

## Prace oryginalne

**Zwierzęta ziemnowodne jako źródło zanieczyszczenia wody  
*Cryptosporidium* i *Giardia*<sup>1</sup>****Semi-aquatic animals as a source of water contamination  
with *Cryptosporidium* and *Giardia*****Anna Bajer<sup>1</sup>, Małgorzata Bednarska<sup>1</sup>, Anna Paziewska<sup>1</sup>, Jerzy Romanowski<sup>2</sup>,  
Edward Siński<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Zakład Parazytologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, 02-096 Warszawa<sup>2</sup> Centrum Badań Ekologicznych PAN, Dziekanów LeśnyAdres do korespondencji: Anna Bajer, Zakład Parazytologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii UW,  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; E-mail: anabena@biol.uw.edu.pl

**ABSTRACT.** *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. are parasitic protozoa localized in the alimentary tract of many animal species and humans. Each of these parasite species produces very resistant invasive forms (cysts and oocysts) excreted to the environment with feces of infected hosts. Water contaminated with cysts/oocysts constitutes one of the main transmission routes and is responsible for the majority of infections in humans. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. were found in many different species of animals, including livestock, pets and free living animals. The aim of our study was to determine the prevalence of these protozoa in selected species of semi-aquatic mammals and to estimate their role in water contamination. In years 1996–98 the prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections was high in muskrats (*Ondatra zibethicus*) (58 and 87%, respectively). The origin of animals (farmed or free living) affected the prevalence of both parasites in European beavers (*Castor fiber*). The prevalence of infection increased in second period of study and was 4 and 19% for *Cryptosporidium* and 0 and 8% for *Giardia* spp. in the two studied periods, respectively. Both parasite species were also identified in water vole (*Arvicola terrestris*) and rat (*Rattus norvegicus*).

**Key words:** *Cryptosporidium*, *Giardia*, beaver, muskrat, water, introduction**Wstęp**

*Cryptosporidium* i *Giardia* spp. to pierwotniaki pasożytujące w przewodzie pokarmowym wielu gatunków zwierząt i człowieka. Zarażenia tymi pasożytami są przyczyną długotrwałych lub nawracających biegunek u osób z grup ryzyka, z wrodzonymi lub nabytymi niedoborami odporności. Kryptosporidioza i giardioza są uważane za zoonozy, a gatunki/szczepy pasożytów znajdujące u ludzi występują naturalnie u wielu gatunków zwierząt hodowlanych, domowych i wolno żyjących [1–3]. Obydwa pasożyty wytwarzają bardzo odporne na warunki zewnętrzne formy inwazyjne (oocysty i cysty),

które są usuwane wraz z kałem zarażonych osobników i mogą kumulować się w zbiornikach wód powierzchniowych. Środowisko wodne zanieczyszczone cystami/oocystami stanowi jedną z głównych dróg rozprzestrzenienia się pasożytów, a zanieczyszczona woda jest główną przyczyną kryptosporidiozy i giardiozy u ludzi [4, 5].

Od ponad 20 lat prowadzone są liczne badania nad rezerwuarem zoonotycznym tych pasożytów i znaczeniem różnych grup zwierząt w transmisji pasożytów w środowisku oraz jako źródeł inwazji dla ludzi [1, 2, 6–8]. Zwierzęta ziemnowodne mogą odgrywać szczególną rolę w krążeniu tych pierwotniaków w środowisku, gdyż ich tryb życia

<sup>1</sup> Praca częściowo finansowana z grantu MNiSW nr R 14 012 01

sprzyja bezpośredniemu zanieczyszczeniu wód powierzchniowych. W literaturze pojawiały się doniesienia o istotnej roli, jaką w zanieczyszczeniu wód powierzchniowych w Ameryce Północnej pełni bóbr kanadyjski (*Castor canadensis*), będący naturalnym źródłem inwazji *Giardia* dla ludzi [9, 10]. Do badań wybraliśmy dwa gatunki gryzoni ziemnowodnych – nie badanego wcześniej bobra europejskiego (*Castor fiber*) i piżmaka (*Ondatra zibethicus*). Należą one do największych i najbardziej ruchliwych gatunków gryzoni europejskich. Jednocześnie są w stanie tolerować bliską obecność człowieka, a także zanieczyszczenia wód powierzchniowych, dzięki czemu mogą zasiedlać nie tylko rzeki czy pobraża jezior, ale również małe zbiorniki śródlądowe i śródpolne, stawy rybne, wyrobiska potorfowe, rowy melioracyjne itp. Dzięki aktywnej ochronie gatunkowej populacja bobra europejskiego w Polsce szacowana jest obecnie na ponad 49 tys. osobników [11]. Wraz z reintrodukcją i naturalną migracją bobrów może dochodzić do przenoszenia i rozprzestrzeniania pasożytów w nowych zbiornikach wodnych. Piżmak występuje na terenie całego kraju, a zagęszczenia jego populacji zależą głównie od zagęszczeń drapieżników, takich jak norka amerykańska czy tchórz. Celem naszych badań było określenie odsetka zarażeń *Cryptosporidium* i *Giardia* u tych dwóch gatunków gryzoni ziemnowodnych, co pozwoliłoby określić ich udział w zanieczyszczeniu wód powierzchniowych.

## Materiały i metody

Próby kału od bobrów europejskich pobierane były w dwóch okresach czasu od dwóch grup zwierząt – od bobrów z ферmy hodowlanej Stacji Badawczej Rolnictwa Ekologicznego i Zachowawczej Hodowli Zwierząt PAN w Popielnie i od zwierząt wolno żyjących, odławianych ze środowiska naturalnego z terenu Suwalszczyzny.

W pierwszym okresie badań, od listopada 1996 do lipca 1998, badano 5-krotnie próby pochodzące z 11 kolonii bobrów europejskich na ферmie Stacji Badawczej PAN w Popielnie. W sumie zebrano 44 zbiorcze próby kału z boksów zamieszkałych przez bobrze rodziny. W drugim okresie badań (2003–2005) badano trzykrotnie próby pochodzące od zwierząt z ферmy w Popielnie (łącznie 30 prób).

Jesienią 1997 roku oraz wiosną i jesienią 1998 zbadano 46 prób kału pochodzących od 56 bobrów odławianych ze środowiska naturalnego na Suwalszczyźnie i przeznaczonych do introdukcji lub ho-

dowli. Próby zbierane były z klatek, w których zwierzęta przetrzymywano pojedynczo lub w parach. W drugim okresie badań, w październiku 2003 roku, zebrano 22 indywidualne próby kału od bobrów odłowionych na Suwalszczyźnie.

Do badań populacji piżmaka wykorzystano próby kału zbierane od listopada 1996 do lipca 1998 w dorzeczu Wisły, z nabrzeży cieków wodnych środkowej i wschodniej Polski (dawne woj. siedleckie, skierniewickie, warszawskie, białkopodlaskie). W sumie zbadano 100 prób kału pochodzących z 75 stanowisk. Dodatkowo zebrano i przebadano 3 próby kału pochodzące od szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*) oraz 3 próby od karczownika ziemnowodnego (*Arvicola terrestris*).

Z zebranych prób sporządzano rozmazy kału, które po wysuszeniu utrwalano w metanolu i barwiono zmodyfikowaną metodą Ziehl-Neelsena [12]. Pod powiększeniem 400x przeglądzano minimum 200 pól rozmazu w poszukiwaniu oocyst *Cryptosporidium*. Oocysty identyfikowano na podstawie rozmiaru (objektyw pomiarowy) i koloru oraz charakterystycznych struktur wewnętrznych.

Jako metodę referencyjną w diagnostyce zarażeń stosowano test immunofluorescencyjny (IFA) MerI-Fluor *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Diagnostics Inc., Cincinnati, Ohio, USA). Do IFA wykorzystano próbki kału o masie od 0,3 do 1 g, przechowywane w 2,5% roztworze dwuchromianu potasu i zagęszczane za pomocą zmodyfikowanej metody flotacji na sacharozie [13, 14]. Wskaźnik intensywności inwazji stanowiła średnia liczba cyst/oocyst na 1 ml zagęszczonego osadu. Do porównania ekstensywności zarażeń stosowano test  $\chi^2$  a do porównania średniej intensywności zarażeń – test analizy wariancji (ANOVA).

## Wyniki i omówienie wyników

W pierwszym okresie badań (1996–1998) stwierdzono znaczne różnice w zarażeniu pomiędzy dwoma badanymi gatunkami gryzoni ziemnowodnych (Tabela 1). Oocysty *Cryptosporidium* spp. wykryto w 58% prób kałowych piżmaków i w poniżej 5% prób pochodzących od bobrów europejskich (wolno żyjących i z ферmy). Cysty *Giardia* spp. stwierdzono w 87% prób od piżmaków, natomiast nie znaleziono ich w próbach od bobrów (Tabela 1). Oocysty *Cryptosporidium* spp. wykryto także w 2 z 3 prób kału pochodzących od karczownika ziemnowodnego i w jednej z 3 prób od szczura wędrownego. Inwazje *Giardia* stwierdzono natomiast w 2

próbach od karczownika i w 2 próbach od szczura wędrownego. Również w badaniach prowadzonych w Niemczech stwierdzono, że spośród różnych gatunków gryzoni ziemnowodnych to właśnie piżmak odgrywa zdecydowanie najistotniejszą rolę jako rezerwuuar *Giardia* spp. [15].

W drugim okresie badań (2003–2005) stwierdzono wyższe odsetki zarażeń *Cryptosporidium* spp. i pierwsze inwazje *Giardia* spp. w obu grupach bobrów (Tabela 1). W próbach pochodzących od zwierząt wolno żyjących wykazano wyższą ekstensywność zarażenia *Cryptosporidium* niż u bobrów z fermy (odpowiednio 30% i 10%). Także zagęszczenia oocyst były czterokrotnie wyższe dla zwierząt dzikich – wyniosły 9 oocyst/ml zagęszczonego osadu (95% CL: 2–40,1) u bobrów z Suwalszczyzny w porównaniu do 1,9 oocyst/ml (95%CL: 0,9–4,1) u bobrów z fermy, choć różnice te nie były istotne statystycznie. Z kolei wyższą ekstensywność zarażenia *Giardia* spp. stwierdzono u zwierząt z fermy (10%) a u bobrów wolno żyjących cysty znaleziono w jednej próbie (4,5%). Zagęszczenia cyst były podobne dla obu grup zwierząt i wyniosły 1,6 cyst/ml zagęszczonego osadu (95% CL: 0,6–3,9) u bobrów z Suwalszczyzny oraz 1,9 cyst/ml (95%CL: 0,9–3,8) u bobrów z fermy (NS).

Ogółem oocysty *Cryptosporidium* spp. były częściej wykrywane u bobrów wolno żyjących niż u zwierząt z hodowli (13,2% versus 6,8%), natomiast cysty *Giardia* były stwierdzane częściej u bobrów z fermy (4,1% versus 1,5%). Wydaje się więc, że w przypadku bobrów lepsze warunki dla transmi-

sji *Cryptosporidium* spp. istnieją w środowisku naturalnym, natomiast dla *Giardia* spp. w warunkach hodowli. Zaobserwowany znaczący wzrost odsetka zarażeń obydwoma pasożytami u bobrów w kolejnych latach badań może być związany ze wzrostem zagęszczenia tych zwierząt w środowisku naturalnym, gdyż podobne zależności obserwowano w naturalnie zarażonych populacjach drobnych gryzoni w Polsce [2].

Znaczenie badanych gatunków zwierząt jako źródła inwazji dla ludzi wymaga dalszych badań, ze względu na potrzebę określenia gatunków i genotypów pierwotniaków. Wiadomo, iż u piżmaków występują inwazje gatunków i genotypów nie inwazyjnych dla ludzi, takich jak *G. microti* czy dwa nowe, specyficzne żywicielsko genotypy *Cryptosporidium*, które nie były nigdy stwierdzane u innych gatunków zwierząt ani u ludzi [16, 17]. Dalsze badania polegające na genotypowaniu izolatów pasożytów pochodzących od zwierząt ziemnowodnych powinny pomóc w uściśleniu ich roli w rozprzestrzeleniu pierwotniaków w Polsce.

## Wnioski

1. Badane gatunki gryzoni ziemnowodnych stanowią rezerwuuar pierwotniaków jelitowych w Polsce i mogą przyczynić się do zanieczyszczenia wód powierzchniowych cystami i oocystami tych pasożytów.

2. W trakcie kolejnych lat badań zaobserwowano wzrost odsetka zarażeń u bobra europejskiego,

Tabela 1. Ekstensywność zarażenia *Cryptosporidium* i *Giardia* spp. u badanych gatunków gryzoni ziemnowodnych  
Table 1. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in studied semi-aquatic rodent species

Żywiciel Host species	Okres badań Period of study	Pochodzenie zwierząt Origin of animals	<i>Cryptosporidium</i>			<i>Giardia</i>		
			N	Z	% infect.	N	Z	% infect.
Bóbr europejski European beaver ( <i>Castor fiber</i> )	1996–1998	Fermowe/Farmed	44	2	4.5%	44	0	0%
	1996–1998	Dzikie/Free living	46	2	4.3%	46	0	0%
	2003–2005	Fermowe/Farmed	30	3	10%	30	3	10%
	2003–2005	Dzikie/Free living	22	7	32%	22	1	4.5%
Ogółem Total	1996–2005	Fermowe/Farmed	74	5	6.8%	74	3	4.1%
	1996–2005	Dzikie/Free living	68	9	13.2%	68	1	1.5%
	1996–1998	F+D	90	4	4.4%	90	0	0%
	2003–2005	F+D	52	10	19.2%	52	4	7.7%
Piżmak Muskrat ( <i>Ondatra zibethicus</i> )	1996–1998	Dzikie/Free living	100	58	58%	100	87	87%

Objaśnienia/Explanations: N – liczba zbadanych prób/no of studied samples; Z – liczba prób pozytywnych/no of positive samples; F+D – fermowe i dzikie łącznie/farmed and free living together

prawdopodobnie związany ze wzrostem zagęszczenia populacji żywicieli.

### Podziękowania

Za pomoc w zbieraniu materiału od gryzoni ziemnowodnych składamy podziękowania Panu doktorowi Hubertowi Niewęglowskiemu (PZŁ Czempin) i Panu Janowi Goździewskiemu (PZŁ Suwałki).

### Literatura

- [1] Bajer A. 2008. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. *Parasitology Research*: 1–17.
- [2] Bajer A. 2008. Between-year variation and spatial dynamics of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infections in naturally infected rodent populations. *Parasitology* 135: in press.
- [3] Smith H.V., Caccio S.M., Tait A., McLauchlin J., Thompson A.R.C. 2006. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in Parasitology* 22: 160–167.
- [4] Dillingham R.A., Lima A.A., Guerrant R.L. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection* 4: 1059–1066.
- [5] Kasprzak W., Majewska A.C. 1995. Kryptosporydioza – parazytoza o typowym uwarunkowaniu środowiskowym. *Wiadomości Parazytologiczne* 41: 140–154.
- [6] Bajer A., Bednarska M., Cacciñ S.M., Wolska-Kuśnierz B., Heropolitanska-Pliszka E., Bernatowska E., Wielopolska M., Paziewska A., Welc-Falęciak R., Siński E. 2008. Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human clinical cases in Poland. *Parasitology Research* 103: 37–42.
- [7] Paziewska A., Bednarska M., Niewęglowski H., Karbowski G., Bajer A. 2007. Distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in selected species of protected and game mammals from North-Eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 14: 159–167.
- [8] Appelbee A.J., Thompson R.C.A., Olson M.E. 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. *Trends in Parasitology* 21: 370–376.
- [9] Fayer R., Santín M., Trout J.M., DeStefano S., Koenen K., Kaur T. 2006. Prevalence of Microsporidia, *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp. in beavers (*Castor canadensis*) in Massachusetts. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 37: 492–497.
- [10] Isaac-Renton J., Moorehead W., Ross A. 1996. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cyst levels, parasite viability, and health impact. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 47–54.
- [11] Główny Urząd Statystyczny (GUS) <http://www.stat.gov.pl/cps/rde/xchg/gus>
- [12] Henriksen S., Pohlenz J. 1981. Staining of cryptosporidia by modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica* 22: 594–596.
- [13] Bajer A., Bednarska M., Pawelczyk A., Behnke J.M., Gilbert F.S., Sinski 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.
- [14] Garcia L.S., Bruckner D.A. 1988. Macroscopic and microscopic examination of fecal specimens. In: *Diagnostic Medical Parasitology*. (Ed. L.S. Garcia). Elsevier, New York: 377–391.
- [15] Karanis P., Opiela K., Renoth S., Seitz H.M. 1996. Possible contamination of surface waters with *Giardia* spp. through muskrats. *Zentralblatt fur Bakteriologie* 284: 302–306.
- [16] Yang W., Chen P., Villegas E.N., Landy R.B., Kanetsky C., Cama V., Dearen T., Schultz C.L., Orndorff K.G., Prelewicz G.J., Brown M.H., Young K.R., Xiao L. 2008. *Cryptosporidium* source tracking in the Potomac River watershed. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 6495–6504.
- [17] van Keulen H., Feely D.E., Macechko P.T., Jarroll E.L., Erlandsen S.L. 1998. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. *Journal of Parasitology* 84: 294–300.

Wpłynęło 6 października 2008

Zaakceptowano 26 listopada 2008