για την Eimeriidae που κατατασσόταν μέχρι τώρα[17].

Cryptosporidium parvum και Giardia lamblia

Υπάρχουν οκτώ ζεύγη εκκινητών για την εφαρμογή της PCR στη διαφορική ανίχνευση του *C. parvum* και *G. lamblia* στο νερό[18]. Η μέγιστη ευαισθησία της μεθόδου ε-

πιτυγχάνεται κατά την εφαρμογή δύο διαδοχικών κύκλων πολλαπλασιασμού ενός τμήματος DNA του παρασίτου[18]. Παρ' όλο το γεγονός ότι η μέθοδος είναι χρήσιμη και ακριβής, χρειάζεται βελτίωση[18]. Σήμερα η ανίχνευση του *C. parvum* και *G. lamblia* γίνεται με συνδυασμένη εφαρμογή της μεθόδου του ανοσοφθορισμού και PCR[19].

Neospora spp.

Με χρήση συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών για την PCR ανιχνεύεται μια αλληλουχία DNA της *Neospora spp.* σε δείγματα αίματος ή εμβρυϊκά υγρά, ακόμα και σε πρώιμα στάδια της προσβολής[20]. Ένας ειδικός ανιχνευτής για το *Toxoplasma* που η αλληλουχία του διαφέρει ελάχιστα από τον ανιχνευτή της *Neospora*, χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των δυο παρασίτων[20].

Babesia spp.

Η συνδυασμένη χρήση διάφορων εκκινητών της PCR αποκάλυψε 17 διαφορετικούς γονότυπους για τη *B. bovis*[21]. Το DNA της *B. bigemina* δεν πολλαπλασιάζεται με αυτούς τους εκκινητές[21]. Σε καμία από τις εφαρμογές της PCR δεν παρατηρήθηκε πολλαπλασιασμός του DNA του κυττάρου ξενιστή. Η μέθοδος είναι πολύ ακριβής αλλά απαιτεί μεγάλη προσοχή στους χειρισμούς για να αποφευχθεί η διασταυρωμένη μόλυνση από διαφορετικά παράσιτα[22]. Σήμερα η μέθοδος εφαρμόζεται σε επιδημιολογικές μελέτες, ανιχνεύοντας τους φορείς και τα διάφορα είδη της *Babesia* στα βοοειδή[22].

Theileria spp.

Με χρήση PCR ανιχνεύονται τα παράσιτα του γένους *Theileria* και διαχωρίζονται τα παράσιτα *T. annulata*, *T. parva* και *T. lestoquardi*[23,24]. Επίσης διαχωρίζονται με PCR τα είδη *T. sergenti*, *T. buffei* και *T. orientalis*[25]. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται δεν αναγνωρίζουν DNA διαφορετικών ειδών του *Babesia spp*[23]. Επίσης, με PCR ανιχνεύονται οι μεταβολές των αντιγονικών χαρακτηριστικών του *T. sergenti* κατά τη δίοδο του παρασίτου από τον ενδιάμεσο στον κύριο ξενιστή, καθώς και σε περιπτώσεις μακροχρόνιων προσβολών, λόγω της επίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή επί του παρασίτου[26].

ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Ascaris sp. και Toxocara sp.

Η εφαρμογή της PCR για τη διάγνωση και το διαχωρισμό προσβολών από μεταναστευτικές προνύμφες (Visceral Larva Migrans) των νηματωδών παρασίτων *Ascaris* και *Toxocara*, βρίσκεται ακόμα σε πειραματικό στάδιο[27]. Σε μία μελέτη δείγματα ήπατος ελήφθησαν από ομάδες ποντικών που είχαν μολυνθεί με αυγά των *Toxocara canis*, *Toxocara cati* και *Ascaris suum*[27]. Όταν έγινε εφαρμογή της PCR με εκκινητές εξειδικευμένους για την *Toxocara*, εμφανίσθηκαν ενδείξεις για την *Toxocara*, αλλά καμία θετική ένδειξη για την *Ascaris*[27]. Επίσης για την ανίχνευση της *Ascaris suum* έχει απομονωθεί DNA από τους μυς της *A. suum* που μπορεί εύκολα να πολλαπλασιασθεί με τη μέθοδο PCR[28].

Strongylida

Είκοσι τέσσερα είδη νηματωδών σκωλήκων της τάξης Strongylidae χαρακτηρίστηκαν με RFLP-PCR (restriction fragment length polymorphism) σε πρόβατα, αίγες, βοοειδή ή χοίρους[29]. Τα προϊόντα της PCR, τμήματα του ριβοσωμικού (r)DNA, είναι κοινά για όλα τα παράσιτα της τάξης, εκτός από το *Ostertagia ostertagi*[29]. Τελευταία εφαρμόζεται η PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) για το διαχωρισμό 14 ειδών νηματωδών της τάξης *Strongylidae*[30]. Η εφαρμογή της PCR ανιχνεύει γενετικούς δείκτες για την αναγνώριση των ειδών της τάξης *Strongylidae*, εκτός από το *Cooperia surnabada* και *C. oncophora* που έχουν ιδιαίτερα αναγνωριστικά χαρακτηριστικά. Ιδιαίτερα χρήσιμη είναι η PCR για το διαχωρισμό των σταδίων ανάπτυξης των παρασίτων, όπου η χρήση των μορφολογικών χαρακτηριστικών δεν είναι αξιόπιστη[29].

Metastrongylus spp.

Τέσσερα είδη του γένους *Metastrongylus* (*M. asymmetricus*, *M. confusus*, *M. pudendotectus* και *M. salmi*) διαχωρίζονται δύσκολα χρησιμοποιώντας μόνο μορφολογικά χαρακτηριστικά, ενώ οι επιδημιολογικές μελέτες προκαλούν αμφιβολίες για τη διάκριση αυτών των ειδών[31]. Η χρήση RAPD-PCR απέδειξε ότι αυτά τα τέσσερα είδη ανήκουν σε γενετικά διαφορετικές ομάδες, χωρίς όμως να μπορούν να διακριθούν απόλυτα μεταξύ τους[31]. Για καλύτερα αποτελέσματα η RAPD-PCR εφαρμόζεται για διάφορες περιοχές (ριβοσωμικό, μιτοχονδριακό DNA) σε συνδυασμό με δεδομένα από μορφολογικές και επιδημιολογικές μελέτες[31].

Onchocerca volvulus

Η εφαρμογή της PCR για την ανίχνευση της *Onchocerca volvulus*, μέσω του πολλαπλασιασμού ενός τμήματος DNA του παρασίτου, είναι μια διαδικασία αρκετά εύχρηστη και ακριβής (ποσοστό επιτυχίας 95%). Παρ' όλο που η συλλογή του δείγματος από τους αγωγούς Malpighi ή τις ωοθήκες του ενδιάμεσου ξενιστή είναι διαδικασία ρουτίνας, μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η διατήρηση του DNA του παρασίτου σε κατάλληλη μορφή για την εφαρμογή της PCR[32].

Trichinella spiralis

Η PCR έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για τον πολλαπλασιασμό του DNA της προνύμφης *Trichinella spiralis* στο στάδιο που προσβάλλει τους μυς[33]. Η ανίχνευση με PCR της μεταναστευτικής προνύμφης γίνεται σε αίμα των ποντικιών από την 5η έως τη 14η μέρα της μόλυνσης. Η επιτυχία της διάγνωσης εξαρτάται από τη σοβαρότητα της μόλυνσης (όσο πιο πολλά παράσιτα τόσο πιο ακριβής η μέ-

θοδος) και το βιολογικό στάδιο του παρασίτου[33].

Trichuris suis

Η PCR εφαρμόζεται για τη διάγνωση της μόλυνσης από το παράσιτο *Trichuris suis*, και βασίζεται στην ανίχνευση μιας κυτοκινίνης που παράγεται κατά την προσβολή του ζώου από το συγκεκριμένο παράσιτο[34]. Πλεονέκτημα της PCR είναι η διάκριση παραλλήλων με το παράσιτο προσβολών από βακτήρια[34]. Με την PCR προκύπτουν συμπεράσματα σχετικά με την ανθεκτικότητα του ζώου σε παρασιτικές προσβολές[34].

Dirofilaria sp.

Οι διαφορές στην επιδημιολογία των *Dirofilaria repens* και *Dirofilaria immitis* είναι δύσκολο να διακριθούν εξαιτίας της έλλειψης διαγνωστικών μεθόδων που θα έκαναν δυνατή τη συστηματική αναγνώριση αυτών των παρασίτων, ειδικά όταν βρίσκονται στο στάδιο της αναπτυσσόμενης μικροφιλάριας στον ενδιάμεσο ή σε κάποιο ασυνήθιστο ξενιστή (π.χ. άνθρωπο)[35]. Με την εφαρμογή της PCR είναι δυνατό να διακριθούν οι ώριμες και ανώριμες μορφές των ενήλικων σκωλήκων, στους τελικούς ξενιστές, τα ζώα, και στον ενδιάμεσο ξενιστή που είναι το κουνούπι[35]. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα ανάλυσης δειγμάτων αποθηκευμένων είτε σε ξηρή μορφή είτε σε διάφορα άλλα συντηρητικά μέσα, εκτός από φορμόλη[35]. Ο μεγάλος βαθμός εξειδίκευσης και ευαισθησίας της μεθόδου βελτιώνει τις προοπτικές για συγκριτική επιδημιολογική έρευνα των *Dirofilaria repens* και *Dirofilaria immitis*, ειδικά σε περιοχές όπου εμφανίζονται προσβολές και από τα δυο είδη[35].

ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΤΡΗΜΑΤΩΔΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Fasciola hepatica

Αρχικά με εφαρμογή της PCR έγινε προσπάθεια διαχωρισμού διαφορετικών σταδίων του βιολογικού κύκλου του *Fasciola hepatica*. Πράγματι, παρ' όλο που η διαδικασία είναι πολύπλοκη, οι ανώριμες διαχωρίστηκαν από τις ώριμες μορφές του παρασίτου[36]. Η εφαρμογή της PCR με διάφορους εκκινητές έδειξε ότι το 24% από τους εκκινητές είχαν μεγάλη εξειδίκευση στον πολλαπλασιασμό του DNA των ενήλικων και το 14% στο DNA των ανώριμων μορφών του παρασίτου[37].

Schistosoma mansoni

Από το γονιδιωματικό DNA του *Schistosoma mansoni* πολλαπλασιάστηκε με PCR το γονίδιο μιας χαρακτηριστικής για το παράσιτο πρωτεάσης. Τα ανασυνδυασμένα βακτήρια που φέρουν το γονίδιο, παράγουν σημαντικές ποσότητες της πρωτεάσης[38]. Είναι λοιπόν δυνατή η παραγωγή ανασυνδυασμένων βακτηρίων με ικανότητα παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων αντιγόνου για την πρωτεάση του *S. mansoni*, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή εμβολίου έναντι του παρασίτου[38].

ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΕΣΤΩΔΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Echinococcus multilocularis

Από τα χαρακτηριστικά των προϊόντων της PCR και SSCP έγινε διαχωρισμός 7 διαφορετικών γονοτύπων του *Echinococcus* (G1, G4, G6, G8, O, V και H2)[39]. Η εξειδίκευση της PCR στην ανίχνευση 11 ειδών κεστωδών είναι 100% (συμπεριλαμβανομένου του *E. granulosus*)[40]. Η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αυγό παρασίτου στα κόπρανα. Η RAPD-PCR χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του γενετικού τύπου του *Echinococcus* και την ύπαρξη γενετικής ποικιλομορφίας στο DNA του *E. granulosus*, ακόμα και εντός της ίδιας σειράς ζώων[41].

Spirometra erinacei και S. mansonoides

Τα είδη των κεστωδών *Spirometra erinacei* και *S. mansonoides* είναι γενετικά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Η μόνη μορφολογική διαφορά που εντοπίζεται είναι το σχήμα της μήτρας στην ώριμη προγλωττίδα[42]. Η γενετική απόσταση μεταξύ των δυο αυτών ειδών προσδιορίζεται με εφαρμογή της RFLP-PCR[42]. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι δυο σκώληκες μοιράζονται ένα κοινό πρόγονο στο άμεσο παρελθόν τους[42].

ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΡΘΡΟΠΟΔΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Cochliomyia hominivorax και C. macellaria

Η μέθοδος RFLP-PCR (Restriction fragment length polymorphism) χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό διαφόρων διπτέρων της οικογένειας Calliphoridae[43]. Αναγνωρίστηκε και διαχωρίστηκε το είδος *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) από το *C. hominivorax macellaria*. Η RFLP-PCR είναι εύκολη στην εφαρμογή αλλά το μεγαλύτερο πλεονέκτημα συνίσταται στην ικανότητα διαχωρισμού παρασίτων που βρίσκονται σε διαφορετικό βιολογικό στάδιο (διαχωρισμός και αναγνώριση αυγού- προνύμφης- ενήλικων ατόμων). Η μέθοδος δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις ως προς τη μορφή του DNA που θα χρησιμοποιηθεί και έτσι αποφεύγονται πολλά προβλήματα συντήρησης του δείγματος. Η RFLP-PCR είναι άμεση και φτηνή και μπορεί να αναλύσει δείγματα με απόλυτη εξειδίκευση σε 24 ώρες[43].

Κρότωνες

Με PCR διαχωρίζεται η οικογένεια των σκληρών κροτώνων (Ixodidae)και συγκεκριμένα τα είδη: *Rhipicephalus pusillus*, *Boophilus annulatus*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *Haemaphysalis puncata* και *Ixodes risinus*[44]. Φυλογενετική ανάλυση δείχνει ότι τα γένη *Hyalomma* και *Rhipicephainae* έχουν κάποιο κοινό πρόγονο, ώστε το πρώτο να μη θεωρείται πλέον υποοικογένεια. Δεν υπάρχουν όμως ξεκάθαρα συμπεράσματα για τις σχέσεις των υποοικογενειών *Haemaphysalinae* και *Amblyomminae*[44].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μοριακή βιολογία έχει συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών εργαλείων, συχνά επιτυγχάνοντας τέτοιο επίπεδο ευαισθησίας, ώστε να είναι δυνατή ακόμα και η ανίχνευση ενός μόνο παρασίτου[4,5]. Λόγω της ανεπάρκειας των ανοσοχημικών μεθόδων (αντιγόνου-αντισώματος) να ανιχνεύσουν, διαχωρίσουν και να ταυτοποιήσουν τα είδη των παρασίτων, θεωρείται απαραίτητη η χρήση μεθόδων όπως της PCR που βασίζονται στη δράση ειδικών ανιχνευτών και εκκινητών. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η εξειδίκευση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο, παρέχοντας θετική ένδειξη αναγνώρισης αποκλειστικά για το παράσιτο για το οποίο έχουν σχεδιαστεί[4,5]. Επομένως, με τον ίδιο εκκινητή στο ίδιο δείγμα δεν ανιχνεύονται άλλα διαφορετικά παράσιτα, ακόμα κι αν υπάρχουν στο δείγμα σε επαρκή για ανίχνευση ποσότητα. Ωστόσο, παρά την ευαισθησία και εξειδίκευση της PCR στην ανίχνευση των παρασίτων, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή[5,6].

Συμπερασματικά, η PCR χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των παρασίτων, την περιγραφή της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ φυλών, οικογενειών και ειδών παρασίτων, και τη διάγνωση και επιδημιολογική μελέτη των παρασιτικών νοσημάτων. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της PCR είναι η απόλυτη εξειδίκευσή της έναντι των κλασικών μεθόδων έμμεσης διάγνωσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Comes AM, Humbert JF, Carabet J, Elard L. Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. Vet Res 1996, 27:333-42
2. Felleisen RS, Móller N, Yamage M, Gottstein B. Diagnostic PCR in veterinary parasitology: tritrichomonosis, neosporosis, toxoplasmosis, echinococcosis, cysticercosis. Schweiz Arch Tierheilkd 1996, 138:144-51
3. Romanova EA, Semenova SK, Benediktov II, Ryskov AP. Use of polymerase chain reaction for identifying helminth DNA from the species Trichinella, Fasciola, Echinococcus, Nematodirus, Taenia. Parazitologiia 1997, 31:53-65
4. PCR Cloning Protocols: Methods in Molecular Biology, Vol. 67, Ed. B. White. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1996
5. Kaufmann J. Parasitic Infections of Domestic Animals. Birkhauser, 1996, pp. 20-22
6. Haque R, Ali IK, Akther S, Petri WA Jr. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of Entamoeba histolytica infection. J Clin Microbiol 1998, 36:449-52
7. Felleisen RS, Lambelet N, Bachmann P, Nicolet J, Móller N, Gottstein B. Detection of Tritrichomonas foetus by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. J Clin Microbiol 1998, 36:513-9
8. Masake RA, Majiwa PA, Moloo SK, Makau JM,; Njuguna JT, Maina M, Kabata J, ole MoiYoi OK, Nantulya VM. Sensitive and specific detection of Trypanosoma vivax using the polymerase chain reaction. Exp Parasitol 1997, 85:193-205
9. Maslov DA, Lukes J, Jirku M, Simpson L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. Mol Biochem Parasitol 1996, 75:197-205
10. Desquesnes M, Tresse L. Evaluation of sensitivity of PCR for detecting DNA of Trypanosoma vivax with several methods of blood sample preparations. Rev Elev Med Vet Pays Trop 1996, 49:322-7
11. Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of Leishmania infantum in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. J Clin Microbiol 1999, 37:9, 2931-5
12. Esteban Redondo I, Innes EA. Detection of Toxoplasma gondii in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. Int J Parasitol 1998, 28:1459-66
13. Pelloux H, Weiss J, Simon J, Muet F, Fricker Hidalgo H, Goullier Fleuret A, Ambroise Thomas P. A new set of primers for the detection of Toxoplasma gondii in amniotic fluid using polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett 1996, 138:11-5
14. Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspock H, Bessires MH, Blatz R, Del Pezzo M, Girault V, Gratzl R, Holberg Petersen M, Johnson J, Króger D, Lappalainen M, Naessens A, Olsson. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for Toxoplasma gondii, involving 15 teams. FEMS Microbiol Lett 1998, 165:231-7
15. Joachim A, Tenter AM, Jeffries AC, Johnson AM. A RAPD-PCR derived marker can differentiate between pathogenic and non-pathogenic Sarcocystis species of sheep. Mol Cell Probes 1996, 10:165-72
16. Tsuji N, Kawazu S, Ohta M, Kamio T, Isobe T, Shimura K, Fujisaki K. Discrimination of eight chicken Eimeria species using the two-step polymerase chain reaction. J Parasitol 1997, 83:966-70
17. Carreno RA, Schnitzler BE, Jeffries AC, Tenter AM, Johnson AM, Barta JR. Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that Isospora is most closely related to Toxoplasma and Neospora. J Eukaryot Microbiol 1998, 45:2, 184-8
18. Rochelle PA, De Leon R, Stewart MH, Wolfe RL. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of Cryptosporidium parvum and Giardia lamblia in water. Appl Environ Microbiol 1997, 63:106-14
19. Mayer CL, Palmer CJ. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of Giardia and Cryptosporidium species in wastewater. Appl Environ Microbiol 1996, 62:2081-5
20. Ho MS, Barr BC, Marsh AE, Anderson ML, Rowe JD, Tarantal AF, Hendrickx AG, Sverlow K, Dubey JP, Conrad PA. Identification of bovine Neospora parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. J Clin Microbiol 1996, 34:1203-8
21. Lew AE, Dalrymple BP, Jeston PJ, Bock RE. PCR methods for the discrimination of Babesia bovis isolates. Vet Parasitol 1997, 71:223-37
22. Buening GM, Figueroa JV. Use of polymerase chain reaction in bovine babesiosis research. Ann N Y Acad Sci 1996, 791:466-8

23. Shayan P, Biermann R, Schein E, Gerdes J, Ahmed JS. Detection and differentiation of Theileria annulata and Theileria parva using macroschizont-derived DNA probes. Ann N Y Acad Sci 1998, 849:88-95

24. Kirvar E, Ilhan T, Katzer F, Wilkie G, Hooshmand-Rad P, Brown D. Detection of Theileria lestoquardi (hirci) in ticks, sheep, and goats using the polymerase chain reaction. Ann N Y Acad Sci 1998, 849:52-62

25. Onuma M, Kakuda T, Sugimoto C. Theileria parasite infection in East Asia and control of the disease Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1998, 21:165-77

26. Kubota S, Sugimoto C, Onuma M. Population dynamics of Theileria sergenti in persistently infected cattle and vector ticks analysed by a polymerase chain reaction. Parasitology 1996, 112(Pt 5):437-42

27. Rai SK, Uga S, Wu Z, Takahashi Y, Matsumura T. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of toxocariasis: an experimental study. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997, 28:3, 541-4

28. Di Mito C, Betschart B. DNA extraction from Ascaris suum muscle tissue. Parasitol Res 1998, 84:7, 596-7

29. Newton LA, Chilton NB, Beveridge I, Hoste H, Nansen P, Gasser RB. Genetic markers for strongylid nematodes of livestock defined by PCR-based restriction analysis of spacer rDNA. Acta Trop 1998, 69:1-15

30. Gasser RB, Zhu X, McManus DP. Display of sequence variation in PCR-amplified mitochondrial DNA regions of Echinococcus by single-strand conformation polymorphism. Acta Trop 1998, 71:107-15

31. Leignel V, Humbert JF, Elard L. Study by ribosomal DNA ITS 2 sequencing and RAPD analysis on the systematics of four Metastrongylus species (Nematoda:Metastrongyloidea). J Parasitol 1997, 83:606-11

32. Toi L, Back C, Adjami AG, Tang JM, Unnasch TR. Onchocerca volvulus: comparison of field collection methods for the preservation of parasite and vector samples for PCR analysis. Bull World Health Organ 1997, 75:443-7

33. Uparanukraw P, Morakote N. Detection of circulating Trichinella spiralis larvae by polymerase chain reaction. Parasitol Res 1997, 83:52-6

34. Mansfield LS, Urban JF, Holley Shanks RR, Murtaugh MP, Zarlenga DS, Foss D, Canals A, Gause W, Lunney JK. Construction of internal cDNA competitors for measuring IL-10 and IL-12 cytokine gene expression in swine. Vet Immunol Immunopathol 1998, 65:63-74

35. Favia G, Lanfrancotti A, della Torre A, Cancrini G, Coluzzi M. Advances in the identification of Dirofilaria repens and Dirofilaria immitis by a PCR-based approach. Parassitologia 1997, 39:4, 401-2

36. Heussler V, Dobbelaere D. Cloning of a protease gene family in Fasciola hepatica using the polymerase chain reaction (PCR). Schweiz Arch Tierheilkd 1996, 138:125-32

37. Reed MB, Spithill TW, Strugnell RA, Panaccio M. Fasciola hepatica: stage-specific expression of novel gene sequences as identified by differential display. Exp Parasitol 1998, 89:169-79

38. Price HP, Doenhoff MJ, Sayers JR. Cloning, heterologous expression and antigenicity of a schistosome cercarial protease. Parasitology 1997, 114(Pt 5):447-53

39. Gasser RB, Monti JR. Identification of parasitic nematodes by PCR-SSCP of ITS-2 rDNA. Mol Cell Probes 1997, 11:201-9

40. Dinkel A, von Nickisch-Rosenegk M, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T. Detection of Echinococcus multilocularis in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. J Clin Microbiol 1998, 36:1871-6

41. Ortona E, Margutti P, Riganς R, Siracusano A. Genetic variability in Italian sheep isolates of Echinococcus granulosus. Appl Parasitol 1996, 37:205-8

42. Lee SU, Huh S, Phares CK. Genetic comparison between Spirometra erinacei and S. mansonoides using RFLP-PCR analysis. Korean J Parasitol 1997, 35:277-82

43. Taylor DB, Szalanski AL, Peterson RD. Identification of screwworm species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Med Vet Entomol 1996, 10:63-70

44. Mangold AJ, Bargues MD, Mas Coma S. 18S rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae). Med Vet Entomol 1996, 10:63-70