

## Badania nad występowaniem *Fasciola hepatica* na wybranych obszarach Polski w oparciu o metody molekularne i serologiczne

### The occurrence of *Fasciola hepatica* in chosen regions of Poland based on molecular and serological methods

Monika Kozak-Cięszczyk

Praca doktorska wykonana w Instytucie Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN w Warszawie i obroniona 24 lutego 2006 r.

Promotor: Prof. dr hab. Halina Z. Wędrychowicz

Recenzenci: Prof. dr hab. Danuta Klimuszek

Prof. dr hab. Andrzej Malczewski

**ABSTRACT.** Fasciolosis, caused by the liver fluke (*Fasciola hepatica*) is an important issue for both human and animal health. The disease evokes economic losses which are a consequence of impaired animal productivity leading to higher costs of meat and milk production, as well as liver condemnation. The goals of this thesis were to: (1) elaborate a molecular method — PCR for the detection of *F. hepatica* DNA in intermediate and definite hosts; (2) estimate the usefulness of a recombinated cysteine proteinase produced in *E. coli* in the form of inclusive bodies in serological diagnosis of *F. hepatica* infection in definite hosts, using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); (3) conduct field research on the prevalence of infection among intermediate and definitive hosts (cattle) in chosen regions of Poland, utilizing the elaborated methods. Based on the results obtained in this study, it was established that it is possible to detect *F. hepatica* DNA in the feces of definite hosts with the elaborated PCR method. The amplification of a 124 base pair tandem repeat allows the detection of fluke larval stages in intermediate hosts within 12 hours of exposure and *F. hepatica* infection in definite hosts (by the 5th week in rats, 8th week in sheep and 10th week in cattle). Therefore, the PCR test is more sensitive than traditional microscopic methods. Furthermore, it was determined that, the recombinated cysteine proteinase in the form of inclusive bodies, after solubilization exhibits antigenic properties of the native protein and the ELISA method based on this antigen may be useful as a tool for diagnosing fasciolosis in sheep and cattle, in both serum and milk samples. The test achieves a greater sensitivity and specificity than an ELISA based on native excretory-secretory antigens. The results of field research indicate that *Fasciola hepatica* is a frequent parasite of cattle in central and eastern Poland. The mean prevalence was 34.86% ( $\pm 16.95$ ) in all studied areas. The prevalence among intermediate hosts varied greatly (0–100%). The elaborated tests were proved to be valuable, mutually complementing diagnostic tools, applicable to different epidemiological situations.

**Key words:** cysteine proteinase, definitive hosts, ELISA, *Fasciola hepatica*, intermediate hosts, PCR, tandem repeat DNA.

#### Streszczenie

Choroba motylicza, wywoływana przez przywrę *Fasciola hepatica*, jest poważnym problemem zdrowotnym zarówno dla zwierząt jak i człowieka. Fascjoloza wywołuje straty ekonomiczne wynikające

z jednej strony z gorszej produktywności zwierząt, a zatem zwiększonych kosztów uzyskiwania mięsa czy mleka, a z drugiej strony z powodu konfiskat wątrób. Uważa się, że parazytoza ta jest przyczyną strat ekonomicznych rzędu 3 miliardów dolarów rocznie w rolnictwie na świecie. W Polsce w 1997

jej ekstensywność, oceniona na podstawie badań poubojowych, dochodziła do 16,31% na terenach północno-wschodnich. Nie ma jednak precyzyjnych danych o aktualnej sytuacji epidemiologicznej. Objawy kliniczne tej choroby są mało charakterystyczne, o różnym nasileniu — od słabo wyrażonych aż do nagłych zejść śmiertelnych. Z tego względu konieczne są odpowiednio czułe i specyficzne metody diagnostyczne umożliwiające rozpoznanie inwazji.

W Polsce dotychczas do rutynowej diagnostyki przyżyciowej u bydła stosowana jest wyłącznie metoda koproskopowa — dekantacja. Pozwala ona na wykrycie obecności pasożyta dopiero w okresie patentnym, gdy motyllice dojrzeją płciowo i rozpoczną, po 3–4 miesiącach od zarażenia produkcję jaj. Czułość tej metody jest niska ponieważ produkcja jaj przez przywry nie jest stała. W diagnostyce serologicznej u ludzi stosuje się enzymy należące do proteaz cysteinowych *F. hepatica*. Nie ma natomiast testu komercyjnego dla zwierząt wykorzystującego te antygeny. Coraz częściej podejmuje się próby wykorzystania antygenów rekombinowanych w miejsce natywnych, ponieważ mogą one być produkowane na skalę przemysłową w różnych systemach ekspresyjnych.

W Polsce, najważniejszym żywicielem pośrednim motyllicy jest *Galba truncatula*. Badanie ekstensywności zarażenia żywicieli pośrednich formami larwalnymi *F. hepatica* jest jedną z metod poznania transmisji pasożyta, co jest istotne dla ustalenia odpowiedniego programu zwalczania czy monitorowania zagrożenia chorobą motylliczą. Obecna sytuacja epidemiologiczna wśród ślimaków w Polsce nie jest znana. Tradycyjne metody mikroskopowe, stosowane do wykrywania pasożyta u ślimaków cechują się niską czułością, a przy tym są bardzo pracochłonne. Metody pozwalające na wykrycie materiału genetycznego przywry są bardziej czułe i specyficzne. Najwięcej dotychczas opracowanych technik wykorzystywało metodę hybrydyzacji. Powstały jedynie dwa testy polegające na amplifikacji kwasów nukleinowych.

Celem badań było: (1) opracowanie metody molekularnej — PCR do wykrywania DNA *F. hepatica* u żywicieli pośrednich oraz ostatecznych; (2) ocena przydatności rekombinowanej proteazy cysteinowej uzyskiwanej w *E. coli* w postaci ciałek inkluzyjnych w diagnostyce serologicznej inwazji *F. hepatica* u żywicieli ostatecznych, przy wykorzystaniu testu immunoenzymatycznego (ELISA); (3) przeprowadzenie badań nad ekstensywnością zarażenia żywicieli pośrednich i ostatecznych (bydło) na

wybranych obszarach Polski za pomocą opracowanych metod.

W celu opracowania metody PCR do diagnozowania inwazji *F. hepatica* u żywicieli pośrednich i ostatecznych, z bazy GenBank wyselekcjonowano sekwencję 124-nukleotydową, specyficzną dla przywry, występującą w wielu kopiach, stanowiącą około 15% genomu pasożyta. W prezentowanych badaniach po raz pierwszy zastosowano tę sekwencję w metodzie PCR. Wynikiem amplifikacji było powstanie charakterystycznego wzoru amplikonów, z których najmniejszy odpowiadał wielkości około 124 par zasad, a kolejne korespondowały z 2, 3 i 4-krotnością sekwencji wyjściowej. Liczba powstających produktów była proporcjonalna do ilości DNA matrycowego, wskazując na tandemowe ułożenie sekwencji. Opracowana metoda okazała się również być specyficzną. Eksperymentalnie stwierdzono brak reakcji krzyżowych z DNA przywyr najbliższej spokrewnionych z *F. hepatica*, pasożytujących u przeżuwaczy w Polsce: *P. cervi* i *D. dendriticum*. Sprawdzono również czułość i specyficzność opracowanych metod: PCR i ELISA na żywicielach zarażonych eksperymentalnie: szczurach, owcach i bydłem. Następnie testami tymi badano żywicieli zarażonych naturalnie, pochodzących z rejonów centralnych i wschodnich Polski.

Na podstawie wyników uzyskanych w trakcie badań ustalono, że w kale żywicieli ostatecznych możliwe jest wykrycie DNA *Fasciola hepatica* za pomocą opracowanej metody PCR. Wykorzystanie sekwencji tandemowo powtórzonej pozwala na wykrywanie form larwalnych *F. hepatica* u żywicieli pośrednich, już w 12 godzin po ekspozycji oraz inwazji *F. hepatica* u żywicieli ostatecznych (od 5 tygodnia po zarażeniu u szczura, 8 tygodnia u owcy, a 10 u bydła). Tak więc, test ten jest bardziej czuły niż tradycyjne metody mikroskopowe. Ponadto stwierdzono, że rekombinowana proteaza cysteinowa w postaci ciałek inkluzyjnych po przejściu w formę rozpuszczalną wykazuje właściwości antygenowe białka natywnego, a test immunoenzymatyczny wykorzystujący ten antygen może być przydatny jako narzędzie do diagnozowania choroby motylliczej u bydła i owiec, przy wykorzystaniu zarówno surowicy jak i próbek mleka. Wykazuje on większą czułość i specyficzność niż test z udziałem natywnych antygenów ekskrecyjno-sekrecyjnych. Wykazano również, że rekombinowana proteaza cysteinowa w postaci ciałek inkluzyjnych, nie może być stosowana jako antygen do uzyskiwania monospecyficznych przeciwciał mogących posłużyć do

wykrywania natywnego enzymu przywry w kale zwierząt zarażonych.

Z przeprowadzonych badań terenowych wynioskowano, że *Fasciola hepatica* jest częstym pasożytem bydła w centralnych i wschodnich regionach Polski. Średnia ekstensywność zarażenia we wszystkich badanych lokalizacjach wyniosła 34,86% ( $\pm 16,95$ ). Prewalencja inwazji *Fasciola he-*

*patica* u żywicieli pośrednich była bardzo zróżnicowana (0-100%). Opracowane metody okazały się wartościowymi, wzajemnie się uzupełniającymi narzędziami diagnostycznymi, mogącymi mieć zastosowanie w różnych sytuacjach epidemiologicznych.

Wpłynęło 21 marca 2006,  
Zaakceptowano 24 marca 2006