

Rolul biologiei moleculare în parazitologia veterinară

N. DULCEANU

Facultatea de Medicină Veterinară Iași

REZUMAT. Biologia moleculară constă în manipularea ADN și ARN în laborator și operează prin mijloace specifice ca: enzyme de restricție, recombinarea și clonarea ADN, ADN complementar, secvențierea ADN, reacția în lanț a polimerazei (PCR) etc.

PCR este implicat în: a) depistarea, identificarea, compararea speciilor, sușelor, varietăților, hibridilor de paraziți; b) studiul ciclului vital; c) epidemiologia parazitozelor; d) imunitatea antiparazitară; e) studiul rezistenței gazdei și paraziților, f) precizarea diagnosticului; g) controlul parazitozelor, etc.

În a doua jumătate a secolului trecut oamenii de știință au recunoscut paraziții ca excelente sisteme model pentru descoperirea principiilor de bază a biologiei eukariotelor.

Un număr de descoperiri au stimulat intens cercetări similare ale altor sisteme, cum ar fi biochimia, biologia moleculară, imunologia parazitara. O semnificativă schimbare în parazitologie a marcat-o introducerea tehnologiilor moderne din biologia moleculară (12).

Biologia moleculară este un termen general, ce se referă la manipularea ADN și ARN în laborator. Această manipulare este deja aplicată în producția de vaccinuri, în diagnostic, în detectarea purtătorilor de gene dăunătoare și în terapia genetică. În viitor va fi foarte dificil de a găsi domenii în medicina veterinară și în producția animalelor care să nu fie substanțial beneficiare ale acestei tehnologii.

Biologia moleculară operează cu câteva mijloace specifice ca: enzyme de restricție, recombinarea și clonarea ADN, ADN complementar, secvențierea ADN, reacția în lanț a polimerazei (PCR) etc.

În 1970 s-a descoperit că bacteriile produc enzyme capabile de a degrada ADN străin ajuns intrabacterian. Activarea acestor enzyme joacă un rol cheie în fenomenul cunoscut ca „restricția

gazdei” (ce constă în autoprotecția bacteriilor față de virusuri, prin fragmentarea ADN-ului viral), ele sunt denumite enzyme de restricție sau enzyme restrictive. Azi sunt cunoscute sute de asemenea enzyme. Aceste enzyme se fixează pe secvențele specifice ale ADN, fenomen denumit „recunoașterea secvențelor” și fiecare enzimă scindează ADN într-un loc specific de clivaj, localizat de obicei în secvența recunoscută. Când o enzimă de restricție este fixată pe ADN, acesta este clivat în mai multe locuri și astfel ADN este fragmentat. Dacă locurile de clivaj nu sunt poziționate la intervale regulate, de-a lungul moleculei de ADN, fragmentele rezultate au lungimi și greutatea diferite. Electroforeza pe gel a acestor fragmente evidențiază migrarea fragmentelor cu o rată invers proporțională cu logaritmul greutății lor.

Astfel de enzyme bacteriene obținute în laborator sunt, de exemplu: enzima BamHI, din *Bacillus amyloliquefaciens*, sușa H și I (prima enzimă obținută), EcoRI din *Escherichia coli*, Hind III din *Haemophilus influenzae*, etc.

Un alt mijloc prin care operează biologia moleculară este producția unui număr nelimitat de copii ale unui anumit segment de ADN. Această producție de masă, a unui segment de ADN este o condiție necesară pentru determinarea secvenței de bază a segmentelor și pentru multe alte tehnici moleculare. Obținerea copiilor se poate realiza pe două căi: a) clonarea

genelor sau clonarea ADN; b) reacția în lanț a polimerazei (PCR).

Clonarea ADN se realizează prin sudarea ADN-ului ce urmează a fi clonat (numit ADN străin, sau ADN inserat) cu un vector capabil de replicare într-o gazdă. Cerința inițială pentru acest proces este ca ADN inserat și ADN vector să aibă capete compatibile (obținute cu ajutorul unei enzime restrictive adecvată). Când ADN inserat și ADN vector sunt puse în contact direct cu o enzimă, ADN-ligaza, capetele celor două tipuri de ADN se unesc printr-un proces de legare sau îmbinare (ligation sau splicing). Molecula ADN rezultată este un exemplu de ADN recombinat (termenul se aplică legării a două segmente de ADN din diferite surse).

Există o clasă de virusuri a căror întreg genom este format numai din ARN.

Deoarece ARN nu este capabil de replicare, singura cale posibilă de replicare a acestor virusuri este ca ele să-și propage propriul ARN, prin reconversia lui în ADN, motiv pentru care se numesc „retrovirusuri”. ADN-ul se replică și acționează ca un șablon pentru sinteza unei cantități mai mari de ARN. Enzimele care catalizează transcripția inversă a ARN în ADN sunt numite „reverse transcriptaze”. Aceste enzime sunt extrem de importante în biologia moleculară pentru că permit izolarea rapidă a regiunilor codificate ale genelor.

Un țesut care produce polipeptide conține relativ o mare concentrație de ARN mesager (mARN) pentru aceste polipeptide. Dacă mARN este extras din acel țesut și sunt adăugate (adăugate) nucleotidele și enzima revers transcriptaza, poate fi sintetizat un lanț complementar de ADN (ADN complementar, sau copie ADN, cADN). Ulterior, prin adăugarea mai multor nucleotide și enzime ADN-polimeraze, un singur cADN poate fi replicat într-un dublu cADN. Acesta corespunde genelor care au fost active în țesut în momentul când mARN a fost extras. Fragmentele de ADN pot fi clonate la rândul lor creându-se o adevărată bibliotecă cADN.

Una din cele mai importante realizări ale biologiei moleculare a fost dezvoltarea metodelor pentru o rapidă secvențiere a fragmentelor de ADN. Această separare a fost folosită în scop diagnostic și s-a realizat prin două metode: a) metoda Sanger, sau dideoxy

(chain-terminating) și b) metoda Maxam-Gilbert, sau metoda chimică.

Prima este folosită mai des în practică. Pe această cale se alcătuiește genomul unei specii. Astfel se ajunge la stabilirea genomului paraziților și al altor agenți patogeni (16), cum este cazul spirochetei *Borrelia burgdorferi* (20). Genomul poate fi un nou potențial mijloc de control al acestor organisme.

Reacția în lanț a polimerazei (Polymerase chain reaction - PCR)

Unul din cele mai importante instrumente de lucru în biologia moleculară este PCR, folosit larg în prezent pentru cercetare și diagnostic în detectarea genelor particulare (atât benefice cât și dăunătoare) la animalele domestice. În viitor se va extinde folosirea acestei metode în multe domenii ale practicii veterinare.

ADN-ul pe care se execută PCR (numit ADN șablon, model) poate fi ADN genomic (extras din celulele albe sangvine, sau din splină, ori alte țesuturi), sau un fragment de ADN din orice altă sursă. Prin PCR s-au creat aproximativ un milion de copii ale unor segmente mici de ADN șablon, suficient pentru a permite ca segmentul să fie clonat sau analizat. Cerința de bază este cunoașterea secvenței fragmentului sau ordinea la fiecare capăt al segmentului pe care dorim să-l amplificăm. Folosind această informație sunt sintetizate două lanțuri de nucleotide (numite oligonucleotide sau oligo, prescurtat), fiecare cu o lungime de 20 de baze, unul este complementar capătului al treilea al segmentului ce trebuie amplificat, iar altul este complementar unui alt capăt trei al altui segment. Deoarece rolul acestor oligonucleotide este de a amorsa sinteza de noi lanțuri (strands) de ADN, ele sunt numite „primeri”.

ADN șablon este plasat într-un tub împreună cu primerii, cu o cantitate de deoxinucleotide și cu ADN-polimerază. Amestecul este încălzit până la 95°C pentru a separa (denatura) cele două lanțuri de ADN șablon (ADN polimeraza este stabilă termic, așa că ea rezistă la temperaturi mari din faza de denaturare).

O formă obișnuit folosită este Taqpolimeraza, numită așa pentru că provine din bacteria termofilă *Thermus aquaticus*.

Temperatura este apoi scăzută la 50-60°C pentru a permite primerilor să se lege la secvențele lor complementare din ADN șablon (de exemplu la capătul segmentului care dorim să îl amplificăm). Odată ce primerii s-au legat, temperatura este crescută la 70°C, aceasta fiind optimă pentru ADN-polimerază, care adună nucleotidele specifice la capătul 3 al fiecărui primer, extinzând, astfel, lanțurile de ADN. După ce a trecut suficient timp pentru ca noile lanțuri să fie sintetizate, temperatura va crește din nou la 95°C, începând astfel un nou ciclu de denaturare, legare și extensie. Lungimea unui ciclu (numit ciclu de amplificare) este de 5 minute: 15 secunde pentru denaturare, 30 secunde pentru sudare, 90 secunde pentru extensie, plus timpul minim necesar schimbării temperaturii între faze (30-60 secunde pentru fiecare schimbare).

Ciclul se poate repeta de 30-35 ori într-un automat (thermal cyclers) care poate fi programat exact pentru fiecare fază. Teoretic se pot realiza 2^{30} - 2^{35} copii identice (numit PCR product) ale segmentului.

În practică amplificarea exponențială nu este perfectă. Este posibil să se repete de 1×10^6 cicluri și să se obțină 1 μg de PCR product.

Limita și puterea PCR sunt remarcabile. De exemplu, produșii PCR pot fi obținuți din ADN-ul microorganismelor vii, din produsele animale (carne, ouă), sau din speciile din muzee sau arheologice. Probele pot fi la fel de mici ca un spermatozoid, sau un folicul pilos. Produșii PCR pot fi obținuți chiar din lapte, deoarece laptele conține celule somatice.

Există mai multe variații ale PCR de bază. De exemplu, câteva perechi de primeri pot fi incluși într-o reacție PCR multiplex.

O altă variantă este cea care dă naștere la ADN polimorfic amplificat la întâmplare (RAPD) (polimorfic se referă la existența a mai mult decât un tip de formă). La câteva specii RAPD sunt o sursă utilă de markeri ADN pentru hărțile genetice sau (în cazul paraziților), pentru identificarea speciilor.

O altă variantă implică transcriptia inversă a unei probe de ARN, pentru a produce cADN, care este apoi amplificată prin PCR, metodă cunoscută ca transcriptia inversă a PCR (reverse transcription PCR) (RT-PCR). Este un eficace

mijloc de identificare și studiu al genelor, fără a recurge la procesul de clonare.

Se mai cunosc și alte metode de cercetare în biologia moleculară ca: analiza Southern, delecția variației secvențelor de bază (diferențierea alelelor). Prin aceasta se poate diferenția animalele homozigote de heterozigote (16).

Tehnicile citate anterior (PCR, PCR multiplex, ADN polimorfic amplificat la întâmplare, transcriptia inversă a ARN - revers transcription PCR, analiza Southern etc.), au implicații în cercetarea fundamentală, în diagnostic, în supravegherea epidemiologică, în imunitatea antiparazitara, în controlul paraziților, etc.

Aceste tehnici au creat o revoluție în diagnostic, înlocuind tehnicile inexacte și consumatoare de timp cu teste bazate pe manipularea ADN. Ele sunt foarte rapide (5 minute) și foarte sensibile. Multe dintre aceste teste sunt bazate pe PCR și pot fi executate pe probe prelevate de la animale vii, produsele animale, cadavre proaspete, vechi sau autolizate, fetuși, avortoni, apa suspectă de contaminare, aer, blocuri tisulare în parafină (2, 8, 14, 15, 16, 23).

Prin alegerea primerilor potriviți și/sau a probelor, testele bazate pe manipularea ADN sunt implicate în:

1. depistarea speciilor, sușelor, serogrupelor, varietăților și hibridilor de virusuri, retrovirusuri, bacterii, fungi, protozoare, nematode, cestode etc.;
2. identificarea speciilor și sușelor de paraziți;
3. compararea speciilor din același gen, sau sușelor din aceeași specie;
4. depistarea paraziților vii sau morți;
5. diferențierea metacestodelor ce parazitează o singură gazdă sau gazdă comună;
6. precizarea fazelor ciclului vital al unor protozoare;
7. investigarea specificității pentru gazdă a unui parazit;
8. detecția gazdelor definitive infestate cu cestode;
9. evidențierea căilor de infestare a gazdei;
10. investigarea interacțiunii gazdă-parazit;
11. investigarea domeniului imunității antiparazitare;
12. cuantificarea citokinelor și interferon gama;

13. facilitarea supravegherii epidemiologice a efectivelor;
14. facilitarea investigării rezistenței gazdei la invazie;
15. precizarea unui diagnostic de certitudine;
16. controlul parazitozelor;
17. investigarea rezistenței paraziților;
18. identificarea și diferențierea cărnii diferitelor specii animale.

Cel mai simplu test de diagnostic implică amplificarea unui anumit segment de ADN, urmată de electroforeză pe gel și colorarea gelului în bromură de etidium (16).

1. Depistarea speciilor. Prin PCR s-a confirmat prezența în organismul gazdei a protozoarelor din genurile *Neospora* la taurine (14, 19), *Leishmania* la câine (10), *Toxoplasma* (23), *Pneumocystis* (3), *Trichomonas* la carnivore (6), *Echinococcus multilocularis* (9). Această depistare s-a făcut pe probe prelevate din diverse structuri organice, lichide biologice etc.

2. Identificarea speciilor și a sușelor de paraziți.

Cu ajutorul reacției în lanț a polimerazei (PCR) s-a putut identifica *Neospora caninum* la avortonii de 4-9 luni de taurine, prin examenul probelor de creier și miocard. Probele au fost conservate la -80°C .

Prin amplificare genică (PCR) s-a extras ADN dintr-un eșantion și s-a amplificat specific un anumit fragment din genomul parazitului. S-a folosit tehnica Müller, care permite amplificarea unui fragment din gena Nc5. Evidențierea s-a făcut prin colorare cu bromură de etidium după electroforeză (migrare pe gel de agaroză) (18).

Anumite gene de *N. caninum* sunt detectate, prin PCR, în lichidele biologice sau în țesuturile animalelor infestate (11).

N. caninum se poate pune în evidență prin PCR și în cazul când sunt foarte puțini paraziți, cum ar fi țesuturile autolizate și în cazul infestațiilor subclinice (4).

La cal, *N. caninum* a fost pus în evidență prin PCR (19). În acest scop de la fetusul avortat se recoltează probe, pentru PCR, din creier, cord, ficat, pulmon, iar în cazul manifestărilor nervoase se recurge la examenul prin PCR a LCR. De la caii morți probele se recoltează din

creier, din zona de urgență a nervilor considerați afectați în raport cu semnele clinice (19). La aceleași probe se recurge și în cazul formei nervoase la taurine.

Prin PCR se detectează ADN-ul speciei *Neospora caninum* din toate țesuturile fetale și placentă (4, 14).

Toxoplasma gondii, viabilă și neviabilă poate fi identificată în țesuturi prin PCR. În acest scop s-au folosit genele P30 și B1 ca ținte pentru detecția toxoplasmelor în diferite probe recoltate de la om.

La oaie, în același scop, s-au examinat probe de placentă, creier, lichid peritoneal de la fetuși și limfă, sânge și ganglioni limfatici de la oile infestate experimental (23).

Detecția *T. gondii* prin amplificarea genei B1 pare mai ușor de realizat și metoda este mai sensibilă decât prin folosirea genei P30, datorită naturii repetitive a genei B1, din care în genom se regăsește 25-50 copii, comparativ cu o singură copie a genei mai lungi, P30.

PCR a fost utilizată și pentru detecția și identificarea sușelor speciei *Trichomonas tenax* la câine și pisică (6). Prin metode de cercetare specifice biologiei moleculare s-a stabilit polimorfismul cariotipului speciei *Pneumocystis carini*. Astfel, s-a scos în evidență că numărul cromozomilor este diferit, la această specie, în funcție de gazdă, acest număr se poate modifica in vitro și că la șobolan se găsesc pneumociști cu kariosomi diferiți. Această diversitate inter și intraspecifică a fost precizată prin stabilirea ordinii secvențiale a genelor. Genotipul a sugerat că gene *Pneumocystis* ar putea include câteva specii, motiv pentru care s-a ajuns la determinarea trinomială a speciilor de *Pneumocystis carinii* ce parazitează pe gazde diferite. Prin secvențializarea directă a produșilor PCR și prin studiul polimorfismului unui singur lanț de ADN, după amplificarea prin PCR, s-a dovedit diversitatea intraspecifică. Pe această cale s-a ajuns să se identifice cel puțin 6-10 sușe de *Pneumocystis carinii* la om și două la iepure.

3. Comparația între specii. PCR a fost folosită pentru a face o comparație și diferențiere între speciile *Neospora caninum* și *Toxoplasma gondii* (2).

Această diferențiere s-a impus deoarece au existat dubii generate de stadiile schizogonice intracelulare de tachizoizi liberi și în schizonti; de chistul cu bradizoizi ale celor două specii, mai ales la taurine (11, 14).

În același scop s-a recurs la PCR pentru identificarea și individualizarea unor specii din genul *Sarcocystis*, mai ales în cazul celor ce parazitează o gazdă comună și în cel al gazdelor găsite parazitare de o specie nespecifică acestora (13).

4. Depistarea paraziților vii sau morți. PCR permite depistarea și identificarea unor protozoare parazite, indiferent dacă acestea sunt vii sau moarte. Așa este cazul speciei *Toxoplasma gondii*, prezentă în diferite țesuturi vii sau autolizate. Pentru aceasta s-au folosit genele P30 și B1.

5. Diferențierea metacestodelor. Un alt domeniu al diferențierii stadiilor de dezvoltare ale unor paraziți metazoari, în care s-a recurs la PCR, a fost cel al metacestodelor speciilor *Echinococcus multilocularis* și cele ale speciilor din genul *Taenia* (*T. taeniaeformis*, *T. crassiceps*), *Mesocestoides*, *Cladotaenia*. Metacestodele acestor specii parazitează în comun rozătoarele (9).

O altă aplicare a PCR a fost în cazul stabilirii asemănarilor și deosebirilor dintre două specii ale aceluiași gen. Este cazul speciilor *Cryptosporidium parvum* și *C. wrairi*. În acest scop s-a folosit ADN din oocisturi (5).

6. Studiul ciclului vital. Depistarea ADN speciei *Pneumocystis carinii* în mediul ambiant, ADN asemănător celui al speciilor *Pn. carinii rattus* și *Pn. carinii hominis* a permis constatarea că în aer există forme parazitare distincte, mai mici decât formele cunoscute (oocisturi). Acestea ar putea fi spori de *Pn. carinii*, ceea ce a condus la concluzia că în ciclul vital ar exista o fază liberă. În timpul acestei faze parazitul ar putea suferi o dezvoltare cu producerea de forme infestante ce nu au fost încă identificate. *Pn. carinii* a fost detectat în aer, lângă pacienții umani, prin aspirație, filtrare și amplificare prin PCR a ADN, ceea ce sugerează calea aeriană de infestare (3).

7. Specificitatea pentru gazdă a fost studiată prin PCR în cazul diverselor varietăți și sușe de *Pneumocystis carinii*. Astfel s-a ajuns la

constatarea că varianta de *Pn. carinii* de la șobolan poate infesta omul, dar și că aceasta se poate recombină cu varianta de *Pn. carinii* de la om, apărând astfel hibridii. Aceasta demonstrează că infestarea încrucișată este posibilă, ceea ce pune în discuție specificitatea pentru gazdă. Problema nu este elucidată și se discută acum asupra caracterului de zoonoză al pneumocistozei, cât și asupra existenței unei specii rezervor de paraziți pentru om (3).

8. Detecția gazdelor definitive infestate cu cestode. PCR a fost utilizată în detecția gazdei definitive (vulpea) și a gazdei intermediare infestate cu *Echinococcus multilocularis*. În acest scop, prin PCR s-a detectat copro-ADN, descoperindu-se, astfel, purtătorii de paraziți. Eficacitatea metodei a fost de 100% pentru detecția animalelor sănătoase și 94% pentru cele infestate. S-au folosit fecale proaspete stocate în etanol 70%, ouă inactivate prin congelarea fecalelor la -80°C, timp de 2 zile, sau prin incubare la ±70°C timp de 2 ore. S-a putut extrage direct ADN parazitar din fecale, putându-se detecta ADN derivat din ouă ca și ADN din parazit chiar în absența ouălor (9).

9. Precizarea căilor de infestare. Mai ales în cazul speciei *Pn. carinii* a fost investigată prin PCR, după ce a fost detectat ADN parazitar în aerul din jurul oamenilor bolnavi. S-a constatat că ADN provenea de la forme de dezvoltare ce se găsesc în aer, acestea fiind probabil spori. Astfel s-a dovedit că posibilă infestarea omului pe cale aeriană cu *Pn. carinii*. Tot prin PCR s-a dovedit transmiterea in utero a acestui parazit.

Infestațiile latente cu *Pn. carinii*, detectate prin PCR, ar sta la baza pneumocistozei de novo (3).

10. Interacțiunea gazdă-parazit. Studiul tripanosomozelor africane a evidențiat faptul că infestația cu tripanosome se caracterizează printr-o fluctuație regulată a numărului de paraziți din gazdă. Aceasta poate merge de la un virtual zero la aproximativ 1500 flagelate/ml sânge și se datorează fenomenului de **variație antigenică** a populației de tripanosome introduse simultan în gazdă.

Tripanosomele sunt acoperite de un înveliș glicoproteic, iar determinanții antigenici ai acestui înveliș sunt doar proteinele. Acestea constau într-un singur lanț format din aproximativ 600 aminoacizi produși de o simplă

genă a tripanosomelor. Când o populație de tripanosome intră în gazdă, toate flagelatele prezintă un antigen de bază contra căruia organismul produce anticorpi, urmarea acestui fapt este moartea multor paraziți. Unele tripanosome însă, „deconectează” gena responsabilă de producerea antigenului de bază și o „schimbă” pentru un alt antigen, care diferă prin mai mulți aminoacizi de antigenul de bază. Tripanosomele care poartă gena acestui antigen secundar se multiplică rapid până ce gazda reușește să producă anticorpi specifici noului antigen.

În acest moment alte tripanosome produc alt antigen. Fenomenul de exacerbare și reprimare a populației de tripanosome se repetă timp de mai multe cicluri, ceea ce face ca paraziții să fie cu un pas înaintea răspunsului imun al gazdei.

Genomul tripanosomelor are mai mult de 100 de gene și fiecare genă este codată pentru un tip diferit de antigen. „Deconectarea” unei anumite gene implică duplicarea ei și transpoziția duplicatului în altă regiune a genomului, unde produce antigen. Acest fenomen al variației antigenice are o bază genetică și se întâlnește și la alte protozoare, cum ar fi genurile *Plasmodium* și *Babesia* (16).

11. Imunitatea antiparazitara. Se afirmă că există molecule semnal ce mediază între factorii elaborați de parazit (hidatida alveolară) și răspunsul imunitar celular specific (7).

Producția de anticorpi este dependentă genetic de ADN, de secvențierea acestuia și de genele producătoare de imunoglobuline (1, 22).

12. Cuantificarea citokinelor și a interferonului gama la mieii imunizați și susceptibili la infestația cu nematode gastrointestinale a fost studiată prin PCR (17).

13. Supravegherea epidemiologică a efectivelor. Cu ajutorul metodei PCR s-a putut urmări incidența, prevalența și evoluția frecvenței infestației cu *N. caninum* (18). Tot cu ajutorul acestei tehnici moleculare s-au putut supraveghea câinii după tratamentul contra leishmaniozei. Detecția ADN leishmaniilor este posibilă într-o mare varietate de țesuturi ale pacientului, incluzând aspirate din măduva osoasă, ganglioni limfatici, sânge, ca și în gazdele intermediare, țânțarii flebotomi.

Specificitatea metodei este foarte mare: 100% în cazul măduvei; 60% în sânge. Prin PCR se pot detecta leishmanii în probele biotice cutanate incluse la parafină (10).

14. Rezistența gazdei la invazia parazitara recunoaște variații genetice între specii și între rasele de animale. Variația genetică a rezistenței la agenții parazitari se întâlnește la găini și pești față de anumite protozoare, la oaie față de acarieni, insecte, nematode, la taurine față de căpuși, insecte și tripanosome (16).

Pentru a obține gazde rezistente la invazii se urmărește: a) descoperirea markerilor ADN pentru rezistență; b) identificarea genelor responsabile de rezistență.

15. Precizarea unui diagnostic de certitudine. Acesta urmărește depistarea prezenței și identificarea agentului patogen parazitari, și nu numai, în organismul gazdelor definitive și intermediare vii, moarte autolizate, în fetuși și avortoni (21).

Diagnosticul se poate realiza prin examenul PCR al probelor recoltate din țesuturi solide, LCR, sânge, scuame, cruste, spermă, fecale, lapte, ouă, carne, cadavre proaspete sau vechi, autolizate, din fetuși, avortoni, fetuși mumificați, din biopsiile cutanate, din blocurile la parafină și diverse țesuturi (2, 10, 14, 16, 23).

Astfel, tehnica PCR a fost utilizată pentru diagnosticul neosporozei la taurine (14), a neosporozei equine (19), a leishmaniozei canine (10), a toxoplasmozei la om și la oaie (23), a trichomoniozei la câine și pisică produsă de *Trichomonas tenax* (6). Totodată s-a putut diagnostica infestația cu *N. caninum* la fetuși (taurine, equine), avortoni, cât și diagnosticul de certitudine în formele nervoase ale neosporozei la aceleași animale. PCR însă, nu permite diferențierea neosporozei - boală de infestație subclinică cu *Neospora*, cel puțin la taurine (4, 14), spre deosebire de alte infestații cu protozoare chiar și cu *N. caninum* în țesuturile autolizate. Cu toate acestea, PCR rămâne o tehnică fidelă și rapidă de diagnostic.

16. Controlul paraziților. Metoda genetică de control se utilizează azi doar în cazul câtorva specii de diptere patogene, cum ar fi insecte miiazigene: *Chrysomya bezziana*, *Cochliomyia hominivorax*, *Lucilia cuprina* etc. Aceste metode

constau în creșterea și obținerea în laborator a insectelor adulte sterile. Sterilitatea genetică se poate realiza prin rearanjarea cromosomală, ce are efect asupra fecundității insectelor, ajungându-se la obținerea de masculi heterozigoți sterili (16).

17. Rezistența paraziților la medicația specifică.

Tehnicile de investigație din domeniul biologiei moleculare au evidențiat faptul că rezistența speciei, de ex. *Lucilia cuprina*, se datorează unei selecții naturale foarte puternice, ce favorizează alelele pentru rezistență situate în unul sau mai multe locusuri.

Alelele pentru rezistență, de obicei, operează prin codificarea unei enzime, care este capabilă să deterioreze insecticidul, sau prin codificarea numai a unei variante a enzimei împotriva căreia acționează insecticidul. Această variantă devine, astfel, capabilă să funcționeze în prezența insecticidului asigurând rezistența dipterului.

Alelele cu rol în codificarea enzimelor, sunt localizate în locusurile care codifică enzima citocrom-P450 ce joacă un rol cheie în detoxifierea medicamentelor.

Anterior introducerii insecticidului, alelele de rezistență sunt menținute la o frecvență (un număr) redusă în toată populația de diptere ale speciei *Lucilia cuprina*.

Prin folosirea tehnicilor biologiei moleculare de întocmire a hărților de gene s-a determinat localizarea locusurilor cu gene de rezistență în genomul insectei.

Există de exemplu, două locusuri cu alele care conferă rezistență la organofosforice: unul pe cromozomul 4 și unul pe cromozomul 6. Pentru dieldrin, de exemplu, locusul este pe cromozomul 5 (16).

Rezistența helminților la antihelmintice este conferită de o alelă specială cu efect relativ mare,

situată într-un singur locus. În alte cazuri rezistența pare să fie multifactorială, fiind primar determinată de mai multe alele, dar cu efect redus și situate în locusuri necunoscute (16).

18. PCR se folosește azi și în identificarea și diferențierea cărnii diferitelor specii de animale (16).

Un dezavantaj major al acestor tehnici moleculare, implicate în parazitologie și nu numai, este că necesită o dotare tehnică avansată, un laborator bine și ultramodern dotat, cât și un personal foarte bine instruit. Are însă avantajul major că aceste tehnici de manipulare a ADN pot detecta paraziții în pacienții care sunt clinic sănătoși de mulți ani. Aceasta ar putea fi folosită pentru menținerea germen-free a animalelor de laborator. Cu PCR s-au detectat leishmanii în cicatricile vechi din leishmanioza cutanată a omului (10).

SUMMARY

The role of molecular biology in veterinary parasitology

Molecular biology consists of the manipulation of DNA and RNA in the laboratory. The main research tools are: restriction enzymes, recombinant DNA and DNA cloning, complementary DNA, DNA sequencing, polimerase chain reaction (PCR) etc. In the parasitology are implicated besides other methods, DNA and gene cloning and PCR. PCR is used in: a) detection, identification, comparison of the species, strains, varieties and cross-breeds of the parasites; b) the study of vital cycles; c) parasitosis epidemiology; d) parasitary immunity; e) host and parasites resistance; f) diagnosis; g) control of the parasites and parasitosis.

Bibliografie

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S., 1994 — Cellular and molecular immunology, 2nd Ed. Saunders Co. Philadelphia, 65-115, 136-166.
2. Buxton, D., 1998 — Protozoan infection (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances, *Vet. Res.*, 29: 289-310.
3. Ceré, N., Polack, B., 1999 — Animal pneumocystosis: a model for man, *Vet Res.*, 30: 1-26.
4. Chermette R., Marquer A., 2000 — *Neospora caninum*: un nouveau parasite?, *Point Vet.*, 31, 208: 9-14.
5. Chrisp C.E., LeGendre M., 1994 — Similarities and differences between DNA of *Cryptosporidium parvum* and *C. wrairi* detected by the polymerase chain reaction, *Folia Parasitologica*, 41: 97-100.
6. Cielecka, Danuta, Borsuk, P., Grytner-Ziecina Barbara, Turkowicz, Monika, 2000 — First detection of *Trichomonas tenax* in dog and cat by PCR-RFLP. *Acta Parasitologica*, 45(4): 350-352.
7. Dar F.K., Alkarmi, T., 1997— Immunopathology of alveolar echinococcosis. *Acta Parasitologica*, 42(1): 1-6.
8. Dubey, J.I., Dorrough K.R., Jenkins M.C., 1998 — Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture, *J. Parasitology*, 28: 1293-1304.
9. Eckert J., Deplazes P., 2001 — Immunological and molecular techniques for diagnosis the *Echinococcus multilocularis* infection in definitive and intermediate hosts, *Acta parasitologica*, 46(1): 1-7.
10. Ferrer, L.M., 1999 — Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: an update. *Proceed. of Internat. Canine Leishmaniasis forum, Barcelona, Spania*, 6-10.
11. Guillot, J., Escrion, C., Fritz, D., 2000 — La néosporose canine *Point Vet.*, 31, 208: 29-35.
12. Köhler, P., 2001 — The impact of research on parasite beyond parasitology *Acta Parasitologica*, 46(1): 63-69.
13. MacPherson J.M., Gajadhar A.A., 1994 — Specific amplification of *Sarcocystis cruzi* DNA using a randomly primed polymerase chain reaction assay, *Vet. Parasitol.*, 55: 267-277.
14. Marquer, A., Chermette, R., 2000 — La néosporose chez les bovines. *Point Vet.*, 31, 208: 17-22.
15. Müller N., Zimmermann V., Hentrich, B., Gottstein B., 1996 — Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection par PCR and hybridization immunoassay. *J. Clin. Microbiol.*, 82: 272- 279.
16. Nicholas, F.W., 1996 — Introduction to Veterinary genetics, *Oxford University Press*, 45-64: 184- 197.
17. Pernthaner, A., Cabaj, W., Stankiewicz, M., Davies J., Maas, D., 1997 — Cytokine mRNA expression and IFN- γ production of immunized nematode resistant and susceptible lambs against natural poly-generic challenge, *Acta Parasitologica*, 42(3): 180- 186.
18. Pittel, P-H., Pronost, S., Legendre M-F., Chatagnon, G., Tainturier, D., Fortier, C., 2000 — Infections des bovines par *Neospora caninum*: deux années d'observation dans l'Ouest de la France, *Point Vet.*, 31, 205: 53-58.
19. Pronost, S., Pittel, P., Foucher, N., Collobert, C., Fortier, G., 2000 — La néosporose equine. *Point Vet.*, 31, 208: 23-28.
20. Rudenko, Nataliia, Golovchenko, Maryna, Grubhoffer, L., 1999 — Lectin-like sequences in genome of *Borrelia burgdorferi*, *Folia Parasitologica*, 46: 81-90.
21. Sally L., Vivrette, Debra C. Sellion, Debra S. Giblons, 2000 — Clinical applications on a polymerase chain reaction assay (PCR) in the diagnosis of pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in horse, *J.A.V.M.A.*, 217, 9.
22. Travers, Janeway, 1996 — Immunobiology, 2nd ed., *Garland Publishing Inc.*, 3.1-4.30.
23. Wastling, J.M, Nicoll, S., Baxton D., 1993 — Comparison of two gene amplification method for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep, *J. Med. Microbiol.*, 38: 360-365.