

## WSPÓŁWYSTĘPOWANIE *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*, *GIARDIA* SPP. I HELMINTÓW W POPULACJACH DROBNYCH GRYZONI

ANNA BAJER<sup>1</sup>, JERZY M. BEHNKE<sup>2</sup>, MAŁGORZATA BEDNARSKA<sup>1</sup>, KAROLINA  
KULIŚ<sup>1</sup> I EDWARD SIŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Parazytologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096  
Warszawa, E-mail: anabena@biol.uw.edu.pl; <sup>2</sup>School of Biology, University of Nottingham,  
Nottingham NG7 2RD, UK.

**ABSTRACT.** The co-occurrence of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia* spp. and helminth infections in small rodent populations. During long-term (1998-2000) studies on rodent parasite populations in Mazury lake district there were collected and analyzed data on co-occurrence of intestinal protozoa (*Cryptosporidium parvum*, *Giardia* spp.) and helminths. There were performed 178 autopsies of common vole *Microtus arvalis*, 85 autopsies of yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* and 386 autopsies of bank vole *Clethrionomys glareolus*. Positive effect of helminth infections was found in *C. glareolus*. Voles infected with nematode *Heligmosomum mixtum* showed higher prevalence of *C. parvum* and *Giardia* spp. than voles infected with *Heligmosomoides glareoli*. The host age took part in these interactions and positive effect of co-occurrence was mainly observed in voles older than 3 months. The other intrinsic (host sex) or extrinsic (season and year of study) factors influenced interactions between parasites. Presented results revealed that helminth infections may facilitate chronic infections of intestinal protozoa in rodent populations.

**Key words:** bank vole, common vole, co-occurrence, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia*, *Heligmosomoides*, *Heligmosomum*, helminths, rodents, yellow necked mouse.

### WSTĘP

Do chwili obecnej zarażenie *Cryptosporidium* spp. jest poważnym problemem epidemiologicznym dla ludzi w wielu krajach świata, a badania nad rezerwuarem nadal rozszerzają listę gatunków żywicielskich (Xiao i wsp. 2000). Zarażenia *Giardia* spp. są uznawane za najczęstszą spośród inwazji pierwotniakami jelitowymi u ludzi. Badania kilku populacji gryzoni prowadzone w Zakładzie Parazytologii UW dowiodły, że odsetek zarażeń w tej grupie jest wysoki (40-80%), a występujące genotypy *C. parvum* mogą stanowić realne zagrożenie dla zdrowia ludzi (Siński i wsp. 1998; Bajer i wsp. 2002, 2003). Zastosowanie specyficznych gatunkowo sond potwierdziło występowanie u gryzoni *Giardia intestinalis*, gatunku inwazyjnego dla człowieka (Bednarska i wsp. 2003). W trakcie wieloletnich badań gryzoni Pojezierza Mazurskiego zostały określone niektóre czynniki wpływające na dyna-

mikę inwazji pierwotniaczych (Bajer i wsp. 2002). Wykazano, że większość zarażeń tym pierwotniakiem ma charakter chroniczny, co prowadzi do długotrwałego skażenia środowiska formami dyspersyjnymi pasożytów (Bajer i wsp. 2001). Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu obecności helmintofauny – nicieni i tasiemców – na utrzymywanie się obecności *C. parvum* i *Giardia* spp. u gryzoni.

#### MATERIAŁ I METODY

Gryzonie odławiano na terenie Mazurskiego Parku Krajobrazowego (MPK) w pobliżu Bazy Terenowej Instytutu Zoologii UW w Urwitałcie k/Mikołajek: (1) w latach 1998-2000 wiosną i jesienią w mieszanym lesie i na ugorze na północnym brzegu J. Śniardwy, (2) w roku 1999 w czasie 3 tygodni (przełom sierpnia i września) na trzech powierzchniach leśnych (okolice Urwitałtu, Tałt, Pizsu). Miejsca odłowów i metodykę badań, np. określanie wieku gryzoni, identyfikację helmintów, opisano poprzednio (Bajer i wsp. 2001, Behnke i wsp. 2001, Barnard i wsp. 2002).

Sporządzano po 2 rozmazy kałowe z kału zbieranego z pułapek, resztę kału przechowywano w 2,5% roztworze dwuchromianu potasu. Rozmazy barwiono zmodyfikowaną metodą Ziehl-Neelsena (Henriksen i Pohlenz 1981). Jako metodę referencyjną do oznaczenia *C. parvum* i *Giardia* spp. stosowano test immunofluorescencyjny MerIFluor *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Diagnostics Inc., Cincinnati, Ohio, USA) na próbkach zagęszczonych wg Bajer i wsp. (2001).

Współwystępowanie helmintów oraz pierwotniaków analizowano przy użyciu technik najwyższej wiarygodności korzystając z analizy log-liniowej tablic kotyngencji w programie Statgraphics Version 7. Eliminację zależności w modelu i testowanie dopasowania modelu przeprowadzono według metodyki opisanej poprzednio (Bajer i wsp. 2002). Analizę przeprowadzono oddzielnie dla danych z 2 lub 3 lat z jednego miejsca odłowów (Urwitałt) oraz dla danych z roku 1999 dla *C. glareolus* odławianych z trzech powierzchni badawczych.

#### WYNIKI I DYSKUSJA

Ogółem w latach 1998-99 przeprowadzono 178 sekcji *Microtus arvalis* i 85 sekcji *Apodemus flavicollis*, natomiast w latach 1998-2000 wykonano 249 sekcji *Clethrionomys glareolus* z okolic Urwitałtu (w tym 124 samice i 125 samców) oraz 137 sekcji nornic z trzech powierzchni w roku 1999 (68 samic i 71 samców). Spis gatunków helmintów stwierdzonych u myszy leśnej i nornika zwyczajnego zawiera praca Bajer (2002), natomiast pasożyty nornicy rudej przedstawia Tabela 1. Ze względu na specyficzny skład gatunkowy zgrupowań helmintów i różną prewalencję pierwotniaków jelitowych, analizy współwystępowania przeprowadzono oddzielnie dla każdego z gatunków gryzoni i oddzielnie dla poszczególnych grup pa-

sożyków, tj. nicieni z rodziny Heligmosomoididae, nicieni łącznie, dorosłych tasiemców łącznie oraz helmintów łącznie.

### Nornica ruda *Clethrionomys glareolus*

#### I. Porównanie trzech powierzchni badawczych

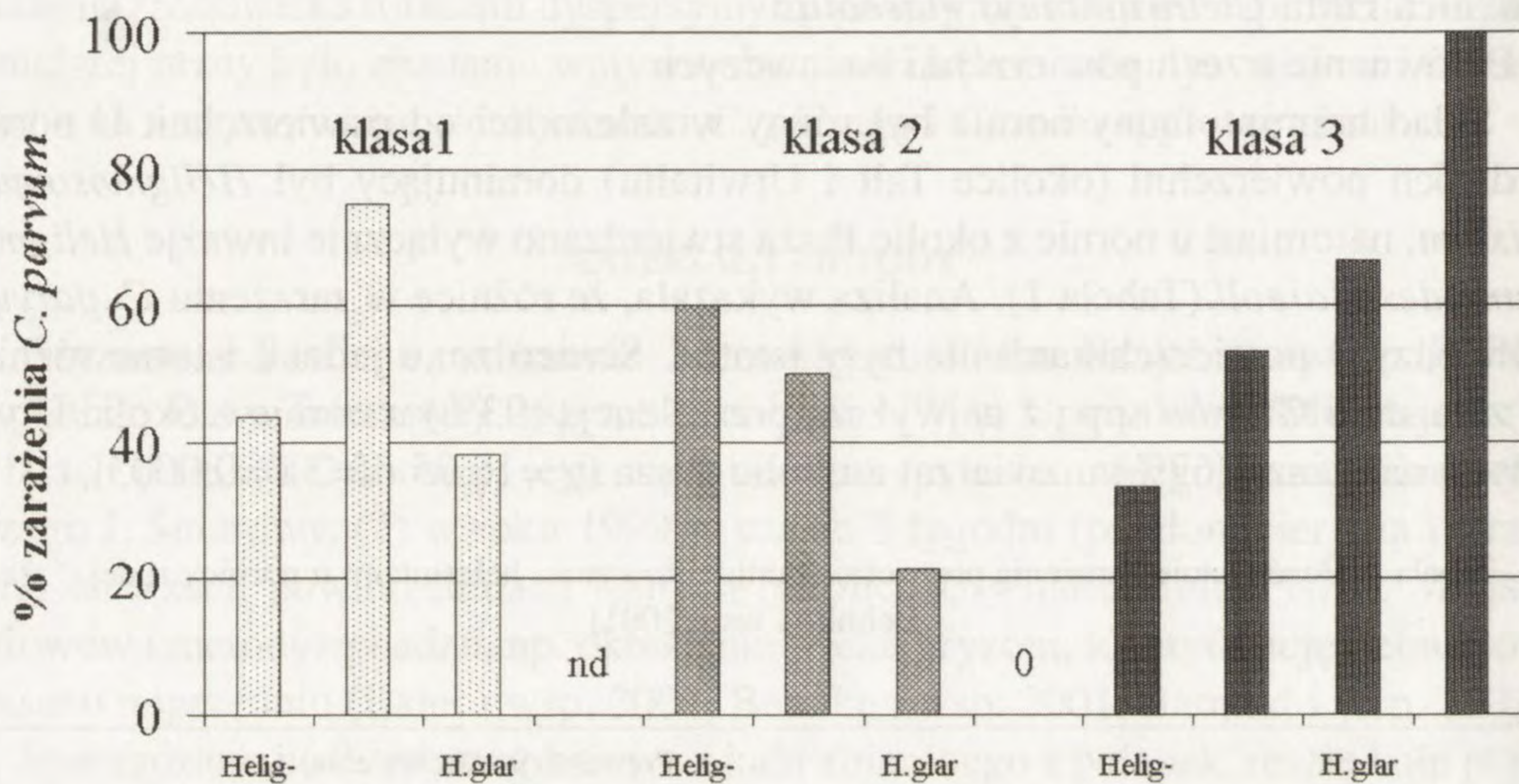
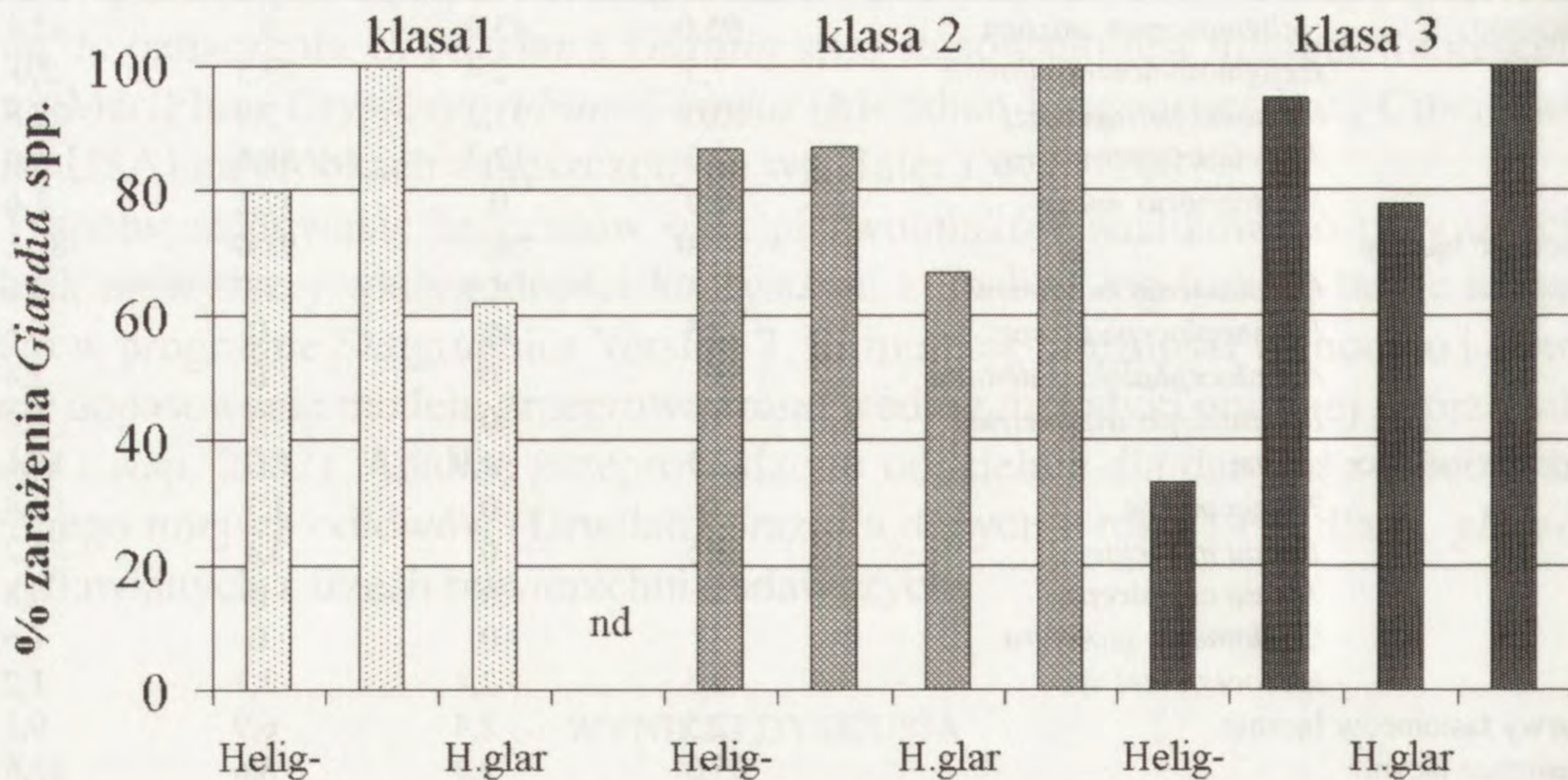
Skład helmintofauny nornic był różny w zależności od powierzchni. U nornic z dwóch powierzchni (okolice Tałt i Urwitałtu) dominujący był *Heligmosomum mixtum*, natomiast u nornic z okolic Pizsa stwierdzano wyłącznie inwazje *Heligmosomoides glareoli* (Tabela 1). Analiza wykazała, że różnice w zarażeniu *C. parvum* pomiędzy 3 powierzchniami nie były istotne. Stwierdzono jednak istotne różnice w zarażeniu *Giardia* spp., z najwyższą prewalencją (93%) u nornic z okolic Urwitałtu a najniższą (67%) u zwierząt z okolic Pizsa ( $\chi^2=16,05$  df=2 P=0,0003).

Tabela 1. Porównanie zarażenia pierwotniakami jelitowymi i helmintami u nornicy rudej (\* za Behnke i wsp. 2001)

Grupa	Gatunek	Siedlisko Rok badań	Prewalencja (% zarażenia)			
			Urwitałt* 1999	Tały* 1999	Pisz* 1999	Urwitałt 1998-2000
Nicienie	<i>Heligmosomum mixtum</i>		95,0	43,9	9	82,4
	<i>Heligmosomoides glareoli</i>		7,5	2,4	79,3	2,0
	<i>Syphacia petruszewiczi</i>		10,0	31,7	3,4	28,8
	<i>Aspicularis tetraptera</i>		2,5	12,2	58,6	4,4
	<i>Mastophorus muris</i>		10,0	0	17,2	1,6
Nicienie łącznie			95,0	68,3	91,4	87,6
Tasiemce	<i>Catenotaenia henttoneni</i>		20,0	4,9	1,7	9,6
	<i>Paranoplocephala</i> spp.		2,5	0	0	5,6
	<i>Anoplocephaloides dentata</i>		0	0	0	2,4
	<i>Rodentolepis assymetrica</i>		0	0	0	0,4
Dorosłe tasiemce łącznie			22,5	4,9	1,7	16,4
	<i>Taenia martis</i>		0	0	1,7	4,4
	<i>Taenia mustelae</i>		2,5	0	3,4	1,2
	<i>Taenia crassiceps</i>		0	0	0	0,8
	<i>Cladotaenia globifera</i>		0	0	0	1,6
	<i>Mesocestoides</i> sp.		2,5	2,4	1,7	1,2
Larwy tasiemców łącznie			2,5	2,4	6,9	9,2
Tasiemce łącznie			25,0	7,3	8,6	23,6
Przywry	<i>Plagiorchis</i> sp.		0	0	0	0,4
Helminty łącznie			95,0	68,3	91,4	90,0
Pierwotniaki	<i>Cryptosporidium parvum</i>		55,6	53,7	39,3	77,9
	<i>Giardia</i> spp.		92,5	85,0	66,7	78,0
Pierwotniaki łącznie			95,0	87,8	71,9	88,8

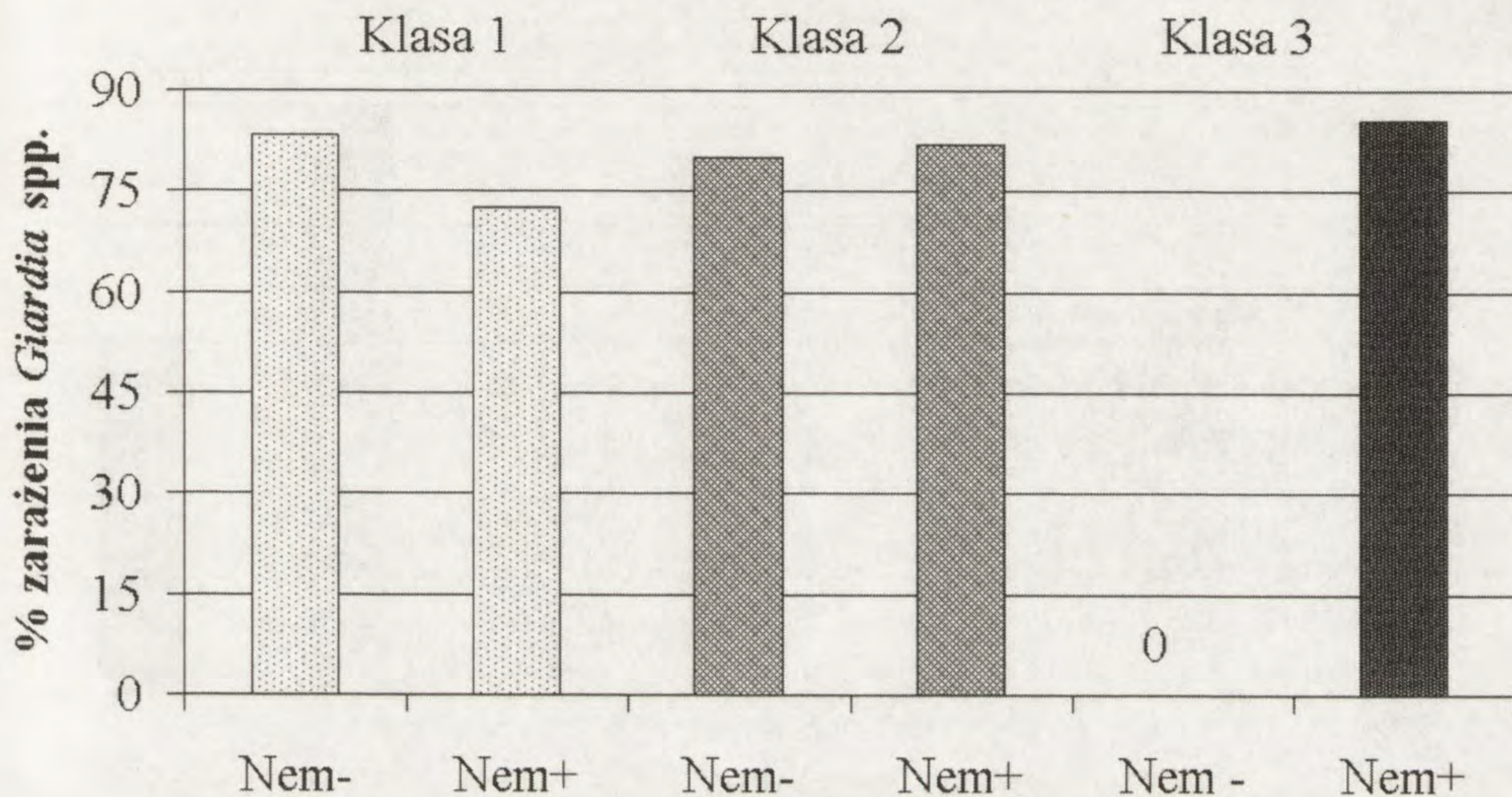
Analiza zależności między zarażeniem różnymi gatunkami nicieni z rodziny Heligmosomoididae a zarażeniem pierwotniakami i wiekiem żywiciela przedstawiona jest na Rys. 1.

Rysunek 1a przedstawia zależność między wiekiem żywiciela a prewalencją *C. parvum* u zwierząt zarażonych nicieniami ( $\chi^2=12,07$  df=6 P=0,0603). W dwóch

a. *Cryptosporidium parvum*b. *Giardia* spp.

Rys. 1. Współwystępowanie pierwotniaków jelitowych i dwóch gatunków Heligmosomoididae w trzech klasach wiekowych nornicy rudej z trzech siedlisk. a. *Cryptosporidium parvum*, b. *Giardia* spp. Helig- – grupa osobników wolnych od nicieni z rodziny Heligmosomoididae; H.mixt – grupa osobników zarażonych *Heligmosomum mixtum*; H.glar – grupa osobników zarażonych *Heligmosomoides glareoli*; H.m+H.g – grupa osobników zarażonych *H. mixtum* i *H. glareoli*; nd – nie stwierdzono takich osobników

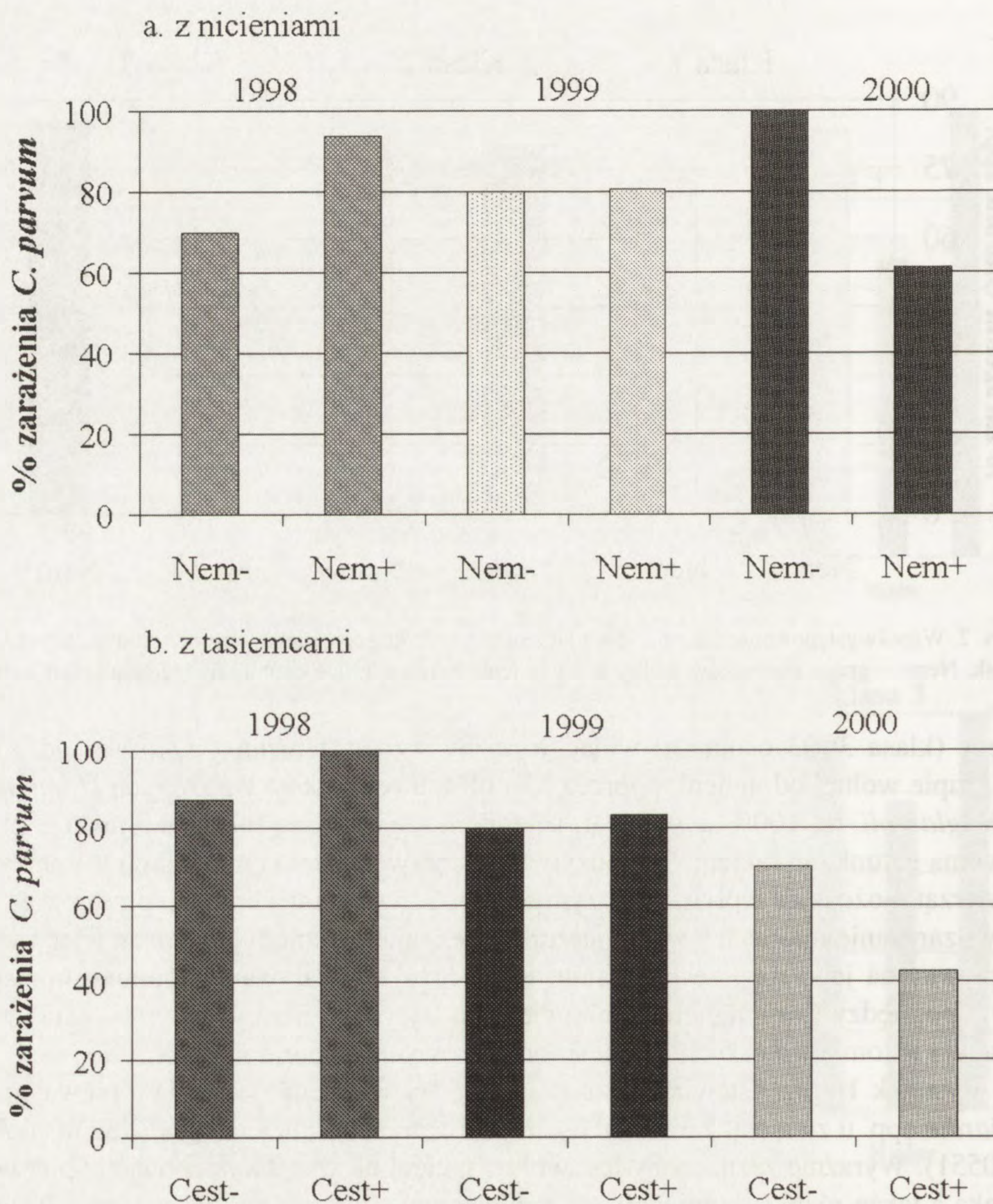
młodszych grupach wiekowych (klasa 1: 36 osobników, klasa 2: 70 osobników) odsetek zarażeń *C. parvum* jest stosunkowo wysoki u osobników wolnych od nicieni, lecz zwraca uwagę wyższy odsetek zarażeń u nornic zarażonych *H. mixtum* w porównaniu do zwierząt zarażonych *H. glareoli*. U zwierząt w wieku powyżej 3 mie-



Rys. 2. Współwystępowanie *Giardia* spp. i nicieni w trzech klasach wieku u nornicy rudej z trzech siedlisk. Nem- – grupa osobników wolnych od nicieni, Nem+ – grupa osobników zarażonych nicieniami.

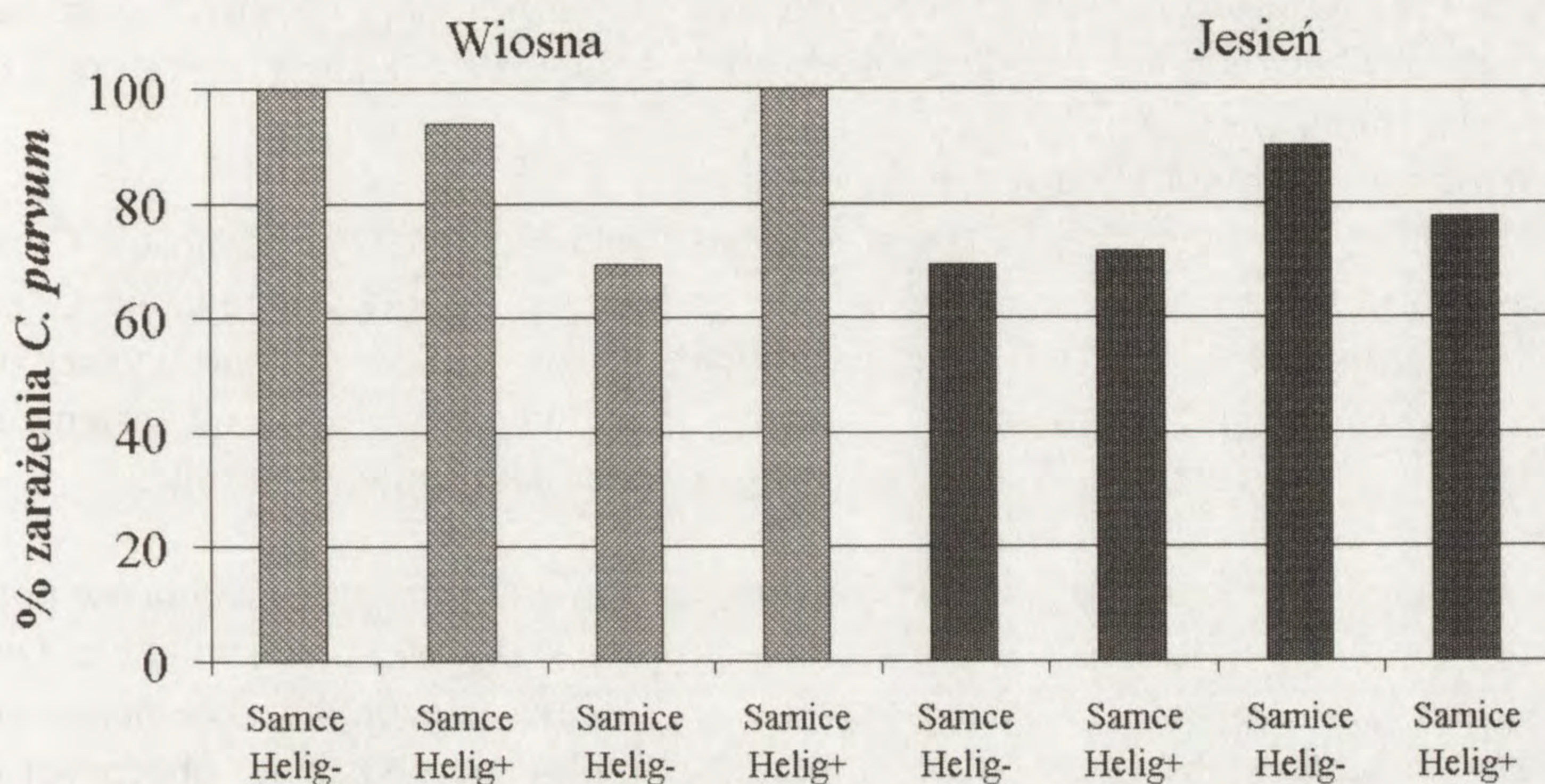
sięcy (klasa 3: 33 osobniki) widać wyraźny wzrost zarażeń *C. parvum* od 33% w grupie wolnej od nicieni, poprzez 53 i 68% u osobników zarażonych *H. mixtum* i *H. glareoli*, do 100% u zwierząt, u których stwierdzono mieszane inwazje obydwoma gatunkami nicieni. Ten pozytywny wpływ zarażenia nicieniami u starszych zwierząt może mieć wpływ na utrzymywanie *C. parvum* w populacji przez okres zimy i zarażanie młodych gryzoni jeszcze przez opuszczeniem gniazda, a więc może wpływać na jego rozprzestrzenienie. Różnice w oddziaływaniu immunosupresyjnym pomiędzy dwoma gatunkami nicieni i pozytywny efekt ich „sumowania” wymagają natomiast dalszych badań środowiskowych i laboratoryjnych.

Rysunek 1b przedstawia zależność pomiędzy wiekiem żywiciela a prewalencją *Giardia* spp. u zwierząt zarażonych różnymi gatunkami nicieni ( $\chi^2=12,32$   $df=6$   $P=0,0551$ ). Wyraźnie zaznaczony jest wpływ nicieni na współwystępowanie pierwotniaka a także różnice pomiędzy oddziaływaniem supresyjnym *H. mixtum* i *H. glareoli*. Najwyższe odsetki zarażeń *Giardia*, niezależnie od różnic pomiędzy klasami wiekowymi, stwierdzano u osobników zarażonych *H. mixtum* lub mieszaną inwazją *H. mixtum* i *H. glareoli* (100%). Wśród zwierząt najstarszych znacznie wyższy odsetek zarażeń *Giardia* wykazano u zwierząt jednocześnie zarażonych nicieniami w porównaniu do wolnych od nicieni. Podobną zależność dla *Giardia* spp., z udziałem wieku żywiciela, otrzymano dla zarażeń Heligmosomoididae łącznie ( $\chi^2=8,64$   $df=2$   $P=0,0133$ ). Prewalencja *Giardia* spp. w dwóch młodszych klasach wieku jest nieco wyższa u zwierząt wolnych od nicieni (80% versus 73,3% i 86,7% versus 80%), w najstarszej klasie wieku prawie trzykrotnie wyższy odsetek zarażeń stwier-



Rys. 3 Współwystępowanie *Cryptosporidium parvum* i helmintów u nornicy rudej w czasie trzech lat badań. a. z nicieniami, b. z tasiemcami. Cest- – grupa osobników wolnych od tasiemców, Cest+ – grupa osobników zarażonych tasiemcami; pozostałe jak na Rys. 2

dzono u nornic zarażonych Heligmosomoididae (90,3% versus 33,3%). Taką samą zależność wykazano także dla zarażeń *Giardia* spp. i nicieniami łącznie (Rys. 2;  $\chi^2=8,38$   $df=2$   $P=0,0151$ ), przy czym w najstarszej grupie wiekowej wszystkie zarażenia *Giardia* występowały u zwierząt zarażonych nicieniami. Wykazana zależność, odmienna dla różnych klas wiekowych, spowodowana jest różnym wpływem wie-



Rys. 4. Współwystępowanie *Cryptosporidium parvum* i nicieni u nornicy rudej w zależności od płci żywiciela i sezonu badań. Objasnienia jak na Rys. 1.

ku żywiciela na zarażenie pasożytami – pozytywnym dla nicieni (dla których prevalencja i intensywność inwazji rosną wraz z wiekiem żywiciela, który w trakcie życia napotyka nowe stadia inwazyjne) a negatywnym dla pierwotniaków (na których inwazje są szczególnie podatne osobniki młode, więc zarówno prevalencja jak i intensywność inwazji maleją z wiekiem żywiciela). Stąd w najmłodszej klasie wieku wyższy odsetek zarażeń *Giardia* występuje u zwierząt wolnych od nicieni, w klasie średniej – zarażenie jest porównywalne wśród zwierząt z nicieniami i bez nich, natomiast wśród najstarszych nornic widać pozytywną zależność pomiędzy pasożytami.

## II. Trzyletnie badania populacji z okolic Urwitałtu

Dla *C. parvum* w czasie analizy kilku modeli (*C. parvum* i Heligmosomoididae; *C. parvum* i nicienie) pojawiły się zależności pomiędzy współwystępowaniem pasożytów a sezonem lub rokiem badań (Rys. 3a, 4). Na Rys. 3a pozytywny wpływ zarażenia nicieniami na pierwotniaka widać w roku 1998, w 1999 brak różnic, natomiast w roku 2000 wyższy odsetek zarażeń *C. parvum* wykazano u nornic wolnych od nicieni. Podobnie przedstawia się obraz współwystępowania zarażeń *C. parvum* i inwazji tasiemców w czasie trzech lat badań (Rys. 3b).

W zależność z udziałem sezonu badań włączona była też płeć żywiciela (Rys. 4); pozytywny wpływ koinwazji nicieniami z rodziny Heligmosomoididae na zarażenie *C. parvum* stwierdzano w sezonie wiosennym u samic, natomiast jesienią więcej zarażeń pierwotniakiem wykazano u samic wolnych od Heligmosomoididae. U samców wiosną zarażenie *C. parvum* było bardzo wysokie, niezależnie od obecności lub braku Heligmosomoididae, a jesienią dużo niższe i niemal identyczne w obu grupach.

W modelach testujących współwystępowanie *Giardia* spp. i różnych grup helminatów stwierdzono jedynie skomplikowane zależności z udziałem wieku i płci żywiciela, trudne do jednoznacznej interpretacji.

#### **Nornik zwyczajny *Microtus arvalis***

Dla nornika zwyczajnego nie stwierdzono zależności między obecnością *C. parvum* a zarażeniem nicieniami. W modelu testującym współwystępowanie *C. parvum* i tasiemców otrzymano jedną negatywną zależność. Stwierdzono wyższy odsetek zwierząt zarażonych pierwotniakiem u osobników wolnych od tasiemców (81,8% w porównaniu do 70,9%), zarówno u samic jak i samców nornika.

#### **Mysz leśna *Apodemus flavicollis***

Jedynie w modelu testującym współwystępowanie *C. parvum* i tasiemców pojawiła się jedna kombinacja zawierająca obie grupy pasożytów i płeć żywiciela. Dwa razy więcej zarażeń *C. parvum* wystąpiło u samców zarażonych tasiemcami niż w grupie samców wolnych od tasiemców. Natomiast nie wykazano obecności *C. parvum* wśród samic zarażonych tasiemcami, podczas gdy pierwotniak ten występował u 18,5% samic wolnych od tasiemców.

Z przedstawionych badań wynika, że u gryzoni naturalne zarażenia helmintami mogą oddziaływać na zarażenia pierwotniakami jelitowymi. Kierunek tych oddziaływań zależy także od innych czynników, np. wieku i płci żywiciela, roku i sezonu badań. Największą rolę odgrywa wiek żywiciela – pozytywny wpływ koinfekcji można obserwować wśród zwierząt starszych niż 3 miesiące, u których zarażenie helmintami (zwłaszcza nicieniami) może być przyczyną chronicznych inwazji pierwotniaków, prowadzących do znacznego skażenia środowiska formami dyspersyjnymi – cystami i oocystami.

Badania były finansowane z grantów KBN nr. 6PO4C09721 i 3PO4C10225, oraz częściowo z grantu YSP BC-KBN nr. WAW/342/06.

#### LITERATURA

- Behnke J.M., Barnard C.J., Bajer A., Bray D., Dinmore J., Frake K., Osmond J., Race T., Siński E. 2001. Variation in the helminth community structure in bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from three comparable localities in the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology* 123: 401-414.
- Bajer A. 2002. Gryzonie różnych siedlisk jako źródło zarażeń *Cryptosporidium*: biologiczna i molekularna charakterystyka izolatów. Praca doktorska, Warszawa 2002.
- Bajer A., Bednarska M., Siński E. 2001. Środowiskowe uwarunkowania zarażeń *Cryptosporidium parvum* w populacjach drobnych gryzoni. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 747-753.
- Bajer A., Bednarska M., Pawełczyk A., Behnke J.M., Gilbert F.S., Siński E. 2002. Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology* 125: 21-34.
- Bajer A., Caccio S., Bednarska M., Behnke J.M., Pieniazek N.J., Siński E. 2003. Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *Journal of Parasitology* 89: 1053-55.



- Barnard C.J., Behnke J.M., Bajer A., Bray D., Race T., Frake K., Osmond J., Dinmore J., Siński E. 2002. Local variation in parasite burdens of bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from ecologically similar sites: morphological and anatomical correlations. *Journal of Helminthology* 76: 103-112.
- Bednarska M., Bajer A., Kuliś K., Siński E., Graczyk T.K. 2003. Analiza żywotności oocyst *Cryptosporidium parvum* i cyst *Giardia* spp. u wybranych gatunków żywicieli. Materiały konferencji „Molekularna epidemiologia i diagnostyka pasożytów”, Poznań, 24 października 2003: 3-4.
- Henricksen S., Pohlenz J. 1981. Staining of cryptosporidia by modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica* 22: 594-596.
- Siński E., Bednarska M., Bajer A. 1998. The role of wild rodents in ecology of cryptosporidiosis in Poland. *Folia Parasitologica* 45: 169-170.
- Xiao L., Morgan U.M., Fayer R., Thompson R.C., Lal A.A. 2000. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitology Today* 16: 287-292.

Zaakceptowano do druku 14 czerwca 2004