



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU
Wydział Medycyny Weterynaryjnej

lek. wet. Agnieszka Piekara-Stępińska

**Występowanie pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia*
u psów i kotów w Polsce**

Praca doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem
Dr hab. Jolanty Piekarskiej, prof. uczelni
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni,
Psów i Kotów, Zakład Parazytologii
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław 2021

Składam serdeczne podziękowania...

*...Pani Promotor dr hab. Jolancie Piekarskiej, prof. uczelni
za poświęcony czas, cenne wskazówki i niezbędną motywację.*

*...całemu Zespołowi Zakładu Parazytologii, a w szczególności dr Michałowi
Gorczykowskiemu za pomoc i rady udzielane na każdym etapie realizacji pracy.*

...mojej Rodzinie za ciągłe wsparcie i motywację.

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

- I. Piekara-Stępińska Agnieszka, Piekarska Jolanta, Gorczykowski Michał
Cryptosporidium spp. in dogs and cats in Poland.
Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2021;28(2):345-347
doi: 10.26444/aaem/120467

MNiSW 100 pkt; IF₂₀₂₀ 1.45

Wkład w autorstwo: **70%**
- II. Piekara-Stępińska Agnieszka, Piekarska Jolanta, Gorczykowski Michał, Bania Jacek
Genotypes of *Giardia duodenalis* in household dogs and cats from Poland.
Acta Parasitologica, 2021;66(2):428-435
doi: 10.1007/s11686-020-00292-1

MNiSW 40 pkt; IF₂₀₂₀ 1.44

Wkład w autorstwo: **70%**

Sumaryczny IF: 2.89

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: 140

Streszczenie

Występowanie pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* u psów i kotów w Polsce

Do rodzajów *Cryptosporidium* oraz *Giardia* należą szeroko rozpowszechnione w świecie pierwotniaki o znaczeniu zarówno w weterynarii jak i w medycynie człowieka. Są to patogeny oportunistyczne, a zarażenia przez nie wywoływane mogą być bezobjawowe, jednak w pewnych sytuacjach przebiegają z ciężkimi objawami klinicznymi.

Giardioza psów i kotów jest przyczyną biegunek, szczególnie u zwierząt młodych do 12. miesiąca życia. Podobne objawy gastroenterologiczne mogą pojawiać się również w przebiegu znacznie rzadziej rozpoznawanej kryptosporydiozy, która dodatkowo często stwarza duże problemy diagnostyczne i terapeutyczne.

Celem badań była charakterystyka inwazji *Cryptosporidium* i *Giardia* u psów i kotów w Polsce, która obejmowała ocenę częstości występowania pasożytów, identyfikację gatunkową/genotypową oraz określenie czynników mogących predysponować do wystąpienia zarażenia (związanych z rasą oraz wiekiem).

Do badań związanych z występowaniem *Cryptosporidium* spp. wykorzystano próbki kału pobrane od 365 zwierząt (264 psy, 101 kotów) pochodzących z dziewięciu województw. Próbki zostały poddane badaniom mikroskopowym oraz molekularnym. Zwierzęta, od których pochodziły badane próbki podzielono na grupy w zależności od wieku (poniżej 1 roku życia, 1-8 lat, powyżej 8 lat), oraz obecności lub braku biegunki. W diagnostyce wykorzystano ocenę mikroskopową preparatów barwionych metodą Ziehl-Neelsena oraz badania molekularne z wykorzystaniem techniki nested-PCR opartej na amplifikacji fragmentu kodującego 18 SSU rRNA kryptosporydiiów, a także sekwencjonowanie. Pozyskany materiał był również poddany rutynowemu badaniu metodą flotacji w celu wykrycia ewentualnych koinwazji.

W badaniu mikroskopowym preparatów barwionych metodą Ziehl-Neelsena oocysty kryptosporydiiów wykryto u 2,7% badanych psów i 1% kotów. Zastosowanie techniki nested-PCR umożliwiło wykrycie materiału genetycznego *Cryptosporidium* spp. w 3,4% próbek pochodzących od psów i 2% próbek pozyskanych od kotów. Sekwencjonowanie produktów uzyskanych w drugiej reakcji pozwoliło na stwierdzenie *C. parvum* i *C. canis* u psów oraz *C. felis* u kotów. Dodatkowo metodą flotacji stwierdzono inwazje towarzyszące wywołane przez *Giardia duodenalis*, *Cystoisospora* spp. i nicienie z rodziny *Ancylostomatidae* u psów oraz rodzaju *Toxocara* u kotów. Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem kryptosporydiiów a wiekiem badanych zwierząt oraz

konsystencją kału u psów. W przypadku kotów *Cryptosporidium* spp. było stwierdzone jedynie u osobników z objawami biegunki.

Badania mające na celu ocenę epidemiologii *Giardia duodenalis*, zostały wykonane z wykorzystaniem próbek kału pochodzących od 293 zwierząt domowych (217 psów i 76 kotów) zamieszkujących różne obszary Polski. Zwierzęta zostały podzielone na grupy w zależności od wieku (poniżej 1 roku życia, powyżej 1 roku życia), rasy oraz widocznych objawów klinicznych (biegunka). Z pozyskanych próbek kału wyizolowano materiał genetyczny, a uzyskane izolaty wykorzystano do badania metodą nested-PCR w celu amplifikacji fragmentu genu kodującego β -giardinę. Produkty drugiej reakcji PCR poddane były sekwencjonowaniu. Dodatkowo w badaniach wykorzystano testy immunoenzymatyczne wykrywające koproantygen *G. duodenalis*, a obecność ewentualnych koinwazji oceniano z zastosowaniem metody flotacji oraz metod hodowlanych (posiew na podłoża).

Materiał genetyczny *G. duodenalis* został wykryty w 6% próbek pochodzących od psów oraz 3,9% próbek pochodzących od kotów. Wyższą częstość występowania *G. duodenalis* odnotowano u psów poniżej pierwszego roku życia – 12,2% ($p < 0.05$). Wyraźnie wyższy odsetek wyników dodatnich stwierdzono u buldogów francuskich (u 25% przebadanych psów tej rasy wykryto DNA *G. duodenalis*). Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic częstości występowania pierwotniaka w zależności od rasy u kotów oraz w odniesieniu do konsystencji badanego kału zarówno u kotów, jak i psów. Sekwencjonowanie umożliwiło wykrycie genotypów C i D u psów oraz A i F u kotów.

Słowa kluczowe: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., zoonoza, pierwotniaki, PCR, Ziehl-Neelsen, β -giardina

Abstract

Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in dogs and cats in Poland

Cryptosporidium spp. and *Giardia* spp. are worldwide spread protozoa, important for both veterinary and human medicine. They are commonly considered opportunistic pathogens. The infections they cause may be asymptomatic or, in certain situations, may lead to severe clinical symptoms not only in animals but also in humans.

Giardiasis is one of the most common reasons of diarrhea in dogs and cats, and it is particularly common in young animals (up to 12 months of age). Cryptosporidiosis, although diagnosed much less frequently, is also classified as a factor causing gastroenterological symptoms. For example, *G. duodenalis* is especially common in young animals or those with a weakened immune system. It also often poses considerable diagnostic and therapeutic problems.

The aim of the study was to characterize the invasion with *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs and cats in Poland. The analysis included the assessment of the parasite frequency, species / genotypic identification and determination of infection predisposing factors (related to race and age).

For the estimation of *Cryptosporidium* spp., fecal samples collected from 365 animals (264 dogs, 101 cats) from nine Polish provinces were subjected to microscopic and molecular tests. The animals were divided into groups depending on age (under 1 year of age, 1-8 years, over 8 years of age) and the presence or absence of diarrhea. The diagnostics involved microscopic evaluation of the preparations stained with Ziehl-Neelsen stain and molecular tests based on nested-PCR that involves amplification of the fragment encoding 18 SSU rRNA of cryptosporidia, as well as sequencing. The investigated material was also subjected to a routine flotation test to detect possible co-invasions.

Microscopic examination of the samples stained with the Ziehl-Neelsen stain, revealed cryptosporidial oocysts in 2.7% of the tested dogs and 1% of cats. The nested-PCR detected the genetic material of *Cryptosporidium* spp. in 3.4% of the canine samples and 2% of the feline ones. Sequencing of the products yielded by the second reaction allowed for identification of *C. parvum* and *C. canis* in dogs and *C. felis* in cats. Additionally, the flotation method revealed co-invasions with *Giardia duodenalis*, *Ancylostomatidae* and *Cystoisospora* spp. in dogs and *T. cati* in cats. No significant differences were observed regarding the animal age. The frequency of *Cryptosporidium* spp. was similar in diarrheic and non-diarrheic dogs, but in cats the parasite was detected only in the diarrheic animals.

The epidemiology of *Giardia duodenalis* was assessed in stool samples from 293 domestic animals – 217 dogs and 76 cats living in various areas of Poland. The animals were divided into groups according to age (under one year old, over one year old), race, and visible clinical signs (diarrhea). Genetic material was isolated from the collected stool samples, and the isolates were used for nested PCR assay to amplify the gene fragment encoding β -giardine. The products of the second PCR reaction were sequenced. Additionally, enzyme immunoassays test detecting *G. duodenalis* coproantigen were used in the study, and the presence of possible co-invasions was assessed using flotation (with a solution of Chilean nitrate) and culture methods.

The genetic material of *G. duodenalis* was detected in 6% of canine and 3.9% of feline samples. A higher percentage of positive samples (12.2%, $p < 0.05$) was identified in the dogs younger than one year. A significantly higher percentage of positive results was found in French bulldogs, as *G. duodenalis* DNA was detected in 25% of the tested dogs of this breed. There were no significant differences regarding breed in cats and consistency of the feces in cats and dogs. Sequencing detected genotypes C and D in dogs and A and F in cats.

Key words: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., Zoonosis, protozoa, PCR, Ziehl-Neelsen, β -giardin