

Doktoraty

Występowanie gatunków i genotypów *Giardia* u ludzi i zwierząt w Wielkopolsce

Occurrence of *Giardia* species and genotypes in humans and animals in Wielkopolska region, Poland

Piotr Solarczyk

Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i obroniona 10 czerwca 2009 r.

Promotor: Prof. dr hab. Anna C. Majewska
Recenzenci: Prof. dr hab. Przemysław Myjak
Prof. dr hab. Wanda Kocięcka

ABSTRACT. *Giardia* is the most common intestinal protozoan parasite found in humans and animals worldwide. Although it has been known for three hundred years, the nomenclature, taxonomy, host specificity, and pathogenicity of *Giardia* still arouse numerous controversies and ambiguities. *Giardia* is classified into six species, that are characterised by various ranges of hosts. The most dubious species is *G. intestinalis*, which includes a dozen or so genotypes, and only two of them (genotype A and B) have wide ranges of hosts, including humans. Moreover, in some genotype assemblages of *G. intestinalis* certain subgenotypes were distinguished and it was proven that in the same host species various subgenotypes of this parasite may occur. Bearing in mind the significant genetic heterogeneity of *G. intestinalis* and the fact that various genotypes and subgenotypes of this parasite are characterised by the broad or narrow host specificity, the data concerning the frequency of giardiasis occurrence are insufficient. It is necessary to use molecular biology techniques in order to define the genotype and/or the subgenotype of *G. intestinalis* that are found in humans and in certain animal species. Furthermore, since more and more pieces of evidence connected with a possibility of the sexual recombination of *Giardia* are gathered, it is unknown if genotypes and subgenotypes of this parasite are stable in time. The aim of this thesis was to define the frequency of *Giardia* occurrence in humans and animals in Wielkopolska region, to identify species and genotypes of *Giardia* that occur in humans and animals, as well as to obtain an axenic culture of the chosen isolates of *Giardia* from animals and to compare the sequence of the β -giardin gene fragment obtained from the DNA isolated from cysts and trophozoites in order to check if the axenisation of *G. intestinalis* leads to the selection of genotypes or if *Giardia* genotypes are stable in time. Altogether, 2183 faecal samples were examined for the presence of *Giardia* cysts; 447 faecal samples were taken from 232 persons coming from 5 cities situated in Wielkopolska, and 1736 faecal samples were obtained from 123 animal species, including: 266 faecal samples from 113 species of animals kept in the Zoological Garden in Poznań, 1286 samples from 4 species of breeding animals, 118 samples from dogs, and 66 samples from 5 species of wild animals. Faecal samples were taken from animals coming from 25 places in Wielkopolska. Moreover, seven isolates of *G. intestinalis* were used in the studies, which were obtained from various species of hosts and kept in an axenic *in vitro* culture. Microscopic, molecular and bio-informative methods were used in the studies. From each faecal sample fresh smears were made in a 0.6% solution of physiological salt and in Lugol's solution, as well as a permanent smear stained with trichrome was made. Moreover, the following molecular techniques were implemented in the studies: DNA extraction and purification, the PCR technique (two molecular markers), electrophoresis and visualisation of PCR products, and sequencing. A fragment of the β -giardin gene was used as a molecular marker in order to define the genotype and subgenotype of *Giardia*. Only in the case of genotyping of two *Giardia* isolates obtained from *Peromyscus eremicus* another molecular marker (SSU rRNA) was additionally used. Some widely available computer programmes (Chromas, CAP 3, BioEdit, BLASTn, MEGA version 4.0) were utilised in the analysis of the sequence of the β -giardin gene fragment and in the phylogenetic

analysis. The culture of *Giardia* trophozoites was established to compare the sequence of the partial β -*giardin* gene from cysts and trophozoites. Concentration and purification of *Giardia* cysts in the saccharose gradient, and the excystation technique were applied in the studies to obtaining an axenic *in vitro* culture. In this study, *Giardia* cysts were found in 12 faecal samples obtained from 3 persons and 5 animal species. *Giardia* cysts were found only in faecal samples from humans living in Poznań and the samples obtained from animals coming from Poznań and around Puszczykowo. The highest frequency of infection was stated in domestic animals (2.5%) and in animals kept in the Zoological Garden (2.0%), whereas a slightly lower frequency was noticed in wild animals (1.5%) and in humans (1.3%). No *Giardia* cysts were found in the faecal samples collected from breeding animals. Two new species of *Giardia* hosts were identified, namely *Rhinella marina* and *Peromyscus eremicus*; however, due to a minimal amount of faecal samples supplied for the study it was impossible to define the species and genotype of this parasite. PCR products (the partial of β -*giardin* gene) were obtained in seven faecal samples out of the ten studied, including three samples from people and four faecal samples derived from three animal species (i.e. dog, tamandua, red deer). Moreover, molecular characterization of seven *Giardia* isolates from three persons and four animal species (red-bellied monkey, silver marmoset, Thomson's gazelle, and sheep) kept in an axenic *in vitro* culture was performed. Based on the β -*giardin* sequence fragment analysis, four assemblages of *G. intestinalis* genotypes were identified (A, B, C and D). In humans, A and B *G. intestinalis* genotypes and three subgenotypes, including a cosmopolitan subgenotype A2 and two new subgenotypes A and B were detected. Furthermore, four *G. intestinalis* genotypes were found in animals, including three genotypes which are non-infectious to humans, namely: genotypes C and D in dogs and a cervids-specific genotype A in red deer (*Cervus elaphus*), which indicate that these animals do not constitute the source of infection to humans. On the other hand, in a tamandua from the Zoological Garden in Poznań a new subgenotype B of *G. intestinalis* was identified, which due to a close relationship with *Giardia* isolates obtained from humans is potentially infectious to man. In none of the studied faecal samples a mixed infection of *Giardia* was found. To date, nine sequences of the partial β -*giardin* gene have been deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), including two sequences of *Giardia* isolates obtained from humans (GenBank accession numbers FJ009207, FJ009208), three sequences of isolate obtained from red deer (GenBank accession numbers EU621373, EU626198, EU216429), two sequences of both *Giardia* isolates obtained from dogs (GenBank accession numbers FJ009205, FJ009206), and the single sequences obtained from tamandua (GenBank accession number FJ009209) and from Thomson's gazelle (GenBank accession number EU626199). According to the literature, an axenic *in vitro* culture of *G. intestinalis* was obtained from a red deer for the first time. Based on the analysis of the sequence of the β -*giardin* gene fragment obtained from the DNA isolated from cysts and trophozoites it was proven that the red deer was infected with a single population of *Giardia* and that during the axenisation of the culture no mutation in the DNA of the parasite's trophozoites took place. Probably the time distance that the DNA was isolated from the trophozoites kept in the culture was too short to cause the mutation. This suggestion is confirmed by the results of the genotyping of seven *G. intestinalis* isolates obtained from various host species and kept in an axenic *in vitro* culture for at least a number of years. Based on the molecular characteristics it was stated that all the studied isolates from the axenic culture were identical and belonged to the same assemblage B. The comparison with the sequences from GenBank database revealed that all mentioned isolates were 99% similar to the sequence of *Giardia* Nij5 isolate obtained from a person from the Netherlands and characterised as genotype B1. Due to the sameness of the molecular marker sequences it seems improbable that the identical *G. intestinalis* genotype occurred in various time periods (the largest difference was 14 years) in humans and in a number of animal species in diverse areas of Wielkopolska region. Quite opposite, the long-term keeping of these isolates in the homogenous conditions of an axenic *in vitro* culture leads to the selection of a genotype or proves the instability of genotypes of this parasite. Long-term studies need to be conducted in order to verify these hypothesis. Their results will have a key meaning in explaining the genetic structure of the *Giardia* population and in understanding the molecular epidemiology of giardiasis.

Key words: *Giardia*, genotype, molecular epidemiology, molecular diagnostics techniques, Poland

Streszczenie

Wiciowce z rodzaju *Giardia* występują kosmopolityczne i należą do najczęstszych pasożytniczych pierwotniaków jelitowych ludzi oraz zwierząt i mimo, że znane są od ponad 300 lat, to jednak nazewnictwo, taksonomia, specyficzność żywicielska i patogeniczność *Giardia* nadal wywołują liczne kontrowersje i niejasności.

Aktualnie wyodrębniono sześć gatunków w rodzaju *Giardia*, które cechują się różnym kręgiem żywicieli. Najwięcej kontrowersji wzbudza gatunek *G. intestinalis* obejmujący kilkanaście genotypów, z których tylko dwa (genotypy A i B) mają szeroki krąg żywicieli, w tym i człowieka. Ponadto, w obrębie niektórych zbiorów genotypów *G. intestinalis* wyodrębniono subgenotypy i wykazano, że u tego samego gatunku żywiciela mogą występować różne

subgenotypy tego pasożyta. Mając na uwadze znaczne zróżnicowanie genetyczne *G. intestinalis* oraz fakt, że różne genotypy i subgenotypy tego pasożyta cechują się szeroką lub wąską specyficznością żywicielską, dane dotyczące częstości występowania giardiozy są już niewystarczające. Konieczne staje się wykorzystanie technik biologii molekularnej, w celu określenia genotypu i/lub subgenotypu *G. intestinalis* występujących u ludzi i poszczególnych gatunków zwierząt. Ponadto, ze względu na gromadzące się dowody na możliwość płciowego rozmnażania *Giardia*, nie wiadomo czy genotypy i subgenotypy tego pasożyta są stabilne w czasie.

Celem niniejszej pracy było określenie częstości występowania *Giardia* u ludzi i zwierząt w Wielkopolsce, zidentyfikowanie gatunków i genotypów *Giardia* występujących u ludzi i zwierząt oraz uzyskanie akseńicznych hodowli wybranych izolatów *Giardia* od zwierząt i porównanie sekwencji fragmentu genu β -*giardiny* uzyskanych z DNA izolowanego z cyst i trofozoitów w celu sprawdzenia, czy akseńizacja *G. intestinalis* prowadzi do selekcji genotypów lub czy genotypy *Giardia* są stabilne w czasie.

Ogółem, zbadano 2183 próby kału w kierunku obecności cyst *Giardia*; 447 prób kału pobrano od 232 osób pochodzących z 5 miejscowości położonych na terenie Wielkopolski, a 1736 prób kału uzyskano od 123 gatunków zwierząt, w tym pobrano: 266 prób kału od 113 gatunków zwierząt hodowanych w Ogrodzie Zoologicznym w Poznaniu, 1286 prób od 4 gatunków zwierząt hodowlanych, 118 prób od psów oraz 66 prób od 5 gatunków dzikich zwierząt. Próby kału od zwierząt pobrano z 25 miejscowości z terenu Wielkopolski. Ponadto, w badaniach wykorzystano siedem izolatów *G. intestinalis* uzyskanych od różnych gatunków żywicieli i utrzymywanych co najmniej kilka lat w akseńicznej hodowli *in vitro*.

W badaniach wykorzystano metody mikroskopowe, molekularne i bioinformatyczne oraz zakładanie akseńicznych hodowli *in vitro*. Z każdej próby kału wykonywano świeże rozmazy kału w 0,6% roztworze soli fizjologicznej i w płynie Lugola oraz trwałe rozmazy barwiony trichromem. Ponadto, w badaniach wykorzystano następujące techniki molekularne: izolację i oczyszczanie DNA, technikę PCR (dwa markery molekularne), elektroforetyczny rozdział i wizualizację produktów PCR oraz sekwencjonowanie. Do określenia genotypu i subgenotypu *Giardia* wykorzystano fragment genu β -*giardiny* jako molekularny marker, Tylko w przy-

padku genotypowania dwóch izolatów *Giardia* uzyskanych od myszaka kaktusowego wykorzystano także inny marker molekularny – fragment genu kodującego RNA z małej podjednostki rybosomu (SSU rRNA). Do analizy sekwencji fragmentu genu β -*giardiny* i analizy filogenetycznej wykorzystano ogólnodostępne programy komputerowe (Chromas, CAP 3, BioEdit, BLASTn, MEGA version 4.0).

Hodowlę trofozoitów *Giardia* zakładano w celu porównania sekwencji fragmentu genu β -*giardiny* pasożyta izolowanego z cyst i trofozoitów. W celu uzyskania akseńicznej hodowli *Giardia* wykorzystano technikę zagęszczania i oczyszczania cyst w gradiencie sacharozy oraz technikę ekscytacji.

Ogółem, mikroskopowo cysty *Giardia* wykryto w 12 próbach kału pochodzących od trzech osób i pięciu gatunków zwierząt. Cysty *Giardia* stwierdzono jedynie w próbach kału od osób mieszkających w Poznaniu oraz w próbach pochodzących od zwierząt z terenu Poznania i okolicy Puszczykowa. Najwyższą częstość zarażenia stwierdzono u zwierząt domowych (2,5%) i hodowanych w ZOO (2%), a nieco niższą u dzikich zwierząt (1,5%) i u ludzi (1,3%). Nie wykryto cyst tego pierwotniaka w próbach kału pobranych od zwierząt hodowlanych. Zidentyfikowano dwa nowe gatunki żywicieli *Giardia* – ropucha kururu i myszak kaktusowy, jednak ze względu na minimalną ilość kału, jaką dostarczono do badań, nie udało się określić gatunku i genotypu tego pasożyta.

Obecność cyst i DNA *Giardia* (fragment genu β -*giardiny*) stwierdzono w 7 próbach kału z 10 badanych, w tym w trzech próbach pobranych od ludzi oraz w czterech próbach kału uzyskanych od trzech gatunków zwierząt (pies, tamandua, jeleń). Ponadto, uzyskano amplikony fragmentu genu β -*giardiny* z trofozoitów 7 izolatów *Giardia* uzyskanych od trzech osób oraz czterech gatunków zwierząt (koczkodana czerwono brzuchego, marmozety białej, gazeli Tomi i owcy) i utrzymywanych w akseńicznej hodowli *in vitro*.

Na podstawie molekularnej charakterystyki uzyskanych sekwencji fragmentu genu β -*giardiny* zidentyfikowano 4 zbiory genotypów *G. intestinalis*: A, B, C i D. U ludzi zidentyfikowano dwa genotypy *G. intestinalis* należące do zbioru A i B oraz trzy subgenotypy, w tym kosmopolityczny subgenotyp A2 oraz dwa nowe subgenotypy A i B. Natomiast u zwierząt zidentyfikowano cztery genotypy *G. intestinalis*, w tym trzy genotypy nieinwazyjne dla człowieka: genotyp C i D u psów oraz specyficzny dla jeleniowatych genotyp A u jelenia europejskie-

go – co wskazuje, że zwierzęta te nie stanowią źródła zarażenia dla człowieka. Z kolei u tamanduy z Ogrodu Zoologicznego w Poznaniu zidentyfikowano nowy subgenotyp B *G. intestinalis*, który – ze względu na bliskie pokrewieństwo z izolatami *Giardia* uzyskanymi od ludzi – jest potencjalnie inwazyjny dla człowieka. W żadnej badanej próbie kału nie stwierdzono mieszanej inwazji *Giardia*. Do tychczas w Banku Genów (NCBI) zdeponowano dziewięć sekwencji fragmentu genu β -*giardiny*, w tym dwie sekwencje izolatów *Giardia* od ludzi (nr akcesyjne FJ009207, FJ009208), trzy sekwencje izolatu od jelenia europejskiego (nr akcesyjne EU621373, EU626198, EU216429), dwie sekwencje obu izolatów *Giardia* uzyskanych od psów (nr akcesyjne FJ009205, FJ009206) oraz pojedyncze sekwencje od tamanduy (nr akcesyjny FJ009209) i od gazeli Tomi (nr akcesyjny EU626199).

Po raz pierwszy uzyskano akсенiczną hodowlę *in vitro* *G. intestinalis* od jelenia. Na podstawie analizy sekwencji fragmentu genu β -*giardiny* uzyskanych z DNA izolowanego z cyst i trofozoitów wykazano, że jeleń był zarażony pojedynczą populacją *Giardia* oraz że w trakcie akсенizacji hodowli nie doszło do mutacji w DNA trofozoitów tego pasożyta. Prawdopodobnie odstęp czasowy, w którym izolowano DNA z trofozoitów utrzymywanych w hodowli był jednak zbyt krótki, aby mogło dojść

do mutacji. Potwierdzeniem tej sugestii są wyniki genotypowania 7 izolatów *G. intestinalis* uzyskanych od różnych gatunków żywicieli i utrzymywanych w akсенicznej hodowli *in vitro* od co najmniej kilku lat. Na podstawie molekularnej charakterystyki stwierdzono, że wszystkie badane izolaty z akсенicznej hodowli były identyczne i należały do tego samego zbioru genotypów B i były w 99% podobne do sekwencji izolatu *Giardia* Nij5 uzyskanego od człowieka z terenu Holandii i scharakteryzowanego jako genotyp B1. Ze względu na identyczność sekwencji markera molekularnego wydaje się mało prawdopodobne, aby identyczny genotyp *G. intestinalis* występował w różnym czasie (największa różnica wynosiła 14 lat) u ludzi i u kilku gatunków zwierząt w rozmaitych miejscach Wielkopolski. Raczej, długotrwałe utrzymywanie tych izolatów w jednorodnych warunkach akсенicznej hodowli *in vitro* prowadzi do selekcji genotypu lub świadczy o niestabilności genotypów tego pasożyta. Sprawdzenie tych hipotez wymaga jednak długofalowych badań doświadczalnych. Wyniki tych badań będą miały kluczowe znaczenie w wyjaśnieniu genetycznej struktury populacji *Giardia* oraz w zrozumieniu molekularnej epidemiologii giardiozy.

Wpłynęło 27 października 2009

Zaakceptowano 3 listopada 2009