

Diffusione e caratterizzazione molecolare di isolati di *Giardia duodenalis* in cuccioli provenienti da canili del centro Italia

RIASSUNTO

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di determinare la prevalenza di *Giardia duodenalis* in cuccioli ospitati presso canili, definire alcuni potenziali fattori di rischio associati all'infezione e caratterizzare genotipicamente gli isolati per definirne il potenziale zoonotico.

Lo studio ha coinvolto 127 cuccioli ospitati in 3 canili rifugio (C₁, C₂, C₃). I campioni fecali di ciascun soggetto sono stati sottoposti a screening mediante DFA per la ricerca di coproantigeni di *G. duodenalis*. I campioni risultati positivi sono stati testati tramite PCR per l'amplificazione di frammenti target dei loci 16s-rRNA e β-giardina.

G. duodenalis è stata identificata in 49 dei 127 cuccioli (38,6%). I soggetti ospitati nella struttura da più di 21 giorni sono risultati più frequentemente infetti rispetto agli altri, così come quelli ricoverati in box multipli. Dei 49 campioni DFA positivi, 36 isolati sono stati amplificati con successo: 22 con entrambi i targets indagati e 14 unicamente attraverso primers specifici per il 16s-rRNA. Il sequenziamento dei 36 frammenti del 16s-rRNA ha permesso di evidenziare 31 assemblaggi di tipo D, 4 di tipo C ed 1 di tipo A. Inoltre, l'analisi dei profili di restrizione degli amplificati della β-giardina ed il successivo sequenziamento hanno permesso di rilevare la presenza di due "infezioni miste" (D ed A-I).

Nonostante la bassa prevalenza del genotipo zoonotico, le possibili implicazioni per la salute pubblica devono essere considerate con la dovuta attenzione alla luce del fatto che i cuccioli sono la categoria preferenzialmente data in affidamento presso nuclei familiari.

INTRODUZIONE

Giardia duodenalis è un protozoo poliflagellato a diffusione cosmopolita, responsabile di sindromi enteriche di gravità variabile nell'uomo ed in numerose altre specie animali, sia domestiche che selvatiche¹.

Esso rappresenta uno degli organismi maggiormente studiati a livello mondiale per il ruolo patogeno, l'ubiquità (è il parassita intestinale più diffuso nella specie umana, con un numero di $2,8 \times 10^8$ nuovi casi all'anno - World Health Organization, 1996) e le possibili implicazioni di natura zoonotica.

Negli ultimi anni sono state intraprese numerose ricerche finalizzate ad individuare il ruolo delle singole specie animali nell'epidemiologia dell'infezione e nella sua propagazione tra le comunità umane, al fine di operare sia in termini di prevenzione che di controllo.

Un particolare interesse è stato rivolto agli animali da compagnia, cani principalmente, provenienti da differenti realtà^{2,3,4,5}.

Studi epidemiologici hanno dimostrato come *G. duodenalis* rappresenti uno tra i più comuni enteropatogeni del cane sia in Paesi industrializzati che in via di sviluppo^{6,7}, ed è stata sottolineata l'elevata prevalenza del parassita all'interno di strutture ad alta densità di animali, quali allevamenti e canili^{4,8,9,10}.

In tali realtà il parassita, oltre a diffondere (con tassi di prevalenza che possono giungere fino al 75%), manifesta meglio anche il suo potenziale patogeno, con quadri morbosi anche mortali, specie nei soggetti più

Fabrizia Veronesi, DVM, PhD

Giulia Morganti, DVM

Daniela Piergili Fioretti, Biol

Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene
delle Produzioni Animali e Alimentari, Sezione Parassitologia
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi
di Perugia

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 26/08/2010 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 24/11/10".

giovani e quando in associazione con agenti virali e batterici.

Al di là degli aspetti strettamente connessi al benessere animale, queste evidenze pongono leciti interrogativi anche sul versante della salute pubblica. In particolare, dal momento che i cuccioli hanno maggiori possibilità rispetto ai cani adulti di essere adottati, il loro inserimento all'interno di un nucleo familiare dove siano presenti soggetti suscettibili all'infezione da *Giardia* (ad es. bambini, anziani, soggetti immunodepressi o portatori di patologie concomitanti) merita attenzione e non può comunque prescindere dalla precisa definizione del loro stato d'infezione.

Sulla base di tali premesse, obiettivi del presente lavoro sono stati quelli di stimare il grado di diffusione dell'infezione da *G. duodenalis* tra i cuccioli ospitati presso canili del Centro Italia, eseguire una caratterizzazione biomolecolare degli "assemblaggi" circolanti per definirne il potenziale zoonotico, stabilire quali siano i fattori di rischio che favoriscono la diffusione di tali "assemblaggi" tra i cuccioli e nell'ambiente.

MATERIALI E METODI

Animali

L'indagine è stata condotta tra Aprile 2009 e Gennaio 2010 presso 3 canili rifugio (C_1 , C_2 , C_3) che ospitano annualmente un numero elevato di cuccioli provenienti da differenti canili sanitari di Umbria e Toscana. I canili sono stati reclutati sulla base della disponibilità offerta dagli enti gestionali, nonché sulla base di un'anamnesi relativa alla presenza di casi clinicamente conclamati di giardiasi. I canili oggetto di indagine ospitano stabilmente 400 (C_1), 220 (C_2) e 200 (C_3) cani adulti ed un numero variabile di cuccioli compreso fra 40 e 120. Le strutture presentano un'organizzazione simile con suddivisione in settori, ognuno dei quali costituito da recinti esterni destinati a 2-6 cani adulti. I cuccioli vengono mantenuti al chiuso, ben riparati e riscaldati; il flusso elevato non consente, tuttavia, di garantire ad ogni cucciolo un box singolo, pertanto, questi animali vengono solitamente ospitati in box multipli, contenenti un numero variabile di animali compreso fra 2 e 8.

La pulizia dei box viene effettuata durante tutto l'arco della giornata per mezzo di fogli di giornale che tappezzano il pavimento e permettono un rapido allontanamento delle feci. Non è previsto il ricorso a disinfezioni di tipo chimico.

Il campionamento è stato condotto a tappeto, su tutti i cuccioli introdotti nei 3 canili nell'arco dei 10 mesi di studio. Complessivamente sono stati campionati 127 soggetti, di cui 66 provenienti dal canile C_1 , 36 dal canile C_2 e 25 dal canile C_3 .

Per ciascun soggetto sono stati raccolti dati relativi alle pratiche di gestione della struttura di pri-

ma accoglienza ed è stata redatta una scheda anamnestica individuale.

Gli animali sono stati suddivisi secondo tre distinte classi d'età: 30-45 giorni; 2-4 mesi; 4-6 mesi; per ciascun animale è stata annotata la tipologia di ricovero (box singolo, box multiplo), il tempo di permanenza all'interno del canile (< 14 giorni, tra 14 e 21 giorni, > 21 giorni), la profilassi antelmintica effettuata (annotando se il prodotto farmacologico utilizzato contenesse o meno molecole attive contro *Giardia*), la consistenza delle feci al momento del campionamento (conformate, non conformate).

Raccolta e conservazione campioni

I campioni fecali raccolti sono stati suddivisi in 2 aliquote di circa 20 g l'una: la prima aliquota, conservata in contenitori a temperatura di refrigerazione (+ 4°C) per max 24 h, è stata utilizzata per la ricerca dei coproantigeni di *G. duodenalis* tramite test di Immunofluorescenza diretta (DFA) mentre la seconda aliquota, nei campioni risultati positivi alla DFA, è stata sottoposta ad estrazione del DNA genomico per la successiva genotipizzazione.

Immunofluorescenza diretta (DFA)

La prima aliquota di feci è stata sottoposta a 2 successivi cicli di lavaggio con PBS (pH 7,2); il pellet è stato risospeso in soluzione 1 M di saccarosio in un rapporto 1:5 all'interno di una provetta da 50 ml e centrifugato per 10' a 800 rpm; il surnatante è stato recuperato e sottoposto a due successivi lavaggi con PBS (pH 7,2).

Il pellet ottenuto è stato nuovamente risospeso in 0,8 ml di PBS e 25 µl di tale sospensione sono stati utilizzati per la ricerca dei coproantigeni di *G. duodenalis*, tramite kit diagnostico in DFA (Merifluor Cryptosporidium-Giardia®, Meridian Bioscience) in accordo con le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

Parallelamente alla valutazione qualitativa, è stata eseguita anche una valutazione di tipo quantitativo in rapporto all'intensità dell'escrezione osservata; a tal fine i campioni sono stati classificati secondo 4 distinti patterns in base al numero di cisti repertate osservando un campo ottico alla magnitudine di 400 X: 0: nessuna ciste per campo ottico (campione negativo); 1: 1-2 cisti per campo ottico (escrezione bassa); 2: 2-5 cisti per campo ottico (escrezione moderata); > 5 cisti per campo ottico (escrezione elevata).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Le seconde aliquote dei campioni fecali risultati positivi alla DFA sono state sottoposte ad estrazione del DNA a partire da 200 µl della sospensione concentrata di cisti ottenuta con modalità

sovrapponibili a quelle già descritte per la ricerca coproantigenica. Per l'estrazione si è fatto riferimento al protocollo operativo descritto dal QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

I prodotti di estrazione sono stati sottoposti a protocolli di PCR per amplificare due tratti di sequenze del genoma parassitario: un frammento di 212 pb situato sulla subunità ribosomiale 16s-rRNA¹¹ ed un frammento di 511 pb del gene della β -giardina¹².

Il frammento finale della β -giardina è stato ottenuto mediante un protocollo di Nested-PCR utilizzando i primers esterni G7(f) (5'-AAGCCCGAC-GACCTCACCCGAGTGC-3') e G759(r) (5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3') (frammento atteso 753 pb) ed i primers interni BGN(f) (5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3') e BGN(r) (5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3') (frammento atteso 511 pb), applicando i protocolli termici suggeriti da Cacciò et al.¹².

Per quanto riguarda l'amplificazione del frammento target del gene 16s-rRNA è stata eseguita una prima reazione di PCR (frammento atteso: 292) utilizzando i primers RH11(f) (5'-CATCCGGTC-GATCCTGCC-3') e RH4(r) (5'-AGTCGA-ACCCTGATTCTCCGCCAGG-3') seguita da una seconda reazione (frammento atteso: 212 pb) per la quale sono stati utilizzati i primers RH11(f) e Gia-N(r) (5'-GTGATGCCCCGGAAGCCCG-3'); le reazioni sono state eseguite applicando le condizioni termiche riferite da Berrilli et al.¹¹.

Tutte le reazioni di PCR sono state ottenute su un volume finale di 50 μ l contenente 10 μ l di DNA ed una miscela di reazione costituita da 5 μ l di 10X iTaq buffer (BIO-RAD), 0,5 μ l di MgCl₂ (50 mM), 1 μ l di dNTP's (10 mM, BIO-RAD), 10 μ l di ciascun primer (10 pmol/ μ l), 0,25 μ l di iTaq DNA Polymerase (5 U/ μ l, BIO-RAD) e 31,25 μ l di H₂O distillata sterile.

Aliquote da 16 μ l dei prodotti di amplificazione sono state caricate insieme a 4 μ l di un Gel Pilot Loading Dye (5X, Qiagen) su gel di agarosio al 1,2% (Agarose electrophoreses grade, Invitrogen) e analizzate mediante corsa in camera elettroforetica usando il tampone di caricamento TBE (89 mM di Tris-HCl, pH 7,2, 89 mM di acido borico e 2 mM di EDTA, Invitrogen) 1X ed applicando un voltaggio di 120V per circa 45'.

Gli amplificati, colorati con bromuro di etidio (0,5 ug/ml) in tampone TBE 1X, sono stati visualizzati al transilluminatore. Il peso molecolare dei frammenti amplificati è stato stimato per confronto con il marker di peso molecolare noto (1 KbPlus marker, Invitrogen).

Sequenziamento

Per determinare gli "assemblaggi" di appartenenza di ciascun isolato, tutti i campioni risultati positivi in PCR al 16s-rRNA ed alla β -giardina sono stati purificati da gel di agarosio mediante il kit Qiaex Gel

Extraction (Qiagen) e sequenziati sia in *forward* che in *reverse* per mezzo di un sequenziatore automatico. Le sequenze ottenute sono state lette, appaiate ed è stata eseguita un'analisi di sequenza utilizzando gli strumenti analitici forniti dall'NCBI (*National Center for Biotechnologies and Information*) comparando le sequenze ottenute con quelle disponibili in GenBank ed EMBL mediante il programma nBLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Tutti i campioni risultati positivi in PCR alla β -giardina sono stati sottoposti, oltre al sequenziamento, a RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) secondo il protocollo descritto da Lalle et al.¹³.

La digestione enzimatica è stata ottenuta attraverso incubazione per 4 h a 37 °C in un volume totale di 20 μ l contenente Buffer 10X, 2000 ng del prodotto di PCR e 1 U di enzima *HaeIII* (Fermentas) che riconosce selettivamente la sequenza A↓AGCTT.

I prodotti digeriti sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio ad alta risoluzione al 3% (MetaPhor Agarose, Microtech) e riconosciuti tramite confronto con un opportuno standard esaminato contemporaneamente (DNA Molecular Weight, 20 pb, Fermentas), previa colorazione con TBE 1X e bromuro di etidio (0,5 ug/ml) per 30 minuti e decolorazione mediante lavaggio con H₂O distillata per 20 minuti.

Analisi statistica

I risultati dello screening coprologico mediante DFA sono stati utilizzati per il calcolo della prevalenza osservata (PO) e di quella attesa (PA), basata sugli indici di accuratezza del test applicato alla specie canina (Sensibilità 90%; Specificità 94%)¹⁴, con relativi limiti fiduciarci (C.I.) al 95%.

I dati di prevalenza ottenuti con DFA sono stati valutati tramite un'analisi statistica a singola variabile (test del chi-quadro) inserendo nel modello le seguenti variabili: canile d'origine, età, tempo di persistenza all'interno della struttura, tipo di stabulazione, presenza di sintomi e trattamenti farmacologici attivi contro *Giardia*. È stata inoltre stimata la misura dell'associazione, in termini di odds ratio (O.R.), tra la positività al DFA e le varie categorie di ogni variabile considerata con i relativi C.I. al 95%. Per l'analisi statistica ci si è avvalsi del free software WinPepi (2005).

RISULTATI

Quarantanove cuccioli (PO: 38,6% C.I. 95% 30,1-47,6; PA: 38,8% C.I. 95% 29,2-49,1) sono risultati positivi alla ricerca coproantigenica per *G. duodenalis*; di questi 28 provenivano dal canile 1 (C₁), 12 dal canile 2 (C₂) e 9 dal canile 3 (C₃) (Tab. 1).

TABELLA 1
Distribuzione dei soggetti DFA positivi rispetto sia alla classe d'età (adulti/cuccioli) e al canile di provenienza

Canile	DFA No animali DFA positivi/ No animali campionati	PO % (C.I. 95%)	PA % (C.I. 95%)
C ₁	28/66	42,4% (32,1-55,5)	43,4% (30,05-57,7)
C ₂	12/36	33,3% (18,6-50,9)	32,5% (16,9-51,9)
C ₃	9/25	36% (18-57,5)	35,7% (16,9-58,9)
No Totale	49/127	38,6% (30,1-47,6)	38,8% (29,2-49,1)

PO: prevalenza osservata; PA: prevalenza attesa.

TABELLA 2
Distribuzione dei soggetti DFA positivi rispetto ai diversi patterns d'intensità d'escrezione cistica

Classe di escrezione	DFA No animali positivi	Prevalenza% (C.I. 95%)
Bassa	26	53,1% (38,3-67,5)
Moderata	16	32,6% (19,9-47,5)
Elevata	7	14,3% (6,5-26,2)

Rispetto ai patterns d'escrezione, 26 soggetti (53,06%, C.I. 95% 38,3-67,5) mostravano escrezione bassa, 16 (32,6%, C.I. 95% 19,9-47,5) moderata e 7 animali (14,3%, C.I. 95% 6,5-26,2) elevata (Tab. 2).

Tra le variabili analizzate, sono risultate significativamente associate alla positività per *Giardia* il tempo di persistenza all'interno dei canili (P<0,05) e la tipologia di accasamento dei cuccioli (P<0,001) (Tab. 3). I cuccioli ospitati nelle strutture da più di 21 gg sono risultati più predisposti all'infezione (O.R.: 13,2; C.I. 95% 6,2-17,1), così come quelli accasati in box multipli rispetto ai singoli (O.R.: 2,36; C.I. 95% 1,8-7,1).

Non sono emerse associazioni significative (P>0,05) tra positività all'infezione e canile di provenienza, età degli animali, alterazioni nella consistenza delle feci e trattamenti con molecole farmacologicamente attive nei confronti di *Giardia* (Tab. 3).

L'infezione da *Giardia* rilevata mediante DFA è stata confermata tramite PCR complessivamente in 36 dei 49 campioni fecali positivi (73%; C.I. 95% 19,21%-31,03%); di questi, 22 (44,89%; C.I. 95% 30,74-59,81) sono stati amplificati con successo sia con primers specifici per il 16s-rRNA (Fig. 1) che per la β-giardina (Fig. 2) mentre 14 sono risultati positivi unicamente per il frammento target 16s-rRNA.

Dei 36 isolati amplificati con successo, 24 provenivano dal canile 1, 8 dal canile 2 e 4 dal canile 3 (Tab. 5).

TABELLA 3
Risultati dell'analisi univariata: fattori di rischio connessi alla positività coprologica a *Giardia*

Variabile • categoria	% Animali DFA positivi (No positivi/No totale)	P	O.R.	95% C.I.
Età				
• 30-45 giorni	35,1% (13/37)	0,38	1	–
• 2-3 mesi	43,4% (33/76)		1,4	0,8-2,4
• 4-6 mesi	21,4% (3/14)		0,5	0,1-1,1
Accasamento		*0,048		
• box singoli	24,1% (7/29)		1	–
• box multipli	42,8% (42/98)		2,3	1,8-7,1
Presenza diarrea		0,59		
• si	35,9% (14/39)		1	–
• no	40,9% (36/88)		0,8	0,3-1,8
Canile di provenienza		0,63		
• 1	42,4% (28/66)		1	–
• 2	33,3% (12/36)		0,6	0,1-1,0
• 3	36% (9/25)		0,7	0,3-0,9
Trattamenti farmacologici		0,32		
• si	31,2% (10/32)		1	–
• no	41% (39/95)		1,5	0,6-4,0
Tempo di permanenza nel canile		*0,000		
• < 14 giorni	9,6% (3/31)		1	–
• 14-21 giorni	31,5% (12/38)		4,0	2,1-7,4
• > 21 giorni	58,6% (34/58)		13,2	6,2-17,1

*Differenza statisticamente significativa (P< 0,05).

Confrontando i risultati ottenuti mediante DFA con quelli derivanti dall'applicazione dei protocolli biomolecolari, si evidenzia come questi ultimi abbiano una minor capacità di rilevare infezioni a bassa escrezione cistica. In particolare, l'applicazione del protocollo di semi-Nested al frammento target di 212 pb della 16s-rRNA di isolati provenienti da animali con classe d'escrezione bassa ha consentito di amplificare con successo solo 13 dei 26 (50%) campioni; utilizzando come target di amplificazione la β -giardina, la percentuale di positività si è ulteriormente ridotta al 26,92% (7/26) (Tab. 4). Applicando i medesimi protocolli ad isolati provenienti da animali con classi d'escrezione moderata ed elevata, la percentuale di successo nell'amplificazione dei frammenti è notevolmente aumentata sia per la 16s- rRNA (100%) che per la β -giardina (55,25% per i campioni in classe moderata e 85,71% per quelli in classe elevata) (Tab. 4).

Per quanto riguarda l'identità genetica degli isolati parassitari, l'analisi delle sequenze dei 36 frammenti del 16s-rRNA ha evidenziato la presenza di 31 "assemblaggi" di tipo D, 4 di tipo C ed 1 di tipo A. L'analisi dei profili di restrizione dei 22 amplificati della β -giardina ed il successivo sequenziamento ha permesso di confermare l'identità degli isolati specie specifici (C e D) e nel caso di due campioni di svelare la contemporanea presenza di assemblaggi misti di tipo D ed A-I.

La distribuzione degli assemblaggi rispetto ai canili di provenienza è riportata nella Tabella 5: l'assemblaggio D è risultato quello maggiormente diffuso in tutti e tre i canili; in particolare, nei canili 2 e 3 sono stati isolati unicamente assemblaggi specie-specifici del cane, mentre i 2 isolati zoonotici provenivano dal canile 1.

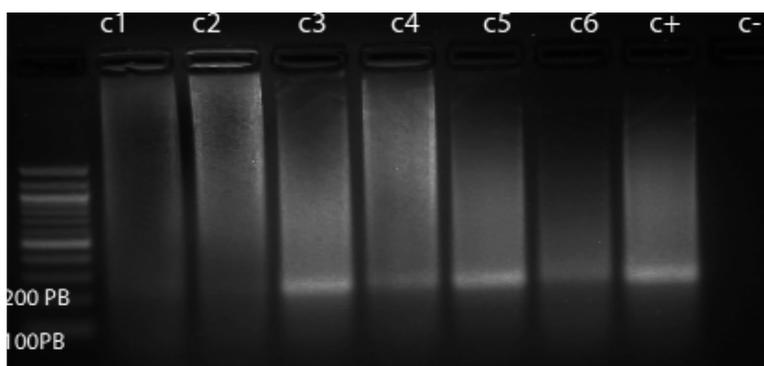


FIGURA 1 - Elettroforesi dei prodotti di amplificazione del frammento di 212 pb situato sulla subunità ribosomiale 16s-rRNA. C+ = controllo positivo C- = controllo negativo C1,2,3,4,5,6= campioni in esame.

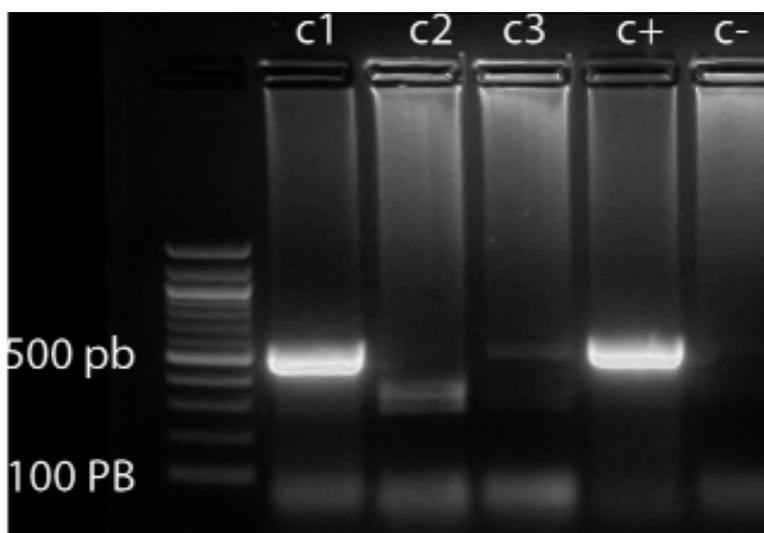


FIGURA 2 - Elettroforesi dei prodotti di amplificazione del frammento di 511 pb situato sul gene codificante per la β -giardina. C+= controllo positivo C-= controllo negativo C1,2,3= campioni in esame.

TABELLA 4 Distribuzione della PCR positività in relazione alle diverse classi di escrezione cistica				
Classe di escrezione	PCR β -giardina		PCR 16s-rRNA	
	No animali PCR+/ No animali DFA +	Prevalenza % (C.I. 95%)	No animali PCR+/ No animali DFA +%	Prevalenza (C.I. 95%)
1	7/26	26,92% (11,61-47,82)	13/26	50% (29,93-70,12)
2	9/16	56,31% (29,93-80,24)	16/16	100% (79,42-100)
3	6/7	85,71% (42,14-99,63)	7/7	100% (59-100)
Totale	22/49	44,89% (30,74-59,81)	36/49	73% (58,92-85,12)

TABELLA 5 Distribuzione dei diversi "assemblaggi" genomici rispetto al canile di provenienza				
Assemblaggio	Canile 1	Canile 2	Canile 3	Totale
A-I+D	2	0	0	2
C	3	1	0	4
D	19	7	4	30
Totale	24	8	4	36

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, l'applicazione della Legge 281/1991 per il controllo del randagismo ha fatto sì che la popolazione canina ospitata presso i canili pubblici aumentasse progressivamente e che, di conseguenza, aumentassero anche le patologie a trasmissione oro-fecale riconducibili ad un'igiene ambientale non facile da mantenere.

Nonostante l'analisi comparativa dei risultati ottenuti da studi epidemiologici sia spesso difficile a motivo dell'utilizzo di tecniche diagnostiche diversificate e della variabilità inter ed intra popolazione oggetto di studio, indagini condotte a livello mondiale hanno dimostrato un'ampia circolazione dell'infezione da *G. duodenalis* nelle popolazioni canine ed in particolar modo in quelle presenti all'interno di canili rifugio ed allevamenti¹⁵.

In tale contesto vanno inseriti e discussi i risultati del presente studio, fra i pochi in letteratura che si focalizzano sul ruolo del cucciolo nell'epidemiologia dell'infezione.

Peraltro, proprio questi soggetti risultano a maggior rischio a causa della giovane età, dello stress legato a sovraffollamento e scarsa igiene ambientale, delle carenze nutrizionali e dei cambi di alimentazione apportati.

Il presente lavoro è il primo, in ambito nazionale, volto a definire la prevalenza ed i fattori di rischio connessi al perpetuarsi dell'infezione da *Giardia* in cuccioli ospitati presso canili.

Il confronto con precedenti dati di prevalenza relativi a canili rifugio in Italia, mette in evidenza come il valore riscontrato ricada nel range fino ad oggi disponibile, compreso tra il 14% e il 74%^{4,8,9,10,11,17,18,19}.

Per quanto riguarda i fattori di rischio connessi all'instaurarsi della parassitosi, l'analisi univariata ha messo in evidenza una significativa associazione tra positività a *Giardia*, tempo di persistenza dei cuccioli all'interno della struttura e permanenza in box multipli. Questo dato suggerisce come il confinamento di un numero elevato di soggetti all'interno di un'area ristretta, l'intensa interazione che si verifica tra cuccioli, unitamente all'assenza di una corretta disinfezione dei box ed alla scarsa maturità immunologica dei soggetti, possano favorire l'ampia diffusione della parassitosi e l'instaurarsi di una condizione di endemia ambientale.

Negli ultimi anni, il ruolo del cane nell'epidemiologia della giardiasi umana sta finalmente definendosi grazie allo sviluppo di tecniche di biologia molecolare. L'applicazione di tali metodologie ha consentito di evidenziare la recettività della specie canina sia per "assemblaggi" specie-specifici (C e D) sia per "assemblaggi" come A-I ed occasionalmente B, dotati di potenzialità zoonotiche^{10,20,21}. Vale la pena ricordare che recentemente l'assemblaggio A-II, considerato specifico dell'uomo, è stato rin-

venuto in campioni fecali di cane sia in Messico che in India^{22,23} e che, viceversa, un "assemblaggio" ritenuto specifico del cane (C) è stato isolato in una comunità umana disagiata di Bangkok²⁴.

Per quanto riguarda il presente lavoro, la genotipizzazione degli isolati ha confermato la circolazione prevalente degli "assemblaggi" specie-specifici (C e D), in analogia con studi precedentemente condotti sia in Europa che in Italia^{14,10,11,13,19}. Tale genotipizzazione è stata effettuata mediante sequenziamento di due distinti marker genetici: β -giardina e 16s-rRNA.

Il target 16s-rRNA si è mostrato maggiormente sensibile rispetto alla β -giardina nell'individuare infezioni a bassa intensità d'escrezione cistica, mentre l'RFLP ed il sequenziamento applicati agli amplificati di β -giardina hanno consentito sia di confermare l'identità genetica degli "assemblaggi" specie-specifici che di individuare la presenza di due infezioni miste (A-I, D), evenienza già riportata in letteratura^{13,25,26}.

I nostri risultati supportano, in questo senso, quanto affermato da Cacciò *et al.*²⁷ circa i limiti di un approccio basato sullo studio delle sequenze di un unico locus genetico quale ad esempio il 16s-rRNA. Recenti studi hanno infatti dimostrato come l'indagine di almeno due *loci* genetici risulti essenziale al fine sia di distinguere in maniera inequivocabile tra i diversi assemblaggi e sotto-assemblaggi²⁸, sia di individuare correttamente infezioni sostenute da più genotipi contemporaneamente, come nel nostro caso.

Nonostante la bassa prevalenza del genotipo zoonotico riscontrata nel presente lavoro, le possibili implicazioni per la salute pubblica devono comunque essere prese in considerazione.

Dati bibliografici internazionali^{22,23,24,29} relativi ad indagini effettuate in alcuni Paesi in via di sviluppo (Tailandia, India, Brasile) supportano la possibilità di un passaggio interspecifico cane-uomo del parassita in quanto, in tali Paesi, l'elevata interazione animale-uomo facilita l'instaurarsi di cicli antropozoonotici e/o zoonotici.

La problematica connessa al ruolo del cane nell'epidemiologia dell'infezione umana merita tuttavia di essere ulteriormente indagata anche nei Paesi socio-economicamente più evoluti, vista la crescente tendenza ad umanizzare l'animale da compagnia, specialmente il cucciolo, e l'incurezza nella gestione igienica dello stesso.

Indagini condotte in Italia hanno già evidenziato la presenza del sottoassemblaggio zoonotico A-I in campioni fecali di cane raccolti in aree verdi di diverse città^{5,30}.

Ulteriori indagini mirate all'identificazione di comunità e categorie di animali ad alto rischio e alla messa a punto di test diagnostici sempre più sensibili e specifici sono auspicabili al fine di un migliore inquadramento della problematica e, ove indicato, alla definizione di linee guida gestionali.

Parole chiave

Giardia duodenalis, cuccioli, canile.

Prevalence of *Giardia duodenalis* infection and genotyping of isolates in puppies housed in kennels of central Italy

Summary

Aim of the present study was to determine the prevalence, genotypes and associated risk factors for *Giardia duodenalis* infection occurring in puppies housed in kennels. The study was conducted on 127 puppies housed in 3 different public kennels (C₁, C₂, C₃). Individual faecal samples were collected and screened by a commercially available DFA test; genomic DNA was extracted from the DFA positive samples and amplified at 16s-rRNA and at β-giardin protein loci. *G. duodenalis* was identified in

49 of the 127 puppies analyzed (38.58%); *Giardia*-positive puppies were more prevalent amongst those kept in multiple than individual box, and those kennelled since more than 21 days. Twenty two of the DFA positive samples were successfully amplified at both loci whereas 14 samples only at 16s-rRNA locus. The sequence analysis of 16s-rRNA fragments showed that 31 isolates exhibited an high homology with *G. duodenalis* dog-specific genotype D, 4 with genotype C and 1 with genotype A; RFLP and sequence analysis applied to the β-giardin fragments allowed also to identify two mix infections (A-I, D). Despite the low prevalence of zoonotic genotypes, public health implications of *Giardia* infection in kennelled puppies deserve attention since they represent an important source of new pets for households.

Key words

Giardia duodenalis, puppies, kennel.

BIBLIOGRAFIA

- Thompson RCA: The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* 126: 15-35, 2004.
- Claerebout E, Casaert S, Dalemans A C, De Wilde N, et al.: *Giardia* and other intestinal parasites in different dog population in Northern Belgium. *Vet. Parasitol.* 161: 41-46, 2009.
- Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Jiménez-Cardoso E: Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitol. Res.* 97: 1-6, 2005.
- Paoletti B, Iorio R, Capelli G, Sparangano OAE, et al.: Epidemiological scenario of giardiasis in dogs from Central Italy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149: 371-374, 2008.
- Papini R, Marangi M, Mancianti F, Giangaspero A: Occurrence and cyst burden of *Giardia duodenalis* in dog faecal deposits from urban areas: implication for environmental contamination and related risks. *Prev. Vet. Med.* 92: 158-162, 2009.
- Itoh N, Muraoka N, Aoki M, Itagaki T: Prevalence of *Giardia lamblia* in household dogs. *J. Jap. Assoc. Infect. Dis.* 75: 671-677, 2001.
- Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN: *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. *Vet. Parasitol.* 131(1-2): 1-4, 2005.
- Capelli G, Paoletti B, Iorio R, Frangipane Di Regalbono A, et al.: Prevalence of *Giardia* spp. in dogs and humans in Northern and Central Italy. *Parasitol. Res.* 90: 154-155, 2003.
- Papini R, Gorini G, Spaziani A, Cardini G: Survey of giardiasis in shelter dog populations. *Vet. Parasitol.* 128: 333-339, 2005.
- Scaramozzino P, Di Cave D, Berrilli F, D'Orazi C, et al.: A study of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting kennelled dogs. *Vet. J.* 182: 231-234, 2008.
- Berrilli F, Di Cave D, De Liberato C, Franco A, et al.: Genotype characterization of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing. *Vet. Parasitol.* 122: 193-199, 2004.
- Cacciò SM, De Giacomo M, 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.* 32(8): 1023-1030, 2002.
- Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, et al.: Genetic heterogeneity at the β-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int. J. Parasitol.* 35: 207-213, 2005.
- Geurden T, Berkvens D, Casaert S, Vercruyssen J, et al.: A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 157: 14-20, 2008.
- Ballweber LR, Xiao L, Bowman DD, Kahn G et al.: Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol.* 26(4): 180-189, 2010.
- Hamnes IS, Gjerde BK, Robertson LJ: A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. *Acta Vet. Scand.* 49(1): 22, 2007.
- Bianciardi P, Papini R, Giuliani G, Cardini G: Prevalence of *Giardia* antigen in stool samples from dogs and cats. *Revue Méd. Vét.* 155(8-9): 417-421, 2004.
- Capelli G, Frangipane di Regalbono A, Iorio R, Pietrobelli M, et al.: *Giardia* species and other intestinal parasites in dogs in north-east and central Italy. *Vet. Rec.* 159 (13): 422-424, 2006.
- Giangaspero A, Berrilli F, Brandonisio O: *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: The epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol. Rec.* 101: 1169-1182, 2007.
- Nikolic A, Dimitrijevi S, Kati-Radojevi S, Klun I, et al.: High prevalence of intestinal zoonotic parasites in dogs from Belgrade, Serbia. *Acta Vet. Hung.* 56: 335-340, 2008.
- Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo MN, Bermudez-Cruz RM, Salazar-Schettino PM, et al.: Unusual prevalence of *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *Int. J. Parasitol.* 32: 1201-1212, 2002.
- Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Cota-Guajardo S, Gaxiola S, et al.: Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using β-giardin restriction gene. *Vet. Parasitol.* 156: 205-209, 2008.
- Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, et al.: Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dog living in the same community. *Parasitology* 128: 253-262, 2004.
- Traub RJ, Inpankaew T, Reid SA, Sutthikornchai C, et al.: Transmission cycle 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.* 111: 125-132, 2009.
- Itagaki T, Kinoshita S, Aoki M, Itoh N, et al.: Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Vet. Parasitol.* 133(4): 283-7, 2005.
- Palmer CS, Traub RJ, Robertson ID, Devlin G, et al.: Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Vet. Parasitol.* 154(1-2): 142-147, 2008.
- Cacciò SM, Sprong H: *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp. Parasitol.* 124(1): 107-112, 2010.
- Cacciò SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV: Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21: 430-437, 2005.
- Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão A, et al.: Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop.* 102(1): 10-9, 2007.
- Rinaldi L, Maurelli MP, Musella V, Veneziano V, et al.: *Giardia* and *Cryptosporidium* in canine faecal samples contaminating an urban area. *Res. Vet. Sci.* 84: 413-415, 2008.