

Diagnostic approach to *Giardia intestinalis* infection in dogs and cats

Zygner W.¹, Jaros D.², Division of Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW¹, Laboratory of Transcription Regulation, Institute for Medical Biology of the Polish Academy of Sciences in Łódź²

The aim of this paper was to present the current approach to the laboratory diagnostic procedures in giardiasis infection in dogs and cats. Infection in dogs and cats with *Giardia intestinalis* is common with subclinical to severe disease resulting. Transmission to humans can occur. There are few laboratory methods applicable for the diagnosis, but they differ in the specificity and sensitivity. Therefore a critical review of advantages and disadvantages of currently used diagnostic assays was presented.

Keywords: *Giardia intestinalis*, canine and feline giardiasis, diagnostic tests, specificity, sensitivity.

Rozpoznawanie inwazji *Giardia intestinalis* u psów i kotów

Wojciech Zygner¹, Dorota Jaros²

z Zakładu Parazytologii i Inwazjologii Katedra Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie¹ oraz Pracowni Regulacji Transkrypcyjnej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi²

Giardioza jest pasożytniczą chorobą wielu gatunków zwierząt oraz człowieka. U psów i kotów, jak i u ludzi, choroba powodowana jest przez inwazję pierwotniaków należących do gatunku *Giardia intestinalis* (syn. *G. lamblia*, *G. duodenalis*). Ponadto żywicielem pierwotniaka, oprócz ludzi oraz psów i kotów, są również przeżuwacze, świnie, gryznie oraz mały. Inwazja *G. intestinalis* jest jedną z przyczyn biegunek na tle pasożytniczym u ludzi i zwierząt (1, 2, 3). Pomimo że ten sam gatunek pasożyta powoduje chorobę u psów i kotów, jak i u ludzi, nie

wszystkie szczepy należące do tego gatunku izolowane od psów, kotów czy innych gatunków zwierząt stanowią zagrożenie dla człowieka. Wynika to z faktu, że u różnych gatunków zwierząt inwazje powodowane są przez różne genotypy (grupy Mayrhofera) oznaczane literami od A do G. Spośród wymienionych, jedynie pasożyty należące do grup A i B powodują inwazje u ludzi. Należy tu również dodać, że genotyp A dzieli się na dwie grupy, takie jak A-1 (określany również terminem szczep polski) oraz A-2. Inwazje u psów powodowane są przez genotypy A-1, B,

C i D, natomiast u kotów przez genotypy A-1 i F. Wynika z tego, że nie wszystkie inwazje u psów i kotów są groźne dla ludzi, jednakże ze względu na fakt, iż odróżnienie genotypów możliwe jest jedynie przy użyciu technik biologii molekularnej, rozpoznanie inwazji u zwierząt bez określenia genotypu traktować należy jako zagrożenie dla zdrowia człowieka (4).

Do zarażenia pasożytem dochodzi w wyniku zjedzenia inwazyjnych cyst wydalanych wraz z kałem żywiciela. Cysty zdolne są do przetrwania w wilgotnym środowisku od kilku do kilkunastu miesięcy. Po dostaniu się do żołądka ze stadium inwazyjnego uwalniane są ekscyzoity, które następnie dzielą się na potomne trofozoity. Jest to stadium, które zasiedla błonę śluzową dwunastnicy. Obecnie w dwunastnicy trofozoity rozmnażają się przez podział komórkowy, dając potomne pokolenie trofozoitów kolonizujących dalsze odcinki błony śluzowej jelita cienkiego. Z części potomnych trofozoitów powstają cysty, które wydalone są do środowiska zewnętrznego. Inwazja może rozprzestrzeniać się między ludźmi i zwierzętami bezpośrednio drogą fekalno-oralną lub też za pośrednictwem zanieczyszczonej cystami wody lub żywności (5).

W prezentowanej publikacji autorzy omówili techniki laboratoryjne stosowane w diagnostyce inwazji *G. intestinalis*, ze szczególnym uwzględnieniem techniki immunochromatograficznej oraz mikroskopowego badania kału, co wynika z faktu, iż te dwie metody, jako najtańsze, stosowane są najczęściej w komercyjnie dostępnej weterynaryjnej diagnostyce laboratoryjnej.

Metody diagnostyczne

Ze względu na fakt, iż giardioza jest zoonozą, lekarz weterynarii jest bezwzględnie zobowiązany do zwalczania u zwierząt inwazji powodowanej przez *G. intestinalis*. Jednym z istotnych elementów zwalczania inwazji jest prawidłowe rozpoznanie. Znanych jest kilka metod laboratoryjnych wykorzystywanych w rozpoznawaniu tej inwazji. W diagnostyce zastosowanie znajdują: badanie mikroskopowe, testy immunologiczne oraz wykrywanie kwasów nukleinowych pasożyta w próbce kału (2, 6). Testy te różnią się między sobą zarówno czułością, czyli odsetkiem uzyskiwanych wyników prawdziwie pozytywnych, jak i swoistością, czyli odsetkiem uzyskiwanych wyników prawdziwie negatywnych. Wyniki testów o wysokiej czułości są rzadko fałszywie negatywne, natomiast wyniki testów o wysokiej swoistości są rzadko fałszywie pozytywne. Zarówno czułość, jak i swoistość testu oblicza się względem testu referencyjnego, tzw. złotego standardu (7). W przypadku diagnostyki giardiozy do

niedawna za test referencyjny uznawano badanie mikroskopowe, natomiast obecnie badanie kału metodą PCR oraz test immunofluorescencji bezpośredniej uznawane są za złoty standard w diagnostyce tej parazytozy (8, 9, 10). Jednakże i te 2 testy różnią się między sobą czułością i swoistością. Badanie kału metodą PCR wykazuje wysoką czułość, jednakże jego swoistość jest umiarkowana. Z kolei test immunofluorescencji wykazuje średnio-wysoką czułość, jednak jego swoistość jest bardzo wysoka (11).

Test PCR

Badanie kału metodą PCR w kierunku pierwotniaków *G. intestinalis* uważane jest za jeden z najczulszych testów laboratoryjnych stosowanych komercyjnie w diagnostyce giardiozy. Test ten przydatny jest szczególnie w sytuacjach, gdy koncentracja cyst pasożyta w kale jest niewielka. Dzięki technikom biologii molekularnej możliwe jest wyizolowanie oraz powielenie materiału genetycznego pasożyta, prowadzące do jego wykrycia, a następnie dzięki reakcji sekwencjonowania możliwe jest potwierdzenie uzyskanego wyniku (2, 12). Ponadto analiza restrykcyjna bądź sekwencjonowanie produktu PCR pozwalają na określenie genotypu *G. intestinalis*, a co za tym idzie, stwierdzenie, czy pasożyt powodujący inwazję u konkretnego zwierzęcia należy do genotypu zdolnego do wywołania inwazji u człowieka (2).

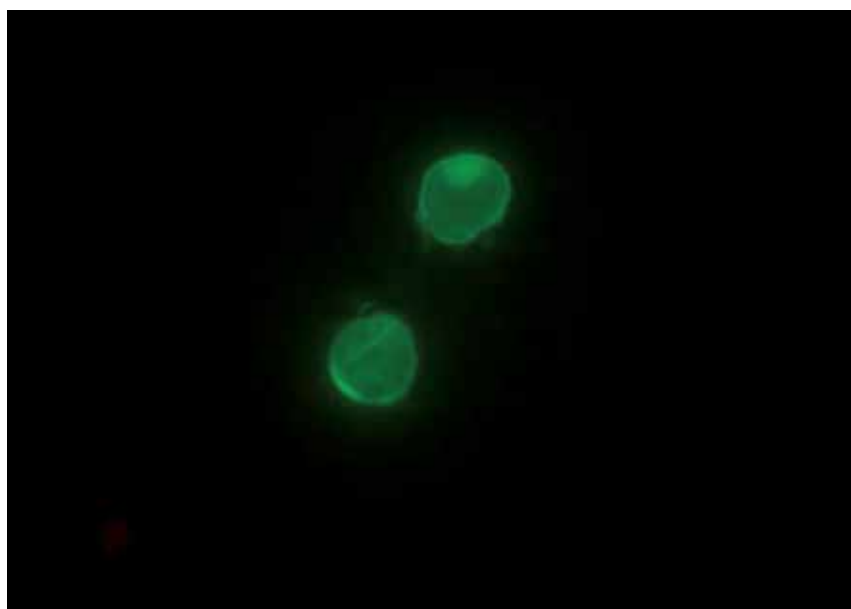
Test immunofluorescencji bezpośredniej

Według niektórych autorów test immunofluorescencji bezpośredniej obecnie uważany jest za tzw. złoty standard w diagnostyce inwazji powodowanej przez *G. intestinalis* u psów (9). W teście tym (MERIFLUOR[®]

Cryptosporidium/Giardia Test Kit) wykrywane są w kale cysty za pośrednictwem przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluoresceiną (ryc. 1), która po wzbudzeniu światłem o długości fali 494 nm emituje falę o długości 518 nm (barwa zielona). Test ten charakteryzuje się bardzo wysoką czułością i swoistością, co oznacza znikomy odsetek uzyskiwanych wyników zarówno fałszywie pozytywnych, jak i fałszywie negatywnych (2, 9). Jednakże test immunofluorescencyjny innej firmy wykazywał bardzo wysoką swoistość oraz średnio-wysoką czułość (11). Niestety wadą tego testu jest duży koszt badań wynikający z jednej strony z wysokiej ceny przeciwciał monoklonalnych, z drugiej zaś z kosztów samego mikroskopu fluorescencyjnego. Wysokie koszty tej metody diagnostycznej na razie znacząco ograniczają jej zastosowanie w praktyce klinicznej.

Test ELISA

Test ELISA jest testem immunoenzymatycznym. W testach stosowanych do diagnostyki inwazji *G. intestinalis* wykrywane są antygeny pasożyta obecne w kale zwierząt. Antygeny te wiążą się z przeciwciałami, którymi opłaszczona jest płytka titracyjna, a następnie wykrywane są za pomocą przeciwciał rozpoznających drugi epitop analizowanego antygenu. Jeśli wykorzystywany test należy do grupy testów bezpośrednich, to przeciwciało jest od razu wyznakowane, np. peroksydazą chrzanową, natomiast jeśli należy do testów pośrednich, to dopiero kolejne przeciwciało rozpoznające przeciwciało pierwszorzędowe jest wyznakowane enzymatycznie. Stosowane komercyjnie testy ELISA wykrywające antygeny pasożyta w kale ludzi zarażonych *G. intestinalis* wykazywały umiarkowaną



Ryc. 1. Cysty *G. intestinalis* wykryte w kale psa za pomocą testu immunofluorescencji bezpośredniej

czułość i swoistość w diagnostyce inwazji u psów. Jeden ze starszych testów wykazywał zarówno niższą czułość, jak i swoistość względem badania mikroskopowego w mikroskopie świetlnym (13). Z kolei nowszy test ELISA (PT5012 Giardia II test Direct ELISA) z przeciwciałami monoklonalnymi w porównaniu do testu immunofluorescencji wykazywał wyższą swoistość od testów immunochromatograficznych oraz badania za pomocą mikroskopu świetlnego, jednak jego czułość była niższa od obu tych wspomnianych metod diagnostycznych (9).

Warto zwrócić tutaj również uwagę, na pewne zjawisko zaobserwowane przez Cirak i Bauer (14). Autorzy ci zaobserwowali, że w próbkach pozytywnych w teście ELISA dla antygenu *G. intestinalis* i równocześnie negatywnych w mikroskopowym badaniu kału stosunkowo często wykrywano równocześnie oocysty kokcydiiów z rodzaju *Isospora*. Zatem wydaje się możliwe, iż antygeny innych pierwotniaków jelitowych mogą być również wykrywane w reakcjach immunoenzymatycznych, dając wyniki fałszywie pozytywne.

Test immunochromatograficzny

W dostępnym na rynku weterynaryjnym teście immunochromatograficznym (Idexx SNAP[®] Giardia antigen test kit) wykrywany jest antygen pasożyta w kale. Test ten, podobnie jak test ELISA, oparty jest na reakcji enzymatycznej. Zaletą tego testu jest stosunkowo niska cena względem wcześniej wymienionych testów. Test ten wykazuje niższą czułość od testu immunofluorescencji bezpośredniej, jednakże wystarczającą do diagnostyki komercyjnej. Czułość tego testu zbliżona jest do czułości mikroskopowego badania kału. Test ten w jednych badaniach wykazywał nieznacznie wyższą czułość od mikroskopowego badania próbki zbiorczej kału (odpowiednio 67 i 65%), natomiast w innych badaniach stwierdzano nieznacznie niższą jego czułość (70%) od mikroskopowego badania kału próbki zbiorczej (72%) w odniesieniu do testu immunofluorescencji bezpośredniej jako testu referencyjnego (9, 10). W ostatnio przeprowadzonych badaniach przez Rishniw i wsp. (9) oszacowano również wartości predykcyjne dla tego testu. Okazało się, iż test wykazywał wysoką wartość predykcyjną dodatnią (0,91) w przypadku populacji zwierząt, w której stwierdzano wysoką ekstensywność inwazji wynoszącą 50%, jednakże w populacji zwierząt, w której ekstensywność inwazji, wynosiła 10%, wartość predykcyjna dodatnia spadała już do 0,51 (9). Oznacza to, iż prawdopodobieństwo, że wynik pozytywny jest wynikiem prawdziwie pozytywnym w populacji zwierząt o ekstensywności inwazji, wynoszącej 10%, wynosi 0,51 (7). Zatem, jak podają Rishniw

i wsp. (9), test ten przydatny jest w rozpoznawaniu inwazji w populacjach zwierząt, w których jest wysoka ekstensywność inwazji, takich jak np. populacje psów w schroniskach dla zwierząt. Z kolei niska wartość predykcyjna dodatnia w populacjach o niskiej bądź stosunkowo niskiej ekstensywności inwazji znacznie ogranicza zastosowanie tego testu. Przykładowo w Warszawie ekstensywność inwazji u psów oszacowana za pomocą testu PCR wynosiła 9,14% (15), co oznacza, iż prawdopodobieństwo, że uzyskany wynik pozytywny jest prawdziwie pozytywny jest mniej więcej takie samo, jak to, że wynik ten jest fałszywie pozytywny.

Mikroskopowe badanie kału

Mikroskopowe badanie kału jest jednym z najczęściej wykonywanych badań ze względu na bardzo niskie koszty tego badania w porównaniu z innymi metodami. Istnieją dwie wersje tego badania. W jednej z nich wykonuje się badanie rozmazu bezpośredniego, w drugiej zaś badanie metodą flotacji w siarczanie cynku. W badaniach klinicznych stwierdzono, że czułość i swoistość tego testu jest zbliżona do czułości i swoistości testu immunochromatograficznego (10). Warto jednak dodać, że w przypadku tego badania, w którym na wynik wpływają czynniki subiektywne, zarówno czułość, jak i swoistość będą w znacznym stopniu zależne od doświadczenia, wiedzy i umiejętności osoby wykonującej badanie mikroskopowe. Warunkiem uzyskania wiarygodnego wyniku negatywnego jest badanie 3 próbek kału zbieranych przez 5–7 dni, co wynika z faktu nieregularnego wydalania cyst *G. intestinalis* (6). Zatem badanie tylko jednej próbki znacząco wpłynie na swoistość testu, natomiast wiedza i doświadczenie badacza zarówno na czułość, jak i swoistość tego badania.

Niewątpliwą zaletą mikroskopowego badania kału jest, poza jego niską ceną, możliwość znalezienia stadiów rozwojowych innych pasożytów, takich jak oocysty kokcydiiów czy też jaja nicieni i tasiełców. Badanie mikroskopowe pozwala również oszacować liczbę bakterii oraz stwierdzić obecność drożdżaków, co może być szczególnie przydatne po prowadzonej wcześniej antybiotykoterapii. Ponadto jedynie w badaniu mikroskopowym rozmazu bezpośredniego istnieje możliwość znalezienia trofozoitów *Tritrichomonas foetus*, co pozwoli ukierunkować dalszą diagnostykę biegunki i skierować próbkę kału do badania metodą PCR (6, 16, 17). Warto również dodać, iż mikroskopowe badanie kału pozwala stwierdzić obecność tłuszczu i skrobi w kale, co wskazywać może na rozwój zewnątrzwydzielniczej niewydolności trzustki lub inne zaburzenia trawienia i wchłaniania (18).

Podsumowanie

Spośród wymienionych w tym artykule technik diagnostycznych, według wiedzy autorów, na polskim rynku weterynaryjnym komercyjnie dostępne są: mikroskopowe badanie kału, testy immunoenzymatyczne oraz badanie metodą PCR (19, 20, 21). Ostatni z tych testów oferowany jest przez laboratorium zagraniczne, jednak mające swoje przedstawicielstwo również w Polsce. Niestety wadą tego jest podniesienie kosztów związanych z transportem próbek zagranicę. Badanie mikroskopowe oraz testy immunoenzymatyczne są porównywalne pod względem czułości i swoistości. Jednakże wyniki niektórych testów immunoenzymatycznych nie są równoważne z faktem wydalania cyst pasyżna bądź rozwojem choroby, a wskazują jedynie na fakt zjedzenia przez żywiciela cyst *G. intestinalis* (22). Wybór metody badawczej należy pozostawić lekarzowi weterynarii. Problemem dla zlecającego badanie lekarza weterynarii jest jednak sytuacja, w której uzyskuje dwa odmienne wyniki badania uzyskane dwiema różnymi technikami laboratoryjnymi, najczęściej testem immunoenzymatycznym oraz badaniem mikroskopowym, jako metodami stosunkowo tanimi. W takiej sytuacji należy kierować się z jednej strony obrazem klinicznym i oceną, czy uzyskany wynik pasuje do stanu klinicznego pacjenta, z drugiej zaś strony wiedzą na temat doświadczenia i wiarygodności laboratorium bądź osoby wykonującej badanie oraz wiedzą na temat stosowanej przez laboratorium techniki diagnostycznej. W przypadku wątpliwości, który z uzyskanych wyników jest wynikiem prawdziwym, można również zlecić badanie metodą PCR. Badanie to ze względu na wyższe koszty jest rzadziej wykonywane, jednak jego czułość jest wysoka (23).

Postawienie ostatecznie prawidłowego rozpoznania jest istotne, ze względu na fakt wspomnianego już wcześniej zoonotycznego potencjału pasożyta, co zobowiązuje do leczenia przyczynowego. Warto również dodać, że powinno być również przeprowadzone badania skuteczności leczenia po skończonej terapii, gdyż zarówno u ludzi, jak i u zwierząt stwierdzano przypadki rozwijającej się lekooporności (23, 24).

Piśmiennictwo

1. Taylor M.A., Coop R.L., Wall R.L.: *Veterinary Parasitology*. Blackwell Publishing, Oxford, 2007.
2. Barr S.C.: *Giardiasis*. W: Greene C.E.: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri 2006, s. 736-742.
3. Jaros D.: Patofizjologiczne i immunologiczne aspekty giardiozy. *Życie Wet.* 2007, **82**, 483-485.
4. Zygner W., Wędrychowicz H.: Rola zwierząt jako rezerwuaru giardiozy u ludzi – zoonotyczny potencjał *Giardia intestinalis*. *Post Mikrobiol.* 2008, **47**, 287-291.
5. Adam R.D.: *Biology of Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, **14**, 447-475.

6. Zajac A.M., Conboy G.A.: *Veterinary Clinical Parasitology*. 7th ed. Blackwell Publishing, Ames, 2006.
7. Kaba J. Testy diagnostyczne. W: Kita J., Kaba J.: *Podstawy epidemiologii weterynaryjnej*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2008, s.125-145.
8. Hopkins R.M., Deplazes P., Meloni B.P., Reynoldson J.A., Thompson R.C.: A field and laboratory evaluation of a commercial ELISA for the detection of *Giardia* coproantigens in humans and dogs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1993, **87**, 39-41.
9. Rishniw M., Liotta J., Bellosa M., Bowman D., Simpson K.W.: Comparison of 4 *Giardia* diagnostic tests in diagnosis of naturally acquired canine chronic subclinical giardiasis. *J. Vet. Intern. Med.* 2010, **24**, 293-297.
10. Geurden T., Berkvens D., Casaert S., Vercruyse J., Claerebout E.: A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 2008, **157**, 14-20.
11. Traub R.J., Inpankaew T., Reid S.A., Sutthikornchai C., Sukthana Y., Robertson I.D., Thompson R.C.A.: Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in Temple communities in Bangkok — A critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop.* 2009, **111**, 125-132.
12. Zarlenga D.S., Higgins J.: PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 2001, **101**, 215-230.
13. Barr S.C., Bowman D.D., Erb H.N. Evaluation of two test procedures for diagnosis of giardiasis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1992, **53**, 2028-2031.
14. Cirak V.Y., Bauer C.: Comparison of conventional coproscopical methods and commercial coproantigen ELISA kits for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dogs and cats. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 2004, **117**, 410-413.
15. Zygner W., Jaros D., Skowrońska M., Bogdanowicz-Kamirska M., Wędrychowicz H.: Występowanie *Giardia intestinalis* u psów domowych w Warszawie. *Wiad. Parazyt.* 2006, **52**, 311-315.
16. Greene C.E., Chandler F.W.: Candidiasis and Rhodotorulosis. W: Greene C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri 2006, s. 627-633.
17. Zygner W. Tri(tri)chomonozja kotów – rzadko rozpoznawana przyczyna biegunek. *Magazyn Wet.* 2009, **18**, 1086-1087.
18. Bounous D.I.: Digestive system. W: Latimer K.S., Mahafey E.A., Prasse K.W.: *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. 4th ed. Blackwell Publishing, Ames, 2003, s. 215-230.
19. <http://www.vetlab.pl/oferta.php> (16.02.2011)
20. <http://www.idexx.pl/animalhealth/laboratory/download/> (16.02.2011)
21. <http://www.labwet.pl/4/badania-laboratoryjne> (16.02.2011)
22. <http://www.drugs.com/vet/snap-giardia-antigen-test-kit.html> (16.02.2011)
23. Allenspach K., Gaschen F.P.: Choroby jelit cienkich. W: Steiner J.M.: *Choroby przewodu pokarmowego psów i kotów*. Galaktyka, Łódź, 2009, 183-198.
24. Zygner W., Jaros D., Gójska-Zygner O., Wędrychowicz H.: Azithromycin in the treatment of a dog infected with *Giardia intestinalis*. *Pol. J. Vet. Sci.* 2008, **11**, 231-234.

Dr Wojciech Zygner, Zakład Parazytologii i Inwazyjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa