

Morfologiczne i molekularne porównanie nicieni z rodzaju *Uncinaria* pasożytujących u lisa (*Vulpes vulpes*) i psa (*Canis familiaris*)

Molecular and morphological comparison of hookworms from genus *Uncinaria* invading red fox (*Vulpes vulpes*) and dog (*Canis familiaris*)

Paweł Górski, Agnieszka Radowańska, Dorota Jaros i Marcin Wiśniewski

Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Adres do korespondencji: Paweł Górski, Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, Polska

ABSTRACT. Two species of hookworms from genus *Uncinaria* have been found so far in Poland. *Uncinaria stenocephala* infects mainly dog, wolf and red fox, whereas *Uncinaria criniformis* is a parasite of mustelids (but it was also reported from red fox). 19 male and 29 female hookworms from red foxes have been compared with 10 male and 12 female worms from dogs. Hookworms from dogs were generally smaller than these from foxes, but no other morphological differences could be found. These hookworms were qualified to species *Uncinaria stenocephala* on the ground of morphology of male. Genomic DNA samples have been isolated from these hookworms and segments of rDNA including part of small subunit of ribosomal RNA gene; internal transcribed spacer 1 (ITS1); 5.8 S ribosomal RNA; internal transcribed spacer 2 (ITS2) and part of large subunit of ribosomal RNA have been amplified and sequenced. Sequences from *Uncinaria* obtained both from foxes and dogs have shown very high similarity to the sequence of *Uncinaria stenocephala*, so all examined hookworms have been classified as belonging to this species.

Key words: dog, red fox, *Uncinaria*

Wstęp

Nadrodzina Ancylostomatoidea, do której należą przedstawiciele rodzaju *Uncinaria*, obejmuje szereg gatunków pasożytniczych nicieni znanych pod polską nazwą tęgoryjce. Znaczenie medyczne i weterynaryjne tęgoryjców, ze względu na sposób odżywiania się (są to nicienie krwiopijne) oraz powszechność występowania, jest ogromne. Szacuje się, że około 1,3 miliarda ludzi na całym świecie zarażonych jest jednym z atakujących człowieka gatunków tej grupy [1]. Nie ma szczegółowych danych dotyczących globalnej liczby zarażonych tęgoryjca-

mi zwierząt mięsożernych, ale również w medycynie weterynaryjnej tęgoryjczyce stanowią poważny problem. *Uncinaria stenocephala* jest gatunkiem docierającym najdalej na północ i w strefie klimatu umiarkowanego (również w Polsce) jest najszerzej rozpowszechnionym tęgoryjcem psowatych.

Uncinaria stenocephala została opisana ponad sto lat temu (w roku 1884) przez Raillietta. Żywicielami tego gatunku są głównie psy i inne psowate, znacznie rzadziej kotowate, a nawet świnie. Wydaje się, że poza psowatymi, pozostałe gatunki są jednak żywicielami nieswoistymi, w których pasożyt nie może rozwinąć się prawidłowo [2].

W Polsce uncinarioza jest niedoceniana, a często niediagnozowana, mimo powszechności występowania. Według literatury ekstensywność inwazji tego gatunku u psów w naszym kraju waha się od 1,4 do 37,5% [2], a w niektórych regionach (np. województwo kieleckie) osiąga nawet 75% [3]. Według własnych badań, w sprzyjających warunkach (schroniska dla zwierząt usytuowane w środowisku wiejskim) ekstensywność inwazji jest bardzo wysoka i waha się od 15,9 do 47,7% [4].

Według doniesień z innych niż Polska krajów strefy umiarkowanej podstawowe znaczenie jako rezerwuar tego pasożyta wśród zwierząt dzikich mają lisy (*Vulpes vulpes*) [5, 6] i zapewne podobnie jest w Polsce, gdzie pasożyty z rodzaju *Uncinaria* niejednokrotnie stwierdzano właśnie u lisów [7, 8]. Wilk (*Canis lupus*), jako gatunek niezmiernie rzadki na znacznych obszarach Europy, ma minimalne znaczenie epizootyczne. Do rodzaju *Uncinaria* należą także inne gatunki pasożytujące u przedstawicieli rzędu mięsożernych oraz naczelnych. W Europie (i w Polsce) występuje jeszcze gatunek *Uncinaria criniformis*, pasożytujący głównie u borsuka (*Meles meles*) i tchórza (*Mustela putorius*). Według różnych źródeł oba wymienione gatunki pasożytów (*U. stenocephala* oraz *U. criniformis*) mogą występować zarówno u lisa, jak i u borsuka [9], ewentualnie traktowane są jako jeden gatunek (*U. stenocephala*) atakujący zarówno psowate, jak i borsuki [10, 11]. Te niejasności wynikają z dużego (mimo istniejących jednak różnic) morfologicznego podobieństwa obu form, a być może, także z rzeczywistej ich jedności gatunkowej. Co więcej, nie ma pewności czy uncinarie pasożytujące u lisów są faktycznie przedstawicielami tego samego gatunku, co pasożyty psów. W niniejszej pracy podjęto próbę wyjaśnienia tego zagadnienia w oparciu o morfologię okazów pochodzących od psów i od lisów, jak również badaniami molekularnymi.

Badając pokrewieństwo poszczególnych gatunków analizuje się sekwencje wewnętrznych transkrybowanych segmentów rozdzielających (ITS1 i ITS2) w genie kodującym 5,8S rDNA. Sekwencja tej jednostki nie ulega szybkim zmianom ewolucyjnym, zaś sekwencje w ITS1 i ITS2 są jednorodne tylko w obrębie jednego gatunku. Metoda ta z powodzeniem była już wykorzystywana do określania pokrewieństwa między poszczególnymi grupami nicieni [12], także w obrębie tęgoryjców [13] i na niej opiera się współczesna systematyka nicieni [14].

Material i metody

Do badań użyto nicieni z rodzaju *Uncinaria* pochodzących z psów oraz z lisów. Okazy z psów (22 osobniki) były pozyskane w latach 90 z psów mieszańców zarażonych doustnie larwami tego tęgoryjca wyhodowanymi z jaj zebranych z odchodami psów żyjących w schroniskach dla zwierząt. Nicienie były przechowywane w temperaturze -20°C . Z kolei tęgoryjce pochodzące z lisów (48 osobników) izolowano z jelit dostarczanych w sezonie 2004/2005 do Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Warszawie, a następnie przechowywanych przez kilka tygodni w -70°C . Część nicieni przeznaczono do badań morfologicznych, część zaś do analizy molekularnej.

Nicienie przeznaczone na preparaty trwałe były konserwowane w 70% roztworze alkoholu etylowego, prześwietlane według standardowych procedur glicerolem i zamykane w glicerożelatynie. W sumie wykonano preparaty z 10 samców i 12 samic pochodzących z psów oraz 19 samców i 29 samic pochodzących z lisów. Preparaty oglądano pod mikroskopami świetlnymi Nikon ECLIPSE TE200 i Nikon ALPHAPHOT-2 YS2. Za pomocą programu LUCIA dokonano pomiarów długości ciała i przełyku poszczególnych osobników, a u samców też długości spikuli. Sprawdzono też kształt promieni grzbietowego płata torebki kopulacyjnej (liczba gałązek tego promienia jest ważną cechą gatunkową pozwalającą odróżnić *U. stenocephala* i *U. criniformis*).

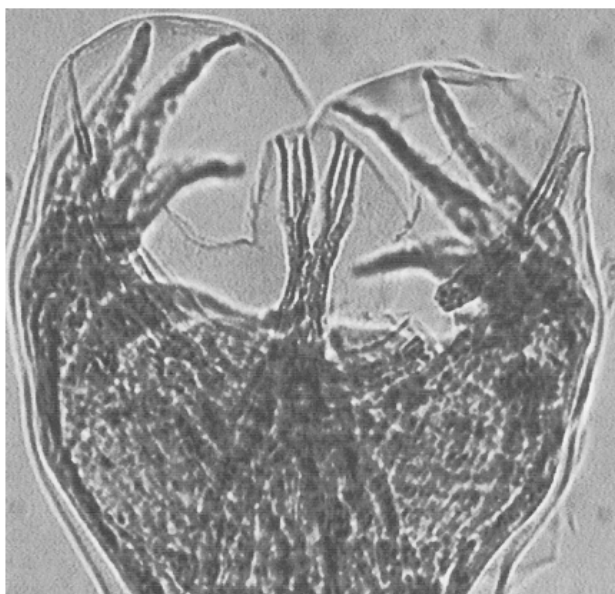
Badania molekularne przeprowadzono na DNA wyizolowanym z pasożytów pochodzących od 2 psów i 5 lisów (od 6 do 31 osobników obojga płci z jednego żywiciela). Do izolacji użyto zestawu Genomic DNA Prep Plus firmy A&A BIOTECHNOLOGY. Za pomocą metody PCR namnażano odcinek rDNA obejmujący wewnętrzne transkrybowane segmenty rozdzielające (ITS1 i ITS2). Użyto podawanych w literaturze [15, 16] primerów NC5 : 5' — GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT — 3' oraz NC2 : 5' — TTAGTTTCTTTTCTCCGCT — 3'. Sekwencjonowanie zamplifikowanego fragmentu DNA zlecono Centrum Onkologii w Warszawie. Następnie, korzystając z programu BLAST dostępnego na stronie National Center for Biotechnology Information, odnaleziono sekwencję najbardziej zbliżoną do otrzymanych sekwencji. Zestawienia i porównania wszystkich sekwencji dokonano w programie Multalin 5.4.1.

Tabela 1. Morfologiczne porównanie nicieni z rodzaju *Uncinaria* pasożytujących u psów i lisów
 Table 1. Morphological comparison of hookworms of *Uncinaria* genus obtained from dogs and foxes

	Nicienie z psa		Nicienie z lisa	
	zakres wartości	średnio	zakres wartości	średnio
Długość ciała samców	4,21-6,54 mm	5,38 mm	6,30-9,29 mm	7,80 mm
Długość ciała samic	4,61-8,05 mm	6,33 mm	6,71-12,87 mm	9,80 mm
Długość przelyku u samców	0,596-0,932 mm	0,760 mm	0,679-0,931 mm	0,804 mm
Długość przelyku u samic	0,861-0,966 mm	0,910 mm	0,748-1,001 mm	0,880 mm
Długość spikuli	0,585-0,952 mm	0,770 mm	0,719-0,900 mm	0,810 mm
Liczba gałązek płata grzbietowego torebki kopolacyjnej samców	2 x 3		2 x 3	

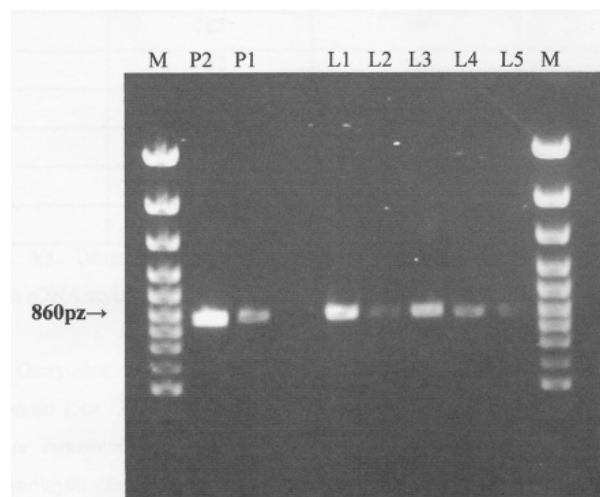
Wyniki

Dane morfometryczne okazów pochodzących z psów i lisów podane są w Tabeli 1. Długość ciała badanych nicieni (samców i samic) pochodzących od obu gatunków żywicieli generalnie mieści się w granicach podawanych dla *U. stenocephala*. Okazy pozyskane z lisów były nieco większe niż pochodzące z psów. Również maksymalna długość przelyku u tęgoryjców z lisów była nieco większa, ale średnie wartości były odwrotne (średnia długość przelyku pasożytów pochodzących z psa była większa). Szczecinki kopolacyjne samców pasożytów pochodzących z lisów okazały się nieco dłuższe, lecz wartości te także mieściły się w zakresie wartości podawanym dla *U. stenocephala*. Kształt torebki kopolacyjnej samców nicieni pochodzących od obu gatunków żywicieli był identyczny (rozwidłone żeberko płata grzbietowego torebki, a każde z ra-



Rys.1. Torebka kopolacyjna samca uncinarii pasożytującej u psa

Fig.1. Male bursa of *Uncinaria* obtained from dog



Rys. 2. Amplifikowane fragmenty rDNA nicieni z rodzaju *Uncinaria* z psa (P1-P2) i z lisa (L1-L5)

Fig. 2. Amplificated rDNA fragments of *Uncinaria* obtained from dog (P1-P2) and red fox (L1 L5)

mion zakończone trzema gałązkami) (Rys.1) i typowy dla *U. stenocephala* [17].

Wyizolowane i namnożone fragmenty rDNA miały wielkość około 860 par zasad i były takie same dla nicieni pasożytujących u obu gatunków żywicieli (Rys. 2). Zsekwencjonowane fragmenty DNA o długości około 795 par zasad porównano z sekwencją nukleotydową tego fragmentu z *U. stenocephala*. Znaleziono różnice w zaledwie dwóch do pięciu pozycjach, zależnie od osobnika, od którego pochodził materiał genetyczny. Więcej różnic stwierdzono w sekwencjach tęgoryjców pozyskanych od lisów (były to różnice rzędu 0,25-0,63%). Różnice między badanymi nicieniami wynosiły od 0,13 do 1,52%; największe różnice stwierdzono między nicieniami pochodzącymi z jednego gatunku żywiciela — z lisa.

Wnioski

Uzyskane parametry morfologiczne wskazują na

przynależność badanych osobników nicieni do gatunku *Uncinaria stenocephala*. Dotyczy to zarówno pasożytów izolowanych od psa jak i od lisa. Pewne różnice w wielkości ciała mogą wynikać z różnego wieku badanych nicieni lub z zależności tych parametrów od gatunku żywiciela. Podawana w literaturze, uznawana za typową dla tego właśnie gatunku cecha morfologiczna — żeberko płata grzbietowego torebki rozwidła się, każde z ramion kończy się trzema gałązkami — odpowiada gatunkowi *U. stenocephala* [17, 18].

Na przynależność do jednego gatunku pasożytów z psa i lisa wskazują także wyniki badań molekularnych. Porównanie wszystkich otrzymanych sekwencji z sekwencją *U. stenocephala* daje różnice rzędu 0,25–0,63%. Sekwencje nicieni pochodzących od różnych żywicieli różniły się między sobą, ale różnice te były na tyle niewielkie (od 0,13 do 1,52%), że pozwalają zaliczyć wszystkie badane nicienie do gatunku *Uncinaria stenocephala*.

Nasze badania wskazują, że tęgoryjce pochodzące zarówno od psa, jak i od lisa należą do jednego gatunku, lecz ze względu na niewielką liczebność badanych prób prace mające na celu wyjaśnienie tego zagadnienia powinny być kontynuowane.

Literatura

- [1] Chan M.S. 1997. The global burden of intestinal nematode infections — fifty years on. *Parasitology Today* 13: 438–443.
- [2] Ramisz A., Martynowicz T. 1963. Parazytotauna przewodu pokarmowego psów i kotów m. Wrocławia i okolic ze szczególnym uwzględnieniem nicieni z rodziny *Ancylostomatidae*. *Wiadomości Parazytologiczne* 2: 115–127.
- [3] Okulewicz A., Złotorzycka J., Czułowska A. 1994. Wpływ warunków środowiskowych na zarobaczenie psów. *Wiadomości Parazytologiczne* 40: 293–298.
- [4] Górski P., Badowska M., Wędrychowicz H. 1996. Występowanie nicienia *Uncinaria stenocephala* u psów w okolicach Warszawy. *Wiadomości Parazytologiczne* 42: 221–227.
- [5] Richards D.T., Harris S., Lewis J.W. 1995. Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of rural and urban red foxes (*Vulpes vulpes*) in the united Kingdom. *Veterinary Parasitology* 59: 39–51.
- [6] Willingham A.L., Ochens N.W., Kapel C.M., Monrad J. 1996. A helminthological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the metropolitan area of Copenhagen. *Journal of Helminthology* 70: 259–263.
- [7] Malczewski A. 1962. Helminth parasites of bred foxes and minks in Poland. *Acta Parasitologica Polonica* 16: 231–260.
- [8] Rocki B. 2000. Helmintofauna przewodu pokarmowego lisów dzikich, ze szczególnym uwzględnieniem tasiemca *Echinococcus multilocularis* w wybranych rejonach Polski. Praca doktorska, Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN w Warszawie.
- [9] Kontrimavichus V.L. 1985. Helminths of mustelids and trends in their evolution. Amering Publishing Co. PVT. LTD.
- [10] Simpson V.R. 2002. Wild animals as reservoirs of infectious diseases in UK. *The Veterinary Journal* 163: 128–146.
- [11] Sleeman P., Kelly T. 1997. Parasites and diseases of Irish badgers (*Meles meles*). *Small Carnivore Conservation* 17: 20–21.
- [12] Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R., Liu L.X., Scheldman P., Viestraete A., Vanfleteren J.R., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T., Kelley T.W. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71–75.
- [13] Gasser R.B., Stewart L.E., Speare R. 1996. Genetic markers in ribosomal DNA for hookworm identification. *Acta Tropica* 62: 15–21.
- [14] Okulewicz A., Perec A. 2004. Ewolucja i systematyka nicieni w oparciu o badania molekularne. *Wiadomości Parazytologiczne* 50: 101–108.
- [15] Chilton N.B., Gasser R.B. 1999. Sequence differences in the internal transcribed spacers of DNA among four species of hookworm (*Ancylostomatoidea*). *International Journal for Parasitology* 29: 1971–1977.
- [16] Monti J.R., Chilton N.B., Qian B-Z., Gasser R.B. 1998. Specific amplification of *Necator americanus* or *Ancylostoma duodenale* DNA by PCR using markers in ITS-1 rDNA, and its amplification. *Molecular and Cellular Probes* 12: 71–78.
- [17] Rep B.H. 1963. On the polyxenia of *Ancylostomatidae* and the validity of the characters used for their differentiation (II). *Tropical and Geographical Medicine* 15: 173–218.
- [18] Gibbs H.C. 1961. Studies on the life cycle and developmental morphology of *Dochmoides stenocephala* (Raillet 1884) (*Ancylostomatidae*: *Nematoda*). *Canadian Journal of Zoology* 39: 325–348.

Wpłynęło 10 lipca 2006

Zaakceptowano 7 sierpnia 2006