

AGNIESZKA MIZIO<sup>1</sup>, PAWEŁ J. DOMAGAŁA<sup>1,2</sup> , BARBARA LIS<sup>1,3</sup> 

## Przyczynek do poznania zmienności genetycznej polskich osobników tasiemca psiego *Dipylidium caninum* (LINNAEUS, 1758) (Cyclophyllidea: Dipylidiidae) na podstawie analizy sekwencji genu kodującego podjednostkę 28S rybosomalnego RNA

<https://doi.org/10.5281/zenodo.17365183>

<sup>1</sup> Uniwersytet Opolski, Instytut Biologii, ul. Oleska 22, 45-052 Opole, Polska

<sup>2</sup> e-mail: pdomagala@uni.opole.pl, ORCID: 0000-0003-1005-7193

<sup>3</sup> e-mail: canta@uni.opole.pl, ORCID: 0000-0002-3292-1109

**Abstract:** Contribution to the knowledge of the genetic diversity of the flea tapeworm *Dipylidium caninum* (LINNAEUS, 1758) (Cyclophyllidea: Dipylidiidae) from Poland, based on the sequence analysis of the gene encoding the 28S ribosomal RNA subunit. This paper presents the results of a study on the molecular divergence of the flea tapeworm *Dipylidium caninum* from Poland, based on the analysis of the 28S nuclear subunit sequence. The results showed no differences between samples from Poland and a populations from different countries and continents. The association of genetic variation with host rather than geographical location was confirmed.

**Key words:** flea tapeworm, *Dipylidium caninum*, Eucestoda, 28S, rDNA, nuclear DNA, Poland.

### WSTĘP

Tasiemiec psi *Dipylidium caninum* (LINNAEUS, 1785) to kosmopolityczny, celozoiczny endopasożyt ssaków z rodziny psowatych i kotowatych, np. psów, kotów lub lisów, u których w jelicie cienkim bytuje jego dojrzałe stadium. Żywicielami pośrednimi tego tasiemca są różne gatunki pcheł np. *Ctenocephalides canis* (CURTIS, 1826), *Pulex irritans* LINNAEUS, 1758 i wszołów *Trichodectes canis* (DE GEER, 1778). Człowiek może być przypadkowym żywicielem ostatecznym tego tasiemca (MOLINA *et al.* 2003, ROUSSEAU *et al.* 2022, SZWAJA *et al.* 2011, TAYLOR & ZITZMANN 2011).

Dla żywiciela ostatecznego postacią inwazyjną tasiemca psiego jest cysticerkoid, który rozwija się w jamie ciała żywicieli pośrednich. Do inwazji tasiemca psiego dochodzi w wyniku przypadkowego połknięcia żywiciela pośredniego, czyli pchły lub wszoła. Dojrzały tasiemiec osiąga 15-70 cm długości i 2-3 mm szerokości. Jego skoleks zaopatrzony jest w cztery przyssawki i stożkowate rostellum z 1-8 rzędami haczyków (TAYLOR & ZITZMANN 2011). Apolizyjna strobila składa się z 60-175 proglotydów. Każdy człon zaopatrzony jest

w podwójny zestaw obojnaczych układów rozrodczych i dwa otwory płciowe (stąd angielska nazwa tasiemca: „double-pored dog tapeworm”), po jednym na każdej bocznej krawędzi członu (SZWAJA *et al.* 2011). Dojrzałe człony tasiemca odrywają się i aktywnie, lub w sposób bierny wraz z kałem, opuszczają organizm żywiciela ostatecznego przez odbyty. Dojrzały człon ma ok. 12 mm długości i do 3 mm szerokości, a kształtem przypomina nasiona dyni. Zawiera jaja zebrane w pakiety (od 3 do 30 jaj), które trafiają do sierści psów lub kotów. Jaja te, zawierające onkosfery, zjadane są przez mające aparat gębowy typu gryzącego larwy pcheł lub wszofy. W jamie ciała owadów w ciągu trzech miesięcy onkosfery przekształcają się w cysticerkoidy (ROUSSEAU *et al.* 2022, SZWAJA *et al.* 2011).

W przypadku człowieka, na inwazję tasiemca psiego najbardziej narażone są małe dzieci, ze względu na ich bliski i często niekontrolowany kontakt z psami i kotami. Co ciekawe, tasiemiec psi został stwierdzony nawet u niemowląt, które, być może raczkując po podłodze, przypadkowo połknęły zarażoną pcheł (MOLINA *et al.* 2003, ROUSSEAU *et al.* 2022, SZWAJA *et al.* 2011, TAYLOR & ZITZMANN, 2011).

W niniejszej pracy autorzy przedstawiają wyniki badań nad pokrewieństwem okazów tasiemca *D. caninum* pochodzących z Polski, w oparciu o analizę sekwencji podjednostki jądrowej 28S. Uzyskane sekwencje okazów krajowych porównano dodatkowo z dostępnymi sekwencjami tego gatunków pozyskanymi z bazy NCBI GenBank. Warto dodać, że jest to pierwsza tego typu praca badawcza w Polsce wykorzystująca sekwencje *D. caninum*, które zebrane zostały na terenie Polski.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły człony tasiemców pobrane z okolic odbytu kotów domowych oraz z ich kału. Łącznie do badań pozyskano człony od 6 okazów tasiemców. Szczegółowe dane na temat miejsca zebrania okazów przedstawiono w tabeli 1. Zebrane człony do czasu izolacji materiału genetycznego zostały umieszczone w 96% roztworze etanolu i przechowywane w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Izolację materiału genetycznego wykonano przy użyciu zestawu Sherlock AX firmy A&A Biotechnology (zgodnie z protokołem producenta).

Profil reakcji PCR opracowano na podstawie danych przedstawionych przez ABDULLAH *et al.* (2019) i BEUGNET *et al.* (2014) i składał się z denaturacji inicjującej w temperaturze  $95^{\circ}\text{C}$  przez 2 minuty, następnie 40 cykli ( $95^{\circ}\text{C}$  przez 20 s,  $66^{\circ}\text{C}$  przez 5 s,  $72^{\circ}\text{C}$  przez 30 s). Reakcja kończyła się elongacją końcową trwającą 5 minut w temperaturze  $72^{\circ}\text{C}$ . Do przeprowadzenia reakcji PCR wykorzystano gotową mieszaninę reakcyjną PCR Mix Plus firmy A&A Biotechnology oraz parę starterów DC28S-1R: 5'-CACATTCAACGCCCGACTCCTGTAG-3', DC28S-1F:5'-GCATGCAAGTCAAAGGGTCTACG-3' (BEUGNET *et al.* 2014).

Oczyszczenie i sekwencjonowanie uzyskanych produktów PCR zostało wykonane w firmie A&A Biotechnology (Gdańsk).

Uzyskane sekwencje sprawdzono pod kątem ich poprawności oraz jakości, wykorzystując wyszukiwarę BLAST oraz program FinchTV. Dalsze analizy przeprowadzono w programie Mega 11 (TAMURA *et al.* 2021) gdzie wykonano przyrównanie sekwencji przy użyciu algorytmu ClustalW oraz obliczono dystans molekularny korzystając z modelu p-distance.

W przeprowadzonych analizach wykorzystano 67 sekwencji pozyskanych z NCBI Genbank (Tabela 2). Analizę haplotypów wykonano przy użyciu programu DnaSP v.6 (ROZAS *et al.* 2017) oraz PopArt (LEIGH *et al.* 2016), wykorzystując metodę Median-joining (BANDEL *et al.* 1999). Wszystkie uzyskane sekwencje zdeponowano w NCBI GenBank pod numerami akcesyjnymi: PV768808-PV768813.

## WYNIKI I DYSKUSJA

W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskano sześć sekwencji o długości 604 pz. Wszystkie sekwencje pochodzące od okazów z terenu Polski nie wykazują różnic pomiędzy sobą.

Na podstawie przeprowadzonej analizy haplotypów okazów krajowych oraz 67 sekwencji pozyskanych z bazy NCBI GenBank wykazano obecność tylko czterech haplotypów. Wszystkie sekwencje pochodzące z Polski należą do Haplotypu nr 1 (Hap\_1), podobnie jak okazy z szeregu innych krajów m.in. Francji, Niemiec, Portugalii, Węgier czy Chin, USA i Nowej Zelandii. Drugi najliczniejszy haplotyp to haplotyp nr 3 (Hap\_3), do którego należą 34 sekwencje pochodzące z różnych lokalizacji. Podobnie jak w przypadku haplotypu nr 1 należą do niego sekwencje pochodzące z kilku krajów i kontynentów. Pojedyncze sekwencje pochodzące z Iraku oraz Federacji Saint Kitts i Nevis zaklasyfikowano odpowiednio do Haplotypu nr 2 (Hap\_2) i haplotypu nr 4 (Hap\_4). Szczegółowe dane przedstawione na temat przynależności konkretnych haplotypów przedstawiono w tabeli 1 i 2 oraz wygenerowanej sieci haplotypów (Ryc. 1). Obliczony dystans molekularny pomiędzy haplotypem nr 1 a haplotypem nr 3 wynosi ponad 5%, a sekwencje te różnią się w 35 pozycjach (Tabela 3).

Uzyskane wyniki analiz wyraźnie wskazują na brak powiązania konkretnego haplotypu z lokalizacją geograficzną. Wykazany brak korelacji haplotypów z konkretnym stanowiskiem potwierdza wcześniejsze badania, które wskazywały, że zmienność genetyczna *D. caninum* nie jest związana z daną lokalizacją, a z konkretnymi żywicielami (EAST *et al.* 2013, LABUSCHAGNE *et al.* 2018).

Rodzaj *Dipylidium* jest monotypowy, jednakże w roku 2017 Low i współpracownicy na podstawie analizy dystansu genetycznego zasugerowali obecność dwóch oddzielnych gatunków, które morfologicznie klasyfikowane są jako *D. caninum*.

Dalsze badania przeprowadzone przez BEUGNETA i współpracowników (2014) oraz LABUSCHAGNE i współpracowników (2018) potwierdziły obecność dwóch genotypów związanych z żywicielami. Na podstawie swoich badań autorzy wyróżnili genotyp koci, obecny prawie wyłącznie u pcheł zebranych na kotach domowych oraz genotyp psi, spotykany u pcheł żerujących na psach. Wyniki uzyskane podczas eksperymentalnych zakażeń wykazały znaczące różnice biologiczne między dwoma genotypami w odniesieniu do ich związku z żywicielem. Okres między zakażeniem pasożytem a wytworzeniem proglotydów był znacznie dłuższy w przypadku genotypu psiego niż kociego (BEUGNET *et al.* 2018).

Analizowane przez nas okazy pochodzące z terenu Polski należy zaklasyfikować do genotypu kociego, co jest zbieżne z ich pochodzeniem, gdyż wszystkie krajowe okazy zostały zebrane od kota domowego.

Uzyskane wyniki bazują na małej próbie badawczej, niemniej jednak przynoszą wartościowe dane na temat zmienności genetycznej tasiemca psiego w Polsce, jak również potwierdzają korelację genotypu z żywicielem. Ze względu na bardzo interesujące wyniki sugerowane jest przeprowadzenie dalszych badań bazujących na większej próbie badawczej pobranej od różnych żywicieli ostatecznych oraz pośrednich.

Przedstawione w niniejszej pracy badania prowadzono w ramach realizacji pracy magisterskiej pierwszego autora, wykonywanej pod opieką prof. dr hab. Barbary Lis w Instytucie Biologii Uniwersytetu Opolskiego.

Tabela 1. Dane lokalizacyjne zebranych okazów *Dipylidium caninum* wraz z ich charakterystyką i przypisanym haplotypem.  
 Table. 1. Location data of collected *Dipylidium caninum* specimens along with their characteristics and assigned haplotype.

Lp. No.	Numer ewidencyjny Registration number	Miejsce zbioru Place of collection	Charakterystyka Characteristic	Haplotyp Haplotype
1.	AM1	Opole	suchy człon	Hap_1
2.	AM5	Opole	świeży człon	Hap_1
3.	AM6	Opole	świeży człon	Hap_1
4.	AM7	Opole	świeży człon	Hap_1
5.	AM8	Opole	świeży człon	Hap_1
6.	AM9	Opole	suchy człon	Hap_1

Tabela 2. Lista sekwencji *Dipylidium caninum* pozyskanych z NCBI GenBank wraz z przypisanymi haplotypami.  
 Table. 2. List of *Dipylidium caninum* sequences obtained from NCBI GenBank with assigned haplotypes.

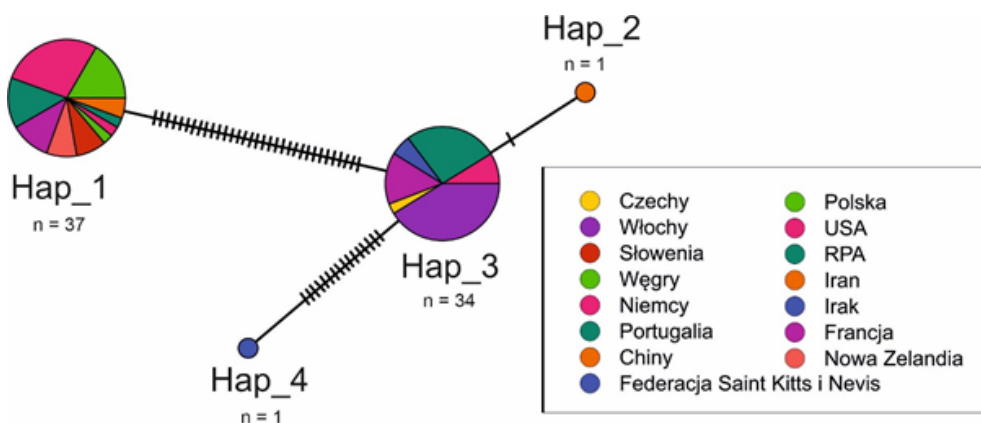
Lp. No.	Numer akcesyjny Accession number	Kraj pochodzenia Country of origin	Haplotyp Haplotype
1.	MG575740	USA	Hap_1
2.	MG575742	Francja	Hap_1
3.	MG575743	Azja	Hap_1
4.	MG575741	Nowa Zelandia	Hap_1
5.	MH040824	Słowenia	Hap_1
6.	MH040825	Słowenia	Hap_1
7.	MH040826	Słowenia	Hap_1
8.	MH040827	Francja	Hap_1
9.	MH040828	Francja	Hap_1
10.	MH040829	Węgry	Hap_1
11.	MH040830	Niemcy	Hap_1
12.	MH040831	Portugalia	Hap_1
13.	MH040853	USA	Hap_1
14.	MH040854	USA	Hap_1
15.	MH040855	USA	Hap_1
16.	MH040856	USA	Hap_1
17.	MH040857	USA	Hap_1
18.	MH040858	USA	Hap_1
19.	MH040859	USA	Hap_1
20.	MH040860	USA	Hap_1
21.	MH040861	USA	Hap_1
22.	MH045472	Nowa Zelandia	Hap_1
23.	MH045473	Nowa Zelandia	Hap_1
24.	MH045474	Francja	Hap_1
25.	MH045475	Chiny	Hap_1
26.	MH045476	Chiny	Hap_1
27.	MH045477	RPA	Hap_1

<b>Lp. No.</b>	<b>Numer akcesyjny Accession number</b>	<b>Kraj pochodzenia Country of origin</b>	<b>Haplotyp Haplotype</b>
28.	MH045478	RPA	Hap_1
29.	MH045479	RPA	Hap_1
30.	MH045480	RPA	Hap_1
31.	MH045481	RPA	Hap_1
32.	MG774549	Iran	Hap_2
33.	MH182478	USA	Hap_3
34.	OL376660	Irak	Hap_3
35.	OL413444	Irak	Hap_3
36.	MH182476	USA	Hap_3
37.	MH182477	USA	Hap_3
38.	MH040832	RPA	Hap_3
39.	MH040833	Czechy	Hap_3
40.	MH040834	Francja	Hap_3
41.	MH040835	Francja	Hap_3
42.	MH040836	Włochy (Sycylia)	Hap_3
43.	MH040837	Włochy (Sycylia)	Hap_3
44.	MH040838	Włochy (Sycylia)	Hap_3
45.	MH040839	Włochy (Sycylia)	Hap_3
46.	MH040840	Włochy (Sycylia)	Hap_3
47.	MH040841	Francja	Hap_3
48.	MH040842	Włochy (Sycylia)	Hap_3
49.	MH040843	Włochy (Sycylia)	Hap_3
50.	MH040844	Włochy (Sycylia)	Hap_3
51.	MH040845	Włochy (Sycylia)	Hap_3
52.	MH040846	Włochy (Sycylia)	Hap_3
53.	MH040847	Włochy (Sycylia)	Hap_3
54.	MH040848	Włochy (Sycylia)	Hap_3
55.	MH040849	Włochy (Sycylia)	Hap_3
56.	MH040850	Włochy (Sycylia)	Hap_3
57.	MH040851	Francja	Hap_3
58.	MH040852	Francja	Hap_3
59.	MH045463	RPA	Hap_3
60.	MH045464	RPA	Hap_3
61.	MH045465	RPA	Hap_3
62.	MH045466	RPA	Hap_3
63.	MH045467	RPA	Hap_3
64.	MH045468	RPA	Hap_3
65.	MH045469	RPA	Hap_3
66.	MH045470	RPA	Hap_3
67.	MT048289	Federacja Saint Kitts i Nevis	Hap_4

Tabela 3. Lista miejsc zmiennych pomiędzy sekwencjami haplotypów.

Table. 3. List of variable sites between haplotype sequences.

	Pozycja nukleotydu w przyrównaniu Nucleotide position in the alignment												
Haplotyp	14	40	42	53	54	55	57	60	62	64	66	75	77
Hap_1	T	C	C	G	C	T	C	T	G	G	A	T	T
Hap_2	C	T	T	-	-	C	G	G	C	T	G	C	C
	Pozycja nukleotydu w przyrównaniu Nucleotide position in the alignment												
Haplotyp	80	83	88	121	138	139	175	195	196	199	205	210	212
Hap_1	G	C	T	T	G	C	C	A	C	C	T	A	G
Hap_2	A	T	C	C	-	-	T	T	T	T	C	G	A
	Pozycja nukleotydu w przyrównaniu Nucleotide position in the alignment												
Haplotyp	216	217	226	250	253	266	588	594	598				
Hap_1	-	-	C	G	A	T	C	C	C				
Hap_2	G	C	G	A	G	C	T	T	T				



Ryc. 1. Sieć haplotypów skonstruowana z wykorzystaniem algorytmu Median-Joining. Kolory odpowiadają pochodzeniu geograficznemu analizowanych sekwencji. Pod nazwą haplotypów podano liczbę osobników do nich zaklasyfikowanych. Poprzeczne kreski odpowiadają liczbie mutacji pomiędzy haplotypami.

Fig. 1. Haplotype network constructed using the Median-Joining algorithm. Colors correspond to the geographic origin of the analyzed sequences. The number of individuals assigned to each haplotype is indicated below the haplotype name. Hatch marks represent the number of mutations between haplotypes.

## PIŚMIENNICTWO

- ABDULLAH S., HELPS C., TASKER S., NEWBURY H., WALL R. 2019. Pathogens in fleas collected from cats and dogs: distribution and prevalence in the UK. *Parasites & Vectors* 12: 71. DOI: 10.1186/s13071-019-3326-x.
- BANDEL T. H. J., FORSTER P., RÖHL A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036.
- BEUGNET F., LABUSCHAGNE M., FOURIE J., GUILLOT J., FARKAS R., COZMA V., HALOS L., HELLMANN K., KNAUS M., REHBEING S. 2014. Occurrence of *Dipylidium caninum* in fleas from client-owned cats and dogs in Europe using a new PCR detection assay. *Veterinary Parasitology* 205: 300-306. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.06.008
- BEUGNET F., LABUSCHAGNE M., DE VOS C., CRAFFORD D., FOURIE J. 2018. Analysis of *Dipylidium caninum* tapeworms from dogs and cats, or their respective fleas; Part 2. Distinct canine and feline host association with two different *Dipylidium caninum* genotypes. *Parasite* 25: 31. DOI: 10.1051/parasite/2018029.
- EAST M. L., KURZE C., WILHELM K., BENHAIEM S., HOFER H. 2013. Factors influencing *Dipylidium* sp. infection in a free-ranging social carnivore, the spotted hyaena (*Crocuta crocuta*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 2: 257-265.
- LEIGH J. W., BRYANT D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 1110-1116.
- LABUSCHAGNE M., BEUGNET F., REHBEIN S., GUILLOT J., FOURIE J., CRAFFORD D. 2018. Analysis of *Dipylidium caninum* tapeworms from dogs and cats, or their respective fleas; Part 1. Molecular characterization of *Dipylidium caninum*: genetic analysis supporting two distinct species adapted to dogs and cats. *Parasite* 25: 30. DOI: 10.1051/parasite/2018028.
- LOW V. L., PRAKASH B. K., TAN T. K., SOFIAN-AZIRUN M., ANWAR F. H. K., VINNIE-SIOW W. Y., ABUBAKAR S. 2017. Pathogens in ectoparasites from free-ranging animals: Infection with *Rickettsia asembonensis* in ticks, and a potentially new species of *Dipylidium* in fleas and lice. *Veterinary Parasitology* 245: 102-105.
- MOLINA C. P., OGBURN J., ADEGBOYEGA P. 2003. Infection by *Dipylidium caninum* in an infant. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 127(3): 157-159. DOI: 10.5858/2003-127-e157-IBDCIA.
- ROZAS J., FERRER-MATA A., SÁNCHEZ-DELBARRIO J. C., GUIRAO-RICO S., LIBRADO P., RAMOS-ONSINS S. E., SÁNCHEZ-GRACIA A. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299-3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248.
- ROUSSEAU J., CASTRO A., NOVO T., MAIA C. 2022. *Dipylidium caninum* in the twenty-first century: epidemiological studies and reported cases in companion animals and humans. *Parasites & Vectors* 15: 131. DOI: 10.1186/s13071-022-05243-5.
- SZWAJA B., ROMAŃSKI L., ZĄBCZYK M. 2011. A case of *Dipylidium caninum* infection in a child from the southeastern Poland. *Wiadomości Parazytologiczne* 57(3): 175-178.
- TAMURA K., STECHER G., KUMAR S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027.
- TAYLOR T., ZITZMANN M. B. 2011. *Dipylidium caninum* in a 4-month old male. *Clinical Laboratory Science* 24(4): 212-214.

Accepted: 7 July 2025; published: 16 October 2025

Licensed under a Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>