

Prevalence of *Cryptosporidium parvum* protozoa in humans and animals in Iasi county, Romania with the establishment of zoonotic risk

LIVIU MIRON, SIMONA MATIUȚ, AND LARISA IVĂNESCU

Abstract. The study aimed to establish the prevalence of cryptosporidiosis in pets, farm animals and humans in order to establish the zoonotic risk of this infection. The results show that cryptosporidiosis is underdiagnosed, as co-infections are common, and for diagnosis, the Ziehl-Neelsen stained smear technique is required, which is specific only to this protozoan, the symptoms being often attributed to another associated pathogen. The general conclusions show a high prevalence of the protozoan *Cryptosporidium sp.* in nature, the source of infestation is represented by pets (dogs, cats), farm animals-cattle and humans. For all categories, a common source of contamination is the tap water and food contaminated with cysts. A high risk of transmission of cryptosporidiosis through breast milk has been shown for calves.

Keywords: cryptosporidiosis, source of contamination.

Prevalența protozoarului *Cryptosporidium parvum* la om și animale în județul Iași, România cu stabilirea riscului zoonotic

Rezumat. Studiul a avut în vedere stabilirea prevalenței criptosporidiozei la animalele de companie, la cele de fermă și om urmărind stabilirea riscului zoonotic al acestei infecții. Rezultatele arată că criptosporidioza este subdiagnosticată, întrucât coinjecțiile sunt frecvente, iar pentru diagnostic, este necesară tehnica frotiului colorat Ziehl-Neelsen care este specific doar acestui protozoar, simptomatologia fiind atribuită de multe ori altui patogen asociat. Concluziile generale arată o prevalență ridicată a protozoarului *Cryptosporidium sp.* în natură, sursa de infestație fiind reprezentată de animalele de companie (câini, pisici), animalele de fermă-bovinele și omul. Pentru toate categoriile luate în calcul, o sursă de contaminare comună o reprezintă apa potabilă de la robinet și alimentele contaminate cu chiști. Pentru viței s-a demonstrat un risc ridicat a transmiterii criptosporidiozei prin laptele matern.

Cuvinte cheie: criptosporidioza, sursă de contaminare.

1. INTRODUCERE

Criptosporidioza rămâne o preocupare importantă pentru sănătatea oamenilor și animalelor, reprezentând unul dintre cele mai răspândite protozoare care infectează animale

PREVALENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* PROTOZOA IN HUMANS
AND ANIMALS IN IASI COUNTY, ROMANIA

domestice și sălbatice și este considerat a doua cea mai frecventă cauză a gastroenteritei severe la copii după rotavirus, afectând și pacienții imunocompromiși. Distribuția geografică a bolilor parazitare evoluează și se schimbă ca urmare a intensificării călătoriilor intercontinentale și datorită fluxului de refugiați și migranți în țările dezvoltate din motive de agrement, educație sau economice [5]. Criptosporidioza și giardioza fac parte dintre paraziții neglijați la nivel mondial, în ultimii ani captând atenția autorităților și a cercetătorilor, ca urmare a creșterii numărului de cazuri, precum și a riscului zoonotic. Alături de bacterii și virusuri, *Cryptosporidium sp.* poate provoca infecții gastro-intestinale la om și animale. Diareea produsă de acești agenți patogeni este una din cauzele principale ale morbidității ridicate în rândul populației din țările dezvoltate și în curs de dezvoltare, ducând deseori la mortalitate în zonele defavorizate [1-3].

Infestația cu *Cryptosporidium sp.* se face pe cale orală, în urma contactului direct sau indirect cu gazdele infectate, precum și cu apa sau hrana contaminate [3]. Identificarea surselor de agenți patogeni și căile de transmitere, sunt esențiale în măsurile de profilaxie și control a criptosporidiozei. Speciile de *Cryptosporidium* au fost identificate în intestin la aproximativ 170 de specii de vertebrate, inclusiv la oameni. De asemenea importanța este foarte mare, întrucât nu există specii clar definite, ci s-au pus în evidență așa numitele genotipuri, care pot apărea la diferite gazde [4,7]. Printre diferitele specii de *Cryptosporidium* care infectează oamenii, *C. parvum* poate contamina o gamă largă de gazde, inclusiv animale de companie și sălbatice; prin urmare, poate fi transmis atât antropotic, cât și zoonotic (M. Insulander, et al., 2013). *Cryptosporidium* a fost responsabil pentru 120 (60,3%) din 199 de focare izbucnite prin consum de apă contaminată, din 2004 până în 2010 [7,8]. Utilizarea îngrășământului produs din deșeurile animalelor, scurgerea la suprafață din alimentarea cu apă și apa netratată folosită pentru irigare poate duce la contaminarea alimentelor cu stadii infecțioase. La animale, infecțiile cu *Cryptosporidium* pot apărea, de asemenea, pe mai multe căi. De exemplu, infecțiile se pot răspândi printre viței prin contactul direct cu animalele bolnave sau indirect prin intermediul ustensilelor sau ugerului, contaminate cu fecale de vițel care conțin chiști. Deoarece animalele tinere sunt de obicei, mai sensibile la infestația cu *Cryptosporidium*, ele pot acționa ca surse majore de infecții la alte animale. *Cryptosporidium parvum* determină o morbiditate ridicată legată de prezența diareei profuze la viței. Uneori, infecția poate duce la moartea animalelor afectate în mod sever. De asemenea, câinii și pisicile pot dezvolta diaree acută sau cronică autolimitată. Infecțiile asimptomatice sunt de asemenea frecvente la diferite animale de companie.

2. MATERIALE ȘI METODE

Cercetările efectuate au avut ca scop stabilirea prevalenței protozoarului *Cryptosporidium sp.*, la om și animale, precum și identificarea altor patogeni semnalăți în probele de fecale prelucrate. Astfel au fost analizate probe de fecale de la animale de companie -câini și pisici, prezentate la clinica de parazitologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară, Iași, România sau de la vițeii din Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Creșterea bovinelor Dancu, Iași pe o perioadă de 3 luni, în perioada 2017-2020, probele fiind identificate cu cod unic, și păstrate în pungi vidate, fiind lucrate eşalonat pe zile. Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Creșterea Bovinelor Dancu, Iași este situată în partea de N-E a municipiului Iași, funcționează din anul 1981 ca unitate de cercetare – dezvoltare în domeniul zootehniei, fiind proprietatea registrului geneologic național pentru rasa Sura de Stepă. În ferma de vaci, vițeii sunt întreținuți în țarcuri individuale, aceștia fiind separați de mamă imediat după fătare și sunt cazați individual, ceea ce poate scădea riscul de contaminare.

De asemenea s-a analizat prevalența criptosporidiozei la om în municipiul Iași pe o perioadă de 3 ani, în colaborare cu cercetătorii de la Praxis, laboratoare înființate cu 15 ani în urmă și care oferă servicii de investigații medicale. Laboratorul are cinci puncte de recoltare în municipiul Iași, echipa de profesioniști fiind formată din medici, farmaciști, biologi, biochimisti, chimiști, asistente de laborator și medicină generală. În cadrul laboratorului se fac investigații și analize, cum ar fi analiza urinei, anatomie patologică, biochimie, biologie moleculară, hematologie, imunologie, microbiologie și serologie.

Diagnosticul de criptosporidioză s-a făcut prin identificarea protozoarului *Cryptosporidium sp.* în froțiul de fecale, colorat Ziehl Neelsen. Inițial carbol fucsina colorează fiecare celulă. Atunci când acestea sunt decolorate cu acid-alcool, numai organismele non-acido-alcool-rezistente ajung decolorate deoarece nu au un strat cerat lipidic gros, ca cele acido-alcool-rezistente. Atunci când este aplicată contra colorația, organismele non-acido-alcool-rezistente se colorează și devin albastre când sunt privite la microscop. Organismele acido-alcool-rezistente păstrează fucsina funicăată astfel încât acestea apar roșii. Tehnica de colorare Ziehl Neelsen modificată permite detectarea așa numitelor organisme "acid fast"; odată ce acestea sunt colorate cu un colorant specific, ele sunt dificil de decolorat și păstrează o culoare roșie chiar atunci când sunt tratate cu un amestec de acid și alcool, în timp ce toate celelalte structuri se decolorează.

PREVALENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* PROTOZOA IN HUMANS AND ANIMALS IN IASI COUNTY, ROMANIA

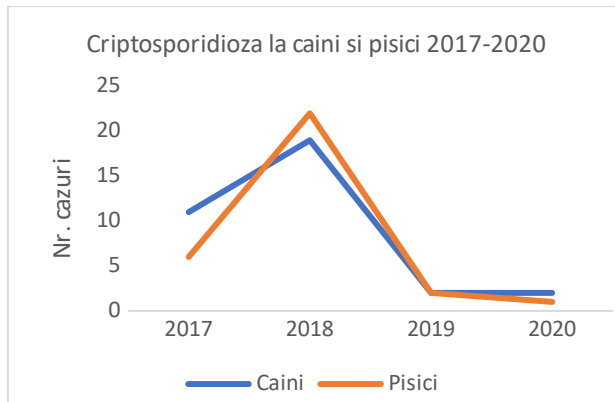


Figura 1. Distribuția criptosporidiozei la câini și pisici în perioada 2017-2020, Facultatea de Medicină Veterinară

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

În cadrul Clinicii de Parazitologie a Facultății de Medicină Veterinară, s-a realizat o prevalență a cazurilor de criptosporidioză, pe o perioadă de 4 ani. Pe perioada 2017-2020, au fost diagnosticate 65 de cazuri de criptosporidioză la animalele de companie, din care 34 de cazuri la câini și 31 de cazuri la pisici (fig. 1). Șaptezeci la sută dintre pisici au fost pisici de apartament, care nu au avut contact cu mediul înconjurător.

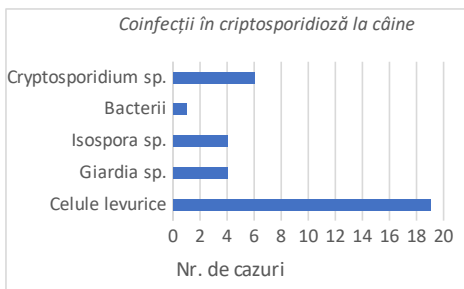


Figura 2. Coinfecțiile înregistrate în infestația cu *Cryptosporidium sp.* la câine

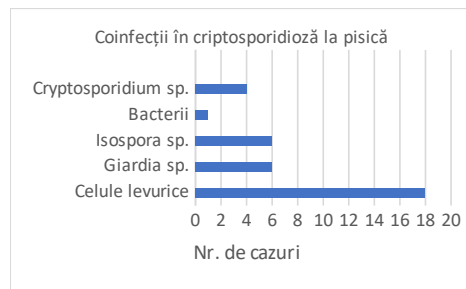


Figura 3. Coinfecțiile înregistrate în infestația cu *Cryptosporidium sp.* la pisică

Din totalul de 34 de cazuri de criptosporidioză, diagnosticate la câine, 55.8% au fost în coinfecție cu celule levurice, 11.7% în coinfecție cu *Giardia sp.*, 11.7% în coinfecție cu *Isospora sp.*, coinfecție 17.6% ca agent patogen singur și 2.9% în coinfecții cu bacterii (*Camphylobacter sp.*) (fig. 2). Asocierea cu celulele levurice, poate indica

faptul că *Cryptosporidium* sp., este oportunist, devenind patogen în momentul când pH-ul și mediul întâlnit la nivelul intestinului este modificat de acțiunea patogenă a levurilor (*Candida*), sau acțiunea patogenă a protozoarului *Cryptosporidium* sp., crează un mediu favorabil înmulțirii celulelor levurice. Potențarea reciprocă, poate reprezenta un indiciu important în administrarea tratamentului, subliniind importanța administrării probioticelor (o floră intestinală defectuoasă favorizează dezvoltarea celulelor levurice).

La pisică din numărul total de 31 de cazuri, la 58% s-a înregistrat o coinfecție cu celule levurice, 19% în coinfecție cu *Giardia* sp., 19% în coinfecție cu *Isoospora* sp., 12% ca agent patogen singur și 3% în coinfecții cu bacterii (*Clostridium* sp.) (fig. 3). La nivel mondial nu există un tratament, cu eficacitate de 100% asupra infecției cu *Cryptosporidium* sp., ceea ce subliniază importanța susținerii sistemului imunitar al gazdei, în încercarea eliminării chiștilor de *Cryptosporidium* sp., fără a folosi tratamente cu toxicitate crescută și cu rezultate slabe. Astfel, că aceleași tratamente, aplicate în clinică la animalele de companie, au avut rezultate foarte diferite, ceea ce sugerează lipsa unei eficacități ridicate a substanțelor active luate în calcul.

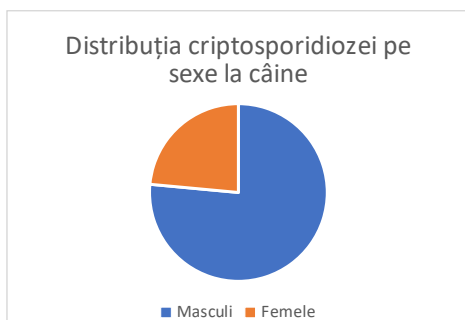


Figura 4. Distribuția criptosporidiozei pe sexe la câine

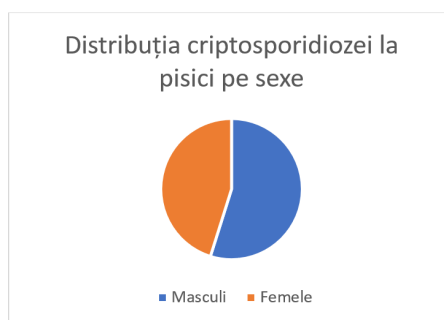


Figura 5. Distribuția criptosporidiozei pe sexe la pisică

La câini din numărul total de cazuri, 73% dintre ele au fost diagnosticate la masculi și doar 23% din cazuri au fost diagnosticate la femele (fig. 4). Având în vedere că majoritatea cazurilor s-a înregistrat la câinii tineri, până într-un an, necastrați, nu putem pune pe seama statusului hormonal, care poate fi o cauză a scăderii imunității. Deci rezultatele obținute, din punct de vedere a sexelor, nu își are o explicație științifică, necunoscându-se diferențe de biochimism la nivelul aparatului digestiv, între femele și masculi. Distribuția pe sexe, a cazurilor de criptosporidioză, la pisici, spre deosebire de situația raportată la câini, este echilibrată cu 54% cazuri înregistrate la masculi și 46% cazuri înregistrate la femele (fig. 5).

PREVALENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* PROTOZOA IN HUMANS AND ANIMALS IN IASI COUNTY, ROMANIA

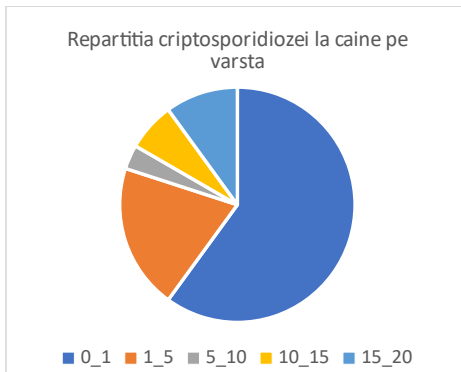


Figura 6. Distribuția criptosporidiozei pe vârstă la câine

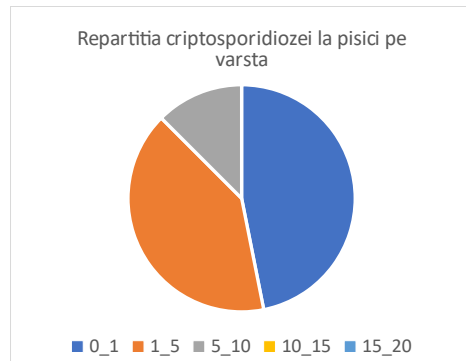


Figura 7. Distribuția criptosporidiozei pe vârstă la pisică

Din totalul de 34 de cazuri diagnosticate la câine, 53% au fost înregistrate la tineretul între 0 și 12 luni, 26% la câinii cu vârstă cuprinsă între 1 și 5 ani, 3% între 5 și 10 ani, 6% între 10-15 ani și 8.8% la câinii cu vârstă cuprinsă între 15 și 20 de ani (fig. 6). Datele corespund cu cele înregistrate în literatura de specialitate, unde criptosporidioza apare ca o boală a tineretului, cu sistemul imunitar în formare. La tineretul canin, se poate frecvent întâlni, un dezechilibru la nivelul aparatului digestiv, întreținut de lipsa unei imunități împotriva paraziților, bacteriilor și o floră intestinală în formare. Astfel, la animalele de companie, prin comercializare, se imprimă un stres de adaptare la noua familie, stresul de înțarcare, precum și schimbarea alimentației; toți acești factori produc imunosupresie, favorizând înflorirea parazitară. La pisică, din totalul de 31 de cazuri, 48% au fost diagnosticate la pisicile cu vârstă cuprinsă între 0-12 luni, 42% la pisicile cu vârstă cuprinsă între 1-5 ani și 13% la pisicile între 5 și 10 ani (fig. 7). Ponderea ridicată la pisicile cu vârstă până la un an, are aceeași explicație ca și la câine. Procentul ridicat la pisicile cu vârstă cuprinsă între 1 și 5 ani, poate fi datorat statusului hormonal, fiind vârsta cea mai propice pentru împerechere; perioada căldurilor contribuind la o imunosupresie accentuată.

La viței din totalul de probe recoltate, *Cryptosporidium sp.* a avut o prevalență de 44.4% la probele recoltate în luna septembrie, 48% în luna octombrie și 60% în luna noiembrie (fig. 8). Prin urmare, criptosporidioza este o protozooză, frecvent întâlnită în fermele de bovine, fiind una din cauzele principale a diareei la viței. Sursa de contaminare cu *Cryptosporidium sp.* este reprezentată de apă de băut, laptele matern și mediu. Având în vedere vârsta precoce a vițelilor de la care s-au recoltat probe, laptele reprezintă principala

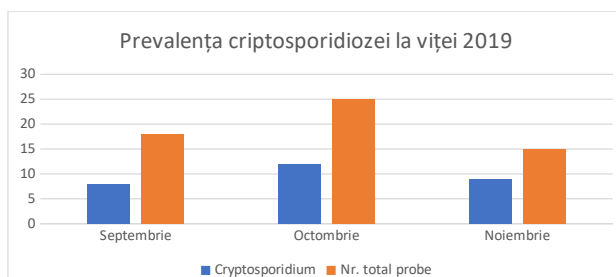


Figura 8. Prevalența criptosporidiozei la viței

sursă de contaminare cu chiști, ceea ce înseamnă că numărul de vaci adulte, purtătoare asimptomatice este ridicat în cadrul fermei.

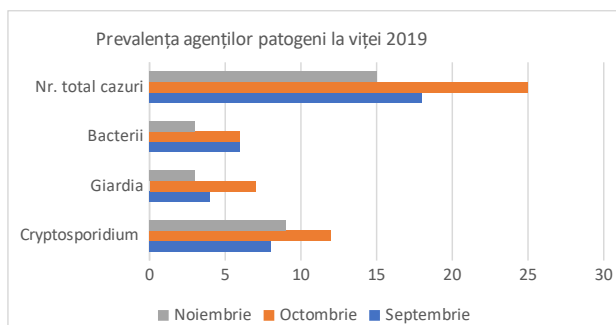


Figura 9. Prevalența agenților patogeni, care produc un tablou clinic manifestat prin diaree, la vițeii de la ferma Dancu

Din numărul total de probe recoltate în luna septembrie s-a observat o prevalență de 44% a Chiștilor de *Cryptosporidium sp.*, 22% a chiștilor de *Giardia sp.*, și 33% a bacteriilor, agenți patogeni care produc un sindrom diareic la viței până la vârsta de înțârcare. În luna octombrie prevalența a fost de 48% pentru *Cryptosporidium sp.*, 28% pentru *Giardia sp.*, și 24% pentru bacterii (*Clostridium Camphylobacter*, *Salmonella*). Pentru luna noiembrie prevalența a fost de 60% pentru *Cryptosporidium sp.*, 20% pentru *Giardia sp.*, și 20% pentru bacterii. Rezultatele arată că protozoarele ocupă un loc principal în apariția diareei la vițeii până la înțârcare (fig. 9).

În perioada 2017-2020, la laboratorul Praxis, au fost efectuate 11.001 de examene coproparazitologice din care doar 390 au fost pozitive. Din totalul de cazuri pozitive, doar 2.8% este reprezentat de infecția cu *Cryptosporidium sp.*, restul de 97% fiind reprezentate de: *Chilomastix mesnili*, *Iodamoeba buetschlii*, *Entamoeba hartmani*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Blastocystis hominis*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Giardia duodenalis* (fig. 10). Criptosporidioza este subdiagnosticată la om, întrucât

PREVALENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* PROTOZOA IN HUMANS AND ANIMALS IN IASI COUNTY, ROMANIA

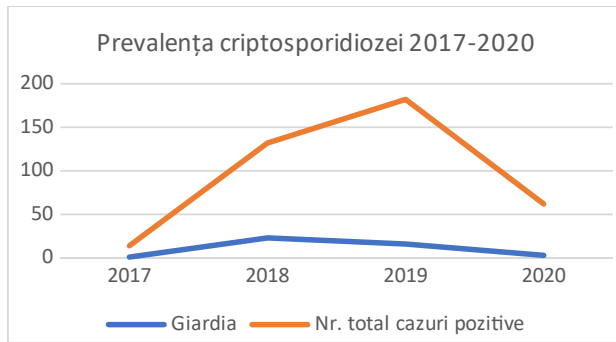


Figura 10. Prevalența criptosporidiozei la om în perioada 2017-2020

coinfecțiile sunt frecvente și pentru diagnosticul protozoarului *Cryptosporidium sp.*, este necesară colorația Zihl Neelsen la rece, care este specifică doar acestui protozoar. În majoritatea cazurilor criptosporidioza este tratată fără un diagnostic în prealabil.

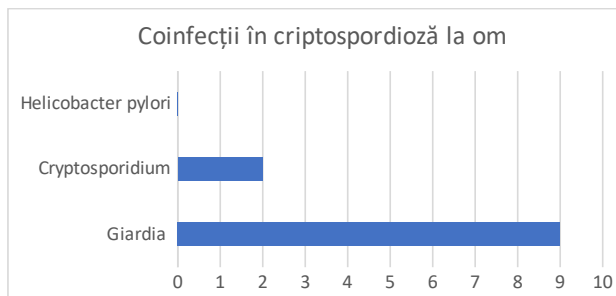


Figura 11. Coinfecții înregistrate în infestația cu *Cryptosporidium sp.*

În 82% din cazuri, *Cryptosporidium sp.* a fost identificat în coinfecție cu *Giardia sp.*, ceea ce arată că este un parazit oportunist, devenind patogen în condiții de imunosupresie și de modificare a biochimismului local, ce se petrec în caz de parazitism. În 18% din cazuri *Cryptosporidium sp.*, a fost identificat ca singur parazit în manifestarea tabloului clinic (fig. 11).

4. CONCLUZII

La animalele de companie 70% dintre pisicile diagnosticate cu criptosporidioză, au fost pisici de apartament, fără a lua contact cu mediul înconjurător, putând deduce un risc al contaminării din apa de la robinet; chiștii de *Cryptosporidium sp.* fiind rezistenți la decontaminarea cu clor. Astfel, procentul apropiat cu cel înregistrat și la câini, sugerează apa, ca sursă principală de contaminare cu *Cryptosporidium sp.* la animalele de companie.

Din totalul cazurilor de criptosporidioză, diagnosticate la câine, 55.8% au fost în coninfecție cu celulele levurice, 11,7% în coinfectie cu *Giardia sp.*, 11.7% în coinfectie cu *Isospora sp.*, 17.6% ca agent patogen singur și 2,9% în coinfecții cu bacterii (*Campylobacter sp.*). Asocierea cu celulele levurice, poate indica faptul că *Cryptosporidium sp.*, este oportunist, devenind patogen în momentul când pH-ul și mediul întâlnit la nivelul intestinului este modificat de acțiunea patogenă a levurilor (*Candida*), sau acțiunea patogenă a protozoarului *Cryptosporidium sp.*, crează un mediu favorabil înmulțirii celulelor levurice. Potențarea reciprocă, poate reprezenta un indiciu important în administrarea tratamentului, sublinind importanța administrării probioticelor (o floră intestinală defectuoasă favorizează dezvoltarea celulelor levurice).

În ceea ce privește vârsta din totalul de cazuri diagnosticate la câine, 53% au fost înregistrate la tineretul între 0 și 12 luni, 26% la câinii cu vârstă cuprinsă între 1 și 5 ani, 3% între 5 și 10 ani, 6% între 10-15 ani și 8.8% la câinii cu vârstă cuprinsă între 15 și 20 de ani. Datele corespund cu cele înregistrate în literatura de specialitate, unde criptosporidioza apare ca o boală a tineretului, cu sistemul imunitar în formare. La tineretul canin, se poate frecvent întâlni, un dezechilibru la nivelul aparatului digestiv, întreținut de lipsa unei imunități împotriva paraziților, bacteriilor și o floră intestinală în formare.

Probele recoltate de la ferma Dancu, au fost de la vițeii cu vârstă cuprinsă între 1 zi și 4 luni, care prezentau scaune diareice. Vițeii sunt separați de mamă imediat după fătare, primind lapte la început cu tetina, apoi direct din găleată. Prin tehnica de hrănire, contaminarea cu chiștii de *Giardia sp.*, și *Cryptosporidium sp.*, se poate face foarte ușor în timpul hrănirii prin laptele matern, vacile adulte fiind purtătoare asimptomatice în cele mai multe cazuri.

De asemenea probele recoltate de la viței arată că protozoarele ocupă un loc principal în apariția diareei până la înțărare, 33% fiind reprezentată de infecția cu *Giardia sp.* și 22% de infecția cu *Cryptosporidium sp.*

La om criptosporidioza este subdiagnosticată, întrucât coinfecțiile sunt frecvente, iar pentru diagnostic, este necesară tehnica frotiului colorat Ziehl-Neelsen care este specific doar acestui protozoar, simptomatologia fiind atribuită de multe ori altui patogen asociat. Concluziile generale arată o prevalență ridicată a protozoarului *Cryptosporidium sp.* în natură, sursa de infestație fiind reprezentată de animalele de companie (câini, pisici), animalele de fermă-bovinele și omul. Pentru toate categoriile luate în calcul, o sursă de contaminare comună o reprezintă apa potabilă și alimentele contaminate cu chiști. Pentru viței s-a demonstrat un risc ridicat a transmiterii criptosporidiozei prin laptele matern.

PREVALENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* PROTOZOA IN HUMANS
AND ANIMALS IN IASI COUNTY, ROMANIA

BIBLIOGRAFIE

- [1] CACCIÒ S.M., PUTIGNANI L., 2014- Epidemiology of human cryptosporidiosis. In: *Cacciò S. M. Widmer G. Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, Vienna2014: 43-79.
- [2] CHECKLEY W., WHITE JR., A.C., JAGANATH D., ARROWOOD M.J., CHALMERS R.M., CHEN X.M. ET AL., 2015-A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15: 85-94.
- [3] S M CACCIÒ , R M CHALMERS 2016- Human cryptosporidiosis in Europe, Jun;22(6):471-80. *Clin Microbiol Infect*. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.04.021.
- [4] JUDIT PLUTZER ET AL. 2016- Review of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the eastern part of Europe, 2016, *Eurosurveillance*, Volume 23, Issue 4, 25/Jan/2018 .
- [5] European Centre for Disease Prevention and Control 2014-*Cryptosporidiosis-Annual Epidemiological Report*.
- [6] MOHAMED MAMMERI,ILHAM CHENAFI, MYRIAM THOMAS, CHRISTINE JULIENB, ISABELLE VALLÉEC, BRUNO POLACK, JÉRÔME FOLLET, KARIM TARIK ADJOU 2018-Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from diarrheal dairy calves in France, *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, Volume 18, December 2019, 100323.1
- [7] P.M. VIEIRA, N. MEDERLE, M.L. LOBO, K. IMRE, O. MEDERLE, L. XIAO, ET AL. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* (Apicomplexa) in children and cattle in Romania *Folia Parasitol (Praha)*, 62 (2015), p. 2015.002, *European Centre for Disease Prevention and Control Annual epidemiological report 2014—food- and waterborne diseases and zoonoses ECDC*, Stockholm (2014).
- [8] JOHANSEN, H., HANEVIK, K., THRANA, F., CARLSON, A., STACHURSKA-HAGEN, T., SKAARE, D. ET AL. Symptomatic and asymptomatic secondary transmission of *Cryptosporidium parvum* following two related outbreaks in schoolchildren, *Epidemiol Infect*, 143 (2015), pp. 1702-1709.

(Liviu Miron, Larisa Ivănescu) UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ "ION IONESCU DE LA BRAD" DIN IAȘI

(Simona Matiuț) LABORATORUL PRAXIS , IAȘI