

Inwazje *Cryptosporidium* u zwierząt gospodarskich, identyfikacja gatunków pasożyta przeprowadzona na podstawie analizy polimorfizmu markerów genetycznych

Streszczenie

Molekularne badania inwazji *Cryptosporidium* spp. u zwierząt zostały zainicjowane wraz z wprowadzeniem do diagnostyki parazytologicznej techniki PCR. Lepsze poznanie genomu pierwotniaka pozwoliło na opracowanie szeregu metod umożliwiających identyfikację i określanie przynależności taksonomicznej wykrywanych gatunków. W rutynowej diagnostyce inwazji *Cryptosporidium* stosuje się metody mikroskopowe. Niemniej jednak niska czułość tych metod nie pozwala na rozpoznawanie zarażeń bezobjawowych i identyfikację gatunków pierwotniaka. Dlatego coraz częściej do wykrywania zarażeń i identyfikacji gatunków *Cryptosporidium* spp. wybiera się metody oparte na analizie markerów molekularnych zlokalizowanych w genach pasożyta charakteryzujących się największym polimorfizmem genetycznym. Zarażenia *Cryptosporidium* spp. występują powszechnie u zwierząt gospodarskich. W zależności od wieku oraz stanu odporności żywiciela mogą mieć różny przebieg kliniczny, chociaż na ogół przybierają formę bezobjawowych inwazji. Pierwotniaki są uważane za główną przyczynę biegunek u cieląt, natomiast rzadziej są one notowane u jagniąt i koźląt.

Celem badań była molekularna diagnostyka inwazji *Cryptosporidium* spp. u wybranych gatunków zwierząt gospodarskich w Polsce. Ważnym elementem pracy była analiza epidemiologii zarażeń *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) u zwierząt przeprowadzona na podstawie oceny polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA pasożyta oraz ocena występowania i stopnia rozpowszechnienia zoonotycznych gatunków *Cryptosporidium* spp. Do badań użyto łącznie 472 próbki kału pochodzące od bydła, owiec, kóz, królików i świń. Kał głównie pobierano od młodych, bezobjawowo zarażonych osobników do 9. tygodnia życia. W przypadku owiec i kóz w badaniach uwzględniono różne rasy zwierząt. Zwierzęta utrzymywane były w gospodarstwach rozmieszczonych na terenie całej Polski.

Ekstrakcję DNA *Cryptosporidium* spp. z próbek kału wykonano metodą lizy alkalicznej połączonej z ogrzewaniem i wymrażaniem oocyst. Detekcję i identyfikację gatunków

Cryptosporidium spp. przeprowadzono metodą 18 SSU rRNA-, COWP- i Lib13-PCR. Genotypy i subgenotypy *C. parvum* i *Cryptosporidium cuniculus* (*C. cuniculus*) określano na podstawie analizy sekwencji mikrosatelitarnych obecnych w genie GP60 pierwotniaków. Wyniki badań analizowano statystycznie stosując metodę analizy wariancji, którą oceniano istnienie zależności pomiędzy wiekiem owiec i kóz oraz rasami zwierząt, a częstością występowania zarażeń powodowanych przez *Cryptosporidium* spp. Natomiast testem niezależności chi-kwadrat (χ^2) sprawdzano zależność pomiędzy obecnością inwazji *Cryptosporidium* spp. u małych przeżuwaczy, a wiekiem zwierząt. Wpływ wieku cieląt na obecność zarażeń *C. parvum* oraz ocenę dominacji inwazji powodowanych przez szczepy pasożyta o genotypie IIa, IIb i III badano metodą jednoczynnikowej analizy wariancji. Dwuczynnikową metodę analizy wariancji bez interakcji zastosowano do oceny częstości występowania poszczególnych gatunków *Cryptosporidium* spp. u rodzimych ras owiec.

Prewalencję *Cryptosporidium* spp. u małych przeżuwaczy określono na 19,2% i 37,1% odpowiednio u jagniąt i koźląt. W populacji owiec (82,1%) i kóz (27,6%) w Polsce dominowały zarażenia powodowane przez *Cryptosporidium xiaoi* (*C. xiaoi*), rzadziej stwierdzano inne gatunki pierwotniaka jak *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium ubiquitum*, *Cryptosporidium hominis* i *C. parvum*. Nie obserwowano istotnej zależności pomiędzy obecnością inwazji i wiekiem zwierząt ($\chi^2=2,195$, $P=0,139>0,05$). U koźląt oprócz *C. xiaoi* (27,6%) zarażenia powodowane były przez *C. parvum* (0,95%). W krajowej populacji owiec również obserwowano inwazje mieszane wywoływane przez dwa lub trzy gatunki *Cryptosporidium*. Ponadto stwierdzono obecność zoonotycznych szczepów *C. parvum* o subgenotypie IIaA17G2R1 (jagnięta) i IIbA23G1 (koźlęta). W stadach cieląt najczęściej identyfikowano szczepy *C. parvum* należące do genotypu IIa (84,2%, CI=3,6%), w porównaniu do inwazji wywoływanych przez pierwotniaki o genotypach IIb (9,5%, CI=4,2%) i III (6,0%, CI=7,2%). Spośród 14 zidentyfikowanych subgenotypów *C. parvum* dominowały szczepy IIaA17G1R1, IIaA17G2R1, IIaA15G2R1 i IIaA16G1R1b. W populacji bydła stwierdzono nowe, dotychczas nie wykrywane u tego gatunku zwierząt w Europie szczepy *C. parvum* o subgenotypach IIaA10G1R1 i IIIA19R3. Najwyższą prewalencję zarażeń *C. parvum* (22,5%, CI=2,5%) obserwowano u zwierząt do 2. tygodnia życia, znacznie niższa była ona u cieląt w grupie wiekowej od 2. do 4. (6,6%, CI=2,6%) i powyżej 4 tygodnia życia (4,9%, CI=2,1%).

Po raz pierwszy na fermie wielkotowarowej królików w Polsce rozpoznano kryptosporydiozę powodowaną przez *C. cuniculus* o subgenotypie VbA24. Zakażenia tym szczepem pierwotniaka dotychczas nie były identyfikowane u królików na świecie. Zakażenia mieszane *Cryptosporidium* spp. obserwowane są dość często u trzody chlewnej, co przysparza dużych trudności diagnostycznych. Biorąc pod uwagę fakt, że analizy molekularne próbek zawierających mieszaninę genomowego DNA różnych gatunków *Cryptosporidium* na ogół prowadzą do wykrycia tylko jednego, dominującego gatunku pierwotniaka, do identyfikacji *Cryptosporidium* spp. użyto metodę sekwencjonowania nowej generacji. Analiza NGS potwierdziła zakażenie zwierząt powodowane przez *Cryptosporidium suis* i *Cryptosporidium scrofarum*. Ponadto zastosowana metoda pozwoliła na analizę próbek zawierających niewielką koncentrację podobnych matryc DNA w przypadkach zakażeń mieszanych.

Summary

Molecular studies of *Cryptosporidium* invasions in animals were initiated with the introduction of PCR methods into parasitology diagnostics. Better recognition of the parasite genome allowed the rapid development of novel molecular tools for identification and taxonomic classification of *Cryptosporidium* species. Currently the most-employed methods in *Cryptosporidium* research are those enabling a DNA sequence polymorphism analysis. Prior to these methods, microscopy was dominant in routine diagnostics of *Cryptosporidium* invasions. However, it does not allow recognition of parasite species or detection of asymptomatic infections. Asymptomaticity may characterise *Cryptosporidium* infections, which are commonly reported in farm animals. Depending on the host age and immunity infections may result in disease with different clinical courses. When disease is developed then it is usually characterized by diarrhoea with varying degrees of severity.

The aim of this study was a molecular diagnosis of *Cryptosporidium* invasions in farmed ruminants, pigs, and rabbits in Poland. An important part of this research were studies on the molecular epidemiology of *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) infections in animals employing microsatellite DNA sequence analysis of the parasite genome. In addition, an assessment of the prevalence and distribution of zoonotic *Cryptosporidium* species in animals was conducted.

In total, 472 faecal samples collected from cattle, sheep, goats, rabbits, and pigs were examined. Mostly young, asymptotically infected animals up to 9 weeks of age were sampled. In the case of sheep and goats the tested animals represented different animal breeds reared in Poland. The animals were kept in farms across Poland. *Cryptosporidium* genomic DNA was extracted from faecal samples using an alkali wash and a heat lysis method. The detection and identification of *Cryptosporidium* spp. were performed using 18 SSU rRNA, COWP-, and Lib13-PCRs. For subtyping of *C. parvum* and *Cryptosporidium cuniculus* (*C. cuniculus*) strains, microsatellite sequence analysis of the GP60 gene was conducted. The obtained results for parasite occurrence in animals were statistically analysed and analysis of variance was performed to assess the relationship between sheep and goat age, animal breed and the frequency of reported *Cryptosporidium* infections. Additionally, a chi-squared (χ^2) test was used to show the relationship between the occurrence of infections in small ruminants and their age. The relationship between cattle age and frequency of *C. parvum*

occurrence as well as the dominance of infections caused by *C. parvum* strains belonging to the IIa, IIc, and III genetic families were analysed using one-way analysis of variance. A two-way analysis of variance without interactions allowed demonstration of the differences in frequency of the occurrence of particular parasite species in native Polish sheep breeds.

The prevalence of *Cryptosporidium* spp. in small ruminants was 19.2% in lambs and in goat kids it was 37.1%. *Cryptosporidium xiaoi* (*C. xiaoi*) infections preponderated in the population of sheep (82.1%) and goats (27.6%) in Poland. Infections caused by other parasite species such as *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium ubiquitum*, *Cryptosporidium hominis*, and *C. parvum* were reported less frequently. There was no significant correlation observed between the presence of infection and animal age ($\chi^2=2.195$, $P=0.139>0.05$). Besides *C. xiaoi* (27.6%), *C. parvum* (0.95%) was also detected in goat kids, while in the sheep population in Poland mixed invasions caused by two or three parasite species were also observed. In addition, zoonotic IIaA17G2R1 (lambs) and IIcA23G1 (goat kids) *C. parvum* subtypes were found. In cattle herds the IIa subtype family prevailed (84.2%, CI=3.6%) over the IIc (9.5%, CI=4.2%) and III (6.0%, CI=7.2%) subtypes. Calves were mostly infected with 4 (IIaA17G1R1, IIaA17G2R1, IIaA15G2R1, and IIaA16G1R1b) out of 14 *C. parvum* subtypes detected. For the first time two novel IIaA10G1R1 and IIIA19R3 subtypes were identified in a bovine host in Europe. The highest *C. parvum* prevalence (22.5%, CI=2.5%) was observed in animals at the age of up to two weeks. It was significantly lower in cattle at the age of two to four weeks (6.6%, CI=2.6%) and older calves (4.9%, CI=2.1%).

For the first time an outbreak of cryptosporidiosis caused by the novel *C. cuniculus* subtype VbA24 was reported on a commercial rabbit farm in Poland. Worldwide leporine research had not identified this *Cryptosporidium* strain in rabbits before. The species of farm animals parasitised by *Cryptosporidium* are not only cattle, sheep, goats, and rabbits, as intestinal *Cryptosporidium* is also a frequent pig parasite. Infections are usually asymptomatic, caused by pig-specific *Cryptosporidium* with a low number of oocysts shed in the faeces. In addition, mixed infections with two or more *Cryptosporidium* species are often observed. In fact, this makes identification of parasites difficult or causes it to be unsuccessful when PCR-based methods are used. It is because efficient amplification of parasite DNA takes place only from the dominant species present in the sample. Therefore a next generation sequencing method (NGS) was used for detection and characterisation of *Cryptosporidium* species infecting pigs. Although initial molecular analyses indicated the

possible presence of another *Cryptosporidium* species other than *Cryptosporidium scrofarum* and *Cryptosporidium suis*, deep sequencing only confirmed the presence of pig-specific *Cryptosporidium*. In this study an alternative NGS technology based on Illumina sequencing was employed which allowed the identification of *Cryptosporidium* species in samples with low abundance of parasite DNA.