

# Diagnostyka toksokarozy z zastosowaniem metod biologii molekularnej

Diagnosis of toxocarosis using methods of molecular biology

Danuta Domżał<sup>1</sup>, Renata Talar-Wojnarowska<sup>2</sup>, Małgorzata Niedworok<sup>3</sup>, Ewa Małecka-Panas<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>studentka, indywidualny tok studiów przy Klinice Chorób Przewodu Pokarmowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

<sup>2</sup>Klinika Chorób Przewodu Pokarmowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

<sup>3</sup>Klinika Gastroenterologii Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki” w Łodzi

Przegląd Gastroenterologiczny 2008; 3 (5): 227–231

**Słowa kluczowe:** toksokaroza, łańcuchowa reakcja polimerazy, polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, analiza polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego DNA, wewnętrzne sekwencje rozdzielające.

**Key words:** toxocarosis, polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, single strand conformation polymorphism, internal transcribed spacers.

---

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Renata Talar-Wojnarowska, Klinika Chorób Przewodu Pokarmowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź, tel./faks +48 42 678 64 80, e-mail: r-wojnarowska@wp.pl

## Streszczenie

Toksokaroza to choroba odzwierzęca wywoływana głównie przez glisty *Toxocara canis* i *Toxocara cati*. Wyróżnia się pięć postaci toksokarozy – zespół larwy wędrującej trzewnej, toksokarozę oczną, neurologiczną postać toksokarozy, toksokarozę ukrytą oraz bezobjawową. Szeroki zakres narzędzi odpowiednich do identyfikacji pasożytów oferuje biologia molekularna. Jest istotnym uzupełnieniem badań serologicznych krwi oraz mikroskopowej obserwacji cech morfologicznych nicieni, szeroko wykorzystywanych w diagnostyce toksokarozy. Celem pracy jest przedstawienie możliwości molekularnej diagnostyki toksokarozy przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy, polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych, polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego DNA oraz losowej amplifikacji polimorficznego DNA. Opisano także znaczenie wewnętrznych transkrybowanych sekwencji rozdzielających – niekodujących, swoistych gatunkowo regionów DNA, oddzielających geny kodujące rybosomalny RNA – które mogą być bardzo użyteczne w diagnostyce toksokarozy.

Toksokaroza to odzwierzęca choroba inwazyjna wywołana zarażeniem formą rozwojową nicienia należącego do rodzaju *Toxocara*. Glista psia (*T. canis*) i glista kocia (*T. cati*) to powszechne pasożyty psów i kotów na terenie Polski (do 72% bezpiecznych psów i 10,5–30% kotów może być zarażonych glistami) [1]. Pełen cykl rozwojowy *T. canis* i *T. cati* zachodzi jedynie u młodych zwierząt, natomiast u dorosłych mięsożernych, drobnych

## Abstract

Toxocarosis is a zoonosis caused by the ascarid nematodes *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. There are five forms of toxocarosis: visceral larva migrans (VLM), ocular larva migrans (OLM), neurotoxocarosis, covert toxocarosis (CT) and asymptomatic toxocarosis. Molecular biology offers a wide range of tools applicable for the identification of parasites. It is an essential supplement of serological blood tests and microscopic observations of the morphological features of the nematode, widely used in diagnosis of toxocarosis. The aim of this paper is to present possibilities of molecular diagnosis of toxocarosis using: PCR (polymerase chain reaction), RFLP (restriction fragment length polymorphism), SSCP (single strand conformation polymorphism) and RAPD (random amplified polymorphic DNA). Also described is the significance of internal transcribed spacers (ITS) – noncoding, species-specific regions of DNA sequence which separate genes coding rRNA, which can be useful in diagnosis of toxocarosis.

gryzoni czy ptaków larwy nie rozwijają się do postaci dorosłych. Chorobę u człowieka mogą także wywołać nicienie z gatunku *Toxascaris leonina* i potencjalnie *Toxocara malaysiensis*, które nie są spotykane na terenie Polski. Do organizmu kociąt, szczeniąt, młodych lisów czy wilków larwy dostają się drogą śródmaciczną, laktogenną lub doustną i po odbyciu wędrówki przez płuca lokalizują się w jelicie cienkim, gdzie osiągną dojrzałość

oraz produkują wydalane z kałem jaja [2]. Jedna samica glisty jest w stanie wytworzyć ok. 200 tys. jaj na dobę, które dzięki grubym otoczkom mogą zachowywać inwazyjność nawet przez 10 lat. Szacuje się, że w zależności od warunków demograficznych na świecie 2–10% populacji jest zarażone *Toxocara* spp. [3]. Według Hozyasz i wsp. dodatnie odczyny serologiczne na obecność inwazji glistami występują w zachodnich województwach Polski u ok. 3,5% dzieci, natomiast w południowo-wschodnich regionach kraju nawet u ok. 19% [4].

Człowiek jest żywicielem przypadkowym, u którego rozwój *Toxocara* spp. jest nietypowy i zostaje zahamowany na poziomie larw. Inwazję pasożyta nabywa się za pośrednictwem jaj pochodzących ze środowiska zewnętrznego. Jaja bezpośrednio wydalane z kałem chorego zwierzęcia nie są od razu zdolne do zarażenia. Dopiero po ok. 3 tyg., przy dostępie tlenu, w odpowiedniej temperaturze (10–30°C) oraz wilgotności środowiska w jaju rozwija się larwa drugiego stadium (L2) – postać inwazyjna *Toxocara* spp. [2]. Ludzie (najczęściej dzieci w wieku 2–7 lat) nabywają toksokarozę głównie przez kontakt ze skażoną ziemią. Zarówno niski poziom higieny, jak i spożywanie surowych warzyw z zanieczyszczonych upraw może doprowadzić do inwazji. Rzadziej wiąże się to z konsumpcją surowego mięsa zwierząt będących potencjalnymi gospodarzami pasożyta, takich jak kurczaki, jagnięta czy króliki [5]. Z połkniętych jaj pasożyta w przewodzie pokarmowym człowieka uwalniają się inwazyjne larwy, które przechodzą przez ścianę jelita i wędrują z prądem krwi do różnych tkanek – głównie wątroby (80%), a także płuc, mózgu, gałki ocznej, mięśni szkieletowych czy mięśnia sercowego. Larwy nigdy nie osiągają postaci dojrzałej, ale są silnymi antygenami i wywołują odczyn zapalny w otaczających tkankach, co prowadzi do powstania ziarniniaków i blizn łąkotkankowych. Różnorodność objawów klinicznych zależy od masywności zarażenia, lokalizacji narządowej pasożyta oraz zapalno-immunologicznej odpowiedzi ze strony organizmu człowieka [6].

### Kliniczny przebieg toksokarozy

Z klinicznego punktu widzenia rozróżnia się pięć form toksokarozy, tj. zespół larwy wędrującej trzewnej (ang. *visceral larva migrans* – VLM), toksokarozę oczną (ang. *ocular larva migrans* – OLM), toksokarozę ośrodkowego układu nerwowego, toksokarozę ukrytą (ang. *covert toxocarosis* – CT) oraz bezobjawową. Według badań przeprowadzonych przez Pracownię Parazytologii Zwierząt Domowych Instytutu Parazytologii PAN w Warszawie najczęściej występuje VLM (45,4%), rzadziej rozpoznaje się postać ukrytą (37,5%) i oczną (17,1%) [2].

Następstwem masywnego zarażenia, głównie u małych dzieci, jest uogólniona postać trzewna (zespół VLM),

objawiająca się bólami brzucha i głowy, gorączką, osłabieniem apetytu, hepatomegalią, splenomegalią i powiększeniem węzłów chłonnych. Towarzyszą im nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych, takie jak leukocytoza z eozynofilią (>2000 komórek/mm<sup>3</sup>), niedokrwistość niedobarwliwa, hipergammaglobulinemia oraz wzrost aktywności aminotransferaz [2, 5]. Przy mniej intensywnej inwazji i słabiej nasilonych objawach stwierdza się postać ukrytą (CT) lub bezobjawową.

W przypadku, gdy larwa dotrze do ośrodkowego układu nerwowego, choroba manifestuje się jako encefalopatia z zaburzeniami funkcji poznawczych, zapalenie opon mózgowych i mózgu, zapalenie naczyń mózgowych, padaczka, osłabienie widzenia, zapalenie rdzenia kręgowego i korzeni rdzeniowych lub zapalenie nerwów czaszkowych [7]. Zapis elektroencefalogramu (EEG) jest nieprawidłowy, natomiast w badaniach obrazowych (tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny) często nie stwierdza się zmian ogniskowych.

Toksokaroza oczna (OLM) jest miejscowym powikłaniem inwazji *Toxocara* spp. i zazwyczaj występuje u dzieci, chociaż opisano także przypadki u dorosłych. Objawy kliniczne obejmują pogorszenie widzenia w ciągu kilku dni lub tygodni, wysięk zapalny w ciele szklistym i komorze przedniej, ziarniniaki (często podejrzenie *retinoblastoma*), zapalenie i wylewy wewnątrzgałkowe, odwarstwienie siatkówki, wtórny zez i zaćmę [8].

### Tradycyjne metody diagnostyczne

W diagnostyce toksokarozy wykorzystuje się badania serologiczne. Poszukuje się swoistych przeciwciał IgG skierowanych przeciwko antygenom wydalniczo-wydzielniczym glist, które są uważane za bardziej swoiste od antygenów somatycznych [9]. Obecnie rutynowo wykonuje się test ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) do wykrywania przeciwciał typu IgG, brak natomiast komercyjnych testów dla IgM [2]. Metoda ELISA charakteryzuje się czułością ok. 78% i swoistością >90% (dla miana  $\geq 1:32$ ) [10]. Jednak specyficzność stadialna niektórych antygenów oraz zmienność antygenowa pasożytów sprawia, że badania serologiczne nie są wystarczająco czułe. Przeciwciała wykrywane u żywiciela są jedynie pośrednim dowodem obecności patogenu i wysokie ich miana mogą utrzymywać się nawet po wyeliminowaniu pasożyta. Dodatkowy problem stanowią reakcje krzyżowe uniemożliwiające definitywne określenie, który z pasożytów – *T. canis* czy *T. cati* – spowodował w danym przypadku chorobę. Zazwyczaj przy rozpoznaniu zespołu larwy migrującej *Toxocara* przyjmuje się, że to *T. canis* [11]. Natomiast *T. cati* – migrująca larwa stadium L2 – także może powodować OLM czy VLM. Istnieje również możliwość dodatkowego zarażenia człowieka dorosłymi pasożytami, co

w przypadku *T. canis* występuje bardzo rzadko (nie potwierdzono obecności jaj w kale). Sugeruje się, że *T. cati* częściej wywołuje OLM niż VLM [11].

Metody mikroskopowe natomiast, także wykorzystywane do diagnostyki toksokarozy, są mało obiektywne, gdyż silnie zależą od umiejętności i doświadczenia osoby badającej. Często w obrębie danego rodzaju pasożytów poszczególne gatunki nie wykazują ponadto znaczących różnic w morfologii lub tylko niektóre ich stadia rozwojowe umożliwiają różnicowanie. Poza tym, aby ocenić cechy budowy nicienia, konieczna jest jego izolacja z tkanek gospodarza. Chorzy nie wydalają jaj *Toxocara* spp. z kałem, a biopsja lub operacyjne usunięcie ziarniniaka powstałego wokół larwy w ludzkich narządach w celu wykonania serii histologicznych skrawków rzadko są możliwe.

Dokładna identyfikacja nicieni w każdym stadium rozwojowym jest niezmiernie ważna do rozpoznania i leczenia choroby. Zazwyczaj poszczególne nicienie są identyfikowane i rozróżniane na podstawie ich cech morfologicznych, gospodarza, którego zaraziły, objawów u żywiciela i ich geograficznego pochodzenia. Kryteria te nie zawsze są jednak wystarczające, co może poważnie ograniczyć możliwości trafnej diagnozy [12]. Dlatego też w diagnostyce toksokarozy i pewnej identyfikacji organizmu pasożyta przewagę mogą mieć techniki oparte na badaniu materiału genetycznego [13, 14]. Znalezienie DNA pasożyta jest jednoznacznym świadectwem jego obecności. Wysoką czułością i specyficznością charakteryzują się jedynie metody biologii molekularnej, które zaczęto stosować w parazytologii po 1990 r.

### Metody diagnostyki molekularnej

Podstawową techniką badawczą i diagnostyczną metod biologii molekularnej jest łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polimerase chain reaction* – PCR), która w ciągu kilku godzin umożliwia amplifikację określonego fragmentu DNA w bardzo dużych ilościach [15]. Substraty niezbędne do przeprowadzenia PCR to matryca (DNA lub RNA), startery (krótkie fragmenty materiału genetycznego, od których rozpoczyna się reakcja), deoksynukleotydy, enzym – polimeraza – oraz bufony reakcyjne [2, 16]. W czasie trwania jednej reakcji przeprowadza się 30–40 cykli, na które składają się trzy etapy, tj. denaturacja cząsteczki DNA (rozdzielenie podwójnej nici na dwie pojedyncze, z których każda staje się następnie matrycą), przyłączanie starterów do odpowiednich sekwencji na powielanych niciach oraz synteza nowej nici między starterami przez enzym – polimerazę (wydłużanie zachodzi w ściśle określonej temperaturze ok. 72°C) [17, 18].

Do wykonania PCR wystarczają pikogramowe ilości DNA [16], co jest szczególnie ważne, gdy dysponuje się jedynie niewielką ilością materiału do badania. łańcuchowa reakcja polimerazy może być przydatnym molekularnym narzędziem do badania materiału biopsyjnego lub próbek z autopsji od chorych podejrzewanych o VLM czy OLM. Dzięki temu możliwe jest wyjaśnienie wielu problemów epidemiologicznych, takich jak względna częstość występowania określonych gatunków nicieni u ludzi [19].

Podstawowe znaczenie dla identyfikacji pasożytów przy użyciu metod PCR ma wybór odpowiedniego regionu DNA (marker genetyczny lub *locus*), który umożliwi odróżnienie danego gatunku od innych, a jednocześnie będzie wykazywał minimalną zmienność wewnątrzgatunkową. Zidentyfikowane na podstawie morfologii dorosłe osobniki *T. canis*, *T. cati* i *T. leonina* mogą być rozróżniane dzięki ich ITS-2 sekwencjom [20]. Wewnętrzne sekwencje rozdzielające (ang. *internal transcribed spacer* – ITS) to niekodujące regiony sekwencji DNA (tzw. rybosomalnego DNA – rDNA), które oddzielają geny kodujące rybosomalny RNA. Sekwencje te między gatunkami różnią się o ok. 26–50%, co jest znamienne większe od wewnątrzgatunkowych polimorfizmów (0–0,6%) [21]. Dodatkowo są one wielokrotnie powtarzane w genomie, grupują się w zespoły i rodziny, dzięki czemu możliwa jest ich detekcja nawet w niewielkiej próbce materiału, co podwyższa czułość badania [22].

Porównując sekwencje ITS1 i ITS2 dla *T. canis*, *T. cati* i *T. leonina*, stworzono startery umożliwiające amplifikację odpowiednich fragmentów DNA w reakcji PCR. Wspólne startery dla ITS1 i ITS2 oraz 5.8S mają następującą sekwencję NC5 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAG-GATCATT-3' oraz NC2 5'TTAGTTTCTTTCTCCGCT 3'. W celu amplifikacji fragmentów charakterystycznych dla poszczególnych gatunków używa się natomiast odrębnych par starterów [19]. Ważną zaletą reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do ITS2 konkretnych gatunków *Toxocara* jest fakt, że nie są wtedy jednocześnie powielane fragmenty DNA pochodzące z tkanek gospodarza. Umożliwia to wykrywanie larw nicieni bezpośrednio w homogenacie tkanki pochodzącej z biopsji czy w płynach ustrojowych pacjenta. Nie ma konieczności izolacji pasożyta czy wykonywania serii histologicznych skrawków w celu lokalizacji larwy [13, 23].

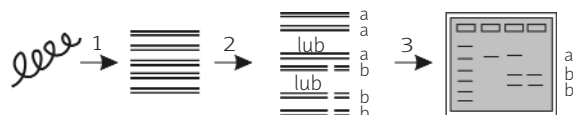
W diagnostyce ludzkiej toksokarozy stosuje się także technikę PCR-RFLP [24] – połączenie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism* – RFLP). Polega ona na amplifikowaniu DNA pasożytów, a następnie trawieniu produktów PCR endonukleazami restrykcyjnymi

i analizowaniu ich w świetle UV po elektroforetycznym rozdziale w żelu agarozowym (ryc. 1).

Do identyfikacji *Toxocara* spp. wykorzystuje się enzymy restrykcyjne *Hinf*I oraz *Rsa*I. Trawienie powielonego DNA endonukleazą *Hinf*I pozwala odróżnić gatunki *Toxocara* od innych nicieni mogących pasożytować w ludzkich tkankach. Sekwencje ITS2 *T. canis* i *T. cati* nie są podatne na cięcie tym enzymem, podczas gdy kwasy nukleinowe pokrewnych gatunków, takie jak *T. leonina*, *Ascaris suum* czy *A. lumbricoides* mają sekwencje rozpoznawane przez *Hinf*I. Endonukleazę *Rsa*I stosuje się natomiast do rozróżnienia *T. canis* od *T. cati*, gdyż przecina ich DNA w różnych miejscach. Materiał po amplifikacji regionu ITS2 pochodzący z *T. cati* przy użyciu *Rsa*I rozcinany jest na trzy fragmenty (110, 160 i 280 pb), a pochodzący od *T. canis* na 2 (250 i 290 pb) [23].

Szybko i łatwo do przeprowadzenia metodą umożliwiającą wykrywanie pasożytów o nieznanym gatunkowo swoistych sekwencjach DNA jest losowa amplifikacja polimorficznego DNA RAPD-PCR (ang. *random amplification of polymorphic DNA* – RAPD). W metodzie tej do reakcji PCR używa się krótkie, przypadkowo dobrane startery, a pasożyta identyfikuje się na podstawie wzoru elektroforetycznego produktu [25, 26]. W przypadku *T. canis* i *T. cati* przy użyciu tej metody otrzymuje się produkt wielkości 293 pb, a nie są jednocześnie namnażane fragmenty DNA innych nicieni, takich jak *A. lumbricoides*, *A. lumbricoides suum* czy *Anisakis simplex* [23]. Niestety, metoda RAPD-PCR ma poważną wadę, jaką jest brak specyficzności starterów i możliwość jednoczesnej amplifikacji, a potem migracji podczas elektroforezy, niehomologicznych fragmentów pochodzących z zanieczyszczeń [21].

Rozróżnianie sekwencji różniących się tylko jednym lub kilkoma nukleotydami umożliwia z kolei analiza polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego DNA (ang. *single strand conformation polymorphism* – SSCP) [12, 27].



**Ryc. 1.** Schemat metody analizy długości fragmentów restrykcyjnych PCR-RFLP: 1 – izolacja DNA i reakcja PCR, 2 – trawienie produktów enzymami restrykcyjnymi, 3 – elektroforeza

**Fig. 1.** Scheme of restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis: 1 – DNA isolation and PCR multiplication, 2 – fragmentation of DNA samples by restriction enzymes, 3 – electrophoresis

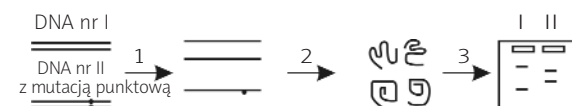
Technika ta polega na analizie szybkości migracji pojedynczych nici DNA w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym. Każda cząsteczka jednoniciowego DNA przybiera charakterystyczną konformację, która jest wynikiem parowania się komplementarnych zasad między nukleotydami, dzięki czemu w żelu migrują z określoną prędkością. Jeżeli natomiast zmieni się pierwszorzędowa struktura kwasu dezoksyrybonukleotydowego, nawet w wyniku punktowej mutacji, ma to swoje odbicie w odmiennej konformacji drugorzędowej i trzeciorzędowej. Cząsteczka taka migruje już z inną prędkością (ryc. 2).

Technikę SSCP wykorzystuje się do wykrywania zmienności w obrębie gatunku czy indywidualnych osobników, badania mechanizmów ewolucji i dziedziczenia. Stanowi ważne narzędzie do monitorowania genów ulegających i nieulegających ekspresji oraz poszukiwania mutacji w allelach, odpowiedzialnych za oporność na leki. Zbyt intensywne wykorzystywanie niektórych leków mogło bowiem doprowadzić do selekcji w heterogenych populacjach nicieni [12].

## Podsumowanie

Metody molekularne w diagnostyce zakażeń i inwazji są stosowane stosunkowo od niedawna, dlatego brak jeszcze standardów pracy laboratoryjnej, które zminimalizowałyby prawdopodobieństwo fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich wyników. Dotyczy to zwłaszcza technik związanych z PCR, dla których niezwykle ważna jest kontrola jakości. Mimo to, techniki biologii molekularnej są najbardziej wiarygodnymi metodami w identyfikacji gatunków pasożytów i diagnostyce chorób przez nie wywołanych. Mogą w istotny sposób wspomóc i uzupełniać tradycyjne metody rozpoznawania toksokarozy z korzyścią zarówno dla pacjenta, jak i lekarza.

Praca finansowana z grantu nr 2 PO5E 015 27.



**Ryc. 2.** Schemat metody analizy polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego DNA-SSCP: 1 – denaturacja podwójnych nici DNA, 2 – pojedyncze nici przybierają charakterystyczne konformacje, 3 – elektroforeza

**Fig. 2.** Scheme of single strand conformation polymorphism (DNA-SSCP) analysis: 1 – denaturation of double strand DNA, 2 – single strand DNA folding with creation of different conformational states according to DNA sequence, 3 – electrophoresis

### Piśmiennictwo

1. Kornaś S, Nowosad B, Skalska M. Występowanie glisty *Toxocara canis* u psów w krakowskim schronisku dla bezdomnych zwierząt. *Wiad Parazyt* 2001; 47: 755-62.
2. Borecka A, Dobosz S, Gawor J i wsp. Toksokaroza – epidemiologia, klinika, diagnostyka, leczenie i zapobieganie. Agencja Reklamowo-Wydawnicza, Warszawa 2005.
3. Mizgajska H. Helminth infections – permanent health problem and ecological conditions. *Wiad Parazyt* 1998; 44: 616.
4. Hozyasz K, Milanowski A. Toxocariasis – an underestimated problem in paediatrics. *Med Wieku Rozwoj* 2002; 6: 155-62.
5. Magnaval JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol* 2001; 39: 1-11.
6. Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 265-72.
7. Finsterer J, Auer H. Neurotoxocarosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007; 49: 279-87.
8. de Visser L, Rothova A, de Boer JH i wsp. Diagnosis of ocular toxocariasis by establishing intraocular antibody production. *Am J Ophthalmol* 2008; 145: 369-74.
9. Żarnowska-Prymek H. Enhancement of laboratory diagnosis specificity in human toxocariasis. *Wiad Parazyt* 2001; 47: 489-96.
10. Smith HV. Antibody reactivity in human toxocariasis. W: Lewis JW, Maizels RM (red.). *Toxocara and toxocariasis: clinical, epidemiological, and molecular perspectives*. London, UK: Institute of Biology and the British Society for Parasitology 1993; 91-109.
11. Fisher M. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends Parasitol* 2003; 19: 167-70.
12. Gasser RB, Chilton NB. Applications of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to taxonomy, diagnosis, population genetics and molecular evolution of parasitic nematodes. *Vet Parasitol* 2001; 101: 201-13.
13. Gasser RB. Molecular taxonomic, diagnostics and genetic studies of parasitic helminthes. *Int J Parasitol* 2001; 31: 860-4.
14. Zhu XQ, Gasser RB, Chilton NB, Jacobs DE. Molecular approaches for studying ascaridoid nematodes with zoonotic potential, with an emphasis on *Toxocara* species. *J Helminthol* 2001; 75: 101-8.
15. Gasser RB. PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 1999; 84: 229-58.
16. *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Bal J (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
17. Borecka A, Gawor J. Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with *Toxocara* spp. eggs. *J Helminthol* 2007; 82: 119-22.
18. Fogt-Wyrwas R, Jarosz W, Mizgajska-Wiktor H. Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. *J Helminthol* 2007; 81: 75-8.
19. Li MW, Lin RQ, Chen HH i wsp. PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Mol Cell Probes* 2007; 21: 349-54.
20. Ishiwata K, Shinohara A, Yagi K i wsp. Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA sequencing. *Parasitol Res* 2004; 92: 50-2.
21. Gasser RB. Molecular tools – advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol* 2006; 136: 69-89.
22. Długosz E, Wiśniewski M. Wykorzystanie sekwencji genu rDNA w molekularnej diagnostyce parazytologicznej. *Wiad Parazyt* 2006; 52: 263-9.
23. Fogt R. Molecular techniques applied in species identification of *Toxocara*. *Wiad Parazyt* 2006; 52: 31-5.
24. Morgan UM. Detection and characterisation of parasites causing emerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1407-21.
25. Epe C, Meuwissen M, Stoye M, Schnieder T. Transmission trials, ITS2-PCR and RAPD-PCR show identity of *Toxocara canis* isolates from red fox and dog. *Vet Parasitol* 1999; 84: 101-12.
26. Wędrychowicz H. Przydatność metody PCR i jej modyfikacji do diagnozowania inwazji pasożytniczych u przeżuwaczy. *Wiad Parazyt* 2000; 46: 295-304.
27. Zhu XQ, Gasser RB. Single-strand conformation polymorphism (SSCP)-based mutation scanning approaches to fingerprint sequence variation in ribosomal DNA of ascaridoid nematodes. *Electrophoresis* 1998; 19: 1366-73.