

Występowanie *Giardia intestinalis* u psów domowych w Warszawie

Prevalence of *Giardia intestinalis* in domestic dogs in Warsaw

Wojciech Zygner, Dorota Jaros, Marta Skowrońska, Marta Bogdanowicz-Kamirska i Halina Wędrychowicz

Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Adres do korespondencji: Wojciech Zygner, wojciechzygner@o2.pl; Tel. (022) 59 360 46

ABSTRACT. Introduction. *Giardia intestinalis* is the most common intestinal protozoan parasite, which infects humans, dogs and other mammals throughout the world. So far eight genotypes of the parasite have been described of which four were found in dogs. Assemblages A-I and B infect either dogs or humans. Assemblages C and D occur only in dogs. The aim of the study was to determine the prevalence and genotypes of *G. intestinalis* in domestic dogs of Warsaw area. **Material and methods.** From October 2005 to March 2006 fecal samples were collected from 350 dogs and examined using light microscopy and PCR techniques. **Results.** 5.14% of dogs was found to be positive for *G. intestinalis* by microscopy and prevalence of 9.14% was found by PCR. The PCR amplicons were sequenced and the DNA sequences were compared with *Giardia* sequences in GeneBank database. The analysis revealed assemblage A-I in 1.71% of dogs, assemblage C in 1.14% and assemblage D in 6.28% of dogs in Warsaw. According to literature, the genotype A can infect humans however a role of dogs as a reservoir of human giardiasis in Poland is not known.

Key words: dogs, *Giardia intestinalis* genotype, PCR, prevalence, zoonosis.

Wstęp

Giardioza psów powodowana jest przez pierwotniaka *Giardia intestinalis*, należącego do rzędu Diplomonadida, podtypu Flagellata (syn. Mastigophora), typu Sarcomastigophora [1, 2]. Pasożyt ten, nazywany również *G. duodenalis* lub *G. lamblia*, odkryty został w 1681 roku przez Antoniego van Leeuwenhoeka, a dokładnie opisany w 1859 roku przez Vilema Lambła [3]. Prowadzone od wielu lat badania biochemiczne i molekularne wykazały, że *G. intestinalis* pasożytuje nie tylko u ludzi, ale również u psów, kotów, bydła i wielu innych gatunków ssaków. Badania prowadzone przy użyciu technik biochemicznych i molekularnych wykazały bardzo duże zróżnicowanie molekularne w obrębie gatunku *Giardia intestinalis*. Jednakże próby klasyfikacji na podstawie budowy antygenów powierzchniowych

trofozoitów [4] lub sekwencji genów kodujących dehydrogenazę glutamylową, czy RNA małej podjednostki rybosomów [5, 6] wykazały występowanie kilku genotypów w obrębie gatunku *G. intestinalis*.

U psów występują genotypy: A-I, określane jako szczep polski, genotyp B, określane jako szczep belgijski oraz genotypy C i D [4]. Znaczenie giardiozy psów jako potencjalnej zoonozy nie jest do końca wyjaśnione. Genotypy A-I i B występują również u ludzi [4]; udało się również eksperymentalnie zarażenie psa cystami pochodzącymi z kału chorego człowieka [5], jednak badania porównawcze sekwencji genu małej podjednostki rybosomu szczepów uzyskanych od psów i ludzi sugerują niskie zagrożenie dla człowieka inwazją genotypów *G. intestinalis* występujących u psów [6]. Szczep polski stwierdzany był również u bydła, owiec, ko-

ni, świń, kotów, bobrów i lemurów. Szczep belgijski występuje także u bobrów, świnek morskich i małp [4].

Giardioza psów, podobnie jak i u ludzi, jest jedną z częstszych chorób pasożytniczych przewodu pokarmowego [5, 7-10]. Objawia się wodnistą biegunką, brakiem apetytu oraz utratą masy ciała. Nie stwierdza się w kale krwi ani śluzu. Choroba może występować w postaci ostrej lub przewlekłej. U wielu ludzi i zwierząt przebieg giardiozy może być bezobjawowy [5, 11]. Przewlekła bądź bezobjawowa giardioza może trwać nawet kilka lat, a przewlekłe zarażeni i bezobjawowi żywicieli stanowią w tym czasie rezerwar inwazji [5]. Zarażenie następuje drogą pokarmową, z wodą pitną, pokarmem bądź bezpośrednio od zarażonego osobnika w środowisku o niskim standardzie higienicznym [10]. Cysty *G. intestinalis* stwierdzane były w wodzie morskiej, słodkiej oraz w kranach w wodzie pitnej [12-15].

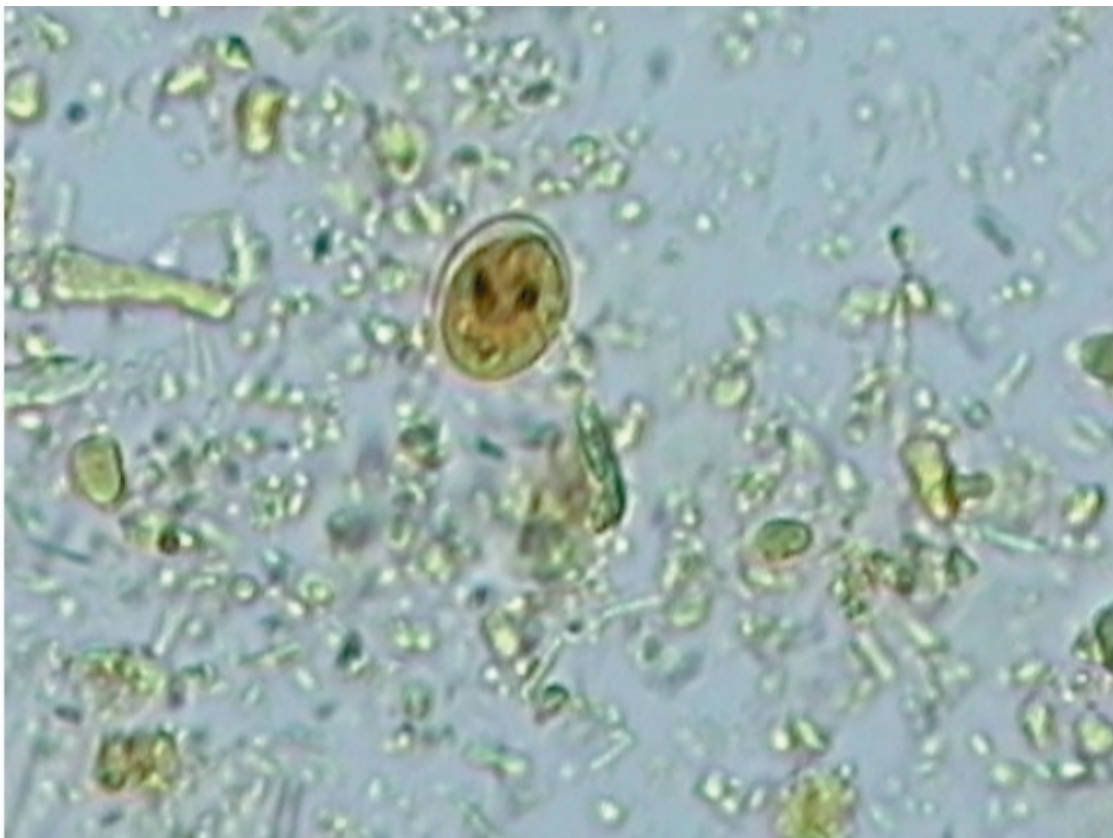
Mimo przypuszczalnie niskiego potencjału zoonotycznego giardiozy psów, autorzy pracy podjęli próbę określenia ekstensywności inwazji *G. intestinalis* u psów domowych na terenie Warszawy oraz genotypowania.

Material i metody

Materiał do badań stanowiły próbki kału psów dostarczone do dwóch warszawskich laboratoriów weterynaryjnych w celu potwierdzenia lub wykluczenia inwazji pasożytów jelitowych. Od października 2005 roku do marca 2006 roku zgromadzono 350 próbek kału psów.

Wykonano badania mikroskopowe rozmazów bezpośrednich wszystkich zebranych próbek barwionych płynem Lugola przy użyciu mikroskopu (Nikon Eclipse TE200). Badane rozmazy obserwowano pod powiększeniem 400 razy.

Ze wszystkich prób kału wyizolowano całkowity DNA używając zestawu do izolacji DNA firmy Qiagen (QIAamp DNA Stool Mini Kit). Uzyskane produkty stanowiły matryce w reakcji PCR. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 50 μ l wchodziły: startery (GDH1 1 μ l o stężeniu 10 μ M i GDH4 1 μ l o stężeniu 10 μ M lub GDHF3 1 μ l o stężeniu 10 μ M i GDHB5 1 μ l o stężeniu 10 μ M), bufor do polimerazy 5 μ l 10 razy stężony, $MgCl_2$ 2 μ l o stężeniu 25 mM, dNTPs 1 μ l o stężeniu 10 mM, *Taq* DNA Polymerase LC (firmy Fermentas) 1 μ l o stężeniu 1u/1 μ l oraz uzyskana matry-



Rys. 1. Cysta *Giardia intestinalis* w mikroskopie świetlnym (400 X).

Fig. 1. *Giardia intestinalis* cyst under a light microscope (400 X).

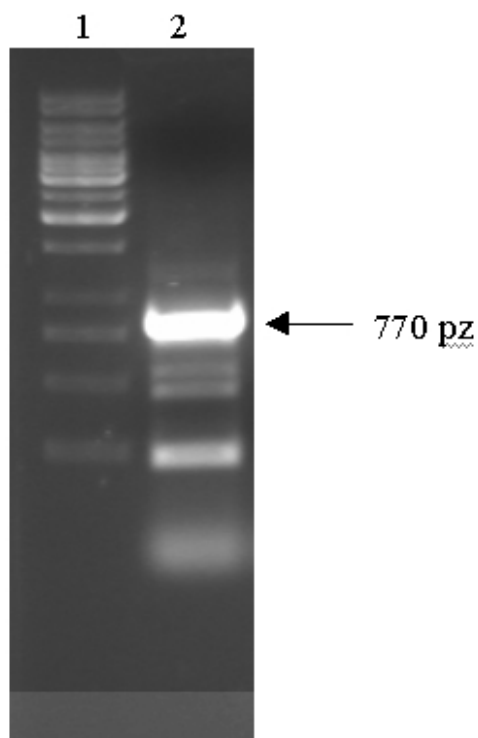
ca. Reakcja oparta była na starterach o następujących sekwencjach nukleotydów: GDH1 5'ATC TTC GAG AGG ATG CTT GAG 3' i GDH4 5'AGT ACG CGA CGC TGG GAT ACT 3' lub GDHF3 5' TCC ACC CCT CTG TCA ACC TTT C 3' i GDHB5 5' AAT GTC GCC AGC AGG AAC G 3' [16]. W łańcuchowej reakcji polimerazy denaturację wstępną (94°C) prowadzono przez 3 minuty. Następnie DNA namnażano w 35 cyklach składających się z następujących etapów: denaturacja DNA w 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w 52°C przez 30 sekund, wydłużanie starterów w 72°C przez 45 sekund. Po 35 cyklach przeprowadzono końcowe wydłużanie starterów w 72°C przez 10 minut. Uzyskane produkty reakcji zostały uwidocznione przy użyciu elektroforezy w żelu agarozowym o stężeniu 1% z dodatkiem bromku etydyny.

Uzyskane produkty PCR zostały poddane sekwencjonowaniu w Zakładzie Biologii Molekularnej Centrum Onkologii w Warszawie przy zastosowaniu oprogramowania GeneScan (r) Analysis So-

ftware. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono genotypowanie.

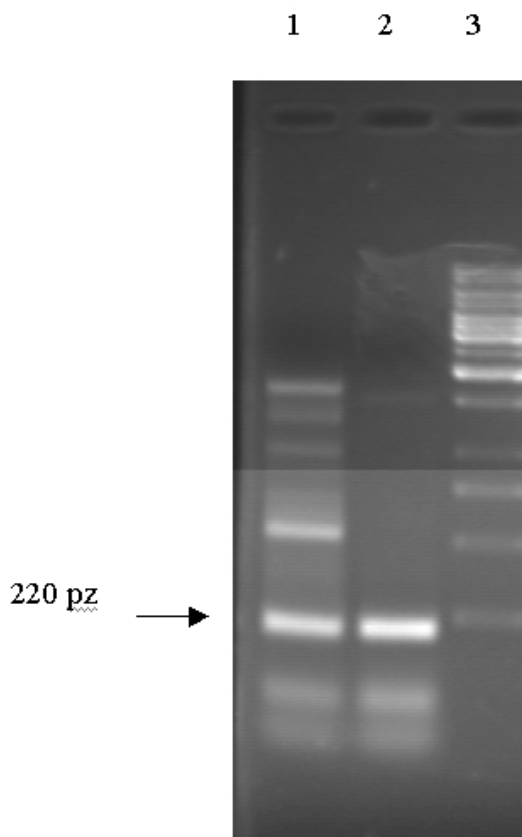
Wyniki

W badaniach mikroskopowych stwierdzono występowanie cyst *G. intestinalis* (Rys. 1) w 18 próbkach kału, co stanowi 5,14%. W badaniu metodą PCR wykryto DNA *G. intestinalis* genotypu D w 25 badanych próbkach (6,28%), genotypu A-I w 6 badanych próbkach (1,71%) oraz genotypu C w 4 badanych próbkach (1,14%). Uzyskano produkty o długości 770 par zasad (Rys. 2) oraz 220 par zasad (Rys. 3). Porównanie uzyskanych sekwencji produktów PCR z dostępnymi danymi w GeneBank potwierdziło uzyskane wyniki. Wszystkie produkty PCR były homologiczne do sekwencji charakterystycznej dla genotypu A, C lub D.



Rys. 2. Obraz elektroforetyczny produktu PCR uzyskanego przy zastosowaniu starterów GDH1 i GDH4 na całkowitym DNA wyizolowanym z kału — ścieżka 2; ścieżka 1 — marker 1 kb (Fermentas).

Fig. 2. Gel electrophoresis of PCR product obtained with GDH1 and GDH4 primers on total DNA isolated from feces as template-lane 2, lane 1-1 kb ladder (Fermentas)



Rys. 3. Obraz elektroforetyczny produktu PCR uzyskanego przy zastosowaniu starterów GDHF3 i GDHB5 na całkowitym DNA wyizolowanym z kału — ścieżki 1, 2; ścieżka 3 — marker 1 kb

Fig. 3. Gel electrophoresis of PCR product obtained with GDHF3 and GDHB5 primers on total DNA isolated from feces as template-lanes 2 and 3, lane 1-1 kb ladder

Dyskusja

Uzyskane wyniki pokazują, iż pierwotniak *G. intestinalis* pasożytujący u psów domowych w Warszawie należy do genotypu A, C bądź genotypu D. W wyniku podobnych badań przeprowadzonych w Japonii stwierdzono występowanie u psów genotypów A, C i D [16, 17], natomiast w Indiach A i B [18, 19]. Jednak w Indiach stwierdzono również nietypowe występowanie u psów genotypu A-II [19], uważanego za typowy dla inwazji u człowieka [4]. Genotyp ten również stwierdzony został u psów domowych w Meksyku [20], co wskazuje, iż genotyp A-II należy również postrzegać jako występujący u psów. U ludzi dominującym genotypem jest B, stwierdzany jest on 2 razy częściej niż drugi najczęściej występujący u ludzi genotyp A-II. Zależność tę zaobserwowano w Wielkiej Brytanii, Indiach oraz Australii [10].

Fakt stwierdzenia w populacji warszawskich psów genotypu A-I u niewielkiego procenta zarażonych psów pozwala przypuszczać, iż zarażone osobniki stanowią w nieznacznym stopniu zagrożenie dla zdrowia ludzkiego. Podobną hipotezę wysunęli Hopkins i wsp. [6]. Ponadto uważa się, iż genotypy C i D stwierdzone u większości warszawskich psów, nie są zdolne do zarażenia ludzi [21]. Obecnie wiadomo, że giardioza psów jest zoonozą, nie określono jednak jaki stanowi potencjał zoonotyczny. Przypuszczalnie ryzyko zarażenia ludzi wzrasta wraz z pogorszeniem warunków higienicznych i zależy również od relacji, w jakich pozostaje człowiek z psem [10].

Giardioza u psów występuje na całym świecie, a ekstensywność inwazji w poszczególnych rejonach waha się od 1,6 do 53% [21]. We Włoszech stwierdzono występowanie *Giardia* spp. u 21,3% badanych psów [22], w Kanadzie u 7,2% [23], w Brazylii u 12,2% [24], w Indiach u 20% [19], w Australii u 22,1% [8], a w Niemczech u 16,6% [9]. Różnice w ekstensywności występowania tego pierwotniaka wynikają zarówno z lokalizacji i odmiennych warunków higienicznych w danym rejonie, jak i z zastosowania różnych metod badawczych (bezpośrednie badanie mikroskopowe, test ELISA oraz PCR). Uzyskane w prezentowanych badaniach wyniki najbardziej zbliżone są pod względem ekstensywności inwazji do wyników Jacobsa i wsp. [23], natomiast pod względem potencjału zoonotycznego do przedstawionych przez Hopkinsa i wsp. [6]. Różnice między wynikami uzyskanymi z badań mikroskopowych oraz badań metodą PCR

występują ze względu na większą czułość badania techniką PCR. Traub i wsp. [18] w badaniach mikroskopowych stwierdzili ekstensywność inwazji wynoszącą 3%, natomiast w badaniu techniką PCR uzyskali wyniki dodatnie u 20% zbadanych psów. Prawdopodobnie na występowanie inwazji *G. intestinalis* ma również wpływ pora roku, co zaobserwowali w swoich badaniach Oliveira-Sequeira i wsp. [24]. Stwierdzili oni, iż najwięcej zarażeń psów występowało w Brazylii od sierpnia do stycznia.

Rola psów w przenoszeniu giardiozy nie została ostatecznie określona. Ze względu na potencjalne ryzyko zarażenia człowieka, należy przyjąć, iż pies zarażony *G. intestinalis* stanowi zagrożenie dla zdrowia ludzi jako rezerwuuar inwazji. W związku z tym wydaje się istotnym zwalczanie giardiozy w populacji psów. Obecnie choroba zwalczana jest u psów w Stanach Zjednoczonych nie tylko poprzez leczenie, ale również przez wprowadzenie komercyjnych szczepionek przeciwko *G. intestinalis* dla psów i kotów [25].

Literatura

- [1] Mehlhorn H. (Ed.) 2001. Encyclopedic Reference of Parasitology, Biology, Structure, Function. Springer. 2nd edition. Berlin Heidelberg.
- [2] Willard M.D. 2005. Digestive System Disorders. In: Manual of small animal internal medicine (Nelson R.W., Couto C.G.). Elsevier Mosby. 2nd edition. St. Louis, Missouri: 213–306.
- [3] Cox F.E.G. 2002. History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 595–612.
- [4] Adam R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 447–475.
- [5] Wolfe M.S. 1992. Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 5: 93–100.
- [6] Hopkins R.M., Meloni B.P., Groth D.M., Wetherall J.D., Reynoldson J.A., Thompson R.C. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *Journal of Parasitology* 83: 44–51.
- [7] Schabowski J., Skrzydło-Radomańska B., Daniluk J. 1993. Parazytozy przewodu pokarmowego u pacjentów Kliniki Gastroenterologii Akademii Medycznej i Oddziału Klinicznego Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie w latach 1981–1990. *Wiadomości Parazytologiczne* 39: 373–381.
- [8] Bugg R.J., Robertson I.D., Elliot A.D., Thompson R.C.A. 1999. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. *Veterinary Journal* 157: 295–301.

- [9] Barutzki D., Schaper R. 2003. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999-2002. *Parasitology Research* 90: 148–150.
- [10] Thompson R.C.A. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology* 126: 15–35.
- [11] Gundlach J.L., Sadzikowski A.B. 2004. Parazytologia i parazytozy zwierząt. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa.
- [12] Wallis P.M., Erlandsen S.L., Isaac-Renton J.L., Olson M.E., Robertson W.J., van Keulen H. 1996. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolated from drinking water in Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2789–2797.
- [13] Hashimoto A., Kunikane S., Hirata T. 2002. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. *Water Research* 36: 519–526.
- [14] Ho B.S.W., Tam T.Y. 1998. Occurrences of *Giardia* cysts in Beach Water. *Water Science and Technology* 38: 73–76.
- [15] Fayer R., Dubey J.P., Lindsay D.S. 2004. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitology* 20: 531–536.
- [16] Abe N., Kimata I., Iseki M. 2003. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. *Journal of Veterinary Medical Science* 65: 29–33.
- [17] Itagaki T., Kinoshita S., Aoki M., Itoh N., Saeki H., Sato N., Uetsuki J., Izumiyama S., Yagita K., Endo T. 2005. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Veterinary Parasitology* 133: 283–287.
- [18] Traub R.J., Robertson I.D., Irwin P., Mencke N., Monis P., Thompson R.C.A. 2003. Humans, dogs and parasitic zoonoses — unravelling the relationships in a remote endemic community in Northeast India using molecular tools. *Parasitology Research* 90: 156–157.
- [19] Traub R.J., Robertson I.D., Irwin P., Mencke N., Thompson R.C.A. 2005. Canine gastrointestinal parasitic zoonoses in India. *Trends in Parasitology* 21: 42–48.
- [20] Ponce-Macotela M., Martinez-Gordillo M.N., Bermudez-Cruz R.M., Salazar-Schettino P.M., Ortega-Pierres G., Ey P.L. 2002. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *International Journal for Parasitology* 32: 1201–1202.
- [21] Monis P.T., Thompson R.C.A. 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infection, Genetics and Evolution* 3: 233–244.
- [22] Capelli G., Paoletti B., Iorio R., Frangipane di Regalbono A., Pietrobelli M., Bianciardi P., Giangaspero A. 2003. Prevalence of *Giardia* spp. in dogs and humans in Northern and Central Italy. *Parasitology Research* 90: 154–155.
- [23] Jacobs S.R., Forrester C.P., Yang J. 2001. A survey of the prevalence of *Giardia* in dogs presented to Canadian veterinary practices. *The Canadian Veterinary Journal* 42: 45–46.
- [24] Oliveira-Sequeira T.C.G., Amarante A.F.T., Ferrari T.B., Nunes L.C. 2002. Prevalence of intestinal parasites in dogs from Sao Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 103: 19–27.
- [25] Olson M.E., Ceri H., Morck D.W. 2000. *Giardia* Vaccination. *Parasitology Today* 16: 213–217.

Wpłynęło 10 lipca 2006

Zaakceptowano 24 lipca 2006