

# Giardioza dróg żółciowych u szopów praczy (*Procyonlotor*)

KLAUDIUSZ SZCZEPANIAK<sup>1</sup>, KRZYSZTOF TOMCZUK<sup>1</sup>, ŁUKASZ ULBRYCH<sup>2</sup>,  
PRZEMYSŁAW ZIĘBA<sup>3</sup>, MARIA STUDZIŃSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Parazytologii i Chorób Ryb, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin

<sup>2</sup>Park Narodowy „Ujście Warty”, Chyrzyno 1, 69-113 Chyrzyno

<sup>3</sup>Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Droga Męczenników Majdanka 50, 20-325 Lublin

Otrzymano 24.04.2023

Zaakceptowano 11.05.2023

## Szczepaniak K., Tomczuk K., Ulbrych Ł., Zięba P., Studzińska M. Biliarygiardiasis in raccoons (*Procyonlotor*)

### Summary

Giardiasis is one of the most significant gastrointestinal diseases caused by a cosmopolitan protozoa *Giardia duodenalis*. The infection occurs in many animals, including wild raccoons (*Procyonlotor*), that may play a role in disseminating *Giardia* cysts into the environment and transmitting it to humans and domestic animals. Giardiasis has various clinical manifestations, including diarrhea, abdominal cramps, and upset stomach or nausea. Active trophozoites normally attach to the mucous membrane of the duodenum and upper jejunum, however few cases of biliarygiardiasis have been reported in humans. The aim of this study was to analyze the occurrence of *Giardia* localization in the gall bladder of raccoons. Bile and feces samples collected from each of the 34 test animals were used for the study. *Giardia* specific antigen was detected by a rapid immunochromatographic test using stool and bile samples. The overall prevalence was 38.2% (13/34, 95% CI, 21.0-55.4%). Positive results were obtained from 8 stool samples 23.5% (95% CI, 8.5-38.6%) and 13 bile samples 38.2% (95% CI, 21.0-55.4%). In all stool-positive raccoons, the infestation was confirmed by bile examination. In five cases a positive result was obtained only from the bile sample. The detection of the specific antigen GSA65 in the bile of the studied raccoons confirms that, similarly to humans, also in animals in the course of *Giardia* infection trophozoites can be localized both in the intestine and in the bile ducts.

**Keywords:** biliarygiardiasis, gallbladder, animals, raccoons

Giardioza (lamblioza) to choroba pasożytnicza układu pokarmowego ludzi oraz wielu gatunków zwierząt. Zakażenia pierwotniakami z rodzaju *Giardia* są jedną z najczęstszych przyczyn tzw. chorób przenoszonych przez wodę (water borne diseases) lub żywność (food borne diseases) na świecie. Globalnie co roku odnotowuje się ponad 300 milionów przypadków zachorowań wśród ludzi, przypuszcza się jednak, że dane te mogą być niedoszacowane, ponieważ znaczna część inwazji ma przebieg skąpo objawowy lub bezobjawowy i nie jest diagnozowana (9, 16).

Według danych agencji rządu federalnego Stanów Zjednoczonych – Centrum Kontroli i Prewencji Chorób (CDC), w 2019 r. (ostatnia aktualizacja sprawozdania) częstość występowania lambliozy wahała się od 4,4 przypadków na 100 000 mieszkańców na południu do 7,6 przypadków na 100 000 mieszkańców na północnym wschodzie USA (4). Natomiast według najnowszego raportu Europejskiego Centrum ds.

Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC), w 2019 r. w UE zgłoszono 18 004 potwierdzonych przypadków lambliozy. Średni wskaźnik zgłoszeń przypadków na 100 000 mieszkańców UE wyniósł 5,2 (5). Ostatnie dane opublikowane w biuletynie rocznym Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH z 2021 r. wykazały 559 odnotowanych przypadków giardiozy w Polsce a zapadalność na 100 000 mieszkańców wyniosła 1,5% ([wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2021/Ch\\_2021.pdf](http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2021/Ch_2021.pdf)). W krajach rozwijających się lamblioza jest trzecim pod względem częstości występowania czynnikiem etiologicznym biegunek u dzieci, po rotawirusach i kryptosporydiozie, ze średnią eksten-sywnością zarażeń wśród dzieci poniżej 5. roku życia od 2% do 7% (9, 16). Giardioza jest także najczęściej występującą inwazją pasożytniczą psów i kotów z globalną prevalencją na poziomie 15,2% u psów i 12% u kotów (3, 11). W praktyce weterynaryjnej inwazja głównie łączona jest z postacią jelitową, w trakcie



Ryc. 1. Odłowiony osobnik szopa pracza (*P. lotor*)

której trofozoity *Giardia* uszkodzają śluzówkę dwunastnicy, prowadząc do uporczywych biegunk, zaburzeń wchłaniania, utraty masy ciała. Pojedyncze doniesienia (medyczne) potwierdzają także pozajelitową lokalizację pasożyta w drogach żółciowych u ludzi, prowadzącą do przewlekłego zapalenia pęcherzyka żółciowego, kamicy pęcherzyka żółciowego, zaburzeń wchłaniania tłuszczu (1-3, 7, 8, 10).

Celem pracy było zbadanie występowania pierwotniaków z rodzaju *Giardia* w drogach żółciowych u zwierząt na przykładzie szopa pracza oraz możliwości użycia komercyjnych testów immunochromatograficznych w diagnostyce giardiozy u *Procyon lotor*.

### Materiał i metody

Badanie przeprowadzono na 34 szopach, 19 samcach i 15 samicach w różnym wieku. Szopy jako gatunek inwazyjny, zagrażający ptakom na terenie Parku Narodowego „Ujście Warty” były odławiane i poddawane eutanazji. Zwłoki zwierząt tuż po eutanazji były zamrażane z przeznaczeniem do wykorzystania w badaniach naukowych. Odłowu dokonywali pracownicy Parku Narodowego „Ujście Warty” w ramach projektu rozpoczętego w 2011 r. „Ochrona ptaków wodnych i błotnych w pięciu parkach narodowych – odtworzenie siedlisk i ograniczanie wpływu inwazyjnych gatunków” finansowanego ze środków Komisji Europejskiej i Narodowego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej w ramach programu LIFE+ PL/NAT/000263 „Polskie Ostoje Ptaków”.



Ryc. 2. Wątroba z wypełnionym pęcherzykiem żółciowym w badaniu sekcyjnym *P. lotor*



Ryc. 3. Wyizolowana wątroba wraz z pęcherzykiem żółciowym od *P. lotor*

Przed badaniami sekcyjnymi wszystkie zamrożone zwłoki dodatkowo były poddane mrożeniu w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$  przez okres 14 dni jako metodzie bioasekuracji przed możliwą inwazją *Echinococcus multilocularis*. Do badań wykorzystano próbki żółci i kału pobrane od każdego z badanych osobników. Żółć uzyskiwano przez punkcję pęcherzyka żółciowego podczas sekcji, natomiast kał izolowano z prostnicy sekcjonowanych zwierząt (ryc. 1, 2, 3). Zastosowano metody mikroskopowe: flotację w roztworze nasycenym siarczanu cynku oraz metodę rozmazu bezpośredniego, a także badanie z wykorzystaniem immunochromatograficznych testów antygenowych RIDASCREEN® *Giardia*.

(R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Testy wykonano zgodnie z zaleceniami producenta dla 50 mg próbek kału oraz w modyfikacji polegającej na użyciu do badania 100  $\mu$ l (dwie krople) żółci zamiast kału.

Wyniki badania poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem pakietu statystycznego Dell Inc. (2016) Dell Statistica (data analysis software system), version 13. Dla uzyskanych wyników wyliczono średnią –  $\bar{x}$ , odchylenie standardowe – SD oraz przedział ufności średniej – CI  $\pm$  95%. Statystyczne różnice pomiędzy wartościami ekstensywności poszczególnych inwazji zostały potwierdzone przy pomocy testu t-Studenta dla prób niezależnych, z przyjętym poziomem istotności  $p \leq 0,05$ . Rozkład danych testowano testem normalności Kołmogorowa-Smirnowa i Lillieforsa.

### Wyniki i omówienie

W badaniach mikroskopowych nie wykryto obecności form dyspersyjnych *Giardia*. Wyniki pozytywne wskazujące na występowanie inwazji uzyskano w badaniach z użyciem testów antygenowych. Ogólna ekstensywność inwazji pierwotniaków z rodzaju *Giardia* w tych badaniach wyniosła 38,2% (13/34, 95% CI, 21,0-55,4%). Wynik pozytywny uzyskano w odniesieniu do 8 próbek kału 23,5% (95% CI, 8,5-38,6%) oraz z 13 próbek żółci 38,2% (95% CI, 21,0-55,4%). U wszystkich szopów z dodatnim wynikiem badania kału inwazję potwierdzono w badaniu żółci. W przypadku 5 osobników wynik pozytywny uzyskano wyłącznie z żółci, przy wyniku negatywnym próbki kału (ryc. 4). Inwazję stwierdzono u 8 samców (42,1%, 95% CI; 17,7-66,6%) i 5 samic (33,3%, 95 CI; 6,3-60,4%).

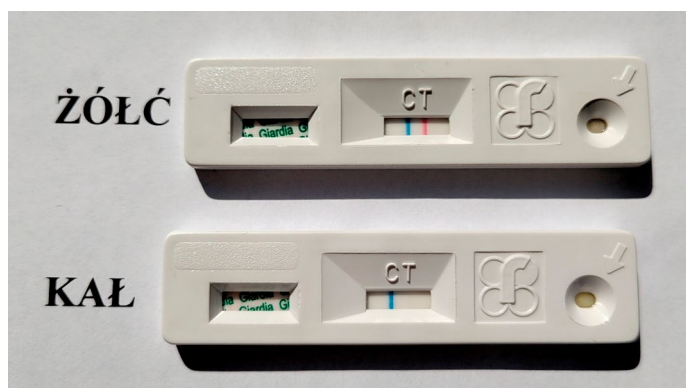
Test t-studenta dla prób niezależnych nie wykazał istotnej statystycznie różnicy w ekstensywności inwazji pomiędzy samcami i samicami ( $p < 0,61$ ;  $t = 0,50$ ;  $df = 32$ ), jak również w porównaniu czułości badania w oparciu o testy antygenowe z wykorzystaniem próbek kału lub żółci ( $p < 0,19$ ;  $t = 1,3$ ;  $df = 66$ ).

Negatywny wynik badania rozmazów przy pozytywnych wynikach testów antygenowych można tłumaczyć długim okresem mrożenia zwłok badanych zwierząt, a następnie ich rozmrożeniem, co spowodowało

zniszczenie cyst *Giardia*. Uzyskane wyniki testów antygenowych potwierdzają wysoką ekstensywność giardiozy w europejskiej populacji szopów pracy, którą wcześniej wykazały badania przeprowadzone przez Solarczyk i wsp. na populacji szopów pracy z terenów Niemiec i Luksemburga, gdzie średnie zarażenie wyniosło 27,3% (95% CI; 17,0-39,6). Wyższą ekstensywność potwierdzono u zwierząt z terenów nieurbanizowanych, odpowiednio: 33,3% w Luksemburgu (3/9; 95% CI, 9,5-65,4) i 34,3% w Niemczech (12/35; 95% CI, 20,0-50,7), na których, jak wykazano, dieta szopów w większym stopniu bazuje na drobnych ssakach, z czym wiąże się wyższe ryzyko transmisji inwazji. Podobnie do prezentowanych wyników, autorzy cytowanej pracy wykazali wyższą prevalencję u samców niż u samic, jednak różnice w obu grupach były nieznaczne (12, 13).

W rozpoznawaniu giardiozy zastosowanie mają zarówno metody mikroskopowe: rozmaz, flotacja w roztworze nasyconym siarczanu cynku, jak również metody immunochromatograficzne, immunologiczne oraz molekularne. Wykazano, że w przypadku badania kału psów i kotów najwyższą czułością powyżej 95% odznaczają się metody immunochromatograficzne i immunologiczne do wykrywania GSA 65 (giardia specific antygen 65 kDa), które wykazały także swoją użyteczność przy wykrywaniu trofozoitów *Giardia* w żółci ludzi (2, 15). Niższą czułość metod mikroskopowych tłumaczy się nieregularnym i okresowym wydalaniem cyst przez zarażone zwierzęta. Fakt ten może także tłumaczyć różnice w uzyskanych wynikach badania próbek kału i żółci. Wydaje się, że w przebiegu inwazji trofozoity mogą być stale obecne w drogach żółciowych ze względu na preferowane przez nie alkaliczne środowisko, jakie w nich panuje (6, 15). Jak wykazano, żółć jest niezbędna w procesie encystacji *Giardii*, dlatego cholestaza w trakcie inwazji może wpływać na brak lub zmniejszoną liczbę cyst wydalanych w kale (6). Należy podkreślić, że użyte w doświadczeniu zwierzęta były odławiane z wykorzystaniem żywołapek w postaci klatek z przynętą. Badania sekcyjne wykazały u znacznej części osobników puste jelita i wypełniony pęcherzyk żółciowy, co dowodzi, że zwierzęta po schwytaniu nie pobierały pokarmu, konsekwencją czego był brak pasażu żółci do jelita, a to mogło wpłynąć na brak cyst w kale i negatywny wynik badania.

Wszystkie uzyskane dotychczas izolaty *Giardia intestinalis* od europejskiej populacji szopów należały do genotypu B (sub-genotyp BIV), który występuje również u ludzi, psów i kotów oraz wielu gatunków ssaków wolno żyjących, w tym m.in. u dzików, lisów czy jeleni (8, 13, 14). Wysoka ekstensywność giardiozy wśród szopów oraz wciąż wzrastająca liczba tych inwazyjnych ssaków w Europie sprawia, że gatunek ten należy poważnie brać pod uwagę jako źródło inwazji *G. intestinalis* dla ludzi i zwierząt.



Ryc. 4. Wynik testu immunochromatograficznego na obecność specyficznego antygenu *Giardia* z żółci i kału tego samego osobnika

Wykrycie w żółci badanych szopów swoistego antygeny GSA65 potwierdza, że podobnie do ludzi, także u zwierząt w przebiegu inwazji rodzaju *Giardia* trofozoity mogą lokalizować się zarówno w jelicie, jak i w drogach żółciowych. Ponieważ pozyskane do badania szopy były zamrożone bezpośrednio po eutanazji i w tym stanie przekazane do Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, nie zdecydowano się na wykonywanie badań histologicznych z wątroby i pęcherzyka żółciowego w celu ewentualnej oceny zmian histologicznych towarzyszących inwazji. Projekt odłowu szopów praczy na terenie parku nie obejmował również badań krwi schwytanych zwierząt, dlatego też niemożliwe było wykonanie badań biochemicznych z uwzględnieniem parametrów wątrobowych dla określenia stanu funkcjonalności narządu u zarażonych osobników. Niemniej jednak można założyć, że podobnie jak u ludzi, także u zwierząt giardioza może przebiegać w postaci jelitowej, wątrobowej lub jelitowo-wątrobowej. W udokumentowanych do tej pory przypadkach medycznych lokalizacji *G. duodenalis* u ludzi w drogach żółciowych towarzyszyły objawy: bolesności okolicy wątroby, dyspepsji żółciowej, skurczów brzucha, mdłości, wymiotów po posiłku, biegunki z domieszką krwi lub tłuszczu. U pacjentów z postacią żółciową giardiozy stwierdzano niedrożności dróg żółciowych wraz ze wzrostem aktywności enzymów związanych z nabłonkiem dróg żółciowych: ALP (fosfatazy zasadowej) i GGTP (gamma-glutamylotranspeptydazy), a w diagnostyce obrazowej potwierdzono ostre bezkamicowe zapalenie pęcherzyka żółciowego, cholangiopatie, jak poszerzenie dróg żółciowych czy pogrubienie ściany pęcherzyka żółciowego (1-3, 8).

Z założenia proste doświadczenie rzuca nowe światło na diagnostykę i leczenie giardiozy u zwierząt. W uzyskanych wynikach zaskakująca była mniejsza liczba wyników dodatnich z badania kału niż z żółci, tym bardziej, że zgodnie z założeniami producenta, test jest przeznaczony do wykrywania swoistych antygenów GSA65 w próbkach kału zwierząt. Wymagane są dalsze badania w celu oceny, czy pierwotniaki z rodzaju *Giardia* kolonizują drogi żółciowe psów i kotów, a także czy podobnie do ludzi mogą przyczyniać się do chorób dróg żółciowych. Do rozstrzygnięcia pozostaje hipoteza – czy leki żółciopędne podane odpowiednio wcześniej mogą zwiększyć liczbę wydalanych cyst przez zarażone zwierzęta do środowiska, a tym samym czy mogą wpłynąć na zwiększenie czułości diagnostyki giardiozy? Uzyskane wyniki sugerują również, że leki żółciopędne mogą wspomagać i przyspieszać działanie terapii przyczynowej giardiozy z użyciem takich substancji, jak fenbendazol czy metronidazol.

## Piśmiennictwo

1. Araki H., Shimizu S., Hayashi K., Yamada T., Kusakabe A., Kanie H., Mizuno Y., Kojima I., Saitou A., Nagao K., Suzuki Y., Toyohara T., Suzuki T., Uchida E., Uno K., Nakazawa T.: Acute A calculous cholecystitis caused by *Giardia lamblia*. Intern. Med. 2017, 56 (13), 1657-1662, doi: 10.2169/internalmedicine.56.8087. Epub 2017 Jul 1. PMID: 28674353; PMCID: PMC5519466.
2. Aronson N. E., Cheney C., Rholl V., Burris D., Hadro N. L.: Biliary giardiasis in a patient with human immunodeficiency virus. J. Clin. Gastroenterol. 2001, 33 (2), 167-170, doi: 10.1097/00004836-200108000-00018. PMID: 11468450.
3. Bouzid M., Halai K., Jeffreys D., Hunter P. R.: The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. Vet. Parasitol. 2015, 207 (3-4), 181-202, doi: 10.1016/j.vetpar.2014.12.011.
4. Centers for Disease Control and Prevention, Giardiasis NNDSS Summary Report for 2019, <https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/giardiasis/giardiasis-2019.html>.
5. European Centre for Disease Prevention and Control, Giardiasis (lamblia), [w:] ECDC. Annual Epidemiological Report for 2019, Stockholm, ECDC, 2022, <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/giardiasis-lamblia-annual-epidemiological-report-2019>
6. Gillin F. D., Boucher S. E., Rossi S. S., Reiner D. S.: *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. Exp. Parasitol. 1989, 69 (2), 164-174, doi: 10.1016/0014-4894(89)90185-9. PMID: 2753120.
7. Goldstein F., Thornton J. J., Szydłowski T.: Biliary tract dysfunction in giardiasis. Digest. Dis. Sci. 1978, 23, 559-560, doi: 10.1007/BF01072702.
8. Guadano Procesi L., Montalbano Di Filippo M., De Liberato C., Lombardo A., Brocherel G., Perrucci S., Di Cave D., Berrilli F.: *Giardia duodenalis* in Wildlife: Exploring Genotype Diversity in Italy and across Europe. Pathogens 2022, 11 (1), 105, org: 10.3390/pathogens11010105.
9. Leung A. K. C., Leung A. A. M., Wong A. H. C., Sergi C. M., Kam J. K. M.: Giardiasis: An Overview. Recent. Pat. Inflamm. Allergy. Drug. Discov. 2019, 13 (2), 134-143, doi: 10.2174/1872213X13666190618124901.
10. Patel P., Sondhi N., Rangasamy A., Tsompanidis A., Dedousis J.: *Giardia*-Induced A calculous Cholangitis. Am. J. Gastroenterol. 2021, 116, 703, doi: 10.14309/01.ajg.0000779748.56557.bc.
11. Ramírez-Ocampo S., Cotte-Alzate J. D., Escobedo Á. A., Rodríguez-Morales A. J.: Prevalence of zoonotic and non-zoonotic genotypes of *Giardia intestinalis* in cats: a systematic review and meta-analysis. Infez. Med. 2017, 25 (4), 326-338.
12. Solarczyk P.: Występowanie gatunków i genotypów *Giardia* u ludzi i zwierząt w Wielkopolsce. Wiad. Parazytol. 2009, 55 (4), 459-462.
13. Solarczyk P., Dabert M., Frantz A. C., Osten-Sacken N., Trzebny A., Wojtkowiak-Giera A., Heddergott M.: Zoonotic *Giardia duodenalis* sub-assembly BIV in Wild raccoons (*Procyon lotor*) from Germany and Luxembourg. Zoonoses Public Health 2021, 68 (5), 538-543, doi: 10.1111/zph.12826.
14. Stojek K., Sroka J., Caccio S. M., Cencek T., Dutkiewicz J., Kusyk P.: Prevalence and molecular typing of *Giardia duodenalis* in wildlife from eastern Poland. Folia Parasitol. 2015, 30, 62, doi: 10.14411/fp.2015.042. PMID: 26278650.
15. Uchôa F. F. M., Sudré A. P., Campos S. D. E., Almosny N. R. P.: Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers. J. Microbiol. Methods. 2018, 145, 73-78, doi: 10.1016/j.mimet.2018.01.001. Epub 2018 Jan 9. PMID: 29329749.
16. Vivancos V., González-Alvarez I., Bermejo M., González-Alvarez M.: Giardiasis: Characteristics, Pathogenesis and New Insights About Treatment. Curr. Top. Med. Chem. 2018, 18 (15), 1287-1303, doi: 10.2174/1568026618666181002095314.

Autor korespondencyjny: dr Maria Studzińska; e-mail: maria.studzinska@gmail.com