

Anna C. MAJEWSKA

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej  
Wydział Lekarski I  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

## KONSEKWENCJE GENETYCZNEGO ZRÓŻNICOWANIA GIARDIA I CRYPTOSPORIDIUM

### CONSEQUENCES OF *GIARDIA* AND *CRYPTOSPORIDIUM* GENETIC HETEROGENEITY

*Protozoan parasites of the Giardia and Cryptosporidium genus are significant causes of disease and morbidity in humans as well as significant economic losses in livestock breeding. Parasites of both genera infect the digestive systems in many species of animals, humans included. Environmentally resistant dispersive stages of the parasites are excreted with the host feces; they are a contributing factor to the environment's biological contamination, particularly in water ecosystems. The issues of potable water and usage of various types of recreational water reservoirs is immensely pertinent in developed countries due to waterborne outbreaks effected by protozoan parasites. Over 325 waterborne outbreaks caused by protozoan parasites to date have been reported worldwide. Giardia and Cryptosporidium were responsible for a majority of the outbreaks, whereas other protozoan parasites and microsporidia were etiological agents in less than 10% of the reported outbreaks. These outbreaks constitute a significant threat for human health and longevity as well as posing a great challenge to public health systems worldwide; morphologically identical parasites of both humans and animals may be present in water, characterized by varying host specificity, infectivity, antigenicity, and virulence.*

*The Giardia and Cryptosporidium genera comprise several species with a variegated range of hosts. Identification of the parasite species is very difficult because cysts and oocysts of most species have the same morphology. A further complication is their considerable genetic heterogeneity. Some Giardia and Cryptosporidium species, assemblages, sub-assemblages, genotypes, and even subtypes are host-specific, whereas others indiscriminately infect humans and many species of animals. Mere detection of Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in water and other environmental samples thus becomes inadequate; sewage plants and government agencies may still incur considerable financial losses.*

*Constantly changing opinions regarding the Giardia and Cryptosporidium genera's taxonomic status aptly illustrate the great impact precise identification and/or nomenclature of pathogens bear on environmental laws, estimating risks of human infection, epidemiological investigations, and particularly on ascertaining the epicenter of water contamination or outbreak, undertaking any/all available preventative measures, as well as developing reliable diagnostic tests.*

## 1. Wprowadzenie

Pasożytnicze pierwotniaki z rodzaju *Giardia* i *Cryptosporidium* są przyczyną wysokiej zachorowalności ludzi i znaczących strat ekonomicznych w hodowli zwierząt. Pierwotniaki z obu rodzajów pasożytują w układzie pokarmowym wielu gatunków zwierząt, w tym i człowieka. Wydalane wraz z kałem żywicieli stadia dyspersyjne tych pasożytów przeżywają przez długi okres w środowisku zewnętrznym i są jednym ze składników biologicznego zanieczyszczenia środowiska, a szczególnie ekosystemów wodnych. Problem bezpiecznej wody pitnej oraz korzystania z różnego typu zbiorników rekreacyjnych w krajach rozwiniętych jest niezwykle aktualny z uwagi na wodno-pochodne epidemie wywołane przez pasożytnicze pierwotniaki. Dotychczas odnotowano ponad 325 wodno-pochodnych epidemii na całym świecie; większość z nich była wywołana przez *Giardia* i *Cryptosporidium*, a tylko niewielka część przez inne pasożytnicze pierwotniaki i mikrosporydia [27]. Epidemie te stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi, a jednocześnie są dużym wyzwaniem dla systemu ochrony zdrowia publicznego na całym świecie, bowiem w wodzie mogą znajdować się morfologicznie identyczne pasożyty ludzi i zwierząt, które cechują się odmienną specyficnością żywicielską, inwazyjnością, antygenowością i wirulencją. Zarówno w obrębie rodzaju *Giardia*, jak i *Cryptosporidium* wyróżnia się szereg gatunków, które cechują się różnym kręgiem żywicieli. Rozpoznanie gatunku tych pasożytów jest bardzo trudne, ponieważ cysty lub oocysty większości gatunków mają taką samą budowę. Dalszym utrudnieniem jest ich znaczne zróżnicowanie genetyczne. Niektóre gatunki, grupy i podgrupy genotypów, a nawet subtypy *Giardia* i *Cryptosporidium* pasożytują tylko u określonych gatunków żywicieli, podczas gdy inne występują zarówno człowieka, jak i u licznych gatunków zwierząt. Zatem, samo wykrycie cyst *Giardia* i oocyst *Cryptosporidium* w wodzie lub innych próbach środowiskowych staje się niewystarczające, ponieważ może wiązać się z ponoszeniem ogromnych strat finansowych przez przedsiębiorstwa wodno-kanalizacyjne i agencje rządowe.

Stale zmieniające się poglądy na status taksonomiczny w obrębie rodzaju *Giardia* i *Cryptosporidium* doskonale ilustrują jak duży wpływ ma precyzyjna identyfikacja patogenu i/lub nazewnictwo na ustalanie norm prawnych, oszacowanie ryzyka zarażenia ludzi, dociekania epidemiologiczne, a szczególnie na ustalenie źródła zanieczyszczenia wody lub wystąpienia epidemii oraz na podjęcie wszelkich środków zapobiegawczych, a także na opracowanie wiarygodnych testów diagnostycznych.

## 2. Taksonomia i genetyczne zróżnicowanie *Giardia*

Wraz z rozwojem technik diagnostycznych oraz wykrywaniem tego pierwotniaka u różnych żywicieli, nomenklatura tego pasożyta stała się przedmiotem licznych kontrowersji.

Pierwotniaki z rodzaju *Giardia* znane są od ponad 300 lat, kiedy to w 1681 roku van Leeuwenhoek przedstawił pierwszy opis trofozoitów tego pasożyta [10]. Przez niemal 200 lat pasożyt ten był zapomniany. Dopiero w 1859 roku czeski lekarz Vilém Dušan Lambl ponownie odkrył i dokładnie scharakteryzował tego wiciowca nadając mu nazwę *Cercomonas intestinalis* [31]. W 1888 roku Blanchard stwierdził, że Lambl utworzył homonim, ponieważ wcześniej inny organizm został tak nazwany. Zatem, aby zlikwidować homonimie i uhonorować odkrycie Lambla, Blanchard utworzył nowy rodzaj

*Lamblia* i umieścił w nim tego wiciowca. Jednakże wcześniej - w 1882 roku Künstler wykrył tego samego wiciowca u kijanek i nazwał go *Giardia agilis*. W roku 1914 Alexeieff wykazał, że rodzaj *Giardia* był wcześniej opisany, a zatem zgodnie z zasadami Kodeksu Nomenklatury Zoologicznej prawidłową nazwą rodzajową jest *Giardia*, a nie *Lamblia*. W 1915 roku, Stiles uważając, że jest wiele nieporozumień dotyczących nazwy gatunkowej tego pasożyta nadał mu nową nazwę *Giardia lamblia* i tym samym jeszcze bardziej skomplikował nazewnictwo tego pasożyta.

Następnie, wraz z pojawianiem się coraz liczniejszych informacji o występowaniu tego pasożyta u ludzi i różnych zwierząt opisano ponad 40 gatunków *Giardia* [28]. Chociaż wiele z nich było morfologicznie identycznych, to wówczas uważano, że populacje *Giardia* są wysoce swoiste dla swoich żywicieli. Później, ze względu na gromadzące się dowody o braku specyficzności *Giardia* ta koncepcja nie była uznawana przez wielu badaczy. Toteż w 1952 roku, Filice na podstawie różnic w budowie trofozoitów wszystkie gatunki *Giardia* przydzielił do trzech grup morfologicznych: *G. agilis* (pasożyt płazów), *G. muris* (pasożyt gryzoni) i *G. duodenalis* (pasożyt człowieka i licznych gatunków zwierząt). Wkrótce większość badaczy zaczęła akceptować istnienie trzech morfologicznie odmiennych grup (gatunków) *Giardia*, ponieważ badania epidemiologiczne oraz wyniki licznych doświadczalnych krzyżowych zarażeń wskazywały na brak specyficzności żywicielskiej w obrębie trzech grup morfologicznych *Giardia* [2, 14, 19, 34, 54]. Później, dzięki wykorzystaniu nowych technik badawczych, z grupy morfologicznej *G. duodenalis* wyodrębniono kolejne gatunki - *G. psittaci* i *G. ardeae* - występujące u ptaków [12, 13] oraz *G. microti* - pasożyta normików i piżmaka [16]. Gatunki *Giardia* występujące u ptaków wyodrębniono na podstawie stwierdzenia subtelnych różnic w budowie trofozoitów widocznych w skaningowym mikroskopie elektrycznym oraz znacznych różnic genetycznych.

Aktualnie, w obrębie rodzaju *Giardia* akceptowanych jest 6 gatunków (Tabela 1), które cechują się różnym kręgiem żywicieli [38]. Spośród nich najwięcej kontrowersji wzbudza gatunek *G. duodenalis* występujący u ludzi i licznych gatunków zwierząt. Wyniki licznych badań wskazują, że jest to albo jeden gatunek charakteryzujący się dużą zmiennością wewnątrzgatunkową, albo też stanowi zbiór morfologicznie nierozróżnialnych gatunków. Ponadto, duże zamieszanie wprowadza synonimowe stosowanie trzech nazw tego pasożyta: *G. intestinalis*, *G. duodenalis* i *G. lamblia*. Chociaż według ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia prawidłową nazwą jest *G. intestinalis* [55], to jednak obecnie większość badaczy uznaje, że zgodnie z zasadami Kodeksu Nomenklatury Zoologicznej, prawidłową nazwą jest *G. duodenalis* [39].

Identyfikacja gatunku *Giardia* jest bardzo trudna. Cysty wydalane wraz z kałem żywiciela są najczęściej podstawą rozpoznania zarażenia. Jednak cysty większości gatunków *Giardia* mają taką samą budowę. Obecność morfologicznie identycznych cyst *Giardia* w próbach środowiskowych utrudnia dociekania epidemiologiczne, a także oszacowanie ryzyka zarażenia ludzi.

Tab. 1. Gatunki w rodzaju *Giardia*Tab. 1. Species in *Giardia* genus

Gatunek Species	Żywiciele Hosts	Morfologia cyst Cyst morphology
<i>G. duodenalis</i>	człowiek, wiele gatunków ssaków, ryby man, many species of mammals, fish	identyczne identical
<i>G. muris</i>	gryzonie rodents	
<i>G. agilis</i>	płazy amphibians	
<i>G. ardeae</i>	ptaki birds	
<i>G. psittaci</i>	ptaki birds	
<i>G. microti</i>	gryzonie rodents	zawierają w pełni zróżnicowane trofozoity cysts contain fully differentiated trophozoites

Jednak coraz powszechniejsze stosowanie technik molekularnych w badaniach tego pasożyta sprawiło, że zaczęły się gromadzić liczne dowody wskazujące na znaczne genetyczne zróżnicowanie *G. duodenalis*. Jedną z pierwszych publikacji na świecie dotyczyła analizy genomu kilkudziesięciu izolatów *Giardia*, uzyskanych od ludzi i różnych gatunków zwierząt z różnych regionów geograficznych, w tym także z Polski [23]. Genetyczna analiza wykazała, że większość izolatów *Giardia* uzyskanych od ludzi i zwierząt należy do dwóch zbiorów genotypów, które wówczas określono jako „polskie” i „belgijskie” [23]. Wraz z udoskonaleniem technik izolacji DNA pasożyta bezpośrednio z kału oraz z prób środowiskowych zaczęły pojawiać się liczne prace, które ponownie wskazywały, że większość izolatów *Giardia* uzyskanych od ludzi i zwierząt w różnych regionach geograficznych należy do dwóch głównych zbiorów genotypów, które są aktualnie nazwane jako zbiory genotypów A i B [35, 40]. Gromadzi się coraz więcej dowodów, że izolaty *G. duodenalis* uzyskane od ludzi i zwierząt z grupy B są bardziej zróżnicowane niż izolaty z grupy A [4, 25, 36]. Ponadto, na podstawie molekularnej charakterystyki izolatów *Giardia* uzyskanych z różnych gatunków zwierząt wykazano istnienie odrębnych genotypów, które charakteryzują się wąską specyficznością żywicielską [15, 24, 32, 38, 47]. Obecnie, w obrębie *G. duodenalis* wyróżnia się co najmniej 7 zbiorów genotypów (Tabela 2), ale nadal identyfikowane są nowe genotypy *Giardia*, które występują głównie u dziko żyjących zwierząt [1, 20].

Później, w obrębie niektórych grup genotypów *G. duodenalis* (A-F) wyodrębniono podgrupy, np. w zoonotycznych grupach genotypów A i B wyodrębniono odpowiednio

trzy (A1, A2 i A3) i dwie (B3 i B4) podgrupy, co przyczyniło się do dalszej komplikacji w określeniu ryzyka zarażenia ludzi [6, 37]. Tym bardziej, że u człowieka oraz u niektórych gatunków zwierząt mogą występować różne podgrupy *Giardia* i niektóre z nich wydają się być zaadaptowane tylko do określonych gatunków żywicieli, np. podgrupę A3 dotychczas wykryto jedynie u dziko żyjących jeleniowatych [5, 4, 29, 30, 38, 44, 49, 53]. Z czasem, na podstawie polimorfizmu pojedynczych nukleotydów w sekwencji markerów molekularnych (t. j. w sekwencji DNA pojedynczych genów) izolatów *Giardia*, zaczęto wyróżniać podtypy w obrębie podgrup genotypów tego pasożyta [4, 46].

Tab. 2. Genetyczne zróżnicowanie *G. duodenalis*

Tab. 2. Genetic variation of *G. duodenalis*

Zbiór genotypów Assemblages of genotypes	Żywiciele Hosts
A	człowiek, naczelne, psy i koty, zwierzęta hodowlane, gryzonie, dzikie ssaki, ryby humans, primates, dogs and cats, livestock, rodents, wild mammals, fish
B	człowiek, naczelne, psy, zwierzęta hodowlane, boby, szczur, niektóre gatunki dzikich ssaków, ryby humans, primates, dogs, livestock, beavers, rat, some species of wild mammals, fish
C i D	psy, inne psowate dogs, other canids
E	bydło i inne kopytne cattle and other hoofed livestock
F	koty cats
G	szczur, chomik rats, hamster

Istotną trudnością w interpretacji wyników genotypowania izolatów *Giardia* uzyskanych od ludzi i zwierząt jest także fakt, że większość badań zróżnicowania genetycznego *Giardia* była oparta na analizie pojedynczego markera molekularnego. Kiedy zaczęto charakteryzować poszczególne izolaty *Giardia* analizując jednocześnie sekwencje kilku markerów molekularnych, pojawiły się problemy z identyfikacją genotypu, np. genotypowanie izolatów *Giardia* uzyskanych od ludzi i zwierząt, oparte na analizie trzech markerów molekularnych (*tpi*, *gdh*, *ssrRNA*) wskazywało na ich przynależność do zbioru genotypów A, podczas gdy analiza innego markera (*bg*) klasyfikowała je do zbioru genotypów B [4]. Podobną niezgodność wyników genotypowania wykazywano we wcześniejszych badaniach izolatów *Giardia* uzyskanych od psów. W zależności od charakteryzowanego markera molekularnego, izolaty *Giardia* klasyfikowano jako nieinwazyjne dla człowieka genotypy C i D lub jako zbiór genotypów B, który charaktery-

zuje się zoonotyczną potencją [42, 49]. Wyniki tych badań mają niezmiernie istotne znaczenie w dociekaniach epidemiologicznych, ponieważ w zależności od użytego markera molekularnego można wyciągnąć odmienne wnioski dotyczące oszacowania ryzyka zarażenia człowieka.

Także dużą trudnością w porównywaniu wyników genotypowania *Giardia* jest wymienne stosowanie terminów „genotyp”, „podgrupa”, „subgenotyp”, „podtyp” i stosowanie niejednolitego nazewnictwa subgenotypów; ostatnio, aby uniknąć nieporozumień zaproponowano ujednoczenie tej terminologii; np. A wskazuje na grupę genotypów, cyfra rzymska (AI) na podgrupę genotypów, a następnie cyfry arabskie (AI-1, AI-2 itd.) na podtypy [4].

Zoonotyczny potencjał *G. duodenalis* może być określony na podstawie porównania genotypów pasożyta występujących u ludzi i zwierząt. Jednak, mając na uwadze wyżej przedstawione trudności w interpretacji wyników genotypowania, należy poprzez porównanie z sekwencjami referencyjnych szczepów ustalić kolejno: w pierw przynależność sekwencji każdego markera molekularnego badanego izolatu do grupy genotypów (A-G) [38]; potem, przynależność do podgrupy genotypów poprzez identyfikację polimorfizmu pojedynczych nukleotydów w badanych sekwencjach [4], a następnie rozpoznać podtyp na podstawie podobieństwa sekwencji [4, 18] i dopiero wtedy, na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzić kompleksową analizę markerów molekularnych [46]. Jedynie w taki sposób przeprowadzone badania izolatów *Giardia* uzyskanych od ludzi i różnych gatunków zwierząt umożliwią określenie roli zwierząt w szerzeniu giardiozy u ludzi.

Przyjmując powyższe założenia, ostatnio przeprowadzono analizę sekwencji czterech markerów molekularnych (SSU-rDNA, *bg*, *tpi*, *gdh*) 2476 izolatów *Giardia* uzyskanych od ludzi, zwierząt i z prób środowiskowych [46]. Wyniki tych rozległych badań wskazują na różny potencjał zoonotyczny izolatów *Giardia* w zależności od badanego poziomu genetycznego zróżnicowania oraz od liczby markerów molekularnych.

Kiedy analizowano sekwencję każdego markera na poziomie grupy genotypów, to okazało się, że u ludzi najczęściej wykrywano zbiór B (56%) i A (43%) oraz bardzo rzadko zbiór C (0.1%), D (0.2%), E (0.2%) i F (0.2%). Zatem, po raz pierwszy wykazano, że nie tylko zbiory genotypów *G. duodenalis* A i B powodują inwazję u ludzi, ale także zbiory C-F mają taką możliwość. Grupę genotypów A wykrywano także często u zwierząt hodowlanych, domowych i dzikich oraz w próbach wody. Natomiast zbiór genotypów B sporadycznie identyfikowano u zwierząt hodowlanych i domowych oraz ponad dwukrotnie rzadziej u zwierząt dzikich i w próbach wody niż zbiór A. Występowanie pozostałych zbiorów genotypów (C-G) było zgodne z wcześniejszymi wynikami badań (patrz Tabela 2).

Kiedy przeprowadzono bardziej wnikliwą analizę tych sekwencji na poziomie podgrupy genotypów, to wykazano, że do podgrupy AI należy około 75% izolatów *G. duodenalis* od zwierząt hodowlanych i domowych oraz 25% izolatów od ludzi. Odwrotną sytuację stwierdzono odnośnie przynależności do podgrupy AII; w tej podgrupie znalazła się większość izolatów od ludzi (75%) i 25% izolatów od zwierząt. Natomiast do podgrupy AIII należały głównie izolaty od dzikich zwierząt, kilka od bydła i pojedynczy izolat od kota. Podobną częstość występowania ludzkich i zwierzęcych izolatów *G. duodenalis* stwierdzono w podgrupach BIII i BIV. Zatem na tym poziomie zróżnicowania genetycznego można przyjąć, że izolaty *Giardia* należące do podgrupy AI, AII, BIII i BIV mają potencjał zoonotyczny, podczas gdy izolaty z podgrupy AIII są inwazyjne tylko dla zwierząt.

Kiedy jednak przeprowadzono jeszcze bardziej wnikliwą analizę sekwencji każdego markera molekularnego, to okazało się, że liczba podtypów *Giardia* zależała od badanego genu; np. w locus SSU-rDNA wyróżniono 15 podtypów w grupie genotypów A, w tym tylko pięć wykrywano zarówno u ludzi i zwierząt, siedem tylko u zwierząt, a trzy pozostałe stwierdzano tylko u ludzi. Także w loci pozostałych trzech genów (*bg*, *tpi*, *gdh*) stwierdzono od 3 do 18 podtypów w grupie genotypów A i B i wszystkie miały potencjał zoonotyczny. Podtypy określono także w grupach genotypów C do F. Podtypy z grup A-E wykryte dotychczas w pojedynczych przypadkach u ludzi były odmienne od tych stwierdzanych u zwierząt. Natomiast w grupie F stwierdzono kilkanaście identycznych podtypów *G. duodenalis* u ludzi i kotów. Kiedy jednak analizowano jednocześnie różne kombinacje dwóch lub trzech markerów molekularnych liczba potencjalnie zoonotycznych podtypów znacząco malała; np. analiza dwóch markerów nadal wykazywała obecność zoonotycznych podtypów w obrębie grupy A i B, ale kiedy jednocześnie analizowano trzy markery molekularne, to stwierdzono jedynie dwa zoonotyczne podtypy w grupie genotypów A. Zatem, wyniki tych wskazują, że zwierzęta odgrywają niewielką rolę w szerzeniu giardiozy u ludzi. Jakkolwiek nie można wykluczyć, że wniosek ten jest zbyt pochopny, ponieważ większość izolatów *Giardia* uzyskanych od zwierząt genotypowano na podstawie sekwencji jednego lub dwóch markerów molekularnych. Ponadto, mimo że liczne badania wskazują na znaczne zróżnicowanie genetyczne izolatów *Giardia*, to jednak należy pamiętać, że ta heterogeniczność dotyczy niewielkich fragmentów genomu tego pasożyta, które nie muszą odpowiadać za jego inwazyjność. Potwierdzeniem jest fakt zarażenia ochotnika izolatem *Giardia* z grupy genotypów B uzyskanym od wielkoszczura [34]. Określenie podtypu tego izolatu nie było wówczas możliwe, ze względu na brak dostępnych obecnie metod. Nie mniej, wykazano, że transmisja *Giardia* między zwierzęciem a człowiekiem jest możliwa.

### 3. Taksonomia i genetyczne zróżnicowanie *Cryptosporidium*

Badania dotyczące *Cryptosporidium* mają trzykrotnie krótszą historię niż badania nad *Giardia*. Mimo to, nomenklatura tego pasożytniczego pierwotniaka jest tak samo skomplikowana, jak w przypadku *Giardia*.

W 1907 roku amerykański parazytolog Ernest Tyzzer po raz pierwszy opisał stadia rozwojowe pierwotniaka, które wykrył w gruczołach żołądkowych laboratoryjnych myszy, lecz dopiero w 1910 roku nadał mu nazwę rodzajową i gatunkową – *C. muris* [50, 51]. W 1912 roku Tyzzer opisał nowy gatunek – *C. parvum*, który w odróżnieniu od *C. muris* rozwija się tylko w komórkach nabłonkowych jelita cienkiego i ma mniejsze oocysty [52]. Przez kilka dziesięcioleci *Cryptosporidium* uważano za mało znaczącego i rzadkiego pasożytniczego pierwotniaka wewnątrzkomórkowego. Jakkolwiek w tym okresie sporadycznie wykrywano *Cryptosporidium* w układzie pokarmowym różnych zwierząt i często na tej podstawie opisywano nowe gatunki tego pasożyta. Podobnie, jak w przypadku *Giardia*, z czasem liczba i nazewnictwo gatunków w rodzaju *Cryptosporidium* ulegały stałym zmianom. Rozpoznanie gatunku *Cryptosporidium* jest również trudne, ponieważ wielkość oocyst większości gatunków jest taka sama lub bardzo zbliżona (Tabela 3). Stąd też obecna klasyfikacja gatunków oparta jest na nie tylko na cechach fenotypowych, ale i genotypowych.

Rozwój technologii molekularnych doprowadził do znaczącej poprawy jakości i czułości testów diagnostycznych, genetycznej charakterystyki oraz taksonomicznej klasyfi-

kacji gatunków *Cryptosporidium*. Kategoryzacja gatunków, genotypów i podtypów *Cryptosporidium* oparta jest głównie na technikach PCR wykorzystujących specyficzne pary starterów do amplifikacji jednego lub więcej markerów molekularnych; następnie produkty amplifikacji są analizowane przy zastosowaniu techniki RFLP i s/lub sekwencjonowania. Chociaż do identyfikacji *Cryptosporidium* wykorzystywano różne markery molekularne (m.in. SSU rRNA, *hsp70*, rDNA, *gp60*), to najczęściej wykorzystywanym w badaniach epidemiologicznych i genetyce populacyjnej tego pasożyta jest gen *gp60*, o czym świadczy znaczna liczba sekwencji tego genu, które zdeponowano w Banku Genów NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Aktualnie w obrębie tego rodzaju akceptowanych jest 20 gatunków (Tabela 3) [45]. U ludzi najczęściej występuje *C. parvum* i *C. hominis* [7]. Wraz z udoskonaleniem technik umożliwiających precyzyjną identyfikację gatunku, u ludzi zaczęto także wykrywać inwazje wywołane przez inne gatunki *Cryptosporidium*: *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. andersoni* i *C. suis*, a także przez genotypy charakterystyczne dla jeleni, małą, królików, koni, skunksów i pręgowców [7, 17, 26, 45, 56].

Przeprowadzona ostatnio kompleksowa analiza 2663 sekwencji fragmentu genu *gp60* izolatów *Cryptosporidium* uzyskanych z od ludzi i zwierząt z 51 krajów wykazały istnienie 6 odmiennych grup podtypów *C. hominis* (Ia, Ib, Id, Ie, If, Ig) i 10 grup *C. parvum* (IIa-IIk), przy czym każda z tych grup zawiera jeden do kilkudziesięciu podtypów [26].

Dominującą grupą podtypów *C. hominis* jest Ib (72%), której występowanie stwierdzono w 36 krajach z 51 badanych. Natomiast pozostałe grupy podtypów *C. hominis* występowały rzadko i były mniej rozpowszechnione: Ia (10% w 17 krajach), Id (8.4% w 16 krajach), Ie (7.7% w 14 krajach), If (1.6% w 9 krajach), Ig (0.2% w 2 krajach) [26]. Ponadto, wykazano, że spośród 12 podtypów w grupie Ib, podtyp IbA10G2R2 jest najczęstszy (88.5%) i jego występowanie stwierdzono w 28 krajach wszystkich kontynentów, za wyjątkiem Ameryki Południowej. Podtyp IbA10G2R2 związany jest z kryptosporydiozą u ludzi i bydła oraz z wieloma wodnopochodnymi epidemiemi kryptosporydiozy w U.S.A i Europie [9, 21, 22, 26, 33, 48]. Ten podtyp jest także najczęściej wykrywany w surowych ściekach w Milwaukee, nawet 10 lat po wybuchu największej wodnopochoдной epidemii kryptosporydiozy [57].



Tab. 3. Gatunki w rodzaju *Cryptosporidium* [45]Tab. 3. Species in *Cryptosporidium* genus [45]

Gatunek Species	Główny żywiciel Major hosts	Pomocniczy żywiciel Minor hosts	Wielkość oocyst ( $\mu\text{m}$ ) Size of oocysts
<i>C. hominis</i>	człowiek humans	diugon, owce, bydło dugong, sheep, cattle	4.5 x 5.5
<i>C. parvum</i>	bydło i inne kopytne, człowiek cattle and other hoofed livestock, humans	jeleń, myszy, świnię deer, mice, pigs	4.5 x 5.5
<i>C. meleagridis</i>	indyk, człowiek turkey, humans	papugi	4.0-4.5 x 4.6-5.2
<i>C. canis</i>	psy dogs	człowiek humans	4.9 x 4.7
<i>C. felis</i>	koty cats	człowiek, bydło humans, cattle	4.5 x 5.0
<i>C. suis</i>	świnie pigs	człowiek humans	4.4-4.9 x 4.0-4.3
<i>C. wrairi</i>	świnka morska guinea pig	?	4.9-5.0 x 4.8-5.6
<i>C. muris</i>	gryzonie rodents	człowiek, góralek przyład- kowy, kozioł śnieżny humans, rock hyrax, mountain goat	5.6 x 7.4
<i>C. andersoni</i>	bydło, wielbłąd cattle, camel	owce sheep	5.6 x 7.4
<i>C. bovis</i>	bydło cattle	owce sheep	4.7-5.3 x 4.2-4.8
<i>C. ryanae</i>	bydło cattle	?	2.9-4.1 x 2.9-3.7
<i>C. xiaoi</i>	owce sheep	?	2.9-4.4 x 2.9-4.4
<i>C. fayeri</i>	kangur rudy red kangaroo	?	4.5-5.1 x 3.8-5.0
<i>C. macropodum</i>	kangur olbrzymi Eastern grey kangaroo	?	4.5-6.0 x 5.0-6.0
<i>C. baileyi</i>	drób poultry	przepiórki, strusie, kaczki quails, ostriches, ducks	4.6 x 6.2
<i>C. galli</i>	zięby, kurczęta finches, chicken	?	8.3 x 6.3
<i>C. serpentis</i>	jaszczurki, węże lizards, snakes	?	5.6-6.6 x 4.8-5.6
<i>C. varanii</i>	jaszczurki lizards	węże snakes	4.2-5.2 x 4.8-5.6
<i>C. molnari</i>	ryby fish	?	4.7 x 4.5
<i>C. scopthalmi</i>	ryby fish	?	3.7-5.0 x 3.0-4.7

Co ciekawe, dwie kolejne, najczęściej występujące grupy podtypów Ia i Id *C. hominis* są najbardziej zróżnicowane i w ich obrębie wykazano istnienie odpowiednio - 25 i 23 podtypów, spośród których dwa podtypy są dominujące: IaA12G1R1 i IdA15G1R1 [26].

Z kolei kompleksowa analiza sekwencji genu *gp60* *C. parvum* wykazała, że dominującą grupą podtypów jest grupa IIA (58%), która jednocześnie jest najbardziej zróżnicowana [26]. Grupa IIA zawiera 50 podtypów, spośród których dwa podtypy IIA16G2R1 (43%) i IIA19G3R1 (25%) są dominujące u ludzi i zwierząt we wszystkich regionach geograficznych, co wskazuje na ich zoonotyczną potencję. Grupa IIc zawiera 1 podtyp (IIcA5G3R2), który wykrywano wyłącznie u ludzi w 11 krajach, natomiast pozostałe grupy (IIb, IIe-IIk) są słabo zróżnicowane i rzadko wykrywane u ludzi [26].

Chociaż w ostatnim czasie dokonano znacznego postępu w poznaniu różnorodności genetycznej dwóch najczęstszych gatunków *Cryptosporidium* (*C. hominis* i *C. parvum*) wykrywanych u ludzi, to jednak realny rozmiar różnorodności genetycznej tych pasożytów nie jest jeszcze w pełni poznany. Nadal są opisywane nowe genotypy lub subtypy tego pasożyta, np. w tym roku opisano nowe genotypy *Cryptosporidium* u jeży europejskich i u ryb (*Mugils cephalus*), lecz ich zoonotyczna potencja nie jest jeszcze znana [11, 43]. Wydaje się, że specyficzność żywicielska nie jest stałą cechą fenotypową, o czym świadczy ostatnio opisana wodnopochozna epidemia, która była wywołana przez genotyp *Cryptosporidium* charakterystyczny dla królików [8].

## 4. Podsumowanie

Poglądy odnośnie inwazyjności dla ludzi różnych gatunków, genotypów lub podtypów *Giardia* i *Cryptosporidium* zmieniały się w szybszym tempie niż podejmowane decyzje prawne związane z kontrolowaniem tych pasożytów. Według obecnie obowiązujących norm, wszystkie wykryte oocysty lub cysty są potencjalnie inwazyjne dla ludzi i woda pitna jest często uzdatniana w celu usunięcia tego zagrożenia [3]. Stąd też, przedsiębiorstwa wodno-kanalizacyjne ponoszą olbrzymie nakłady finansowe wynikające z przestrzegania ustaw, które nie odzwierciedlają aktualnych informacji badań naukowych wskazujących, które gatunki i/lub podtypy *Giardia* i *Cryptosporidium* są inwazyjne dla ludzi. Zmieniające się poglądy na status taksonomiczny tych pasożytów powodują także konieczność zmiany opisów testów diagnostycznych lub leków, jak również sprawdzenia ich wiarygodności lub skuteczności, co także wiąże się z dużymi nakładami finansowymi.

Wraz z rozwojem technik molekularnych można się spodziewać, że nazwy tych pasożytów będą się zmieniały do czasu, kiedy zostanie osiągnięty konsensus i bardzo prawdopodobne wydaje się, że zostaną opisane nowe gatunki *Cryptosporidium* i *Giardia*. Chociaż zmieniające się poglądy na status taksonomiczny w obrębie obu rodzajów tych patogenów mogą początkowo przyprawić o zawrót głowy, to - podobnie jak w przypadku składania rozrzuconych puzzli, w końcu uzyskany zostanie pełen obraz. W osiągnięciu tego celu pomocne będą nowe technologie molekularne, takie jak: real-time PCR, mikromacierze lub platforma 454 o wysokiej wydajności sekwencjonowania oraz metody bioinformatyczne, które umożliwią analizę porównawczą sekwencji dziesiątek lub setek markerów molekularnych izolatów *Giardia* i *Cryptosporidium* uzyskanych od ludzi i zwierząt z różnych regionów geograficznych. Jednak nadal dużym wyzwaniem w oszacowaniu zagrożenia zdrowia publicznego pozostanie opracowanie wiarygodnych i szybkich testów określających żywotność i inwazyjność stadiów dyspersyjnych tych pierwotniaków.

## Bibliografia

- [1] Adams P., Monis P., Elliot A., and Thompson R. Cyst morphology and sequence analysis of the small subunit rDNA and efl alpha identifies a novel *Giardia* genotype in a quenda (*Isoodon obesulus*) from Western Australia. *Infect. Genet. Evol.*, 2004, 4, 365–367
- [2] Belosevic M., Faubert G.M., Guy R., and MacLean J.D. Observations on natural and experimental infections with *Giardia* isolated from cats. *Can. J. Comp. Med.*, 1984, 48, 241-244
- [3] Bowman D.D. What's in a name? *Trends Parasitol.*, 2005, 21, 267-269
- [4] Cacciò S.M., Beck R., Lalle M., Marinculic A., and Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblage A and B. *Int. J. Parasitol.*, 2008, 38, 1523-1531
- [5] Cacciò S.M., De Giacomo M., and Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int. J. Parasitol.*, 2002, 32, 1023-1030
- [6] Cacciò S.M. and Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2008, 160, 75-80
- [7] Cacciò S.M., Thompson A.R.C., McLauchlin J., and Smith H.V. Unraveling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.*, 2005, 21, 430-437
- [8] Chalmers R.M., Robinson G., Elwin K., Xiao L., Ryan U., Modha D., and Mallaghan C. *Cryptosporidium* sp. rabbit genotype, a newly identified human pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, 15, 829-830
- [9] Cohen S., Dalle F., Gallay A., Di Palma M., Bonnin A., and Ward H.D. Identification of Cpg40/15 Type Ib as the predominant allele in isolates of *Cryptosporidium* spp. from waterborne outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44, 589-591
- [10] Dobell C. Anthony van Leeuwenhoek and his "little animals". Dover Publications, New York, p. 224, 1932.
- [11] Dyachenko V., Kuhnert Y., Schmaeschke R., Etzold M., Pantchev N., and Daugschies A. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. genotypes in European hedgehogs (*Erinaceus europaeus* L.) in Germany. *Parasitology*, 2010, 137, 205-216
- [12] Erlandsen S.L. and Bemrick W.J. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J. Parasitol.*, 1987, 73, 623-629
- [13] Erlandsen S.L., Bemrick W.J., Wells C.L., Feely D.E., Knudson L., Campbell S.R., Van Keulen H., and Jarroll E.L. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *J. Parasitol.*, 1990, 76, 717-724
- [14] Erlandsen S.L., Sherlock L.A., Januschka M., Schupp D.G., Schaefer F.W., Jakubowski W., and Bemrick W.J. Cross-species transmission of *Giardia* spp.: inoculation of beavers and muskrats with cysts of human, beaver, mouse, and muskrat origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54, 2777-2785

- [15] Ey, P., Mansouri M., Kulda J., Nohynkova E., Monis P.T., Andrews R.H., and Mayrhofer G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J. Euk. Microbiol.*, 1997, 44, 626-635
- [16] Feely, D.E. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. *J. Protozool.*, 1988, 35, 52-54
- [17] Feltus D.C., Giddings C.W., Schneck B.L., Monson T., Warshauer D., and McEvoy J.M. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44, 4303-4308
- [18] Feng Y., Ortega Y., Cama V., Terrel J., and Xiao L. High intragenotypic diversity of *Giardia duodenalis* in dairy cattle on three farms. *Parasitol. Res.*, 2008, 103, 87-92
- [19] Gasser R.B., Eckert J., and Rohrer L. Infectivity of Swiss *Giardia* isolates to birds and mice, and *in vitro* cultivation of trophozoites originating from sheep. *Parasitol. Res.*, 1987, 74, 103-111
- [20] Gaydos J.K., Miller W.A., Kreuder-Johnson C., Zornetzer H., Melli A.C., Packham A.E., Jeffries J., Lance M.M., and Conrad P.A. Novel and canine genotypes of *Giardia duodenalis* in Harbour Seals (*Phoca vitulina richardsi*). *J. Parasitol.*, 2008, 94, 1264-1268
- [21] Glaberman S., Moore J.E., Lowery C.J., Chalmers R.M., Sulaiman I., Elwin K., Rooney P., Millar C., Dooley J., Lal A.A., and Xiao L. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002, 8, 631-633
- [22] Goldstain S. T., Juranek D.D., Ravenholt O., Hightower A.W., Martin D.G., Mesnik J.L., Griffiths S.D., Bryant A.J., Reich R.R., and Herwaldt B.L. Cryptosporidiosis: an outbreak associated with drinking water despite state-of-the-art water treatment. *Ann. Intern. Med.*, 1996, 124, 459-468
- [23] Homan W.L., van Enkevort F.H.J., Limper L., van Eys G.J.J.M., Schoone G.J., Kasprzak W., Majewska A.C., and van Knapen F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol. Res.*, 1992, 78, 316-323
- [24] Hopkins R.M., Constantine C.C., Groth D.A., Wetherall J.D., Reynoldson J.A., and Thompson R.C. PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intragenic rDNA spacer. *Parasitology*, 1999, 118, 531-539
- [25] Hopkins R.M., Meloni B.P., Groth D.M., Wetherall J.D., Reynoldson J.A., and Thompson R.C.A. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolated recovered from humans and dogs living in the same locality. *J. Parasitol.*, 1997, 83, 44-51
- [26] Jex A. R. and Gasser R. B. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies – Research review. *Biotechnol. Adv.*, 2010, 28, 17-26
- [27] Karanis P. A review of an emerging waterborne medical important parasitic protozoan. *Jpn. J. Protozool.*, 2006, 39, 5-19

- [28] Kulda J. and Nahýnková E. Flagellates of the human intestine and the intestines of other species. In: *Parasitic protozoa Academic Press*, NY, 2, 1-138, 1978
- [29] Lalle M., Frangipane di Regalbono A., Poppi L., Nobili G., Tonanzi D., Pozio E., and Cacciò S.M. A novel *Giardia duodenalis* assemblage A subtype in fallow deer. *J. Parasitol.*, 2007, 93, 426-428
- [30] Lalle M., Pozio E., Capelli G., Bruschi F., Crotti D., and Cacciò S.M. Genetic heterogeneity at the  $\beta$ -*giardin* locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int. J. Parasitol.*, 2005, 35, 207-213
- [31] Lambl D.W. Mikroskopische Untersuchungen der Darmexcrete. *Vierteljahrsschr. Prakt. Heilk.*, 1859, 61, 1-58
- [32] Leonhard S., Pfister K., Beelitz P., Wielinga C., and Thompson R.C. The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Vet. Parasitol.*, 2007, 150, 33-38
- [33] MacKenzie W.R., Schell W.L., Blair K.A., Addiss D.G., Peterson D.E., Hoxie N.J., Kazmierczak J.J., and Davis J.P. Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin. Infect. Dis.*, 1995, 21, 57-62
- [34] Majewska A.C. Successful experimental infection of a human volunteer and *Mongolian gerbils* with *Giardia* of animal origin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 88, 360-362
- [35] Mayrhofer, G., Andrews R.H., Ey P.L., and Chilton N. B. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*, 1995, 111, 11-17
- [36] Meloni B.P., Lymbery A.J., and Thompson R.C. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *J. Parasitol.*, 1995, 81, 368-383
- [37] Monis P.T., Andrews R.H., Mayrhofer G., and Ey P.L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol. Biol. Evol.*, 1999, 16, 1135-1144
- [38] Monis P.T., Andrews R.H., Mayrhofer G., and Ey P.L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect. Genet. Evol.*, 2003, 3, 29-38
- [39] Monis P.T., Caccio S. M., and Thompson R.C.A. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.*, 2009, 25, 93-100
- [40] Monis P.T., Mayrhofer G., Andrews R.H., Homan W.L., Limper L., and Ey P.L. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology*, 1996, 112, 1-12
- [41] Monis P.T. and Thompson R.C.A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infect. Genet. Evol.*, 2003, 3, 233-244

- [42] Read C.M., Monis P.T., and Thompson R.C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.*, 2004, 4, 125-130
- [43] Reid A., Lymbery A., Ng J., Tweedle S., and Ryan U. Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in marine fish. *Vet. Parasitol.*, 2010, 168, 190-195
- [44] Robertson L.J., Forberg T., Hermansen L., Hammes I.S., and Gjerde B. *Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic characterization by PCR-RFLP and sequence analysis at two genes. *J. Wildl. Dis.*, 2007, 43, 576-585
- [45] Smith H.V. and Nichols R.A.B. *Cryptosporidium*: detection in water and food. *Exp. Parasitol.*, 2010, 124, 61-79
- [46] Sprong H., Caccio S.M., van der Giessen J.W.B., on behalf of the ZOOPNET network and partners. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2009, 3, e558, doi:10.1371/journal.pntd.0000558
- [47] Sulaiman I.M., Fayer R., Bern C., Gilman R.H., Trout J.M., Schantz P.M., Das P., Lal A.A., and Xiao L. Triosephosphate isomerase gene characterisation and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, 9, 1444-1452
- [48] Sulaiman I.M., Lal A.A. and Xiao L.A. A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2001, 24S-27S
- [49] Traub R.J., Monis P.T., Robertson I., Irwin P., Mencke N., and Thompson R.C.A. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology*, 2004, 128, 253-262
- [50] Tyzzer E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1907, 5, 12-13
- [51] Tyzzer E.E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.*, 1910, 23, 487-509
- [52] Tyzzer E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.*, 1912, 26, 394-412
- [53] van der Giessen J.W., de Vries A., Roos M., Wielinga P., Kortbeek L.M., and Mank T.G. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int. J. Parasitol.*, 2006, 36, 849-858
- [54] Woo P.T. and Paterson W.B. *Giardia lamblia* in children in day-care centers in southern Ontario, Canada, and susceptibility of animals to *G. lamblia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1986, 80, 56-59
- [55] World Health Organization. Parasitic zoonoses. Report of WHO Expert committee with the participation of FAO. Technical report series no. 637, 1979
- [56] Xiao L., Fayer R., Ryan U., and Upton S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, 17, 72-97
- [57] Zhou L., Singh A., Jiang J., and Xiao L. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41, 5254-5257