

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ A BANATULUI
TIMIȘOARA

**RAPORT DE CERCETARE
2007-2008**

Privind rezultatele obținute la contractul de cercetare științifică cu titlul

**CONTRIBUȚII LA CUNOAȘTEREA BIOLOGIEI, EPIDEMIOLOGIEI, DIAGNOSTICULUI ȘI
CONTROLULUI CRIPTOSPORIDIOZEI ÎN VESTUL ROMÂNIEI**

**Contract: 44GR/23.05.2007
Tema nr.:7
Cod CNCIS: 102
Comisia: 5**

DIRECTOR DE PROIECT,
Drd. IMRE KÁLMÁN

CAP I. DETERMINAREA PREVALENȚEI ȘI EVIDENȚIEREA ALTOR AGENȚI ENTEROPATOGENI ASOCIAȚI CRIPTOSPORIDIILOR

I.A. DEPLASAREA ÎN FERMELE, UNITĂȚILE ZOOTEHNICE ȘI CLINICILE VETERINARE SUPUSE SUPRAVEGHERII ȘI RECOLTAREA DE PROBE PENTRU EXAMINARE

Obiectivul principal al acestui studiu a fost de a determina prevalența criptosporidiozei la câteva specii de animale de interes economic în condiții de creștere intensivă și semiintensivă în județele vestice ale României. În cadrul acestor activități s-au făcut deplasări pe teritoriul a patru județe (Arad, Bihor, Caraș-Severin și Timiș) în diferite ferme și unități zootehnice pentru prelevare de probe biologice după un protocol bine stabilit dinainte.

S-au recoltat materii fecale diareice cu scopul de a:

- **I.B. DETERMINA PREVALENȚA CRIPTOSPORIDIOZEI PRIN ELISA;**
- **I.C. EVIDENȚIA UNII ENTEROPATOGENI ASOCIAȚI INFECȚIEI CRIPTOSPORIDIENE;**

1. DETERMINAREA PREVALENȚEI CRIPTOSPORIDIOZEI BOVINE ÎN ASOCIERE CU ALȚI ENTEROPATOGENI PRIN ELISA ÎN PARTEA DE VEST A ROMÂNIEI

Prevalența criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatojeni la vițeii în județul Arad

Continua artificializare a vieții reprezintă atât pentru om, cât și pentru animalele crescute și exploatate în mari colectivități, o restricționare majoră a interrelațiilor ecologice, microorganism-mediu-organism, cu implicații adânci și diverse asupra patologiei animale. La tineretul animal, asemenea implicații se reflectă în proporție de masă, ceea ce determină și explică în mare parte creșterea procentului bolilor parazitare condiționate și a patologiei de grup [Dărăbuș, 1996].

Criptosporidiile sunt coccidii cu o largă specificitate de gazdă, cu localizare digestivă sau respiratorie, fiind puse în evidență la numeroase specii de vertebrate, inclusiv la om [Fayer, 2007].

Sindromul de diaree neonatală la rumegătoarele mari și mici reprezintă un exemplu de boală polifactorială, determinată de o serie de factori legați de animal, de condițiile de mediu din adăpost și de varietatea de virusuri, bacterii și paraziți protozoari [De Graaf și col., 1999].

Problemele digestive apărute între vârsta de patru zile și șase săptămâni se datorează, în mare parte, infecției cu diferite specii de criptosporidii (*C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis*- fostul genotip bovin de tip B,) și/sau al unor varietăți de virusuri cum ar fi: rotavirusuri, coronavirusuri, virusul diareei virale bovine (BVD), aceștia fiind agenții etiologici cel mai frecvent implicați. Sub vârsta de trei zile gastroenterita neonatală bovină este determinată de *E. coli F5* enterotoxigen și apare în principal la indivizii imunosupresați [De la Fuente și col., 1999].

Tehnica ELISA este o metodă de diagnostic simplă, sensibilă și specifică comparativ cu alte metode care sunt mai laborioase și necesită timp [Imre și col., 2008]. Întrucât nu există niciun studiu epizootologic cu privire la ponderea agenților enteropatojeni la vițeii în județul Arad, s-a considerat oportună efectuarea unor investigații epidemiologice prin tehnica ELISA, în vederea cunoașterii evoluției criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatojeni.

Materiale și metodă

Cercetările au fost efectuate în perioada mai-decembrie 2007, pe un efectiv de 100 de vițeii cu vârste cuprinse între 4 zile și 5 luni, din opt localități ale județului Arad. Vițeii au provenit din patru ferme mari de vaci de lapte și din alte patru microferme, din diferite zone ale județului Arad conform hărții alăturate (figura 1).

Pentru cunoașterea aspectelor epidemiologice ale criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatojeni (rotavirusuri, coronavirusuri, *E. coli F5*) cercetările s-au efectuat în diferite zone ale județului Arad (fig. 1), întocmindu-se pentru fiecare animal examinat fișe individuale care cuprind: numărul matricol (la cele existente), rasă, vârstă și sex.

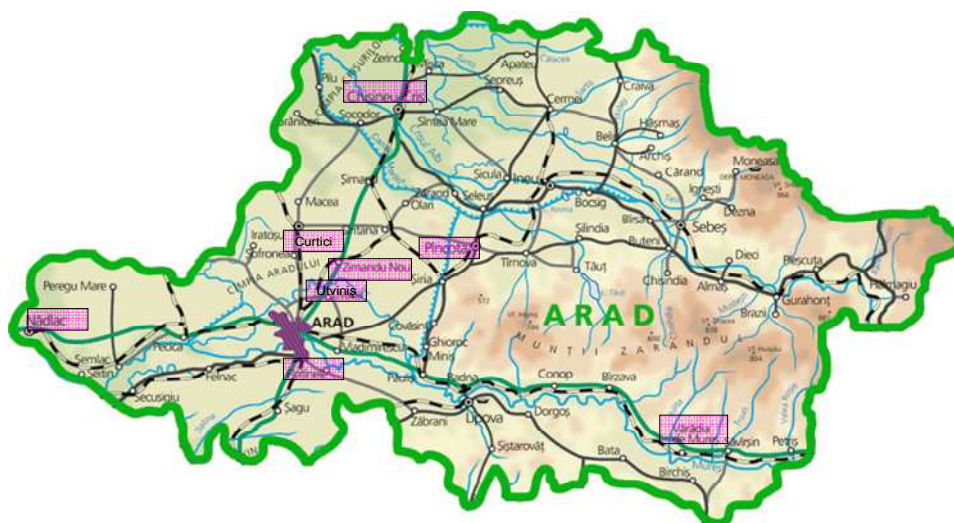


Fig. 1. Dispunerea unităților cartate în județul Arad
 1 - Utviniș; 2 - Fântănele; 3 - Zimandu Nou; 4 – Curtici; 5 – Nădlac;
 6 – Vărădia de Mureș; 7 – Pâncota; 8 – Chișineu Criș. [www.roturism.com]

Materiile fecale diareice au fost recoltate individual, direct din rect, depozitate în coprocultoare la o temperatură de 4°C și prelucrate în decurs de 24 de ore.

Probele recoltate au fost examinate prin tehnica ELISA în laboratorul de "Imunodiagnostic ELISA" din cadrul Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara. S-a utilizat kit-ul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151) (Bio-X Diagnostics, Belgia) care este un kit de diagnostic antigenic „in vitro” din fecale de bovine și respectă principiile tehnicii ELISA dublu – sandwich, având următoarea componență:

- microplaca: cu 96 de camere de microtitrare care sunt saturate cu 4 tipuri de anticorpi monoclonali specifici pentru cei patru agenți enteropatogeni (virusuri rota și corona, *E. coli* F5 și *C. parvum*);
- soluția de spălare, care se va dilua în proporție de 1:20 cu apă distilată;
- soluția de diluție pentru diluarea probelor de fecale în proporție de 1:1;
- conjugatul, în patru sticlule de culori diferite;
- matorul pozitiv și negativ;
- soluția de cromogen (tetrametilbenzidina) și substratul enzimatic (hidrogen peroxid);
- soluția de stopare (acid fosforic 1M);

Principiul testului se bazează pe faptul că anticorpii monoclonali cu care sunt impregnate camerele de microtitrare „capturează” antigenele agenților patogeni corespunzători din probele de fecale.

Datorită faptului că această metodă a fost efectuată în premieră națională am considerat oportună prezentarea schematică a modului de lucru cu următoarele etape:

1. - adăugarea fecalelor diluate 1:1 în camerele de microtitrare a plăcii (tabel 1);
 - adăugarea matorilor pozitivi și negativi;
 - incubarea 1 oră la 21°C;
 - spălare;
2. - adăugarea conjugatelor;
 - incubarea 1 oră la 21°C;
 - spălare;

Schema de așezare a probelor în fiecare cameră din microplacă [după BIO K 151- prospect]

Rotavirusuri			Coronavirusuri			<i>E. Coli</i> F5+			<i>Cryptosporidium</i>		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C-	MF7	MF15	C-	MF7	MF15	C-	MF7	MF15	C-	MF7	MF15
C+	MF8	MF16	C+	MF8	MF16	C+	MF8	MF16	C+	MF8	MF16
MF1	MF9	MF17	MF1	MF9	MF17	MF1	MF9	MF17	MF1	MF9	MF17
MF2	MF10	MF18	MF2	MF10	MF18	MF2	MF10	MF18	MF2	MF10	MF18
MF3	MF11	MF19	MF3	MF11	MF19	MF3	MF11	MF19	MF3	MF11	MF19
MF4	MF12	MF20	MF4	MF12	MF20	MF4	MF12	MF20	MF4	MF12	MF20
MF5	MF13	C+	MF5	MF13	C+	MF5	MF13	C+	MF5	MF13	C+
MF6	MF14	C-	MF6	MF14	C-	MF6	MF14	C-	MF6	MF14	C-

Legendă: C- proba martor; MF-materii fecale

- adăugarea cromogenului;
-așteptare 10 minute;
-adăugarea soluției de stopare;
- Citirea la cititorul de placă (450 nm) sau vizual.

Intensitatea culorii este proporțională cu titrul agentului patogen din probe.

Interpretare: valorile densităților optice finale ale probelor de cercetat s-au obținut prin scăderea valorii densității optice a matorului negativ din valoarea densității optice a fiecărei probe obținută la citire. Limita inferioară a pozitivității pentru fiecare antigen este de 0,150 densitate optică finală. Probele care au o densitate mai mică decât valoarea menționată anterior sunt considerate negative (tabel 2) [BIO K 151- prospect].

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor, obținute în urma citirii la cititorul ELISA la 450 nm lungime de undă, sunt prezentate sintetic în tabelul 3.

În ferma din localitatea Utviniș, 19 probe din 20 au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium spp.* La infecția cu coronavirusuri, 6 probe au fost pozitive, din care 5 au fost pozitive atât la infecția cu *Cryptosporidium spp.* cât și la infecția cu coronavirusuri.

În ferma din localitatea Fântănele, toate cele 20 de probe au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium spp.*, 4 probe din această fermă au fost pozitive, atât la infecția cu *Cryptosporidium spp.*, cât și la infecția cu coronavirusuri.

În ferma din localitatea Zimandu Nou, 11 probe din 20 au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium spp.* La infecția cu coronavirusuri, trei probe au fost pozitive, din care una a fost pozitivă, atât la infecția cu *Cryptosporidium spp.*, cât și la infecția cu coronavirusuri. La infecția cu rotavirusuri patru probe au fost pozitive, din care una a fost pozitivă atât la infecția cu *Cryptosporidium spp.*, cât și la infecția cu rotavirusuri. De asemenea, două probe au fost pozitive în același timp, atât la infecția cu rotavirusuri, cât și la infecția cu coronavirusuri.

În ferma din localitatea Curtici, 5 probe din 20 au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium spp.* La infecția cu rotavirusuri, trei probe au fost pozitive.

În microferma din localitatea Nădlac, 2 probe din 5 au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium spp.* O probă a fost pozitivă, atât la infecția cu *Cryptosporidium spp.*, cât și la infecția cu coronavirusuri. La infecția cu rotavirusuri, 2 probe au fost pozitive.

În microferma din localitatea Vărădia de Mureș, o probă din 5 a fost pozitivă atât la infecția cu *Cryptosporidium spp.* cât și la infecția cu coronavirusuri. La infecția cu rotavirusuri a fost pozitivă o probă.

În microferma din localitatea Pâncota, o probă a fost pozitivă pentru *Cryptosporidium spp.* respectiv pentru coronavirusuri.

În microferma din localitatea Chișineu – Criș, o probă din 5 a fost pozitivă pentru infecția cu *Cryptosporidium spp.* 2 probe din această microfermă au fost pozitive, atât la infecția cu

Cryptosporidium spp., cât și la infecția cu coronavirusuri. Într-o altă probă s-a semnalat concomitent prezența infecției cu coronavirusuri și rotavirusuri.

În niciuna din fermele luate în studiu, *E. coli* F5 enteropatogen nu a fost identificat, ca fiind implicat în producerea diareei la viței.

Pe ansamblu, studiul materiilor fecale prin tehnica ELISA, cu privire la ponderea agenților enteropatogeni implicați în producerea diareilor la viței, arată că:

- *Cryptosporidium spp.* a fost identificat la un număr de 63 probe din 100 analizate (48 de cazuri ca agent patogen unic și 15 cazuri asociat);
- coronavirusurile au fost întâlnite în fecalele a 17 viței din 100 examinate (2 cazuri ca agent patogen unic și 15 cazuri asociat);
- rotavirusurile au fost găsite la 13 probe din 100 analizate (7 cazuri ca agent patogen unic și 6 cazuri asociat);
- *E. coli* F5 enteropatogen nu a fost identificat.

Acest studiu demonstrează că, *Cryptosporidium spp.* a fost cel mai prevalent agent enteropatogen (63%) la viței în primele cinci luni de viață în cele opt ferme cu creștere de tip industrial din județul Arad. Procentul total de detectare a *Cryptosporidium spp.* tinde spre valorile obținute de de la Fuente și col. (1998) în centrul Spaniei (52, 3%) care au făcut investigații epidemiologice la viței în prima lună de viață [De la Fuente și col., 1998b]. În Germania, la viței sub trei săptămâni de viață, Otto și col. (1995) găsesc o pozitivitate de 52,5%, procent care se apropie destul de mult de pozitivitatea găsită de noi [Otto și col., 1995]. În Spania cercetările lui García și col. (2000) scot în evidență o pozitivitate mai mare pentru *Cryptosporidium spp.* (85,2 %) decât cea indicată în acest studiu [Garcia și col., 2000]. Rata de detecție a infecției cu criptosporidii găsită de noi este mult mai mare decât cea găsită de J. Quílez și col. (1996) (19,7%), Reynolds și col.(1986) (14%), Snodgrass și col. (1986) (14%), Abraham și col. (1992) (0%) sau Pérez și col. (1997) (11%) [Quílez și col., 1996; Reynolds și col., 1986; Snodgrass și col., 1986; Abraham și col., 1992; Perez și col., 1997]. După *Cryptosporidium spp.* coronavirusul enteric bovin a fost cel mai prevalent agent enteropatogen (17 %). Acest procent se apropie de valoarea găsită de Reynolds și col. (1986) (14%) în sudul Britaniei și de de la Fuente și col. (1998 b) (11,1%) în Spania [Reynolds și col., 1986; De la Fuente și col., 1998b]. Un procent mult mai mare de infecție cu coronavirusuri a fost semnalată de Abraham și col. (1992) în Etiopia (38,9%) unde acest agent enteropatogen a fost cel mai prevalent [Abraham și col., 1992].

Unii autori, în urma cercetărilor efectuate, au ajuns la concluzia că, rotavirusul ar fi cel mai prevalent agent al diareei la viței [Reynolds și col., 1986; Snodgrass și col. 1986]. Procentul de infecție cu rotavirus găsită de noi (13%) este mult mai mică decât cea găsită de Solana și col. (1985) (43,6%) în Spania, de Fagan și col. (1995) (38,9%) în Irlanda, de Brenner și col. (1993) (41,4%) în Israel respectiv de de la Fuente și col. (1998b) (42,7%) în Spania [Solana și col., 1986; Fagan și col., 1985; Brenner și col., 1993; De la Fuente și col., 1998b]. Valori mai apropiate de ale noastre au fost semnalate de Abraham și col. (1992) în Etiopia (16,7) %, García și col.(2000) în Spania (20,4%) respectiv de Pérez și col. (1997) (7%) la viței cu diaree în cantonul Tilarán (Costa Rica) [Abraham și col., 1992; Garcia și col., 2000; Perez și col., 1997].

Infecții cu *E. coli* F5 (K99) nu au fost semnalate în fecalele diareice ale vițeilor sub vârsta de cinci luni. Într-o lucrare de la Fuente și col. (1998) semnaleză sensibilitatea redusă a kitului ELISA (Tetravalent) (28,6%) în identificarea tulpinii *E. coli* F5, față de cultura bacteriană (97,4%). Acest fapt ar explica în parte neidentificarea tulpinii *E. coli* F5 în prezentul studiu [De la Fuente și col., 1998a].

Infecții mixte au fost semnalate la aproape un sfert (15%) dintre viței infectați cu *Cryptosporidium spp.* Cele mai comune infecții asociate au fost între *Cryptosporidium* și coronavirusuri (12%). Acest lucru este în contradicție cu rezultatele publicate în majoritatea studiilor din întreaga lume care susțin că, cea mai comună infecție mixtă ar fi între *Cryptosporidium spp.* și rotavirusuri. Asocieri între *Cryptosporidium spp.* și rotavirusuri respectiv rotavirusuri și coronavirusuri au fost găsite în procente similare (3%).

Un procent de 25 din fecalele analizate au fost negative pentru cei patru enteropatogeni. Această valoare coincide de negativitatea găsită de alți autori [Bellinzoni și col., 1990; McDonough și col., 1994]. În asemenea situații, pe lângă cei patru enteropatogeni pentru care s-au făcut investigații, în etiologia diareii ar mai putea fi implicați în special calicivirusurile, Breda virusul, *Salmonella spp.* sau Torovirusurile [De la Fuente și col., 1998a; Perez și col., 1997].

Întrucât în România, până nu demult [Dărăbuș, 1996] cercetările au vizat doar parazitismul cu criptosporidii, fără a viza interacțiunea cu alți enteropatogeni, în lucrarea de față ne-am propus elucidarea implicării lor în diareile vițelilor în primele cinci luni de viață. Pe baza acestui studiu se poate spune că, de departe, criptosporidiile, în cele opt ferme din județul Arad, sunt cei mai frecvenți enteropatogeni ce produc diareile la viței. Sistemul de creștere respectiv alimentația exclusiv lactată ar putea reprezenta un factor determinant în evoluția criptosporidiozei. Rotavirusurile și coronavirusul enteric bovin contribuie de asemenea la morbiditate, singure sau în infecții asociate.

Tabel 2

Exemple de densități optice nete a probelor citite la cititorul ELISA la o lungime de undă de 450 nm

Rotavirus			Coronavirus			E. Coli f5+			Cryptosporidium		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,000	2,163	0,003	0,000	1,988	-0,007	0,000	-0,010	0,017	0,000	0,036	0,067
2,274	-0,022	-0,021	3,109	-0,017	-0,013	2,973	0,006	0,013	3,361	1,541	-0,004
0,045	0,394	0,027	-0,015	0,010	0,006	0,007	0,115	0,022	1,527	0,002	1,510
0,002	-0,005	0,012	0,014	0,010	0,002	0,063	0,026	0,020	2,127	0,152	1,340
0,011	-0,014	0,026	-0,011	0,003	0,011	0,044	0,018	0,048	1,748	0,009	1,867
1,556	-0,011	0,014	0,009	-0,003	-0,010	0,025	0,011	0,021	1,843	-0,014	1,618
0,011	0,000	2,260	2,524	-0,007	3,156	0,027	0,023	3,030	1,495	-0,019	3,180
2,210	0,019	0,017	1,507	0,024	0,002	0,025	0,002	0,036	0,001	0,130	-0,050

Studii experimentale și numeroase cazuri de infecții naturale, prezentate în literatura de specialitate, indică rate ale infecției mai mari la vițelii în vârstă de 5-30 de zile, cu un peak la categoria 8-14 zile [Garcia, și col., 2000; Naciri și col., 1999].

Rezultatele anchetei epidemiologice, privind modul în care vârsta influențează extensivitatea infecției cu enteropatogeni la tineretul taurin, sunt prezentate în tabelul 4. Pe ansamblu, s-au înregistrat diferențe foarte mici în ceea ce privește distribuția rotavirusurilor ca singuri agenți enteropatogeni cauzatori ai diareei în primele luni de viață. Această observație este valabilă și pentru coronavirusuri care, de foarte puține ori (în două cazuri), au putut fi identificate neasociate cu alți agenți infecțioși sau parazitari.

Vârsta cea mai receptivă la infecția cu criptosporidii, ca unici agenți patogeni, s-a dovedit a fi cea cuprinsă între 8 și 14 zile. S-au observat diferențe distinct semnificative ($p < 0,01$) între această categorie de vârstă și celelalte categorii luate în considerare (tabel 4). Prevalența crescută la categoria de 3-6 luni, adică faptul că 4 din 6 probe au fost pozitive pentru infecția cu *Cryptosporidium* spp. ca unic agent patogen, se poate explica prin faptul că, prezența vițelilor într-un mediu puternic contaminat a facilitat infecția. Pe măsura înaintării în vârstă, prevalența infecției cu *Cryptosporidium* spp., ca monoparazitism, scade ușor. Această scădere a extensivității infecției se poate explica pe de o parte, pe seama rezistenței de vârstă ca urmare a unor modificări în fiziologia și microflora intestinală, iar pe de altă parte, prin imunitatea dobândită exprimată prin maturizarea sistemului imun ca urmare a contactului repetat cu parazitul. Pentru confirmarea acestui procent atât de ridicat la această categorie de vârstă sunt necesare alte studii pe un efectiv mai mare.

În ceea ce privește infecțiile asociate la diferite categorii de vârste, *Cryptosporidium* spp. apare cel mai frecvent asociat cu coronavirusuri, constatându-se diferențe minore la categoriile de vârste alese de noi sub vârsta de 30 de zile.

Asocieri dintre *Cryptosporidium* spp. și rotavirusuri se pot observa la trei categorii de vârste respectiv 8-14 zile, 15-21 zile și la o junincă de peste 6 luni, fără a se putea trage vreo concluzie semnificativă. În ceea ce privește asocierile dintre rota- și coronavirusuri ca agenți patogeni declanșatori ai diareei, acestea s-au înregistrat la categoriile de vârste cuprinse între 15 - 21 de zile, respectiv 1-3 luni.

Tabel 3

Sinopticul probelor pozitive la kitul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151), în fermele de bovine luate în studiu din județul Arad

Localitatea	Probe pozitive pentru														Negative	
	Nr. total probe	Crypto. singur		Coronav. singur		Rotav. singur		E. coli F5	Crypto. + Coronav.		Crypto. + Rotav.		Rotav. + Coronav.			
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.
Utvișiș	20	14	70	1	5	0	0	0	5	25	0	0	0	0	0	0
Fântănele	20	16	80	0	0	0	0	0	4	20	0	0	0	0	0	0
Zimandu Nou	20	9	45	0	0	1	5	0	1	5	1	5	2	10	6	30
Curtici	20	5	25	0	0	3	15	0	0	0	0	0	0	0	12	60
Nădlac	5	2	40	0	0	2	40	0	1	20	0	0	0	0	0	0
Vărădia de Mureș	5	0	0	0	0	1	20	0	1	20	0	0	0	0	3	60
Pâncota	5	1	20	1	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	60
Chișineu Criș	5	1	20	0	0	0	0	0	0	0	2	40	1	20	1	20
Total (%)	100	48		2		7		0	12		3		3		25	

Legendă: *Crypto* – *Cryptosporidium*; *Coronav* – *Coronavirusuri*; *Rotav* - *Rotavirusuri* ; *E* – *Escherichia*;

Tabel 4

Evoluția celor patru enteropatogeni (*Rotavirus*, *Coronavirus*, *E. coli* F5 și *Cryptosporidium* spp.) în funcție de vârstă la tineretul bovin, în județul Arad

Vârsta	Total Probe examinate	Pozitive pentru							Negative (%)
		Rotav. singur (%)	Coronav. singur (%)	<i>E. coli</i> F5	Crypto. singur (%)	Crypto. asociat cu Corona.(%)	Crypto. asociat cu Rotav.(%)	Coronav. asociat cu Rotav.(%)	
3-4 zile	3	1 (33)	0	0	1 (33)	0	0	0	1(33)
5-7 zile	14	0	1 (7)	0	8 (57)	3 (21)	0	0	2(14)
8-14 zile	20	0	0	0	13 (65)	2 (10)	1 (5)	0	4(20)
15-21 zile	16	2 (13)	0	0	5 (31)	2 (11)	1 (5)	2 (12,5)	4(25)
22-30 zile	20	1 (5)	1 (5)	0	9 (45)	2 (10)	0	0	7(35)
1-3 luni	20	2 (10)	0	0	8 (40)	3 (15)	0	1 (5)	6(30)
3-6 luni	6	1 (17)	0	0	4 (67)	0	0	0	1(17)
> 6 luni	1	0	0	0	0	0	1 (100)	0	0
Total(%)	100	7	2	0	48	12	3	3	25

Legendă: *Crypto* – *Cryptosporidium*; *Coronav* – *Coronavirusuri*; *Rotav* - *Rotavirusuri* ; *E* – *Escherichia*

Prin aplicarea testului χ^2 s-a urmărit influența vârstei asupra evoluției criptosporidiozei la categoriile alese sub vârsta de 3 luni. Din cele opt categorii de vârste, prezentate în tabelul dinainte, au fost eliminate următoarele categorii: 3-4 zile, 3-6 luni și categoria de peste 6 luni întrucât numărul de animale din lot nu constituie un eșantion reprezentativ. Pentru categoriile de vârste rămase în studiu se observă foarte bine că există diferențe distinct semnificative ($p < 0,01$) între categoriile de 5-7 zile, respectiv 8-14 zile și restul categoriilor alese de noi sub vârsta de trei luni. Prevalența maximă a criptosporidiozei s-a înregistrat la vârsta de 8-14 zile (80%) urmată de categoria 5-7 zile (78%). Prin aplicarea testului χ^2 s-au observat diferențe distinct semnificative ($p < 0,01$) între aceste două categorii de vârste și restul categoriilor alese sub vârsta de trei luni (fig. 2).

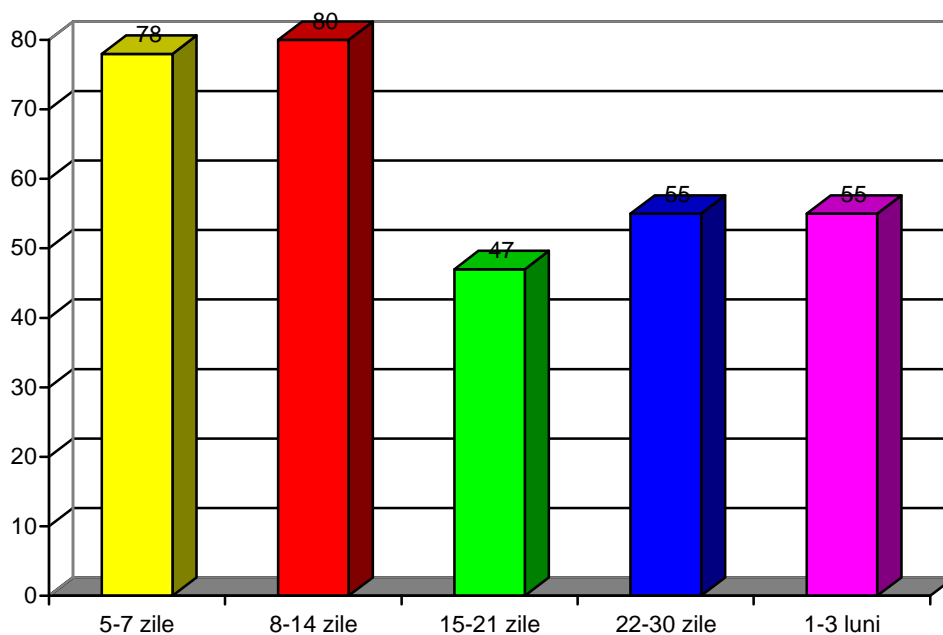


Fig. 2. Prevalența criptosporidiozei la vițeii investigați în județul Arad, în funcție de vârstă

Trebuie menționat faptul că, într-un singur caz din trei analizate, s-a înregistrat infecție cu *Cryptosporidium spp.* la o vârstă (3 zile) care pune sub semnul întrebării modul și calea de contaminare. Pornind de la ideea că, perioada prepatentă în criptosporidioză este în general de 3-4 zile la animalele imunocompetente [Fayer, 1997, Dărăbuș, 1996] în cazul nostru există posibilitatea contaminării intrauterine. Însă, această afirmație nu este decât o suspiciune având în vedere numărul redus de cazuri care au fost analizate. În literatura de specialitate se găsesc mai multe date cu referire la transmiterea transplacentară a criptosporidiilor. Infecția intrauterină nu ar reprezenta o excepție, pentru că și alte coccidii s-au dovedit a putea fi transmise pe această cale [Simpson și col., 1992].

Rezultatele obținute în anchetă pe viței, în județul Arad, privind prevalența și evoluția bolii cu vârsta, sunt asemănătoare cu cele obținute de de la Fuente și col. (1998a), în centrul Spaniei [De la Fuente și col., 1998a]. Naciri și col. (1999) susțin însă că, prevalența criptosporidiilor este mai mare la vițeii din prima săptămână de viață comparativ cu cea de a doua categorie cu vârsta cuprinsă între 8 și 15 zile [Naciri și col., 1999]. Un lucru însă este cert, la ambele categorii de vârste, *C. parvum* constituie agentul etiologic major al diareei neonatale. Proporția criptosporidiozei pe categorii de vârste prezentată în acest studiu se aseamănă foarte mult cu limitele găsite de Dărăbuș și col. (1996) la vițeii investigați în România [Dărăbuș, 1996].

Concluzii

- La bovinele cu vârsta cuprinsă între 4 zile și 5 luni, criptosporidioza, evaluată prin ELISA în premieră națională, a evoluat în toate cele 8 unități de creștere ale județului Arad, având o prevalență de 63% (48% ca agent patogen unic și 15% în asociație cu alți agenți patogeni).
- La aceeași categorie de vârstă, coronavirusul a avut o prevalență de 17 % (2% ca agent patogen unic și 15% în asociație cu alți agenți patogeni).
- Prevalența rotavirozei la tineretul bovin examinat a fost de 13% (7% ca agent patogen unic și 6% în asociație cu alți agenți patogeni).
- Infecția cu *E.coli* F5 enteropatogen nu a fost semnalată.
- Infecția cu *Cryptosporidium spp.*, ca agent patogen unic, a variat între 0% și 80%.
- Coronavirusurile implicate în etiologia diareei la categoria de vârstă 4 zile – 5 luni evoluează de obicei asociate cu criptosporidii.
- Extensivitatea și intensivitatea infecției la taurine este mai ridicată la categoria de vârstă 8-14 zile.
- Nu s-au semnalat diferențe semnificative în ceea ce privește distribuția rota- și coronavirusurilor la categoriile de vârste investigate.

Prevalența criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatogeni la viței în județul Bihor

Criptosporidiile sunt coccidii cu o largă specificitate de gazdă, cu localizare digestivă sau respiratorie, fiind puse în evidență la numeroase specii de vertebrate, inclusiv la om [Fayer, 1997].

Sindromul de diaree neonatală la rumegătoarele mari și mici reprezintă un exemplu de boală polifactorială, determinată de o serie de factori legați de animal, de condițiile de mediu din adăpost și de varietatea de virusuri, bacterii și paraziți protozoari [De la Fuente și col., 1998b]. Problemele digestive apărute în primele luni de viață se datorează, în mare parte, infecției cu diferite specii de criptosporidii (*C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis*- fostul genotip bovin de tip B,) și/sau al unor varietăți de virusuri cum ar fi: rotavirusuri, coronavirusuri, virusul diareei virale bovine (BVD), aceștia fiind agenții etiologici cel mai frecvent implicați (4, 7, 11). Sub vârsta de trei zile gastroenterita neonatală bovină poate fi determinată de *E. coli* F5 enterotoxigen ce apare în principal la indivizii imunosupresați [De Graaf, 1999]. Prezentul studiu încearcă să elucideze câteva aspecte epidemiologice cu privire la interacțiunea criptosporidiilor cu alți enteropatoși dar și evoluția criptosporidiozei în funcție de factorii legați de animal și mediu în județul Bihor.

Materiale și metodă

Cercetările au fost efectuate în perioada februarie-decembrie 2007, pe un efectiv de 80 de viței cu vârste cuprinse între o zi și 60 de zile, din cinci localități ale județului Bihor conform hărții alăturate (fig. 3). Vițeeii au provenit din patru microferme de vaci de lapte și o fermă de tineret bovin (vițeeii de colectură), din diferite zone ale județului Bihor. În scopul cunoașterii unor aspecte epidemiologice ale criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatoși (rotavirusuri, coronavirusuri, *E. coli* F5) pentru fiecare animal examinat au fost întocmite fișe individuale care cuprindeau: numărul matricol (la cele existente), rasă, vârstă și sex. De asemenea, despre fiecare animal investigat au fost cerute informații suplimentare cu referire la: starea de sănătate, dacă se află sub tratament sau nu, modul de hrănire (lapte matern, lapte praf, suplimente nutritive) etc.

Fecalele au fost recoltate individual, direct din rect, depozitate în coprocultoare la o temperatură de 4°C și prelucrate în decurs de 24 de ore. De asemenea, probele recoltate au fost categorisite de către investigator în trei categorii: fecale nediareice, diareic cremoase și diareic apoase (vezi tabel 5).

Examinarea probelor s-a făcut prin tehnica ELISA în laboratorul de serologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara. S-a utilizat kit-ul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151) (Bio-X Diagnostics, Belgia) care este un kit de diagnostic antigenic „in vitro” din fecale de bovine și care respectă principiile tehnicii ELISA „dublu – sandwich” descrisă în capitolul 1.1.2.

Tabel 5

Aspectul fecalelor normale sau diareice pe categorii de vârste, în efectivele de tineret bovin investigate în județul Bihor (n=80)

Consistența Fecalelor	Normal (n=31)	Diareic cremos (n=21)	Diareic apos (n=28)	% de vițeeii pe categorii de vârste
Vârsta				
1-7 zile	46,1%	30,8%	23,1%	16,3%
8-14 zile	33,3%	38,1%	28,6%	26,2%
15-22 zile	40%	15%	45%	25%
> 22 zile	38,5%	23%	38,5%	32,5%



Fig. 3. Dispunerea localităților investigate în județul Bihor în direcția sud-nord
1.- Beiuș; 2- Arpășel; 3.Aleșd; 4.Sântăul Mic; 5. Marghita;

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor, obținute în urma citirii la cititorul ELISA la 450 nm lungime de undă, sunt prezentate sintetic în tabelul 6.

În ferma din localitatea Sântăul Mic, 15 probe din 40 au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium* spp., din care patru probe au fost pozitive atât la infecția cu rotavirusuri cât și la infecția cu *Cryptosporidium* spp. De asemenea, o probă a fost pozitivă în același timp, atât la infecția cu coronavirusuri, cât și la infecția cu *Cryptosporidium* spp. Coronavirusurile și rotavirusurile ca unici agenți patogeni au fost diagnosticate în trei, respectiv cinci probe.

În microferma din localitatea Beiuș, o probă a fost pozitivă pentru *Cryptosporidium* spp., respectiv cinci probe pentru rotavirusuri. Trebuie menționat faptul că, rotavirusurile ca unici agenți patogeni au fost găsite în fecale diareice apoase.

În microferma din localitatea Arpășel, *Cryptosporidium* spp. a fost semnalat în fecalele a trei viței, din care la unul s-a găsit asociat cu rotavirusuri.

În microferma din localitatea Marghita, patru probe din 20 analizate au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium* spp., O probă din această fermă a fost pozitivă, atât la infecția cu *Cryptosporidium* spp., cât și la infecția cu coronavirusuri.

În microferma din localitatea Aleșd, trei probe din 20 investigate au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium* spp.. O probă din această fermă a fost pozitivă, atât la infecția cu *Cryptosporidium* spp., cât și la infecția cu coronavirusuri.

În niciuna din fermele luate în studiu, *E. coli* F5 enteropatogen nu a fost identificat.

Tabel 6

Sinopticul probelor pozitive la kitul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151), în fermele de bovine luate în studiu din județul Bihor

Localitatea	Probe pozitive pentru												Negative	
	Nr. total probe	Crypto. singur		Coronav singur		Rotav. singur		E. coli F5	Crypto. + Coronav.		Crypto. + Rotav.			
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
Sântăul Mic	40	10	25	3	7,5	5	12,5	0	1	2,5	4	10	17	42,5
Beiuș	10	1	10	0	0	5	50	0	0	0	0	0	4	40
Arpășel	10	2	20	0	0	0	0	0	0	0	1	10	7	70
Marghita	10	3	30	0	0	2	20	0	1	10	0	0	4	40
Aleșd	10	2	20	0	0	0	0	0	1	10	0	0	7	70
Total (%)	80	18 (22,5)		3 (3,8)		12 (15)		0	3 (3,8)		5 (6,2)		39 (48,7)	

Legendă: *Crypto* – *Cryptosporidium*; *Coronav* – *Coronavirusuri*; *Rotav* - *Rotavirusuri* ; *E* – *Escherichia*;

Pe ansamblu, studiul materiilor fecale prin tehnica ELISA, cu privire la ponderea agenților enteropatogeni implicați în producerea diareilor la viței, arată că:

- *Cryptosporidium* spp. a fost identificat la un număr de 26 probe din 80 analizate (18 de cazuri ca agent patogen unic și opt cazuri asociat);
- coronavirusurile au fost întâlnite în fecalele a șase viței din 80 examinate (trei cazuri ca agent patogen unic și trei cazuri asociat);
- rotavirusurile au fost găsite la 17 probe din 80 analizate (12 cazuri ca agent patogen unic și cinci cazuri asociat);

Acest studiu demonstrează că, *Cryptosporidium* spp. a fost cel mai prevalent agent enteropatogen (32,5%) la vițeii în primele opt-nouă săptămâni de viață în cele cinci ferme investigate în județul Bihor. Procentul total de detectare a lui *Cryptosporidium* spp. este mult mai mică decât cea obținută de de la Fuente și col. în centrul Spaniei (52,3%) sau de García și col. tot în acea regiune, care scot în evidență o pozitivitate de 85,2% (5, 8) [De la Fuente și col., 1998b; Garcia și col., 2000]. Rata de detecție a infecției cu criptosporidii este mai mare, însă, decât cea găsită de J. Quílez și col. (19,7%), Reynolds și col. (14%), Snodgrass și col. (14%), Pérez și col. (11%) sau Abraham și col. (0%) [Quílez și col., 1996; Reynolds și col., 1986; Snodgrass și col., 1986; Perez și col., 1997; Abraham și col., 1992].

Unii autori, în urma cercetărilor efectuate, au ajuns la concluzia că rotavirusul ar fi cel mai prevalent agent al diareei la viței. Procentul de infecției cu rotavirus găsit de noi (21,2%) este mult mai mic decât cel găsit de Solana și col. (43,6%) în Spania, de Fagan și col. (38,9%) în Irlanda, de Brenner și col. (41,4%) în Israel, respectiv de De la Fuente și col. 42,7% în Spania [Solana și col., 1985; Fagan și col., 1995; Brenner și col., 1993; De la Fuente și col., 1998a].

Rezultatele anchetei epidemiologice, privind modul în care vârsta influențează extensivitatea infecției cu enteropatogeni la tineretul taurin, sunt prezentate în tabelul 3.

Vârsta cea mai receptivă la infecția cu criptosporidii, ca unici agenți patogeni, s-a dovedit a fi cea cuprinsă între 8 și 14 zile. S-au observat diferențe distinct semnificative ($p < 0,01$) între această categorie de vârstă și celelalte categorii luate în considerare (tabel 7). Pe măsura înaintării în vârstă, prevalența infecției cu *Cryptosporidium* spp., ca monoparazitism, scade ușor. Această scădere a extensivității infecției se poate explica pe de o parte, pe seama rezistenței de vârstă ca urmare a unor modificări în fiziologia și microflora intestinală, iar pe de altă parte, prin imunitatea dobândită exprimată prin maturizarea sistemului imun ca urmare a contactului repetat cu parazitul.

Tabel 7

Evoluția celor patru enteropatozigeni (*Rotavirus*, *Coronavirus*, *E. coli* F5 și *Cryptosporidium* spp.) în funcție de vârstă la tineretul bovin, în cele cinci ferme investigate

Vârsta	Total Probe examinate	Probe pozitive pentru						Negative (%)
		<i>Rotav.</i> singur (%)	<i>Coronav</i> singur (%)	<i>E. coli</i> F5	<i>Crypto.</i> singur (%)	<i>Crypto.</i> asociat cu <i>Rotav.</i> (%)	<i>Crypto.</i> asociat <i>Corona</i>	
1-7 zile	13	1 (7,7)	0	0	1 (7,7)	0	0	11 (84,6)
8-14 zile	21	3 (14,3)	0	0	9 (42,8)	0	1 (4,8)	8 (38,1)
15-21 zile	21	4 (19,1)	0	0	5 (23,8)	2 (9,5)	2 (9,5)	8 (38,1)
> 22 zile	25	4 (16)	3 (12)		3 (12)	3 (12)	0	12 (48)
Total(%)	80 (100)	12 (15)	3 (3,7)	0	18 (22,5)	5 (6,3)	3 (3,7)	39 (48,8)

Legendă: *Crypto* – *Cryptosporidium*; *Coronav* – Coronavirusuri; *Rotav* - Rotavirusuri ; E – *Escherichia*

Alături de prezentarea prevalenței criptosporidiozei la viței în județul Bihor, câteva observații merită a fi menționate. Prevalența criptosporidiozei este în corelație cu: prezența rotavirusurilor în fecalele vițeilor, excreția de fecale diareice cremoase, igiena deficitară și tratamentele cu antibiotice. Printre factorii asociați cu prezența rotavirusurilor se numără: igiena adăposturilor de animale, prezența vițeilor cu diaree apoasă sau existența infecțiilor cu criptosporidii.

Concluzii

- La tineretul bovin în primele două luni de viață, criptosporidioza a evoluat în toate cele cinci unități de creștere ale județului Bihor, într-un procent de 32,5.
- Pe lângă infecția cu *Cryptosporidium* spp., rotavirusurile și coronavirusurile contribuie de asemenea la morbiditate, singure sau în infecții asociate.
- Nu au fost identificate infecții cu *E. coli* F5.
- Extensivitatea și intensivitatea infecției la tineretul taurin în primele două luni de viață este mai ridicată la categoria de vârstă 8-14 zile.
- Frecvența Rota virusului a fost mai mare în fecalele diareice cu aspect apos iar *C. parvum* a fost diagnosticat cu preponderență în fecalele diareice cremoase.

Prevalența criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatozigeni la viței în județul Caraș-Severin

Importanța infecțiilor asociate pentru zoo-economie a crescut treptat, pe măsura creșterii șeptelului și, mai ales, pe măsura extinderii sistemelor de creștere intensivă și semiintensivă a bovinelor. Pierderile economice sunt considerabile în special la viței în prima lună de viață. Diagnosticul și măsurile preventive sunt dificile datorită varietății agenților patogeni ce pot fi izolați de la viței la această categorie de vârstă.

Obiectivul principal al acestui studiu a fost de a determina evoluția infecției cu criptosporidii la tineretul bovin în fermele luate în studiu în județul Caraș-Severin.

Materiale și metode

Studiul a fost realizat în luna martie-mai anul 2007 pe un număr de 48 de vițeți cu vârste cuprinse între două și 90 de zile, proveniți din patru ferme cu creștere de tip industrial din diferite zone ale județului Caraș-Severin (fig. 4). Vițeții au fost crescuți în sistem intensiv, în stabulație liberă împreună cu mamele (localitățile Vrani și Răcășdia) sau în cuști individuale (localitățile Berliște și Grădinari) încă din prima zi de viață. Trebuie menționat faptul că, în două din patru ferme s-a făcut vaccinare împotriva coronavirusei și rotavirusului bovine.

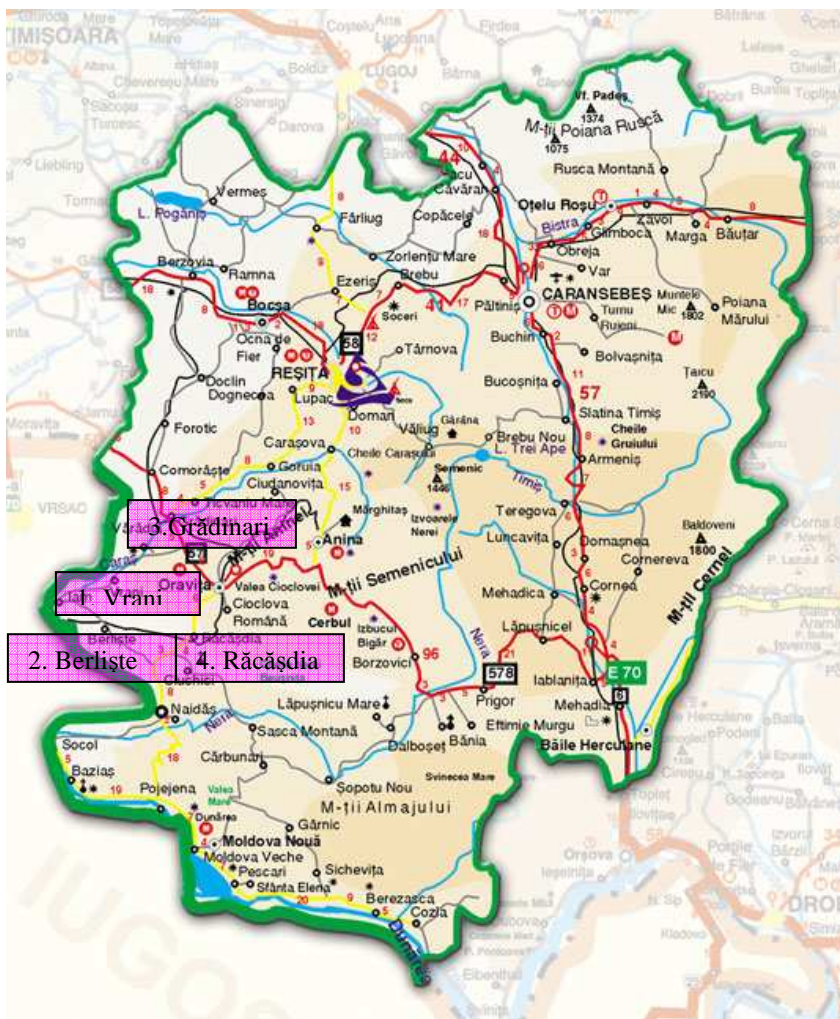


Fig. 4. Disponerea unităților cartate în județul Caraș – Severin
1. Vrani 2. Berliște 3. Grădinari 4. Răcășdia [www.turism-romania.ro]

Materiile fecale diareice au fost recoltate individual direct din rect, depozitate în coprocultoare sterile la o temperatură de 4°C și prelucrate în decurs de 24 de ore. Probele biologice au fost examinate prin tehnica ELISA utilizând kit-ul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151) (Bio-X Diagnostics, Belgia) care este un kit de diagnostic antigenic „in vitro” din fecale de bovine și respectă principiile tehnicii ELISA dublu – sandwich.

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor privind ponderea infecțiilor cu criptosporidii în asociere sau nu cu alți trei enteropatoși la tineretul bovin sunt prezentate sintetic în tabelul 8.

Tabel 8

Sinopticul probelor pozitive la kitul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151), în fermele de bovine luate în studiu din județul Caraș-Severin

Localitatea	Probe pozitive pentru										
	Nr. total probe	Crypto. singur		Rotav. singur		Corona	E. coli F5	Crypto. + Rotav.		Negative	
		Nr	%	Nr	%	Nr/%	Nr/%	Nr	%	Nr	%
Vrani	14	7	50	4	28,5	0	0	2	14,2	1	7,1
Berliște	7	2	28,5	0	0	0	0	0	0	5	71,4
Grădinari	7	1	14,2	0	0	0	0	0	0	6	85,8
Răcășdia	20	7	35	1	5	0	0	1	5	11	55
Total (%)	48	17 (35,4)		5 (10,4)		0	0	3 (6,2)		23 (47,9)	

Legendă: *Crypto* – *Cryptosporidium*; *Corona* – *Coronavirusuri*; *Rota* - *Rotavirusuri* ; *E* – *Escherichia*;

Infecții cu criptosporidii ca unici agenți patogeni au fost semnalate în toate cele patru unități de creștere în procente diferite de la 14,2 % până la 50%.

Rotavirusurile ca unici agenți patogeni au fost diagnosticate tocmai în fermele în care nu se practică vaccinarea preventivă cu vaccin inactivat [tabel 8].

Coronavirusul enteric bovin și *E. coli* F5 (K99) nu au fost identificate în niciuna din fermele investigate.

În cazul infecțiilor mixte, s-au găsit asocieri între criptosporidii și rotavirusuri, acestea fiind prezente în două din patru ferme investigate.

Pe ansamblu, studiul materiilor fecale prin tehnica ELISA cu privire la ponderea agenților enteropatogeni implicați în producerea diareilor la viței arată că:

- *Cryptosporidium* spp. a fost identificat la un număr de 20 probe din 48 analizate (17 de cazuri ca agent patogen unic și 3 cazuri asociat);
- rotavirusurile au fost semnalate în 8 probe din 48 analizate (5 cazuri ca agent patogen unic și 3 cazuri asociat);

Acest studiu demonstrează că, *Cryptosporidium* spp. a fost cel mai prevalent agent enteropatogen (41,65%) la vițeele în primele trei luni de viață în cele patru ferme cu creștere de tip industrial din județul Caraș-Severin. Procentul total de detectare a *Cryptosporidium* spp. tinde spre valorile obținute de de la Fuente și col. (1998) în centrul Spaniei (52, 3%) care au făcut investigații epidemiologice la tineretul bovin în prima lună de viață [De la Fuente și col., 1998b]. În Germania, la vițeele sub trei săptămâni de viață, Otto și col. (1995) găsesc o pozitivitate de 52,5%, procent care se apropie destul de mult de pozitivitatea găsită de noi [Otto și col., 1995]. În Spania cercetările lui García și col. (2000) scot în evidență o pozitivitate mult mai mare pentru *Cryptosporidium* spp. (85,2 %) decât cea indicată în acest studiu [Garcia și col., 2000]. Rata de detecție a infecției cu criptosporidii găsită de noi este mult mai mare decât cea găsită de Reynolds și col. (1986) (14%), Snodgrass și col.(1986) (14%), Abraham și col.(1992) (0%) J. Quílez și col. (1996) (19,7%) sau Pérez și col. (1997) (11%) [Reynolds și col., 1986; Snodgrass și col., 1986; Abraham și col., 1992; Quilez și col., 1996; Perez și col., 1997]

Unii autori în urma cercetărilor efectuate, au ajuns la concluzia că, rotavirusul ar fi cel mai prevalent agent al diareei la viței. Procentul de infecție cu rotavirus găsit de noi (16,65%) este mult mai mic decât cel găsit de Solana și col. (1985) (43,6%) în Spania, de Fagan și col. (1995) (38,9%) în Irlanda, de Brenner și col. (1993) (41,4%) în Israel respectiv de de la Fuente și col. (1998) 42,7% în Spania [Solana și col., 1985; Fagan și col., 1995; Brenner și col., 1993; De la Fuente și col., 1998a].

Valori mai apropiate de ale noastre au fost semnalate de Abraham și col. (1992) în Etiopia (16,7 %), García și col. (2000) în Spania (20,4%) respectiv de Pérez și col. (1997) (7%) la vițeele cu

diaree în cantonul Tilarán (Costa Rica) [Garcia și col., 2000; Perez și col., 1997; Abraham și col., 1992].

Infecții cu *E. coli* F5 (K99) nu au fost semnalate în fecalele diareice ale vițelilor sub vârsta de 90 de zile. Într-o lucrare, de la Fuente și col. (1998b 1) semnalează sensibilitatea redusă a kitului ELISA (Tetravalent) (28,6%) în identificarea tulpinii *E. coli* F5 față de cultura bacteriană (97,4%). Acest fapt ar explica în parte neidentificarea tulpinii *E. coli* F5 în prezentul studiu.

Un procent de 47,9 din fecalele analizate au fost negative pentru cei patru enteropatogeni. Această valoare coincide cu negativitatea găsită de alți autori [Bellinzoni și col., 1990; McDonough și col., 1994]. În asemenea situații, pe lângă cei patru enteropatogeni pentru care s-au făcut investigații, în etiologia diareii ar mai putea fi implicați în special calicivirusurile, Breda virusul, *Salmonella* spp. sau Torovirusurile [De la Fuente și col., 1998; Perez și col., 1997].

Infecții mixte au fost semnalate între *Cryptosporidium* spp. și rotavirusuri (6,2 %). Acest lucru coincide cu rezultatele publicate în majoritatea studiilor din întreaga lume care susțin că, cea mai comună infecție mixtă ar fi între *Cryptosporidium* spp. și rotavirusuri.

Neidentificarea corona- și rotavirusurilor în fermele în care se practică vaccinarea, demonstrează eficacitatea vaccinului și protecția oferită de acesta în primele trei luni de viață.

Pe baza acestui studiu se poate spune că, de departe, criptosporidiile, în cele patru ferme din județul Caraș-Severin, sunt cei mai frecvenți enteropatogeni ce produc diareile la vițel. Sistemul de creștere respectiv alimentația exclusiv lactată ar putea reprezenta un factor determinant în evoluția criptosporidiozei. Rotavirusurile, în fermele în care nu se practică vaccinarea, contribuie de asemenea la morbiditate, singure sau în infecții asociate. Întrucât efectivul investigat nu reprezintă un eșantion reprezentativ pentru fiecare categorie de vârstă (vezi județul Arad), ne-am decis să nu reprezentăm grafic evoluția criptosporidiozei în funcție de vârstă.

Concluzii

- La vițelii în primele două luni și jumătate de viață, în patru ferme de bovine din județul Caraș-Severin cauza majoră a diareilor a fost infecția cu *Cryptosporidium* spp.
- *Cryptosporidium* spp. a fost cel mai prevalent agent enteropatogen (41,65%) la vițelii în primele trei luni de viață în cele patru ferme cu creștere de tip industrial din județul Caraș-Severin
- În fermele în care se practică vaccinarea împotriva corona și rotavirusurilor s-a demonstrat eficacitatea vaccinului și protecția oferită de acesta în primele două luni de viață.
- Pe lângă infecția cu *Cryptosporidium* spp., rotavirusurile contribuie de asemenea la morbiditate, singure sau în infecții asociate.
- Nu au fost identificate infecții cu *E. coli* F5 și coronavirusuri.

Prevalența criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatogeni la vițelii în județul Timiș

Materiale și metodă

Pentru cunoașterea aspectelor epidemiologice ale criptosporidiozei la tineretul bovin, cercetările au fost efectuate în diferite zone ale județului Timiș conform hărții alăturate (fig. 5), întocmindu-se pentru fiecare animal examinat fișe individuale care cuprind: numărul matricol (la cele existente), rasă, vârstă și sex.

Materiile fecale diareice au fost recoltate individual, direct din rect, depozitate în coprocultoare la o temperatură de 4°C și prelucrate în decurs de 24 de ore.

Probele recoltate au fost examinate prin tehnica ELISA utilizând kit-ul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151) (Bio-X Diagnostics, Belgia) care este un kit de diagnostic antigenic „in vitro” din fecale de bovine și respectă principiile tehnicii ELISA dublu – sandwich.

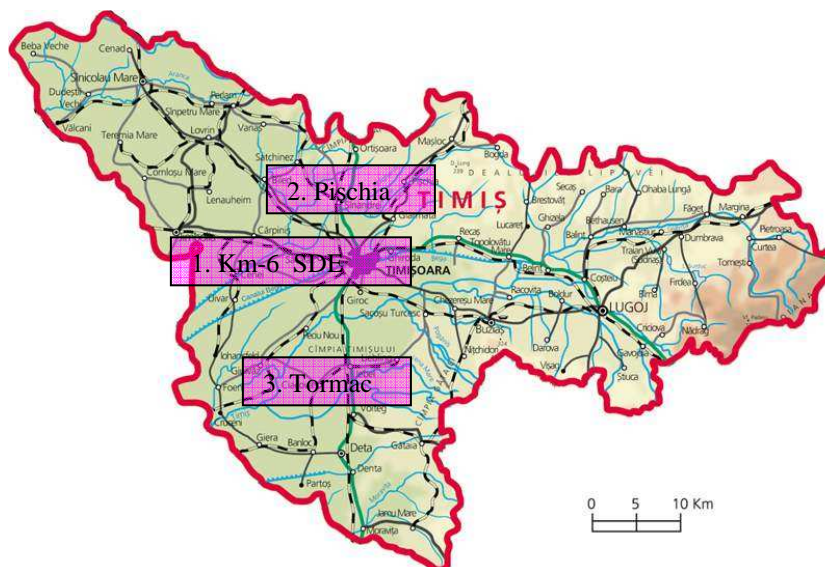


Fig. 5. Dispunerea localităților investigate în județul TIMIȘ 1.- km 6-SDE; 2. -Pișchia;3. –Tormac; [www.infoturism.ro]

Rezultate și discuții

În urma recoltării de probe de la **ferma USAMVB Timișoara – Km 6** au fost observate următoarele aspecte:

- ✓ Din cele 27 probe recoltate, prin tușeu, au fost diareice trei, 19 nediareice și cinci semidiareice;
- ✓ Vârsta vițelilor a fost cuprinsă între 14 zile și șase luni;
- ✓ În ceea ce privește starea fiziologică aceștia se prezentau clinic sănătoși, mai puțin cei diareici.

În urma analizării probelor prin examen ELISA s-a constatat că, 20 din 27 (74, %) de probe au fost negative, șapte probe (25,9 %) fiind pozitive la infecția cu enteropatogenii vizați de ELISA. Dintre acestea două probe (7,40%) au fost pozitive la infecția unică cu *Cryptosporidium* spp., trei (11,1 %) au fost pozitive la infecția asociată rotavirus – *Cryptosporidium*, două probe au fost pozitive la infecția unică cu rotavirus (7,4 %) (tabel 9).

Din ferma SDE a USAB Timișoara au fost recoltate 18 probe, nouă nediareice, două semidiareice și șapte diareice. Vițelii de la care au provenit probele de fecale au avut vârstă cuprinsă între 1,5 și patru luni. Atât cei cu eliminări de fecale nediareice cât și cei cu fecale semidiareice puteau fi încadrați la starea fiziologică clinic sănătoși.

În urma analizării probelor prin examen ELISA s-a constatat că 11 din 18 (61,1 %) probe au fost negative, șapte probe (38,88 %) fiind pozitive la infecția cu enteropatogenii vizați de ELISA. Dintre acestea patru probe (22,2 %) au fost pozitive la infecția unică cu *Cryptosporidium* spp., două (11,1 %) au fost pozitive la infecția asociată coronavirus – *Cryptosporidium*, o probă a fost pozitivă la infecția asociată cu rotavirus – *Cryptosporidium* (5,5 %).

O altă fermă supusă studiului a fost cea de la Pișchia unde au fost examinați 20 de vițel. După aspectul fecalelor 12 au fost diareice (60%), cinci semidiareice (25%) și trei nediareice (15 %). Vițelii supuși studiului au avut vârstă între trei și nouăzeci de zile.

Rezultatele testului ELISA au evidențiat faptul că 10 din 20 de probe (50 %) au fost pozitive din punct de vedere al infecției cu unul sau mai mulți enteropatogeni. Parazitismul cu *Cryptosporidium* spp. a fost observat la 50% din probe (10 din 20). Asocierea *Cryptosporidium* spp. – coronavirus a fost identificată la 20 % (patru din 20). Asocierea *Cryptosporidium* spp. cu rotavirus a fost observată la o probă adică 5 % și cu *E. coli* F5 la o singură probă (5 %). Asocierile observate au fost în toate cazurile *Cryptosporidium* spp. și alți enteropatogeni nu și alți enteropatogeni fără *Cryptosporidium* spp. Procentual aceste asocieri au fost constatate la 25 % dintre probe (tabel 9).

Un alt experiment a fost realizat la una din fermele "Tormac-Tim" localitatea Tormac, unde au fost recoltate fecale de la 15 viței cu vârsta cuprinsă între o zi și 55 de zile. Aspectul fecalelor a fost diareic la patru viței (26,6 %), semidiareic la trei animale (20 %) și nediareic la opt viței (53,3%). În ceea ce privește starea fiziologică se poate spune că, șapte erau clinic sănătoși (46,6 %), doi erau în stare relativ bună (13,3 %) iar 33,3 % (cinci viței manifestau sindrom digestiv și respirator cu prostrație).

Rezultatele testului ELISA au relevat faptul că, nouă probe (60%) au fost pozitive din punct de vedere al enteropatogenilor. Cinci probe (33,3 %) au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium* spp., patru probe (26,6%) au fost pozitive pentru rotavirus, una (6,6 %) a fost pozitivă la coronavirus și o altă probă a fost pozitivă la infecția cu *E. coli* F5 (6,6%).

Asocierile înregistrate au fost coronavirus - *Cryptosporidium* spp. (6,6%) și rotavirus – *Cryptosporidium* spp. (6,6%).

Concluzii

- La tineretul bovin investigat în județul Timiș, criptosporidioza, evaluată prin ELISA, a evoluat în toate cele 4 unități de creștere, având o prevalență de 33,7% (17,5% ca agent patogen unic și 16,25% în asociație cu alți agenți patogeni).
- Coronaviroza a avut o prevalență de 8,75 % evoluând în toate cazurile asociată.
- Prevalența rotavirozei la tineretul bovin examinat a fost de 13,7% (6,25% ca agent patogen unic și 7,5% în asociație cu alți agenți patogeni).
- Infecția cu *E.coli* F5 enteropatogen a avut o prevalență de 2,5%.
- Infecția cu *Cryptosporidium* spp., ca agent patogen unic, a variat între 7,4% și 25%.
- Coronavirusurile implicate în etiologia diareei la tineretul bovin investigat în județul Timiș evoluează de obicei asociate cu criptosporidii.

Tabel 9

Sinopticul probelor pozitive la kitul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151), în fermele de bovine luate în studiu din județul Timiș

Ferma	Nr. probe	Probe pozitive pentru							Negative
		Nr. <i>Crypto</i> sg. (%)	Nr. rotav sg. (%)	Nr. <i>E. coli</i> F5 sg. (%)	Nr. <i>Crypto.</i> + coronav (%)	Nr. <i>Crypto.</i> + rotav (%)	Nr. Rotav. + <i>Crypto</i> + corona (%)	Nr. <i>Crypto</i> + <i>E. coli</i> F5 (%)	
Km 6	27	2 (7,4)	2 (7,4)	0	0	3 (11,1)	0	0	20 (74,0)
SDE	18	4 (22,2)	0	0	2 (11,1)	1 (5,5)	0	0	11 (61,1)
PIȘCHIA	20	5 (25)	0	0	3 (15)	0	1 (5)	1(5)	10 (50)
TORMAC	15	3 (20)	3 (20)	1 (6,6)	1 (6,6)	1 (6,6)	0	0	6 (40)
TOTAL	80	14 (17,5)	5 (6,25)	1 (1,25)	6 (7,5)	5 (6,25)	1 (1,25)	1 (1,25)	47 (58,7)

Screening epidemiologic asupra evoluției criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatogeni la viței, în partea de vest a României

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor privind ponderea infecțiilor cu criptosporidii în asociere sau nu cu alți trei enteropatogeni la tineretul bovin din zona de vest a României sunt prezentate sintetic în tabelul 10. Evoluția celor patru enteropatogeni, precum și procentul probelor negative în județele investigate sunt reprezentate în figura 6.

Infecții cu criptosporidii ca unici agenți patogeni au fost semnalate în toate cele patru județe în care s-au făcut investigații în procente diferite de la 17,5% (județul Timiș) până la 48% (județul Arad).

Rotavirusurile ca unici agenți patogeni au fost diagnosticate de asemenea în toate județele în care s-au făcut investigații (tabel 10). Cel mai ridicat procent de infecție a fost semnalat în județul Bihor, unde 15% dintre vițeii investigați eliminau prin fecale doar rotavirusuri.

Coronavirusul enteric bovin ca și monoinfecție a fost diagnosticat în județele Arad (2%) și Bihor (3,8%) fie singur fie asociat. Infecții cu *E. coli* F5 au fost semnalate numai în județul Timiș având prevalența cea mai mică dintre enteropatogenii investigați.

În cazul infecțiilor mixte, s-au găsit asocieri între: criptosporidii și rotavirusuri (5,2%), criptosporidii și coronavirusuri (6,8%), criptosporidii și *E. coli* F5 (0,3%) respectiv între rotavirusuri și coronavirusuri (0,9%). Într-un singur caz (0,3%), în județul Timiș, s-au înregistrat infecții mixte cu trei enteropatogeni (vezi tabel 10)

Tabel 10

Sinopticul probelor pozitive la kitul BIO K 151 în cele patru județe vestice la bovine

Județ	Nr. Probe	Probe pozitive pentru																		Negative	
		Cry. sg		Rota. sg		Corona. sg.		E. coli F5 sg.		Cry. + Rota		Cry. + Corona.		Cry. + E. coli F5		Rota. + Corona.		Cry.+ Rota.+ Corona.			
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%		
Arad	100	48	48	7	7	2	2	0	0	3	3	12	12	0	0	3	3	0	0	25	25
Bihor	80	18	22,5	12	15	3	3,8	0	0	5	6,2	3	3,8	0	0	0	0			39	48,7
Caraș	48	17	35,4	5	10,4	0	0	0	0	3	6,2	0	0	0	0	0	0	0	0	23	47,9
Timiș	80	14	17,5	5	6,2	0	0	1	1,2	5	6,2	6	6,7	1	1,2	0	0	1	1,2	47	58,7
Total	308	97	31,4	29	9,4	5	1,6	1	0,3	16	5,2	21	6,8	1	0,3	3	0,9	1	0,3	134	43,5

Legendă: Cry-Cryptosporidium spp., Rota-rotavirus, Corona.-coronavirus, E.- Escherichia, sg.- singur

Pe ansamblu, studiul materiilor fecale prin tehnica ELISA, cu privire la ponderea agenților enteropatogeni implicați în producerea diareilor la vițeii în județele vestice ale României, arată că:

- *Cryptosporidium* spp. a fost identificat la un număr de 136 probe din 308 analizate (97 de cazuri ca agent patogen unic și 39 cazuri asociat);
- coronavirusurile au fost întâlnite în fecalele a 30 vițeii din 308 examinate (cinci cazuri ca agent patogen unic și 25 cazuri asociat);
- rotavirusurile au fost găsite la 49 probe din 308 analizate (29 cazuri ca agent patogen unic și 20 cazuri asociat);
- *E. coli* F5 enteropatogen a fost identificat în fecalele a doi vițeii din 308 examinate (într-un singur caz ca agent patogen unic și un caz asociat).

Acest studiu demonstrează că, *Cryptosporidium* spp. a fost cel mai prevalent agent enteropatogen (44,1 %) la vițeii sub vârsta de șase luni în cele patru județe din partea de vest a României (fig. 7). Procentul total de detectare a *Cryptosporidium* spp. tinde spre valorile obținute de de la Fuente și col. (1998b) în centrul Spaniei (52, 3%) care au făcut investigații epidemiologice la tineretul bovin în prima lună de viață [De la Fuente și col., 1998b]. În Germania, la vițeii sub trei săptămâni de viață, Otto și col. (1995) găsesc o pozitivitate de 52,5%, procent care se apropie destul de mult de pozitivitatea găsită de noi [Otto și col., 1995].

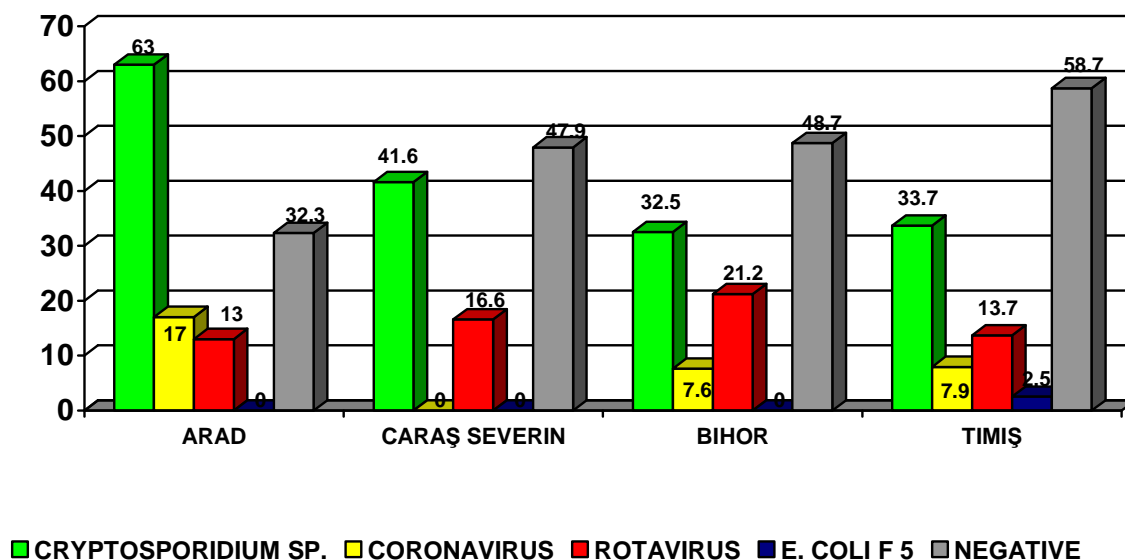


Fig. 6. Reprezentarea grafică a ponderii celor patru enteropatogeni pe județe în partea de vest a României

Analizând rezultatele obținute și comparându-le cu cele relatate de alți autori, pot fi relevate câteva aspecte epidemiologice.

Infecții cu criptosporidii la vițeii au putut fi puse în evidență atât la animalele bolnave cât și la cele clinic sănătoase din întreaga lume, chiar din primele zile de după naștere și până la vârsta de doi ani.

Metodele non-moleculare relevă o prevalență foarte variată de la o regiune geografică la alta. De exemplu datele obținute din cercetările efectuate în două ferme din Franța la vițeii în primele trei săptămâni de viață relevă o prevalență de 86% respectiv 43,4% [Naciri și col., 1999]. Studiul efectuat de Joachim și col. în Germania pe un efectiv de 4060 de vițeii de diferite vârste relevă o prevalență de 21,5% [Joachim și col., 2003]. Într-un alt studiu din S.U.A. în care s-au făcut investigații în 1103 ferme și în care au fost prelucrate și examinate 7369 de probe, s-a ajuns la concluzia că în 59% dintre ferme animalele sunt infectate cu criptosporidii, iar din totalul probelor examinate 22% au fost pozitive [Santin și col., 2004]

În Anglia criptosporidioza este recunoscută ca fiind o problemă gastrointestinală obișnuită la viței. Sturdee și col. (2003) într-un studiu epidemiologic efectuat pe 272 de viței în primele opt săptămâni de viață au găsit o prevalență a criptosporidiozei de 23,2% [Sturdee și col., 2003].

Și pe continentul Asiatic au fost raportate infecții cu criptosporidii la vițeii de diferite categorii de vârste. Printre statele în care s-au efectuat investigații epidemiologice se numără: India (10,9%), Iraq (20%), Japonia (4,7%), Coreea (14,4), Malaysia (25%) și Taiwan (37,6). [Fariyawati și col., 2005; Kaneta și col., 1998; Khubnani și col., 1997; Mahdi și col., 2002; Watanabe și col., 2005; Wee și col., 1996]

În statul african Uganda, Nizeyi și col. (2002) au examinat 50 de probe diareice de la viței înainte și după înțărcare. Ei au găsit o prevalență de 38% [Nizeyi și col., 2002]. În Zambia, Guerden și col. (2006) relatează o prevalență mult mai mică de 6,3% la vițeii în primele 84 de zile de viață [Guerden și col., 2006].

Comparativ cu aceste date prezentate anterior, rezultatele obținute de noi prin testul imunoenzimatic ELISA evocă o prevalență a criptosporidiozei de 44% (fig. 7).

Cu privire la evoluția criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatogeni rezultate comparative efectuate în diferite arii geografice sunt prezentate în cele ce urmează.

În Spania cercetările lui García și col. (2000) scot în evidență o pozitivitate mult mai mare pentru *Cryptosporidium* spp. (85,2 %) decât cea indicată în acest studiu [Garcia și col., 2000]. Rata de detecție a infecției cu criptosporidii găsită de noi este mult mai mare decât cea găsită de Reynolds și col. (1986) (14%), Snodgrass și col. (1986) (14%), Abraham și col. (1992) (0%) J. Quilez și col. (1996) (19,7%) sau Pérez și col. (1997) (11%) [Reynolds și col., 1986; Snodgrass și col., 1986; Abraham și col., 1992; Quilez și col., 1996; Perez și col., 1997]

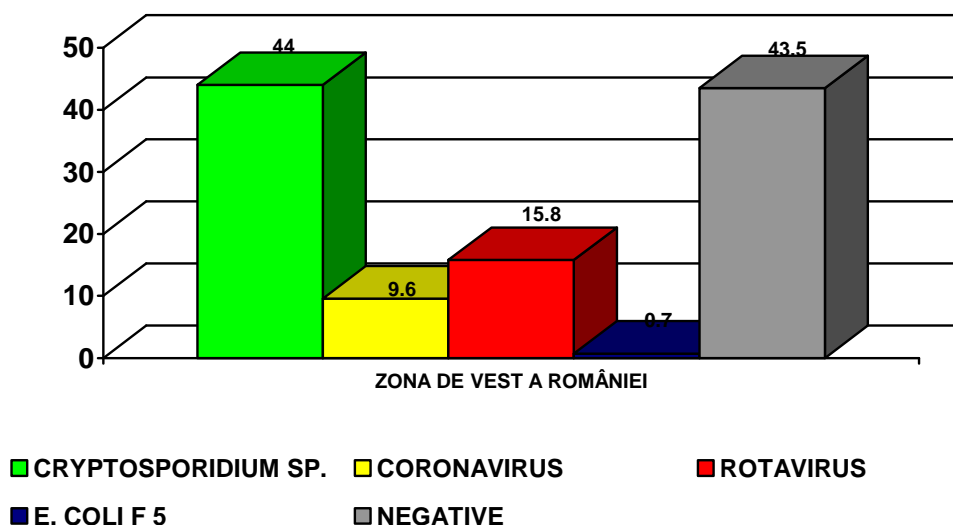


Fig. 7. Reprezentarea grafică a ponderii celor patru enteropatogeni în partea de vest a României

Unii autori în urma cercetărilor efectuate, au ajuns la concluzia că , rotavirusul ar fi cel mai prevalent agent al diareei la viței. Procentul de infecție cu rotavirus găsit de noi (15,8%) este mult mai mic decât cel găsit de Solana și col. (1985) (43,6%) în Spania, de Fagan și col. (1995) (38,9%) în Irlanda, de Brenner și col. (1993) (41,4%) în Israel respectiv de De la Fuente și col. (1998a) 42,7% în Spania [Solana și col., 1985; Fagan și col., 1995; Brenner și col., 1993; De la Fuente și col., 1998a].

Valori mai apropiate de ale noastre au fost semnalate de Abraham și col. (1992) în Ethiopia (16,7 %), García și col. (2000) în Spania (20,4%) respectiv de Pérez și col. (1997) (7%) la vițeii cu diaree în cantonul Tilarán (Costa Rica) [Garcia și col., 2000; Perez și col., 1997; Abraham și col., 1992].

Infecții cu *E. coli* F5 (K99) au fost semnalate în fecalele diareice ale vițeilor într-un procent de 0,7. Într-o lucrare, de la Fuente și col. (1998a) semnalează sensibilitatea redusă a titlului ELISA (Tetralent) (28,6%) în identificarea tulpinii *E. coli* F5 față de cultura bacteriană (97,4%). Acest fapt ar explica în parte slaba prevalență a infecției cu *E. coli* F5 în prezentul studiu [De la Fuente și col., 1998a].

Un procent de 43,5 din fecalele analizate au fost negative pentru cei patru enteropatogeni. Această valoare coincide cu negativitatea găsită de alți autori [Bellinzoni și col., 1990; McDonough și col., 1994]. În asemenea situații, pe lângă cei patru enteropatogeni pentru care s-au făcut investigații, în etiologia diareei ar mai putea fi implicați în special calicivirusurile, Breda virusul, *Salmonella* spp. sau Torovirusurile [De la Fuente și col., 1998; Perez și col., 1997]. Infecții mixte între *Cryptosporidium* spp. și rotavirusuri au fost semnalate într-un procent de 5,1%. În cazul nostru cea mai frecventă asociație a fost între criptosporidii și coronavirusuri (6,1%). Acest lucru este în contradicție cu rezultatele publicate în majoritatea studiilor din întreaga lume care susțin că, cea mai comună infecție mixtă ar fi între *Cryptosporidium* spp. și rotavirusuri.

Neidentificarea corona- și rotavirusurilor în fermele din județul Caraș - Severin în care se practică vaccinarea, demonstrează eficacitatea vaccinului și protecția oferită de acesta în primele trei luni de viață.

Pe baza acestui studiu se poate spune că, de departe, criptosporidiile, în cele patru județe vestice ale României, sunt cei mai frecvenți enteropatogeni ce produc diareile la viței. Sistemul de creștere respectiv alimentația exclusiv lactată ar putea reprezenta un factor determinant în evoluția criptosporidiozei. Pe lângă infecția cu *Cryptosporidium* spp., rotavirusurile, coronavirusurile și *E. coli* F5 contribuie de asemenea la morbiditate, singure sau în infecții asociate.

Concluzii

Investigațiile epidemiologice efectuate la bovinele din patru județe vestice ale României scot în evidență o prevalență de 44% pentru criptosporidioză, 15,8% pentru rotaviroză, 9,6% pentru coronaviroză respectiv 0,7% pentru colibaciloza bovină determinată de *E. coli* F5 enteropatogen.

2. DETERMINAREA PREVALENȚEI CRIPTOSPORIDIOZEI SUINE ÎN ASOCIERE CU ALȚI ENTEROPATOGENI PRIN ELISA ÎN CÂTEVA JUDEȚE VESTICE ALE ȚĂRII

Prevalența criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatogeni la suine în județul Timiș

Sindromul diareic al tineretului suin reprezintă o problemă complexă ca rezultat al interacțiunii dintre agenții enteropatogeni, imunitatea gazdei și procedurile de management. Importanța infecțiilor asociate pentru zoo-economie a crescut treptat, pe măsura creșterii șeptelului și mai ales pe măsura extinderii sistemelor de creștere intensivă și semiintensivă. Pierderile economice sunt considerabile în special la purceii sugari și înțărcați [Johnston și col., 1992].

Diagnosticul și măsurile preventive sunt dificile datorită varietății agenților patogeni ce pot fi izolați de la purceii la această categorie de vârstă [Moga Mânzat, 2001].

Cei mai frecvenți enteropatogeni sunt considerați: coronavirusurile (incluzând virusul TGE și virusul diareei epidemice porcine), rotavirusurile, *E. coli* enterotoxigen (ETEC), *Clostridium perfringens* și coccidiile (incluzând *Isospora suis* și *Cryptosporidium* spp.) [Moga Mânzat, 2001; Katsuda și col., 2006]. Investigații care au avut ca scop determinarea prevalenței acestor agenți enteropatogeni au fost realizate în întreaga lume. Totuși, multe studii au fost concentrate doar pe un singur agent patogen iar investigațiile efectuate asupra infecțiilor mixte sunt raportate acum 15–20 ani și nu reflectă o situație epidemiologică curentă [Dărăbuș, 1996].

Întrucât nu există niciun studiu epizootologic cu privire la ponderea agenților enteropatogeni la tineretul suin în zona de vest a României, s-a considerat oportună efectuarea unor investigații epidemiologice prin tehnica ELISA, în vederea cunoașterii evoluției criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatogeni. Obiectivul principal al acestui studiu a fost de a determina prevalența a câtorva agenți enteropatogeni care determină diareea la purceii, înainte și după înțărcare, în condiții de creștere intensivă.

Materiale și metodă

Studiul a fost realizat în perioada octombrie-decembrie 2007, pe un număr de 104 de purceii cu vârste cuprinse între 0 și 47 de zile, proveniți din opt ferme cu creștere de tip industrial din județul Timiș conform hărții alăturate (fig. 8). Purceii de rasă Landrace, Hampshire, Duroc și Marele Alb, de sexe diferite (50 masculi și 53 femele) au fost crescuți în sistem intensiv, fie în boxe individuale împreună cu mamele până la înțărcare, fie în boxe mai mari de 10-14 purcei/boxă (cei peste 28 de zile).

Materiile fecale diareice au fost recoltate individual direct din rect, depozitate în coprocultoare la o temperatură de 4°C și prelucrate în decurs de 24 de ore. Probele recoltate au fost examinate prin

tehnica ELISA în laboratorul de serologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara. S-a utilizat kit-ul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151) (Bio-X Diagnostics, Belgia) care este un kit de diagnostic antigenic „in vitro” din fecale și respectă principiile tehnicii ELISA dublu – sandwich.

Principiul testului se bazează pe faptul că anticorpii monoclonali cu care sunt impregnate camerele de microtitrare „capturează” antigenele agenților patogeni corespunzători din probele de fecale.

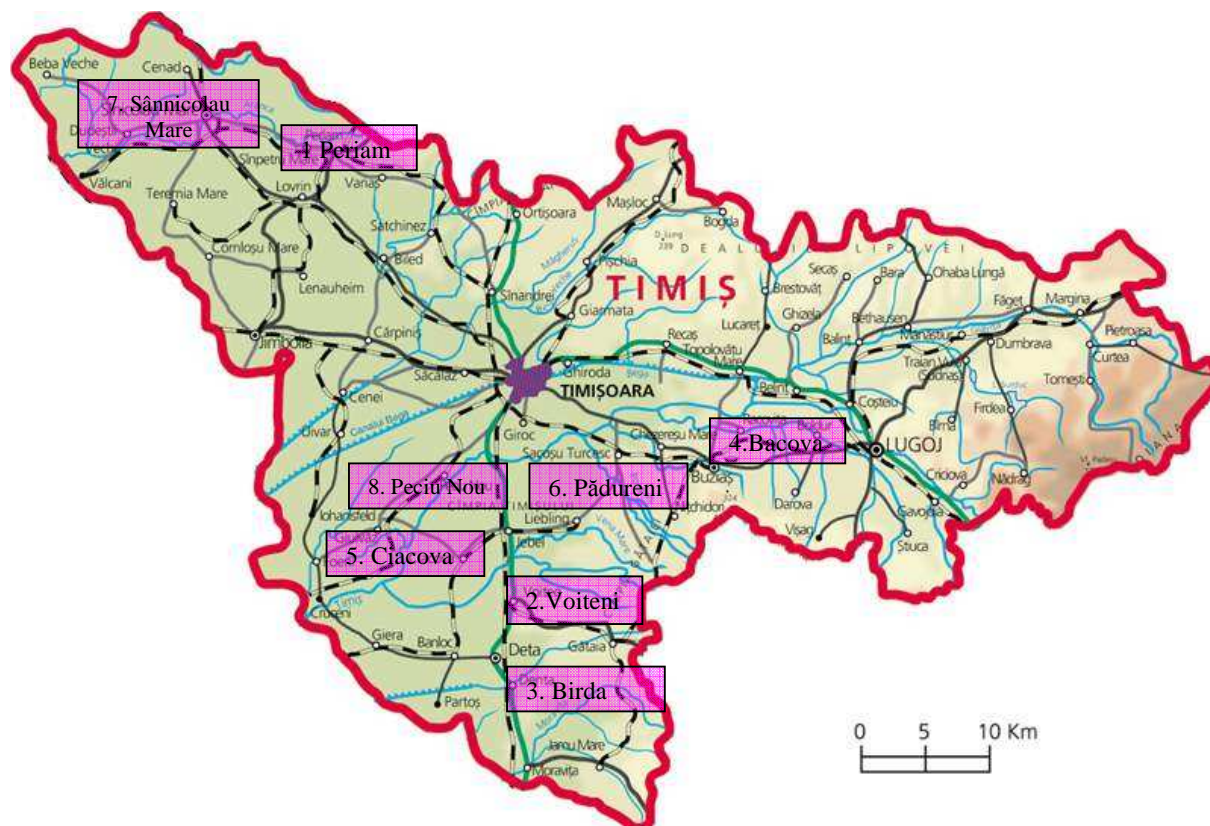


Fig. 8. Dispunerea unităților cartate în județul Timiș
 1 - Periam; 2 - Voiteni; 3 - Birda; 4 – Bacovă; 5 – Ciacova;
 6 – Pădureni; 7 – Sănnicolau Mare; 8 – Peciu Nou;

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor sunt prezentate sintetic în tabelul 11.

În ferma I, o probă din 10 a fost pozitivă la infecția cu *Cryptosporidium spp.* La infecția cu rotavirusuri, două probe au fost pozitive, din care una a fost pozitivă pentru infecția cu rotavirusuri cât și pentru infecția cu *Cryptosporidium spp.*

În ferma II, șase probe din 13 au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium spp.*, din care una a fost pozitivă atât la infecția cu *Cryptosporidium spp.* cât și la infecția cu rotavirusuri.

În ferma III, patru probe din 10 analizate au fost pozitive pentru infecția cu *Cryptosporidium spp.* Rotavirusurile au putut fi evidențiate în două probe din tot atâtea analizate. În această fermă nu s-a găsit nicio asociere între cei doi enteropatogeni.

În ferma IV, nouă din 18 probe au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium spp.* La infecția cu rotavirusuri, două probe au fost pozitive.

În ferma V, o singură probă s-a dovedit a fi infectată cu *Cryptosporidium spp.* În 5 probe din 10 analizate s-au identificat rotavirusuri. În această fermă nu s-a găsit nicio asociere între cei doi enteropatogeni.

În ferma VI, trei probe din 10 prelucrate au fost pozitive pentru infecția cu *Cryptosporidium spp.*, din care o singură probă a fost pozitivă atât la infecția cu *Cryptosporidium spp.* cât și la infecția cu rotavirusuri.

În ferma VII, trei probe din 10 au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium spp.*

În ferma VIII, cinci probe din 23 analizate au fost pozitive la infecția cu *Cryptosporidium* spp.. În aceste probe pozitive pentru *Cryptosporidium* spp., în două situații, s-au găsit asocieri cu alți enteropatojeni: o dată cu rotavirusuri și o dată cu coronavirusuri.

În niciuna din fermele luate în studiu, *E. coli* F5 enterotoxigen (ETEC) nu a fost identificat, ca fiind implicat în producerea diareei la tineretul suin.

Tabel 11

Sinopticul probelor pozitive la kitul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151), în cele opt unități de creștere a tineretului suin din județul Timiș

FERMA	Probe pozitive pentru											Negative	
	Nr. total probe	Crypto. singur		Coronav singur	Rotav. singur		E. coli F5	Crypto. + Rotav.		Crypto. + Corona			
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
I	10	0	0	0	1	10	0	1	10	0	0	8	80
II	13	5	39	0	0	0	0	1	8	0	0	7	54
III	10	4	40	0	2	20	0	0	0	0	0	4	40
IV	18	9	50	0	2	11	0	0	0	0	0	7	39
V	10	1	10	0	5	50	0	0	0	0	0	4	40
VI	10	2	20	0	0	0	0	1	10	0	0	7	70
VII	10	3	30	0	0	0	0	0	0	0	0	7	70
VIII	23	3	13	0	2	8,6	0	1	4,3	1	16,6	16	56
Total (%)	104 (100)	27 (26,2)		0	12 (11,6)		0	4 (3,9)		1 (0,9)		60 (58,2)	

Legendă: *Crypto* – *Cryptosporidium*; *Coronav* – Coronavirusuri; *Rotav* - Rotavirusuri ; *E* – *Escherichia*;

Neidentificarea agentului *E. coli* F5 enterotoxigen se poate explica prin faptul că, la suine, cele mai multe tulpini enterotoxigene posedă adevizatele fimbriale F4 (K88) și mult mai rar F5 (K99) [Moga Mânzat, 2001].

În toate cele șase ferme luate în studiu, pe lângă infecția cu *Cryptosporidium* spp. intervin și rotavirusurile în producerea diareei, fie singure (11.6%) fie în asociere cu criptosporidii (3,9%).

Pe ansamblu, studiul materiilor fecale prin tehnica ELISA, privind ponderea agenților enteropatojeni implicați în producerea diareelor la tineretul suin, arată că:

- *Cryptosporidium* spp. a fost identificat la un număr de 32 probe din 104 analizate (27 de cazuri ca agent patogen unic și cinci cazuri asociat);
- rotavirusurile au fost întâlnite la 16 probe din 104 analizate (12 cazuri ca agent patogen unic și patru cazuri asociat);
- coronavirusurile au fost puse în evidență într-o singură probă asociate cu criptosporidii;
- *E. coli* F5 enteropatojen nu a fost identificat;

Rezultatele anchetei epidemiologice, privind modul în care vârsta influențează extensivitatea infecției cu enteropatojeni la tineretul porcine, sunt prezentate în tabelul de mai jos.

Pe ansamblu, s-au înregistrat diferențe mici în ceea ce privește distribuția rotavirusurilor ca unici agenți enteropatojeni cauzatori ai diareei în primele luni de viață. Rotavirusurile au putut fi identificate la toate categoriile de vârste alese de noi, înainte și după întărcare. Cei mai afectați purcei au fost din categoria 8-14 zile, la care rotavirusurile au putut fi identificate în proporție de 33,3%. Restul categoriilor de vârstă s-au dovedit a fi relativ uniform infectate cu rotavirusuri.

Vârsta cea mai receptivă la infecția cu criptosporidii, ca unici agenți patogeni s-a dovedit a fi cea cuprinsă între 29 și 47 zile. S-au observat diferențe foarte semnificative ($p < 0,001$) între această categorie de vârstă și celelalte categorii luate în considerare (tabel 12). Prevalența crescută la categoria de peste 30 de zile, adică faptul că 15 din 24 probe au fost pozitive pentru infecția cu *Cryptosporidium* spp., ca unic agent patogen, se poate explica prin faptul că, prezența purceilor într-un

mediu puternic contaminat a facilitat infecția. O altă explicație ar putea-o constitui prezența stresului de înțarcare, care intervine ca un factor imunosupresant și declanșator al diareei la tineretul suin înțarcat.

Tabel 12

Evoluția celor patru enteropatogeni (Rotavirus, Coronavirus, *E. coli* F5 și *Cryptosporidium* spp.) în funcție de vârstă la tineretul suin, în cele opt ferme investigate

Vârsta	Total Probe Examine	Probe pozitive pentru						Nega-Tive (%)
		Rotav. Singur (%)	Coronav Singur (%)	<i>E. Coli</i> F5	<i>Crypto.</i> Singur (%)	<i>Crypto.</i> Asociat cu Rotav.(%)	<i>Crypto.</i> Asociat Corona	
1-7 zile	23	2 (8,6)	0	0	4 (17,3)	0	0	17 (73,9)
8-14 zile	18	6 (33,3)	0	0	3 (16,6)	1 (5,55)	1 (5,55)	7 (61)
15-21 zile	22	1 (4,5)	0	0	1 (4,5)	1(4,5)	0	19 (86,3)
22-28 zile	17	1 (5,9)	0	0	4 (23,5)	2 (11,76)	0	10 (60)
29-47 zile	24	2 (8,3)	0	0	15 (62,5)	0	0	7 (29)
Total(%)	104 (100)	12 (11,6)	0	0	27 (26,2)	4 (3,9)	1 (0,9)	60 (58,2)

Legendă: *Crypto* – *Cryptosporidium*; *Coronav* – Coronavirusuri; *Rotav* - Rotavirusuri ; *E* – *Escherichia*

Pentru confirmarea acestui procent atât de ridicat la această categorie de vârstă, sunt necesare alte studii pe un efectiv mai mare. La restul categoriilor de vârste, sub 30 de zile, cu excepția purceilor din a treia săptămână de viață, criptosporidiile ca unici agenți patogeni s-au evidențiat în procente aproximativ egale.

Asocieri dintre *Cryptosporidium* spp. și rotavirusuri se pot observa la trei categorii de vârste respectiv: 8-14 zile, 15-21 zile și 22-28 zile, în procente diferite, fără a se putea trage vreo concluzie semnificativă.

Având în vedere omogenitatea loturilor, s-a întocmit un grafic în care s-a reprezentat evoluția criptosporidiozei la tineretul suin înainte și după înțarcare (fig. 9).

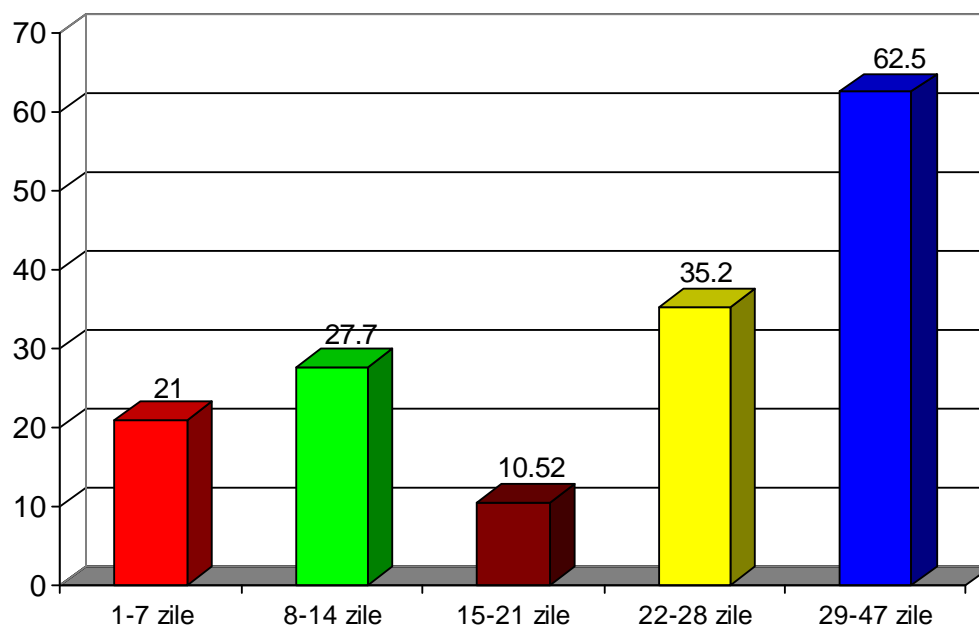


Figura 9. Evoluția criptosporidiozei la tineretul suin în funcție de vârstă

Prin aplicarea testului χ^2 s-a urmărit influența vârstei asupra evoluției criptosporidiozei la categoriile alese sub vârsta de 50 de zile. Din cele cinci categorii de vârste, cel mai înalt procent al infecției cu criptosporidii s-a înregistrat la categoria de 29-47 zile (62,5%), urmată de categoria 22-28

de zile (35,2%). Prin aplicarea testului χ^2 s-au observat diferențe foarte semnificative ($p < 0,001$) între categoria de 29-47 zile și restul categoriilor alese sub vârsta de 29 de zile (fig. 9).

Spre deosebire de datele obținute de noi, care relevă o prevalență relativ mare a parazitismului cu *Cryptosporidium spp.* (31%), Katsuda și col. (2006) constată că problemele digestive care se datorează infecției cu *Cryptosporidium spp.* sub vârsta de trei săptămâni sunt inexistente [Katsuda și col., 2006]. Prima categorie la care ei au înregistrat infecții cu criptosporidii a fost cea de 22-28 de zile într-un procent de 2,5 % la 40 de probe analizate. La categoria de vârstă 29-35 de zile se constată cel mai crescut procent al infecției de 28,3% , lucru ce am observat și noi în investigațiile noastre.

Rezultatele obținute de Wieler și col. (2001), în privința incidenței parazitismului cu criptosporidii în asociere sau nu cu alți enteropatogeni, indică un procentaj foarte scăzut al prevalenței criptosporidiozei (1,4%), comparativ cu investigațiile noastre care scot în evidență un procent de 31 [Wieler și col., 2006].

În condițiile țării noastre, cercetări epidemiologice privind evoluția criptosporidiozei suine au fost efectuate de către Dărăbuș și col. la mijlocul anilor '90 [Dărăbuș, 1996]. Pentru punerea în evidență a protozoarului au fost examinate fecalele a 430 de porcine prin diferite metode: Willis, Ziehl – Neelsen modificată de Henriksen, Anderson, Giemsa, Heine și examenul direct al etalatului de fecale. Deși a fost identificată doar într-un singur caz, este prima semnalare în România, la această specie, ceea ce ar reprezenta o prevalență de 0,23%. Comparând valoarea prevalenței obținută de noi (31%) cu rezultatele investigațiilor de acum 10 ani efectuate de Dărăbuș și col. (prevalență de 0,23%) se constată o diferență foarte mare. Această diferență se datorează, probabil, sensibilității și specificității crescute a testului ELISA la antigenele de *Cryptosporidium spp.* din fecale, comparativ cu metodele uzuale de diagnostic folosite până acum.

Concluzii

- La tineretul suin cu vârsta cuprinsă între 0 și 47 de zile, criptosporidioza, evaluată prin ELISA în premieră națională, a evoluat în toate cele 8 unități de creștere ale județului Timiș, având o prevalență de 31% (26,2% ca agent patogen unic și 4,8% în asociație cu alți agenți patogeni).
- Infecția cu *Cryptosporidium spp.* ca monoparazitism a variat între 0 și 50%.
- La aceeași categorie de vârstă, coronaviroza a avut o prevalență de 0,9 % evoluând asociat cu *Cryptosporidium spp.* într-un singur caz.
- Prevalența rotavirozei la tineretul suin examinat a fost de 15,5% (11,6% ca agent patogen unic și 3,9% în asociație cu criptosporidii).
- Infecția cu *E.coli* F5 enteropatogen nu a fost semnalată.
- Extensivitatea și intensitatea infecției la tineretul suin este mai ridicată la categoria de vârstă de după înțârcare (29-47 de zile).
- Nu s-au semnalat diferențe semnificative în ceea ce privește distribuția rotavirusurilor la categoriile de vârste investigate.

2.2. Studiu epidemiologic prin ELISA asupra parazitismului cu criptosporidii în asociere cu alți enteropatogeni la suine în județul Arad

Materiale și metodă

Studiul a fost realizat în perioada septembrie-noiembrie 2007, pe un număr de 29 de suine cu vârste cuprinse între 110 și 133 de zile, proveniți din trei ferme cu creștere de tip industrial din județul Arad. Purceii de rasă Landrace, Hampshire, Duroc și Marele Alb, de sexe diferite (13 masculi și 16 femele) au fost crescuți în sistem intensiv, în boxe mai mari de 10-14 porci/boxă.

Materiile fecale diareice au fost recoltate individual direct din rect, depozitate în coprocultoare la o temperatură de 4°C și prelucrate în decurs de 24 de ore. Probele recoltate au fost examinate prin tehnica ELISA în laboratorul de imunodiagnostic ELISA din cadrul Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara. S-a utilizat kit-ul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151) (Bio-X Diagnostics, Belgia) care

este un kit de diagnostic antigenic „in vitro” din fecale și respectă principiile tehnicii ELISA dublu – sandwich.

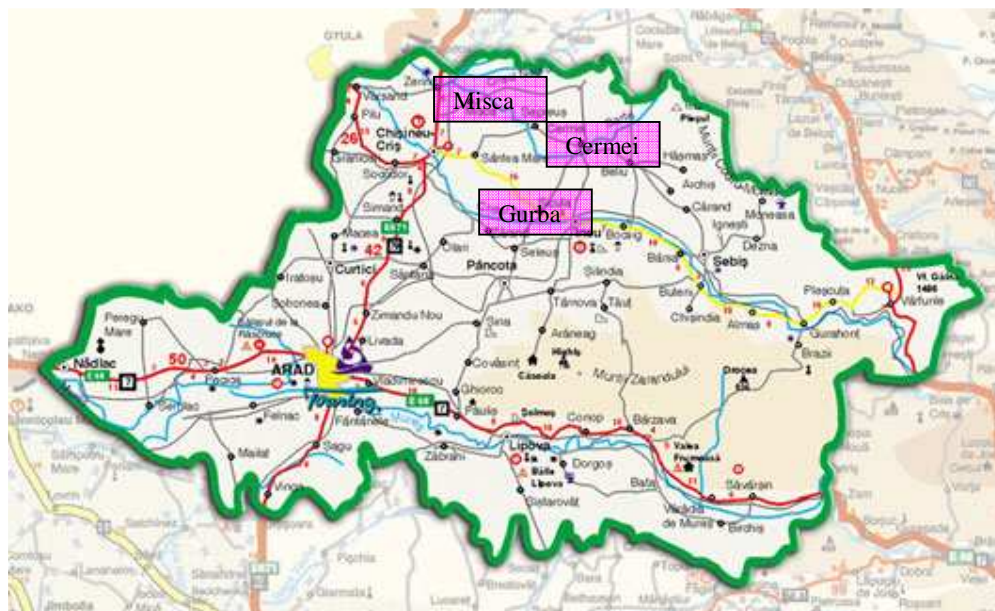


Figura 10. Dispunerea localităților investigate în județul Arad: 1. Mișca, 2. Cermei, 3. Gurba [www.roturism.ro].

Rezultate și discuții

În ferma din localitatea Gurba toate probele examinate, în număr de 10, au fost negative pentru cei patru enteropatogeni testați (*Cryptosporidium* spp, Rotavirus, Coronavirus și *E. coli* F5).

În ferma din localitatea Cermei în patru probe (40%) din 10 prelucrate s-a semnalat prezența protozoarului *Cryptosporidium* spp. Porcii parazițați aveau vârsta de 133 de zile.

În ferma din localitatea Mișca, un singur porc în vârstă de 125 zile din nouă examinate s-a dovedit a fi infectat cu *Cryptosporidium* spp. La fel ca în precedentele două ferme nu s-au identificat infecții cu rotavirusuri, coronavirusuri și *E. coli* F5.

Pe ansamblu se poate spune că, prin analiza a 29 probe de fecale de suine cu vârste cuprinse între 110 și 133 de zile, infecții cu criptosporidii s-au semnalat într-un procent de 17,2. Această valoare este semnificativ mai mică ($p < 0,01$) decât cea obținută în județul Timiș la purceii înainte și după înțârcare, unde s-a semnalat o pozitivitate de 31% pentru infecția cu *Cryptosporidium* spp. Pe de altă parte tot în acest județ pe lângă infecția cu *Cryptosporidium* spp. s-au identificat infecții cu rotavirusuri în proporție de 15,5% (11,6% ca agent patogen unic și 3,9% în asociație cu alți agenți patogeni), lucru neașteptat în județul Arad. Neidentificarea agentului *E. coli* F5 enterotoxigen se poate explica prin faptul că, la suine, cele mai multe tulpini enterotoxigene posedă adezinele fimbriale F4 (K88) și mult mai rar F5 (K99).

Dacă luăm în considerare rezultatele obținute în cele două județe se poate spune că, într-adevăr vârsta cea mai receptivă la infecția cu criptosporidii este cea în jurul înțârcării.

Concluzii

- La suinele cu vârste cuprinse între 110 și 133 de zile, criptosporidioza, evaluată prin ELISA, a evoluat în două din trei unități de creștere ale județului Arad, având o prevalență de 17,2%.
- Infecții cu rotavirusuri, coronavirusuri și *E. coli* F5 enteropatogen nu au fost semnalate.

2.3. Screening epidemiologic asupra evoluției criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatogeni la suine, în două județe vestice din România

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor privind ponderea infecțiilor cu criptosporidii în asociere sau nu cu alți trei enteropatogeni la tineretul suin în zona de vest a României sunt prezentate sintetic în tabelul 13. Evoluția celor patru enteropatogeni, precum și procentul probelor negative în județele investigate sunt reprezentate în figura 10.

Infecții cu criptosporidii ca unici agenți patogeni au fost semnalate atât în județul Arad (17,2%) cât și în județul Timiș (26,2%).

Rotavirusurile ca unici agenți patogeni au fost diagnosticate doar în județul Timiș. (tabel 13).

Coronaviroza suină ca și monoinfecție nu a fost întâlnită, în schimb asociat cu criptosporidii a fost diagnosticat într-un singur caz în județul Timiș. Infecții cu *E. coli* F5 de asemenea nu au fost întâlnite.

În cazul infecțiilor mixte, s-au găsit asocieri între: criptosporidii și rotavirusuri (3,9%) respectiv criptosporidii și coronavirusuri (0,9%) în județul Timiș.

Tabel 13

Sinopticul probelor pozitive la kitul BIO K 151 în cele două județe vestice la suine

Județ	Probe pozitive pentru											Negative	
	Nr. total probe	Crypto. Singur		Coronav. Singur	Rotav. Singur		E. Coli F5	Crypto. + Rotav.		Crypto. + Corona			
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
Arad	29	5	17,2	0	0	0	0	0	0	0	0	24	82,8
Timiș	104	27	26,2	0	12	11,6	0	4	3,9	1	0,9	60	58,2
Total (%)	133 (100)	32 (24)		0	12 (9)		0	4 (3)		1 (0,7)		84 (63,2)	

Legendă: *Crypto.* – *Cryptosporidium*; *Coronav.* – Coronavirusuri; *Rotav.* - Rotavirusuri ; *E.* – *Escherichia*

Pe ansamblu, studiul materiilor fecale prin tehnica ELISA, cu privire la ponderea agenților enteropatogeni implicați în producerea diareilor la suine în cele două județe vestice ale României, arată că:

- *Cryptosporidium spp.* a fost identificat la un număr de 36 probe din 133 analizate (32 de cazuri ca agent patogen unic și 4 cazuri asociat);
- coronavirusurile au fost întâlnite în fecalele unui singur porc din 133 examinate;
- rotavirusurile au fost găsite la 16 probe din 133 analizate (12 cazuri ca agent patogen unic și 4 cazuri asociat);
- *E. coli* F5 enteropatogen nu a fost identificat.

Acest studiu demonstrează că, *Cryptosporidium spp.* a fost cel mai prevalent agent enteropatogen (27,7 %) dintre cei investigați la suinele din cele două județe vestice ale României (fig. 11).

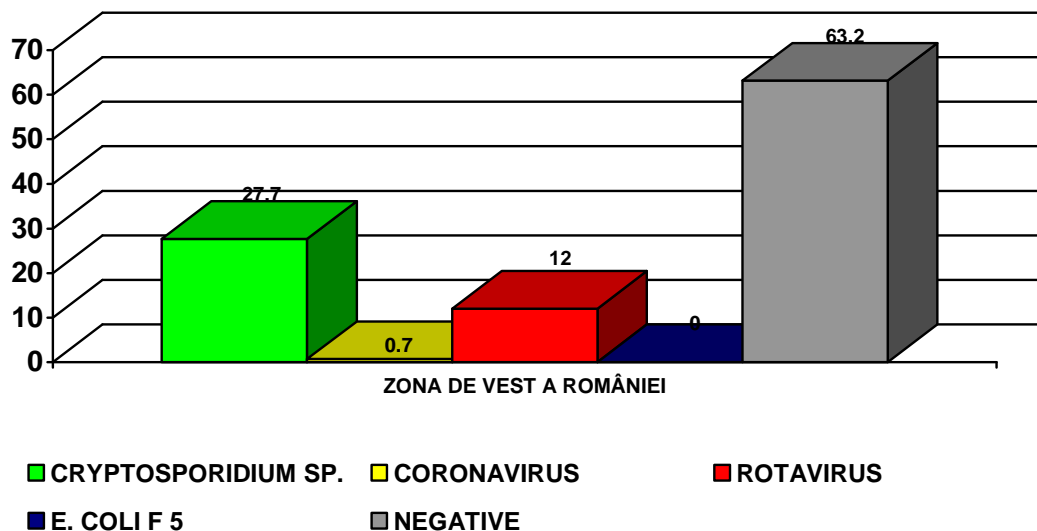


Fig. 11. Reprezentarea grafică a ponderii celor patru enteropatogeni la suine în două județe din partea de vest a României

Prin analiza literaturii de specialitate reiese că, spre deosebire de infecțiile experimentale, care produc simptome exprimate clinic, infecția naturală se pare că evoluează asimptomatic la suine [Katsuda și col., 2006]. În ciuda acestui fapt, investigațiile epidemiologice efectuate prin metode non-moleculare în diferite arii geografice relatează o prevalență destul de variabilă de la 0% până la 88%, sau chiar 100% în cazul unei exprimări cumulative a prevalenței din aria examinată (tabel 14).

Tabel 14

Relatări privind prevalența criptosporidiozei suine în câteva state ale lumii determinată prin metode non-moleculare [după Santin și col., 2007, modificat].

Țara	Nr. De probe Analizate/nr. de ferme	Vârsta	Prevalență (% pozitive)	Referenți
Australia	646/22	< 9 săptămâni	6	O'Donoghue și col., 1987
Canada	33/1	21 zile-6 luni	100 ^a	Guselle și col., 2003
Danemarca	504	1-4 luni	71	Maddox-Hyttel și col., 2006
Germania	287/24	1-42 zile	1,4	Wieler și col., 2001
Japonia	108	adulti	0	Koyama și col., 2005
Coreea	589/4	adulti	62	Yu Seo și col., 2004
Serbia	50	< 9 lună	32	Misic și col., 2003
Spania	329	<2 luni	3	Villacorta și col., 1991
Spania	16	1-2 luni	87,5	Quilez și col., 1996
Trinidad & Tobago	275	nespecificată	19.6	Kaminjolo și col., 1993
U.S.A. (California)	62	9 luni	3	Atwill și col., 1997
U.S.A. (Ohio)	176	5-8 săptămâni	8	Xiao și col., 1994
Vietnam	17	4-8 săptămâni	23.5	Koudela și col., 1986

Legendă: a-prevalență cumulativă;

Cele mai multe cazuri de infecții s-au înregistrat la categoria de vârstă cuprinsă între o lună și șase luni.

Comparativ cu aceste date prezentate în tabelul anterior, rezultatele obținute de noi prin testul imunoenzimatic ELISA evocă o prevalență a criptosporidiozei de 27,7 % (fig. 11).

În ceea ce privește evoluția criptosporidiozei împreună cu alți agenți infecțioși și parazitari în Japonia, Katsuda și col. (2006) au efectuat un studiu epidemiologic cu scopul de a determina prevalența infecției cu criptosporidii în asociere cu alți enteropatogeni la purceii sugari (1-21 zile) și înțărcați (23-35 zile) (25). Probele de fecale au fost colectate de la un total de 153 de purcei sugari și 116 purcei înțărcați din 14 ferme de producție. Pentru identificarea enteropatogenilor virali, bacterieni și parazitari s-a utilizat microscopia electronică și medii de culturi bacteriene. La purceii sugari, diareea a fost determinată în proporție de 60,8% de un singur agent patogen în timp ce infecțiile mixte au fost înregistrate în proporție de 22,2%. La purceii înțărcați, mono- și poliinfecția s-au înregistrat în proporție de 43,1%, respectiv 47,4%. Cei mai frecvenți enteropatogeni la cele două categorii de vârste au fost rotavirusurile în proporție de 67,3%, respectiv 65,5%. Coccidiile au fost puse în evidență cu preponderență la purceii sugari, în schimb la purceii înțărcați a predominat infecția cu tulpina *E. coli* enterotoxigenă (58,1%). Sub vârsta de 21 de zile nu au fost identificate infecții cu *C. parvum*. Cea mai mare prevalență s-a înregistrat între 29 și 32 de zile (28,3%). Rezultatele acestui studiu confirmă faptul că, sindromul de diaree neonatală la suinele din prima lună de viață reprezintă un exemplu de boală polifactorială, determinată de varietatea de virusuri, bacterii și paraziți protozoari. Suplimentar, aceste rezultate ne dau un răspuns la întrebarea: de ce acest sindrom este așa de dificil de controlat? [Katsuda și col., 2006].

Investigații asemănătoare au fost făcute și de către Wieler și col. (2001) care au examinat probe de fecale diareice de la 205 purcei sugari și de la 82 de purcei înțărcați distribuiți în 24 de ferme din sudul Germaniei [Wieler și col., 2001]. Dintre agenții parazitari, *Isoospora suis* a fost diagnosticat în proporție de 26,9% iar *C. parvum* doar într-un procentaj redus de 1,4%. Proporția animalelor reacționate pozitiv la infecția cu coronavirusuri a fost de 13,4% respectiv de 4% pentru rotavirusuri. S-a pus în evidență că, 17,6% dintre animalele examinate au fost infectate cu *E. coli* enterotoxigen. Aceste rezultate subliniază faptul că, în ciuda eforturilor igienice, tehnice și imune preventive efectuate în ultimii ani, agenții enteropatogeni sunt încă comuni în unitățile de producție la purcei în Germania [Wieler și col., 2001]. Aceste observații sunt valabile și pentru marile complexe industriale din partea de vest a României.

Concluzii

Investigațiile epidemiologice efectuate la suinele din două județe vestice ale României scot în evidență o prevalență de 27,7% pentru criptosporidioză, 12% pentru rotaviroză, 0,7% pentru coronaviroză respectiv 0% pentru colibaciloza suină determinată de *E. coli* F5 enteropatogen.

1.3. DETERMINAREA PREVALENȚEI CRIPTOSPORIDIOZEI PRIN ELISA LA ALTE SPECII DE ANIMALE

1.3.1. Studiu epidemiologic prin ELISA asupra parazitismului cu *Cryptosporidium* spp. la câine

Prima semnalare a bolii datează din 1981 când Tzipori și Campbell au detectat anticorpi de *Cryptosporidium* spp. în 16 din 20 de probe de ser canin. Doi ani mai târziu, Wilson și col. au raportat primul caz clinic de criptosporidioză canină la un cățel de o săptămână, suferind de diaree acută. Bazat pe abilitatea de a infecta oamenii și bovinele, dar incapacitatea acestuia de a determina infecție la șoarece, criptosporidiile identificate la câini au fost denumite *C. canis* [Fayer și col., 2001].

Investigații epidemiologice cu privire la prevalența criptosporidiozei canine au fost efectuate în mai multe regiuni ale lumii, dar și în țara noastră, unde nu a fost încă identificată. Câinii sunt considerați ca potențiale surse de infecție pentru om, iar infecții cu *C. canis* la oameni au fost confirmate în S.U.A., Peru, Thailanda și Marea Britanie [Fayer și Xiao, 2007; Gatei și col., 2002].

Având în vedere aceste două aspecte enumerate anterior am considerat oportună efectuarea unor investigații epidemiologice privind criptosporidioza canină în partea de vest a României.

Materiale și metodă

Investigațiile epidemiologice au fost efectuate în perioada august-octombrie 2007, pe un număr de 96 de câini de diferite vârste (două săptămâni-zece ani). Câinii au provenit din diferite medii (urban și rural) ale județelor: Arad, Bihor, Caraș-Severin, Hunedoara și Timiș (tabel 15). Materiile fecale diareice au fost recoltate de la câini cu sindrom de gastroenterită acută sau cronică și

prelucrate prin tehnica ELISA în decurs de 24 de ore de la recoltare în cadrul Laboratorului de Parazitologie și Boli Parazitare al Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara.

Tabel 15

Date epidemiologice cu privire la câinii de la care s-au prelevat probe de fecale

Numărul total de câini investigați	96 (din care 50 cu sindrom de gastroenterită)							
Vârsta câinilor	2 săptămâni - 1 an (n=39)				peste un an (n=57)			
Sexul	17 mascul		22 femel		30 mascul		27 femel	
Mediul de proveniență	8 rural	9 urban	12 rural	10 urban	15 rural	15 urban	20 rural	7 urban

Legendă n=în număr de...

S-a utilizat kit-ul **BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 070) (Bio-X Diagnostics, Belgia)** care este un kit de diagnostic antigenic „in vitro” a oochisturilor de *C. parvum* din fecale și respectă principiile tehnicii ELISA dublu – sandwich. Anticorpul legat la placă recunoaște și fixează antigenul din proba de cercetat. Acesta recunoaște și fixează un al doilea anticorp anti-antigen (preparat pe altă specie) care la rândul lui reacționează cu anticorpul anti al doilea anticorp cuplat cu enzima (conjugat imunoenzimatic). Prin descompunerea substratului specific se produce oxidarea unui cromogen ce își schimbă culoarea. Valorile densităților optice finale ale probelor de cercetat s-au obținut prin scăderea valorii densității optice a matorului negativ din valoarea densității optice a fiecărei probe obținută la citire. Limita inferioară a pozitivității pentru fiecare antigen este de 0,150 densitate optică finală. Probele care au o densitate mai mică decât valoarea menționată anterior sunt considerate negative. Pentru confirmare sau infirmare, fiecare probă examinată ELISA a fost prelucrată și prin colorare Ziehl-Neelsen modificat de Henriksen.

Rezultate și discuții

În urma prelucrării ELISA și Ziehl-Neelsen, modificat de Henriksen, a celor 96 de probe de fecale de la câini, nu s-au diagnosticat infecții cu *Cryptosporidium* spp. Acest aspect este unul interesant cu toate că, în majoritatea cazurilor, au existat condițiile necesare evoluției bolii. Printre aceste condiții se numără faptul că, 39 de câini (40,6 %) au avut o vârstă fragedă cu un sistem imun imatur iar sindromul de gastroenterită acută sau cronică a creat toate condițiile necesare imunosupresiei. La acestea se mai poate adăuga situația câinilor proveniți din mediul rural sau Casa Câinelui Timișoara, unde condițiile igienice precare și alți factori declanșatori ai criptosporidiozei au fost prezenți.

O situație identică cu a noastră a fost semnalată în Australia unde Bugg și col. (1999) au examinat fecalele a 421 de câini [Bugg și col., 1999]. Prevalența de 0 % a fost găsită și în Germania unde Epe și col (2004) au făcut investigații la un număr de 1281 de câini [15]. Același rezultat a fost obținut și de către Simpson și col. (1988) în Scoția la 101 de câini respectiv de Pohjola și col. (1984) în Finlanda la 57 de câini [Pohjola, 1984; Simpson 1988].

Pe plan mondial, prin efectuarea unor metode microscopice, prevalența criptosporidiozei variază de la 0,23% până la 40 %. Printre țările în care a fost diagnosticată se numără: Argentina (0,23%), Australia (11%), Brazilia (40%), Cehia (4,6%), Coreea (9,7%), Egipt (3,8%), Germania (0,4%), India (8,53%), Spania (7,4%), Statele Unite ale Americii (2%) și Ungaria (8,3%) [Abou-Eisha și col., 1995; Causapé și col., 1996; Cirak și Bauer, 2004; Ederli și col., 2005; El-Ahraf și col., 1991; Fontanarossa și col., 2006; Johnston și Gasser, 1993; Kim și col., 1998; Kumar și col., 2004; Nagy, 1996; Svoboda și col., 1994].

Concluzii

Prin examenul ELISA și Ziehl-Neelsen, modificat de Henriksen, a celor 96 de probe de fecale de la câini nu s-au identificat infecții cu *Cryptosporidium* spp.

1.3.2. Studiu epidemiologic prin ELISA asupra parazitismului cu criptosporidii la păsări

Criptosporidioza este una dintre cele mai „prevalente” infecții parazitare întâlnite la păsările domestice, sălbatice și la cele de colivie. Infecții cu criptosporidii au fost raportate la păsări aparținând ordinelor: *Anseriformes*, *Charadriiformes*, *Columbiformes*, *Galliformes*, *Passeriformes*, *Psittaciformes* și *Struthiniformes* [Sreter și Varga, 1999].

Chiar dacă au fost descoperite infecții la peste 30 de specii de păsări, doar trei specii aviare de criptosporidii au fost denumite: *C. meleagridis*, *C. baileyi* și *C. galli* [Morgan și col., 2001].

Cryptosporidium meleagridis a fost pus în evidență la nivelul epitelului intestinului subțire (porțiunea duodenală și jejunală). *C. baileyi* este, probabil, cea mai comună specie de criptosporidie la păsări fiind diagnosticată atât în colon, cloacă și bursa Fabricius, cât și în multe locuri ale aparatului respirator. Pe lângă speciile menționate anterior, *C. galli* parazitează celulele epiteliale ale proventriculului, nu și tractul aparatului respirator sau al intestinului subțire și gros [Egyed și col., 2002].

La începutul anilor '90 se credea că infecția cu criptosporidii la păsări este slab răspândită dar, datele epidemiologice existente până în prezent, ne îndreptășesc să afirmăm că boala este larg răspândită în toate zonele lumii și la cele mai diverse specii.

Având în vedere aceste considerente am considerat oportună efectuarea unor investigații epidemiologice privind criptosporidioza la păsări în câteva ferme de pui broiler din partea de vest a României.

Materiale și metode

Investigațiile epidemiologice au fost efectuate în perioada iulie-decembrie 2008 pe un efectiv de 120 de pui broiler în primele șapte săptămâni de viață din patru localități ale județelor Hunedoara, Satu Mare și Timiș. Păsările au fost întreținute în sistem intensiv (localitățile: Satu-Mare, Giarmata și Deva) și extensiv (Conacul Iosif). Materiile fecale au fost recoltate individual, depozitate în coprocultoare sterile la o temperatură de 4°C și prelucrate în decurs de 24 de ore.

Probele au fost examinate prin tehnica ELISA în cadrul Laboratorului de Parazitologie și Boli Parazitare al Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara. S-a utilizat kit-ul **BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 070) (Bio-X Diagnostics, Belgia)** care este un kit de diagnostic antigenic „in vitro” din fecale de păsări și mamifere și respectă principiile tehnicii ELISA dublu – sandwich [Bio K 070 prospect]. Pentru confirmare sau infirmare fiecare probă examinată ELISA a fost prelucrată și prin colorare Ziehl-Neelsen modificat de Henriksen.

Rezultate și discuții

În urma prelucrării ELISA și Ziehl-Neelsen modificat de Henriksen a celor 120 de probe de fecale de pui broiler, din patru localități ale județelor Hunedoara, Satu-Mare și Timiș, nu s-au diagnosticat infecții cu *Cryptosporidium* spp (tabel 16).

Această constatare este una interesantă, având în vedere numărul relativ mare de probe prelucrate (184) și situația prevalenței pe plan mondial. Datele din literatura de referință evocă o prevalență de la 6% până la 88%. Printre țările în care s-a semnalat boala se numără: Australia, Argentina, Canada, China, Coreea de Sud, Danemarca, Egipt, Germania, Grecia, Japonia, Olanda, Republica Cehă, România, Scoția, Spania, Africa de Sud, Taiwan, Turcia, Ungaria și S.U.A. [Dărăbuș, 1996; Egyed și col., 2002; Lindsay și col., 1990; Morgan și col., 2001; Morgan și col., 2000; Ryan și Xiao, 2007].

Tabel 16

Localitatea	Nr. Probe examinate	<i>Cryptosporidium</i> spp.
Satu Mare	60	Neidentificat
Giarmata	10	Neidentificat
Deva	30	Neidentificat
Conacul Iosif	10	Neidentificat
Total	120	Neidentificat

Neidentificarea protozoarului *Cryptosporidium* spp. s-ar putea explica și prin faptul că, testele serologice la păsări demonstrează, ca și la mamifere, o incidență mult mai ridicată decât în cazul examenelor coprologice, iar în cazul nostru testul ELISA identifică coproantigeni și nu anticorpi. În ciuda acestor rezultate se constată o diferență enormă între prevalența obținută de noi (0%) și cea

determinată de Dărăbuș și col. (1996) în urma investigațiilor epidemiologice efectuate în câteva ferme din vestul României în deceniul trecut. Ei au examinat un număr de 1248 de probe și au obținut o prevalență de 27,6 % [Dărăbuș, 1996].

Un alt factor care intervine în sprijinul rezultatelor obținute de noi ar fi biosecuritatea și condițiile de creștere și întreținere excelente în fermele în care am efectuat investigații. Conform unor relatări din literatura de specialitate starea de sănătate și statusul imun sunt factori esențiali care pot determina prezența sau absența bolii într-o unitate [Dărăbuș, 1996; Ryan și Xiao, 2007; Morgan și col., 2001].

Concluzii

Prin examenul ELISA și Ziehl-Neelsen modificat de Henriksen a celor 120 de probe de fecale de pui broiler nu s-au identificat infecții cu *Cryptosporidium* spp.

1.3.3. Studiu epidemiologic prin ELISA asupra parazitismului cu *Cryptosporidium* spp. la miei

Criptosporidioza ovină a fost descrisă pentru prima oară la miei cu diaree în Australia de către Baker și Carbonell în 1974. Mai mulți autori l-au raportat ca principal enteropatogen la această specie cu un procent crescut de morbiditate și mortalitate în efectivele în care evoluează. Pierderile economice se reflectă nu numai prin mortalitate și morbiditate crescută, ci și prin reducerea sporului în greutate, asistență veterinară și alte investigații suplimentare de laborator.

Larga răspândire a criptosporidiilor la miei este demonstrată printr-o serie de investigații epidemiologice efectuate prin metode microscopice și de biologie moleculară. Pe plan național criptosporidioza ovină a fost investigată în mai multe zone, în special în partea centrală a Ardealului, dar nu și în zona de vest a României. Interacțiunea criptosporidiilor cu alți enteropatogeni precum și poderea acestora în etiologia polifactorială a diareii la miei nou născuți sunt două motive pentru inițierea unor cercetări în acest domeniu.

Luând în considerare cele expuse mai sus, prezenta investigație își propune să aducă date noi fundamentate științific în cunoașterea epidemiologiei criptosporidiozei mieilor în zona de vest a României.

Materiale și metode

Investigațiile epidemiologice au fost efectuate în perioada ianuarie-aprilie 2008, pe un efectiv de 66 de miei în primele trei săptămâni de viață cu proveniență din cinci localități a patru județe vestice (Arad, Bihor, Satu-Mare și Timiș) ale țării. Pentru fiecare miel investigat s-a întocmit o fișă individuală care cuprindea: numărul matricol (la cele existente), vârstă și sex.

Materiile fecale diareice au fost recoltate individual direct din rect, depozitate în coprocultoare și examinate pentru cei patru enteropatogeni vizați: *Cryptosporidium*, rotavirusuri, coronavirusuri și *E. coli* F5. Examinarea probelor s-a făcut prin tehnica ELISA utilizând kit-ul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151) (Bio-X Diagnostics, Belgia) care este un kit de diagnostic antigenic „in vitro” din fecale și care respectă principiile tehnicii ELISA „dublu – sandwich”.

Rezultate și discuții

Rezultatele investigațiilor epidemiologice efectuate la tineretul ovin în câteva localități din patru județe vestice ale țării sunt prezentate în tabelul de mai jos.

Tabel 17

Localitatea	Nr. Probe	Probe pozitive pentru				Negative
		Rotavirus	Coronavirus	<i>E. coli</i> F5	<i>Cryptosporidium</i> spp.	
Iecea Mică	20	1	0	0	0	19
Finiș	8	1	0	0	0	7
Arad	8	0	0	0	2	6
Bazoșu Nou	18	2	0	0	1	15
Timișoara SDE	12	1	0	1	3	7
Total	66	5	0	1	6	54

În localitatea lecea Mică (județul Satu Mare) o probă din 20 prelucrate a fost pozitivă pentru infecția cu rotavirusuri. Nu s-au identificat infecții cu *Cryptosporidium* spp.

În localitatea Finiș (județul Bihor) o probă din opt analizate a fost pozitivă la infecția cu rotavirusuri. Nu s-au identificat infecții cu *Cryptosporidium* spp.

În localitatea Arad (județul Arad) două probe din opt prelucrate au fost pozitive pentru infecția cu *Cryptosporidium* spp.

În localitatea Bazoșu-Nou (județul Timiș) într-o singură probă din 20 analizate s-au diagnosticat oochisturi de *Cryptosporidium* spp. Alte două probe au fost pozitive pentru infecția cu rotavirusuri.

În Stațiunea Didactică și Experimentală Timișoara (județul Timiș) în trei probe din 12 prelucrate s-au evidențiat coproantigene de *Cryptosporidium* spp. În alte două probe s-au diagnosticat rotavirusuri respectiv infecții cu *E. coli* F5.

În niciuna din fermele luate în studiu, coronavirusurile nu a fost identificate, ca fiind implicate în producerea diareei la tineretul ovin.

Studiul materiilor fecale prin tehnica ELISA, privind ponderea agenților enteropatogeni implicați în producerea diareilor la tineretul ovin, arată că:

- *Cryptosporidium* spp. a fost identificat la un număr de șase probe din 66 analizate neasociat cu alți enteropatogeni investigați
- rotavirusurile au fost întâlnite în cinci probe din 66 analizate, în toate cazurile ca unici agenți patogeni;
- *E. coli* F5 a fost diagnosticat într-o singură probă din 66 analizate.

Rezultatele anchetei epidemiologice, privind modul în care vârsta influențează extensivitatea infecției cu enteropatogeni la tineretul ovin arată că trei cazuri au fost diagnosticate la categoria de 0-7 zile și alte trei cazuri la categoria de 7-14 zile. Din cele cinci cazuri de rotaviroză două au evoluat în prima săptămână de viață, unul în a doua săptămână și celelate două la categoria de 14-21 de zile. Colibaciloza, identificată într-un singur caz, a fost semnalată la un miel în vârstă de patru zile.

Pe ansamblu, prevalența infecției criptosporidiene la tineretul ovin investigat a fost de 9,09 % cu variații între cele cinci localități în care s-au făcut investigații de la 0 % la 25 %.

În tabelul de mai jos sunt prezentate, ca și termeni de comparație, rezultatele mai multor studii epidemiologice "non - moleculare" asupra prevalenței criptosporidiozei ovine efectuate în diferite arii geografice.

Tabel 18

Prevalența criptosporidiozei la miei determinat prin metode microscopice în diferite arii geografice [după Santín și Trout, 2007, modificat].

Țara	Nr. de animale	Prevalența (% pozitive)	Referenți
Egypt	120 miei	36-82 %	Abd-El-Wahed și col. 1999
Marea Britanie	90 miei	53-74 % ^a	Chalmers și col., 2005
Marea Britanie	255 miei	12,9 %	Sturdee și col., 2003
Mexic	556 miei	33,5 %	Alonso-Fresan și col., 2005
Polonia	60 miei	18,3 %	Majewska și col., 2000
Serbia	126 miei	42,1 %	Mišič și col., 2006
Spania	583 miei	59 %	Causapé și col., 2002
Spania	69 miei	1,45 %	Villacorta și col., 1991
S.U.A.	32 miei	84,4 %	Xiao și col., 1993
S.U.A.	31 miei	77,4 %	Santín și col., 2007
Trinidad și Tobago	90 miei	20 %	Kaminjolo și col., 1993
Ungaria	53 miei	22,6 %	Nagy, 1995

Proporția criptosporidiozei la miei, prezentată în acest studiu (9,09 %), se înscrie în limite foarte variabile întâlnite, de altfel, în toată Europa și, în general în lume. În acest sens, procente mai apropiate privind criptosporidioza la miei sunt relatate în Marea Britanie (12,9 %) [Sturdee și col., 2000], Polonia (18,3 %) [Majewska și col., 2000], Trinidad și Tobago (20 %) [Kaminjolo și col., 1993] și Ungaria (22 %) [Nagy și col., 1995]. Prevalențe mult mai mari comparativ cu cele obținute în acest studiu au fost raportate în Serbia (42,1 %) [Mišič și col., 2006], Spania (59 %) [Villacorta și col., 1991] și S.U.A. (84,4 %) [Xiao și col., 1993].

Concluzii

- ❖ Prevalența infecției criptosporidiene la tineretul ovin investigat a fost de 9,09 %.
- ❖ Prevalența infecției cu rotavirusuri la tineretul ovin investigat a fost de 7,57 %.
- ❖ Prevalența infecției cu rotavirusuri la mieii investigați a fost de 1,51 %.
- ❖ Nu s-au diagnosticat infecții cu coronavirusuri sau asociații între enteropatogeni.

CAP II. IDENTIFICAREA SPECIILOR DE CRIPTOSPORIDII, PRECUM ȘI A SURSELOR ȘI PRINCIPALELOR CĂI DE INFECȚIE LA DIFERITE SPECII DE ANIMALE

II. A. EXAMENE COPROSCOPICE ȘI DETERMINĂRI MORFOMETRICE AVÂND CA REZULTAT IDENTIFICAREA SPECIILOR DE CRIPTOSPORIDII

Implicațiile criptosporidiilor în etiologia unor tulburări digestive grave la tineretul bovin în primele luni de viață și încadrarea bolii în categoria zoonozelor face ca, în ultimul timp, să apară tot mai multe studii în acest domeniu [Santín și Ryan, 2007].

La ora actuală sunt acceptate ca specii valide 17 specii de criptosporidii, dintre care patru: *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* și *C. ryanae* parazitează la bovine [Fayer, 2007]. Principala deosebire dintre cele trei specii și *C. andersoni* este faptul că, oochisturile celor trei specii sunt mai reduse ca dimensiune și parazitează la nivelul vilozităților intestinului subțire, determinând afecțiuni intestinale la numeroase specii gazdă. Specia *C. andersoni* parazitează în abomasul vițelilor și produce oochisturi morfologic asemănătoare cu cele produse de *C. muris*, dar mai reduse în dimensiune. În urma efectuării unor experimente de transmitere încrucișată interspecifică, oochisturile de *C. andersoni*, spre deosebire de *C. parvum*, nu s-au dovedit a fi infectante pentru șoarecii imunodeficienți, imunocompetenți sau consangvini, dar nici pentru găini sau capre. De multe ori, relațiile privind identificarea unor specii sunt contradictorii. Una sau mai multe caracteristici ale aceleași specii pot fi diferite pentru izolatele de criptosporidii recoltate din zone diferite [Lindsay și col., 2000].

Chiar dacă oochisturile multor specii de criptosporidii sunt morfologic similare, măsurătorile exacte pot juca un rol deosebit de important în diferențierea speciilor. De exemplu, speciile de la păsări și reptile pot fi ușor diferențiate pe baza mărimii și formei oochisturilor sau, în cazul speciilor intestinale la mamifere, se pot pune în evidență diferențe morfologice mai mult sau mai puțin semnificative. De aceea, descrierea fiecărei specii trebuie acompaniată de o serie de măsurători morfologice asupra unei populații de oochisturi, completate cu anumiți parametri biostatistici cum ar fi: deviația standard sau alte limite de certitudine cunoscute a măsurătorilor ca: lungimea, lățimea sau indicele de formă (raportul lungime/lățime) [Xiao și col., 2004].

Materiale și metode

Identificarea oochisturilor de criptosporidii, de la vițelii cu vârsta cuprinsă între patru zile și cinci luni, s-a făcut în patru ferme cu creștere intensivă și într-o microfermă cu creștere extensivă, în perioada iunie – septembrie 2007. Pentru aceasta au fost recoltate probe diareice de la un efectiv de 29 de vițelii cu criptosporidioză direct din rect. Punerea în evidență a oochisturilor s-a făcut prin examenul microscopic al preparatelor native examinându-se zece oochisturi de la fiecare animal în parte. Oochisturile identificate au fost apreciate privind forma, lungimea, lățimea și indicele de formă.

Forma oochisturilor a fost determinată prin examenul microscopic al preparatelor native; lungimea și lățimea lor au fost măsurate prin utilizarea microscopului Motic cu extensie video, iar indicele de formă s-a obținut prin raportarea lungimii la lățime.

Rezultate și discuții

Prin examenul microscopic al preparatelor native, în 28 din 29 de probe analizate în cele cinci ferme luate în studiu, oochisturile au avut formă ovoidă sau sferică. Ele apar ca formațiuni ovalare sau sferice strălucitoare, cu o tentă roz, cu una sau două puncte de culoare neagră în interior. La unele oochisturi se pot observa linii de sutură, de forme variate, care reprezintă locul de rupere al peretelui oochistului. Aici trebuie precizat faptul că, în cadrul fiecărui preparat nativ s-au regăsit ambele forme.

Într-unul dintre preparate, oochisturile au avut formă eliptică, în rest prezentau aceleași caracteristici ca și cele de formă ovală sau sferică.

Analizând caracteristicile morfologice ale oochisturilor în cele cinci ferme, lungimea acestora a variat în medie între 4,20 μm și 4,80 μm , cu o singură excepție când oochisturile aveau o lungime medie de 6,10 μm . Lățimea oochisturilor a variat în medie între 3,71 μm și 4,60 μm (tabel 19).

În 28 de preparate, din cele cinci ferme, indicele de formă a variat de la 1,09 la 1,17, putându-se observa o oarecare omogenitate față de proba din microferma de la Nădlac în care, oochisturile aveau un indice de formă egal cu 1,30 (tabel 19).

Pe baza măsurătorilor efectuate asupra oochisturilor de criptosporidii din fecalele de vițel se poate spune că, în 28 de probe a fost identificat un parazitism cu specia *Cryptosporidium parvum*. Dimensiunile găsite de noi 4,04 X 4,54 μm (3,71 - 4,30 X 4,20 - 4,80 μm) și un indice de formă de 1,12 (1,09 - 1,17) se aseamănă foarte mult cu dimensiunile standard ale speciei *Cryptosporidium parvum* descrisă în literatura de specialitate: 4,5 – 5 μm (4,2 – 5 X 4,5 - 5 μm) și un indice de formă de 1,15 μm [Fayer, 2007].

Tabel 19

Parametri biostatistici ale oochisturilor de criptosporidii

Ferma	Nr. probe	Forma oochist	Lungimea (μm)		Lățimea (μm)		Indicele de formă	Dev. st.
			extreme	media	extreme	media		
Utvișiș	7	ovoid sferic	3,6-5,2	4,60	3,2-5,0	4,30	1.10	0,40351
Zimandu Nou	5	ovoid sferic	3,8-5,0	4,40	3,8-4,6	4,03	1.09	0,37789
Fântănele	10	ovoid sferic	4,0-5,4	4,70	3,2-4,8	4,08	1.15	0,32567
Curtici	5	ovoid sferic	4,2-5,6	4,80	3,2-5,4	4,10	1.17	0,29002
Nădlac	1	elipsoid	5,0-7,6	6,10	4,2-5,8	4,60	1,32	0,30012
	1	ovoid sferic	3,9-4,6	4,20	3,6-4,0	3,71	1,13	0,27459

Forma eliptică, indicele de formă egală cu 1,32 și dimensiunile oochisturilor de: 4,60 – 6,10 μm (4,2-5,8 X 5,0 – 7,6 μm) găsite într-o probă din microferma de la Nădlac, se aseamănă destul de mult cu dimensiunile speciei *Cryptosporidium andersoni* descrisă de Lindsay și colaboratorii. Această specie are dimensiuni standard de 5,5 – 7,4 μm (6,0-8,1 X 5,0 – 6,5 μm) și un indice de formă egală cu 1,35 [Fayer, 2007; Xiao 2004].

Luând în considerare cele prezentate anterior cu referire la dimensiunile oochisturilor, trebuie să ținem cont de faptul că, în preparatul nativ ele apar mai mari decât în cele obținute prin colorare sau flotație [Dărăbuș, 1996].

Diferențele ar putea fi datorate faptului că, în preparatele native, măsurarea se realizează mai dificil, oochisturile putând fi acoperite de diferite particule ce se găsesc în fecale. De asemenea, imperfecțiunea metodei este dată și de faptul că, prin etalare, paraziții își pot modifica forma. Ei sunt găsiți la diferite nivele în preparat, lucru ce poate falsifica corectitudinea măsurătorilor.

Întotdeauna, datele privind forma criptosporidiilor trebuie coroborate și cu alte criterii [Xiao, 2004]. Ca să ne putem pronunța cu certitudine că într-adevăr este vorba despre un parazitism cu *C. parvum* sau *C. andersoni* va trebui să efectuăm și alte experimente cum ar fi transmiterea încrucișată sau caracterizarea oochisturilor din punct de vedere molecular. Aceste două investigații urmează să fie efectuate într-un capitol ulterior.

Concluzii

- În preparatele native, oochisturile de criptosporidii au un aspect caracteristic prin care pot fi deosebite de alte forme parazitare cu dimensiuni și forme apropiate, sau de alți agenți patogeni.
- Aspectul oochisturilor în preparatele native poate reprezenta un criteriu de identificare a lor, refringența fiind specifică. De asemenea, caracteristice sunt punctul negru situat în masa internă și liniile de sutură identificabile la foarte multe oochisturi.
- În 28 din 29 de probe analizate, pe baza criteriilor morfologice, am identificat parazitism cu *C. parvum*.

- o Într-o probă a fost găsită specia *C. andersoni*.

II. B. IDENTIFICAREA SURSELOR ȘI CĂILOR DE INFECȚIE ÎN CONDIȚII NATURALE ȘI EXPERIMENTALE

Criptosporidiile fac parte din categoria paraziților cu o largă răspândire geografică, putând infecta cele mai diverse specii de vertebrate. Sursele de infecție sunt foarte variate începând cu animalele tinere, care prin numărul mare de oochisturi excretate reprezintă o sursă de bază pentru infecția criptosporidiană, și până la animalele adulte care deseori sunt purtători asimptomatici făcând forme subclinice și care scapă examenului parazitologic [Fayer, 2007; Thompson, 2003].

La viței sursa principală este reprezentată de transmiterea intraspecifică. Materiile fecale prin care sunt eliminate oochisturile în mediul extern contaminatează adăposturile, pășunile și în general mediul înconjurător. Rezistența oochisturilor la acțiunea factorilor de mediu și ușurința cu care acestea sunt transportate de diferiți vectori animați și neanimați determină răspândirea și menținerea bolii în efectivele de bovine. Prezența animalelor adulte asimptomatice care elimină prin fecale oochisturi infectante este un alt factor de risc la bovine, dar nu numai [Fayer, 2007; Thompson, 2003; Dărăbuș, 1996].

Nu de puține ori, eliminarea oochisturilor în mediul extern este urmată de vehicularea și dispersarea acestora prin vectori animați și neanimați. De multe ori, prezența în ferme a rozătoarelor dăunătoare cum ar fi șoarecii și șobolanii, constituie o sursă de infecție. Deși se cunoaște că, sursele de infecție pot fi și de natură interspecifică, acest lucru însă trebuie privit cu prudență [Dărăbuș, 1996].

În cadrul acestor activități s-a urmărit: determinarea rolului pe care îl au în criptosporidioză, ca sursă de infecție, animalele bolnave și cele purtătoare asimptomatice, din aceeași specie sau aparținând altor specii, depistarea altor surse de infecție și experimentarea unor căi de infecție.

Materiale și metode

Pentru determinarea importanței pe care îl au în criptosporidioză, ca sursă de infecție, animalele bolnave, într-o boxă cu șase viței în primele două săptămâni de viață clinic sănătoși și coproscopic neexcretori de criptosporidii au fost introduși doi viței infectați experimental cu *C. parvum*, cu diaree și excretori de oochisturi. S-a urmărit momentul apariției diareei, a oochisturilor în fecale, intensitatea infecției și perioada patentă. Pentru ierarhizarea importanței surselor de infecție criptosporidiană la specia taurină, au fost examinate parazitologic: fecale recoltate de la viței și vaci, probe recoltate prin spălarea ugerului, probe de păr murdărit de fecale, probe de apă, furaj și așternut.

Pentru identificarea oochisturilor în fecale s-a utilizat metoda de flotație cu zaharoză. Probele de păr recoltate din zonele cunoscute a fi predispuse a fi supte de congeneri, probele de așternut au fost amestecate cu apă în proporție de 1/10. Atât aceste probe cât și cele de apă și probele obținute prin spălarea ugerului au fost prelucrate după următorul protocol: 1. strecurarea prin sită metalică; 2. trecerea lichidului obținut prin hârtie de filtru; 3. spălarea hârtiei de filtru în 10 ml PBS; 4. centrifugarea timp de 5 minute la 2000 turații/minut; 5. Flotarea cu soluție de zaharoză a sedimentului, recuperarea inelului superior cu ajutorul unei anse și examinarea la microscop între lamă și lamelă.

Rolul pe care îl are *infecția interspecifică* în criptosporidioză s-a căutat să fie elucidat prin experimente de transmitere a criptosporidiilor izolate de la viței la mai multe specii de animale. Inoculul a fost obținut din fecalele recoltate de la doi viței cu vârstă de 14 zile. S-a respectat un protocol de purificare și izolare a oochisturilor, iar în momentul utilizării numărul oochisturilor a fost determinat cu o cameră Thoma. Inocularea criptosporidiilor izolate de la viței s-a realizat pe cale orală la viței (în vârstă de 3-10 zile), miei (3-7 zile) și șobolani (7 zile). Din două în două zile s-a monitorizat excreția de oochisturi prin examen coprologic (metoda examinării directe în preparatul nativ respectiv metoda colorării Ziehl-Neelsen modificată de Henriksen).

În mod experimental au fost verificate mai multe **căi de infecție** cu criptosporidii la șobolani. S-a utilizat ca specie infectantă *Cryptosporidium* spp.. Câte 14 șobolani în vârstă de 7-10 zile, au fost inoculați oral, intrarectal, intranasal cu 10^3 oochisturi. Pentru un grup asemănător, oochisturile au fost răspândite în cutia în care erau adăpostiți (neselectiv), iar un lot a reprezentat martorul neinoculat. Câte 9 din șobolanii fiecărui lot au fost urmăriți coproscopic, pe toată perioada experimentului (10 zile), monitorizându-se excreția de oochisturi prin fecale.

Rezultate și discuții

La patru zile după ce într-o boxă cu viței clinic sănătoși și coproscopic negativi, au fost introduși doi viței excretori de criptosporidii ca urmare a infecției experimentale, patru din ei au eliminat oochisturi prin fecale, din care, doi aveau și diaree. La șase zile, toți cei șase viței au fost excretori și trei prezentau diaree. Pe ansamblu toți vițeii s-au infectat cu criptosporidii dar intensitatea infecției și durata excreției de oochisturi a variat de la individ la individ. Perioada prepatentă a variat de la patru la șase zile iar cea patentă de la patru la opt zile. Unii dintre viței au prezentat o excreție redusă de oochisturi și cu intermitență.

Rezultă că *vițeii bolnavi și excretori* pot reprezenta o sursă importantă de infecție pentru congengeri, dar un rol în evoluția criptosporidiozei îl are și caracterul individual și/sau întâmplarea în achiziționarea de oochisturi. Infecția a fost exprimată clinic doar la trei din cei șase viței. Deci se poate concluziona că, transmiterea intraspecifică prin viței excretori este o modalitate de bază de transmitere și menținere a criptosporidiozei într-o fermă.

Identificarea criptosporidiilor și în *fecalele vacilor*, indică potențialul pe care îl are în transmiterea bolii această categorie de vârstă. Totuși faptul că parazitul a fost identificat doar la vacile din maternitate semnifică fie că s-au infectat ca urmare a unui mediu puternic contaminat, fie că a intervenit fenomenul de „periparturient rise”.

Pe baza unui număr relativ mare de probe pozitive, 10 din 29 (34,5%), din totalul celor examinate, obținute prin spălarea *ugerului vacilor* din maternități, se poate afirma că alimentația naturală a vițeilor, prin supt la mamele lor, reprezintă o modalitate importantă de infecție.

Prezența criptosporidiilor pe *firele de păr* ale vițeilor, 6 din 30 (20%), denotă că aceștia se pot infecta prin lingerea sau sugerea anumitor regiuni corporale ale congengerilor.

Din totalul de 20 probe de apă recoltate 10% au fost contaminate cu oochisturi de *Cryptosporidium* spp. Acestea s-au contaminat fie cu oochisturi de pe botul vițeilor, fie prin defecările întâmplătoare în adăpători. Deci și apa poate reprezenta o sursă de infecție.

Probele de așternut, din adăposturile pentru viței, recoltate și examinate au demonstrat un procent ridicat, de 20 din 30 de probe (66,6%), de contaminare.

Pe baza experimentului și a cercetării epidemiologice efectuate, se poate conchide că sursele de infecție în criptosporidioză, la viței, pot fi reprezentate de: bolnavi și excretori asimptomatici; de vacile mame prin excreția de oochisturi și prin supt; apă și nu în ultimul rând, de așternut.

Prin infecții experimentale s-a demonstrat că oochisturile de criptosporidii, izolate de la viței, sunt infectante pentru viței și încă două specii de mamifere: miei și șobolani. Infecția la mamiferele luate în experiment a reușit în proporție de 100% fiind de o intensitate crescută cu o perioadă prepatentă scurtă și una patentă lungă. Pe baza acestor considerente se poate spune că ovinele și șobolanii prezintă o receptivitate crescută față de infecția cu criptosporidii de origine taurină. De asemenea reiese rolul important, în epidemiologia criptosporidiozei la mamifere, a taurinelor, ovinelor și șobolanilor.

Cu privire la căile de infecție infecția experimentală cu *Cryptosporidium* spp. la șobolani, a reușit când administrarea s-a realizat pe cale orală, intranasală, intrarectală cât și neselectiv. Spre deosebire de infecția pe cale orală și intrarectală, atunci când inocularea a avut loc intranasal sau administrarea a fost neselectivă, intensitatea infecției a fost redusă și de scurtă durată. Aceasta demonstrează că, toate aceste căi, pot fi luate în considerare și în cazul infecției naturale. Reușita infecției intrarectale sugerează că dechistarea oochisturilor poate avea loc și prin absența sucului gastric.

Tabel 20

Infecția experimentală cu *Cryptosporidium* spp. pe diferite căi la șobolani

Calea de administrare	Nr. Șobolani	Ziua post-inoculare									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Per os	9	-	-	-	+	+++	++	+	+	-	-
Intra-rectal	9	-	-	-	+	+++	++	+	+	-	-
Intra-nazal	9	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Neselectiv*	9	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Martor	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legendă: *-oochisturi distribuite pe așternut; - negativi; +<oochist/câmp; + 1-5; ++ 6-10; +++ >10;

Concluzii

- Prin infecții experimentale, pe viței convenționali, s-a demonstrat rolul pe care îl au excretorii de criptosporidii ca sursă de infecție pentru congeneri. Evoluția infecției este influențată de individ și probabil, de doza de oochisturi pe care întâmplător o ingeră.
- Prezența criptosporidiilor doar la vacile din maternități sugerează existența unui fenomen de "periparturient rise" sau de o infecție generată de un mediu puternic contaminat cu oochisturi.
- Prin examene microscopice au fost depistate, ca surse potențiale de infecție pentru viței așternutul și apa. Un rol important în infecția criptosporidiană a vițeilor îl pot avea alimentația naturală prin supt la amele lor sau la doici, precum și ticul suptului.
- Oochisturile de *Cryptosporidium* spp., izolate de la viței, sunt infectante pentru alte două specii: ovine și șobolani.
- Infecția experimentală cu *Cryptosporidium* spp., la șobolani a reușit atunci când, oochisturile au fost administrate oral, intrarectal, intranazal și neselectiv.

II. C. EXAMENE COPROSCOPICE CANTITATIVE ȘI CALITATIVE ÎMBINATE CU CELE CLINICE ȘI NECROPSICE

Materiale și metodă

În continuarea experimentului anterior câte cinci din șobolanii fiecărui lot, inclusiv a celui martor, la cinci zile post-infecție, au fost necropsiați după omorâre prin narcoză cu cloroform. Tubul digestiv a fost deschis pe toată lungimea lui, de la stomac la rect, și spălat cu ser fiziologic. Din fiecare segment al tubului digestiv s-au efectuat raclarea de mucoasă, etalarea de frotiuri și colorarea prin metoda Ziehl-Neelsen modificată de Henriksen.

Rezultate și discuții

La șobolani localizarea criptosporidiilor în tubul digestiv a variat cu calea de infecție. Inocularea per os a dus la colonizarea intestinului de la jejun la colon iar când infecția s-a realizat intrarectal au fost colonizate ileonul, cecul colonul și rectul. Doar ileonul și cecul au fost cuprinse de infecție când oochisturile au fost cuprinse neselectiv sau pe cale intranazală (Tabel 21).

Tabel 21

Distribuția criptosporidiilor la șobolani în funcție de calea de inoculare

Raclat de mucoasă	Calea de infecție				
	Per os	Intra-rectal	Intra-nazal	neselectiv	martor
Stomac	-	-	-	-	-
Duoden	-	-	-	-	-
Jejun	+	-	-	-	-
Ileon	++	+++	+	+	-
Cec	+	+	+	+	-
Colon	+	+	-	-	-
Rect	-	+	-	-	-
Trahee	-	-	-	-	-

Legendă: + 1-5; ++ 6-10; +++ >10;

Concluzii

- ❖ Infecția experimentală cu *Cryptosporidium* spp. la șobolani, a reușit atunci când oochisturile au fost administrate oral, intrarectal, intranazal și neselectiv. Intensitatea infecției este mai ridicată în cazul primelor două căi de inoculare. Inocularea criptosporidiilor per os, la șobolani, duce la colonizarea intestinului de la jejun la colon, cu intensități variabile. Când infecția s-a realizat intrarectal, criptosporidiile au fost găsite

în ileon, cec, colon și rect. Doar ileonul și cecul au fost colonizate în cazul distribuirii neselective sau intranazale a criptosporidiilor.

- ❖ Rezultatele obținute în infecțiile experimentale cu *Cryptosporidium* spp. pe șobolani demonstrează că infecția are o localizare mai ales digestivă și că intensitatea și durata excreției de oocisturi este mai mare în cazul căii orale. Această cale poate fi, astfel, suspectată ca principala modalitate de infecție și în condiții naturale.

CAP. III. IDENTIFICAREA UNOR SPECII DE CRIPTOSPORIDII LA ANIMALE ȘI OM PRIN TEHNICI MODERNE DE DIAGNOSTIC

III. A. RECOLTARE DE PROBE PENTRU EXAMINARE DE LA ANIMALE ȘI OM

III. B. EFECTUAREA UNOR TEHNICI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ

1. IDENTIFICAREA MOLECULARĂ (PCR) A SPECIILOR DE CRIPTOSPORIDII LA TINERETUL BOVIN ÎN ZONA DE VEST A ROMÂNIEI

Din multitudinea bolilor parazitare identificate la animale și om, *Cryptosporidium* spp. ocupă un loc important. Studiile recente de biologie moleculară au dovedit o diversitate genetică impresionantă în cadrul genului *Cryptosporidium*. Mulțimea trăsăturilor morfologice, biologice și genetice care diferențiază o specie de criptosporidie față de altele este o problemă majoră în înțelegerea modalității de transmitere a infecției criptosporidiene, pentru medicii veterinari practicieni și epidemiologii umani, direct implicați în controlul acestei entități morbide [Santín și Trout, 2008].

Biologia moleculară se bazează pe tehnici moderne care permit identificarea sau capturarea unei cantități foarte mici de acizi nucleici. În cei câțiva ani de la descoperire, reacția polimerazică în lanț (PCR) a devenit o alternativă rapidă la metodele tradiționale de clonare a ADN-ului. PCR este o metodă enzimatică de creare a mai multor copii al unui segment de ADN "pre-selectat". Acest proces de amplificare este realizat cu doi primeri sintetici de oligodezoxinucleotidă, o polimerază ADN termostabilă și cele patru dezoxiribonucleotide trifosfat acționând asupra modelului de ADN [Alves și col., 2001; Xiao și col. 1999].

Rezultatele obținute în urma aplicării acestei tehnici au contribuit semnificativ la găsirea răspunsului la numeroasele întrebări legate de biologia criptosporidiilor. Metoda descrisă de Webster și col. (1993), s-a dovedit a fi una laborioasă, de mare finețe și totodată cel mai specific test de identificare a criptosporidiilor. La ora actuală este cea mai utilizată metodă de diagnostic în întreaga lume [Santín și Trout, 2008].

În ultimii ani, diferențele genetice s-au dovedit a fi cele mai reprezentative elemente în definirea mai multor specii de criptosporidii recent descoperite, ca de pildă: *C. andersoni*, *C. canis*, *C. hominis*, *C. galli*, *C. suis*, *C. bovis* și *C. ryanae*. La ora actuală, datorită existenței unor tehnici de biologie moleculară complexă, se cunoaște o diversitate genetică și biologică foarte mare la speciile de criptosporidii ale mamiferelor, fiind descoperite și descrise o gamă largă de specii noi.

Bovinele reprezintă cel mai mare grup de animale cunoscute a fi infectate cu criptosporidii, probabil datorită numeroaselor studii efectuate pe acestea ca rezultat al importanței acestora. Deși mai multe gene pot fi folosite pentru diferențierea speciilor și genotipurilor de *Cryptosporidium* spp., cea mai utilizată este gena SSU-rRNA (gena 18S). În urma analizelor moleculare a izolatelor de *Cryptosporidium* spp. de la viței, s-au identificat 7 specii și 3 genotipuri: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. suis*, genotipul *C. suis*-like, genotipul de căprioară și genotipul suin de tip II [Bornay și col., 1999; Fayer și col., 2006; Fayer și col., 2001; Feng și col., 2006; Langhajer și col., 2007; Park și col., 2006; Santín și col., 2004; Smith și col., 2005; Starkey și col., 2006].

În câteva studii de prevalență, realizate pe scară largă la bovine, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* și genotipul de căprioară au fost găsite cel mai frecvent ca fiind implicate în etiologia bolii [Fayer și col., 2006; Fayer și col., 2001; Feng și col., 2006; Langhajer și col., 2007; Santin și col., 2004; Xiao și col., 2004]. În contrast, *C. hominis* a fost descoperit doar la câteva bovine în Scoția, India și Republica Coreeană [Feng și col., 2006; Santin și col., 2004; Smith și col., 2005]. *C. suis* a fost găsit la un vițel în Statele Unite și Zambia [Fayer și col., 2006; Langhajer și col., 2007; Park și col., 2006], genotipul *C. suis*-like a fost găsit la trei bovine în Danemarca [Langhajer și col., 2007], genotipul suin de tip II a fost găsit la o vacă în Danemarca [Langhajer și col., 2007] și *C. felis* a fost găsit la o junică în Polonia [Bornay și col., 1999]. La viței, infecții naturale cu *C. canis* nu au fost semnalate, transmiterea fiind posibilă doar pe cale experimentală [Fayer și col., 2001].

Pe baza celor expuse s-a considerat oportună efectuarea unor investigații de biologie moleculară și în condițiile țării noastre, cu scopul de a aduce contribuții noi la cunoașterea criptosporidiozei în România. Totodată, identificarea moleculară a unor specii de criptosporidii sunt

teme care prezintă provocări pentru a înțelege unele aspecte încă incomplet elucidate în legătură cu această protozoonoză atât de importantă pentru sănătatea publică și animală.

Materiale și metode

Studiul a fost realizat în perioada februarie - mai 2008, pe un număr de 76 de viței cu vârste cuprinse între o zi și 30 de zile. Vițeii neînțărcați de rasă Holstein-Friză au provenit din patru efective de vaci de lapte (20-50 de viței/efectiv), din patru localități ale județelor Bihor, Arad și Timiș, cu antecedente diareice și prezența protozoarului *Cryptosporidium* spp. în efectiv. Materiile fecale diareice au fost recoltate individual direct din rect, depozitate în coprocultoare sterile la o temperatură de 4°C și prelucrate în decurs de 24 de ore în vederea identificării oocisturilor de *Cryptosporidium* spp. Probele recoltate au fost examinate prin colorarea Ziehl-Neelsen modificată de Henriksen considerată ca metodă standard în diagnosticul criptosporidiozei [Fayer și col., 2007; Thompson și col., 2003].

Probelor pozitive (în număr de 22 din 76 examinate) li s-a adăugat bicromat de potasiu 2% pentru coservare, după care s-a trecut la o etapă premergătoare reacției polimerazice în lanț (PCR).

Concentrarea oocisturilor de criptosporidii din probele de fecale s-a făcut prin "*metoda concentrării apă - eter*" care este o variantă modificată a metodei concepută de Alves și colaboratorii în 2001 [Alves și col., 2001]. S-au utilizat aproximativ 1,5 g de fecale sau 1,5 ml de fecale lichide pozitive pentru *Cryptosporidium* spp. Probele au fost introduse în tuburi de centrifugă de 10 ml în care, în prealabil, s-a adăugat 3 ml de apă distilată.

Produsul obținut a fost vortexat timp de 30 de secunde după care la mixtura obținută s-a adăugat 1 ml de eter etilic în scopul distrugerii lipidelor. După o ușoară omogenizare a urmat o altă vortexare timp de 1-2 minute. Lichidul vortexat se strecoară printr-o sită cu dimensiunea porilor de 45 μm într-o altă eprubetă similară. Volumul filtratului se ajustează cu apă distilată până la semnul superior (10 ml) al tubului de centrifugă și se centrifughează la 1500 x g timp de 15 minute. După prima centrifugare vom obține trei straturi: sedimentul, supernatantul și stratul de eter care înglobează lipidele extrase din probă. Stratul de eter se înlătură în totalitate iar supernatantul se transferă într-o altă eprubetă similară cu primele două introduse în lucru. Se completează cu apă distilată până la semnul superior după care urmează o altă centrifugare la 4500 x g, timp de 10 minute. Se aspiră supernatantul dar nu în totalitate, iar sedimentul se resuspendă în lichidul rămas care va servi pentru examinarea la microscop. Orientativ, în urma examinării se va aprecia intensitatea infecției cu oocisturi de *Cryptosporidium* spp.

Extracția ADN-ului din oocisturi s-a făcut prin "*metoda MiniBeadBeathers/Silica*" descrisă de Alves și col. în 2001 (1). În prima fază se amestecă conținutul celor două eprubete rezultate în urma centrifugării (sedimentul resuspendat al primei eprubete cu conținutul celei de a doua eprubetă centrifugată). Mixtura obținută se centrifughează la 5000 x g timp de 5 minute după care, din produsul rezultat se înlătură o pătrime. Se ia un tubuleț Eppendorf cu capacitatea de 2 ml în care se introduc aproximativ 0,5 g de Zirconia Silica Beads pulbere nisipoasă, 900 μl Lisis Buffer, 60 μl alcool izoamilic și produs centrifugat resuspendat până la semn (2 ml). Mixtura obținută se introduce într-un aparat special "MiniBead- Beather"(Biospec Product), timp de două minute, în care are loc liza pereților oocisturilor. În paralel se pregătește un alt tubuleț similar cu primul în care se introduc 40 μl Silica și supernatantul obținut în urma lizării oocisturilor în aparat. Tubul Eppendorf cu amestecul rezultat se așează într-un rotator pentru o agitare ușoară timp de o oră. După expirarea timpului, urmează o nouă centrifugare la 14.000 x g timp de 20 de secunde, având ca rezultat aderarea ADN-ului la fundul tubului. În continuare se înlătură supernatantul iar peste sediment se adaugă primul Buffer în cantitate de 200 μl urmat de o resuspensie mecanică cu un obiect contondent (ex. loviri repetate a tubului Eppendorf cu pixul). După o nouă centrifugare, procedeul se repetă. Sedimentul rezultat în urma centrifugării se spală cu 200 μl de etanol 80 %. Urmează o nouă centrifugare și o ultimă spălare cu 200 μl de acetonă 100 %. Supernatantul se decantează iar sedimentul ce aderă la fundul tubului va constitui materialul genetic al oocisturilor de *Cryptosporidium* spp. Tubul Eppendorf cu ADN-ul extras se introduce într-o etuvă specială în care se menține 15 minute la o temperatură de 55° C. După expirarea timpului, în tub se adaugă apă bidistilată sterilă în cantitate de 50 μl cu scopul de a resuspenda depozitul de ADN uscat. Proba se introduce din nou în etuvă timp de 5 minute, urmat de o nouă resuspendare a sedimentului uscat și o centrifugare la 14.000 x g timp de 2 minute. Supernatantul rezultat cu ADN- ul rehidratat se transferă cu mare atenție într-un alt tubuleț Eppendorf cu capacitatea de 0,5 ml iar sedimentul tubului centrifugat se înlătură.

Reacția de polimerizare în lanț (PCR) și analiza polimorfismului lungimii fragmentului restricționat (RFLP) au fost efectuate după modelul american conceput de Xiao și colaboratorii în 1999 (34).

Amplificarea genei. Amplificarea propriu zisă s-a realizat prin "nested PCR" (PCR cuibărit) în două etape: PCR primar și PCR secundar. Investigațiile s-au bazat pe analiza secvențială a genei SSU-rRNA de mărimea ~830 bp, utilizând amorsele (primerii) 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' (SSU-F2) și 5'-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3' (SSU-R2) pentru PCR primar respectiv 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' (SSU-F3) și 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' (SSU-R4) pentru PCR secundar. Probele au fost prelucrate în condiții sterile.

Volumul reacției de amplificare pentru PCR primar a fost de 100 μl, fiind reprezentat de: 10x Perkin-Elmer PCR buffer 10 μl, dNTP (1.25mM) 16 μl, SSU-F2 (40ng/μL) primer 2.5 μl, SSU-R2 (40ng/μL) 2.5 μl, MgCl₂ (25mM) 6 μl, albumină serică bovină neacetilată (BSA 10 mg/mL) 4 μl, apă distilată 56,5 μl, taq polimerază 0,5 μl și 2 μl de ADN extras în suspensie. Programul de amplificare s-a realizat cu amplificatorul Biometra alfa gene PCR System. Acest program a inclus următoarele etape:

- un ciclu de denaturare ADN matriță la 95° C, timp de 3 minute;
- 35 de cicluri de: denaturare la 95° C, timp 45", hibridare la 55° C, timp 45" și extensie la 72° C timp de 1 minut;

- un ciclu de extensie finală la 72° C, timp de 7 minute.

La terminarea reacției de amplificare primară, probele au fost stocate la 4° C după care s-a trecut la a doua amplificare prezentată în cele ce urmează.

Volumul reacției de amplificare pentru PCR secundar a fost tot de 100 μl fiind constituit din: 10x Perkin-Elmer PCR buffer 10 μl, dNTP (1.25mM) 16 μl, SSU-F3 (40ng/μL) primer 2.5 μl, SSU-R4 (40ng/μL) 2.5 μl, MgCl₂ (25mM) 6 μl, apă distilată 55,5 μl, taq polimerază 0,5 μl și 2 μl produs amplificat din reacția PCR primar. Programul de amplificare a fost următorul:

- un ciclu de denaturare la 95° C, timp de 3 minute;
- 35 de cicluri de: denaturare la 95° C, timp 45", hibridare la 58° C ,timp 45" și extensie la 72° C, timp de 1 minut;

- un ciclu de extensie finală la 72° C, timp de 7 minute.

Controlul ampliconilor s-a realizat prin electroforeză orizontală în gel de agaroză 1,5% la 120 V, 60 mA, timp de 60 de minute parcurgând următoarele etape:

- pregătirea aparatului de electroforeză (Bioblock Consort E 865): topirea gelului de agaroză 1,5% urmată de răcirea și introducerea în aparatul de electroforeză împreună cu 100 μl tampon Buffer TAE și 10 μl bromură de etidium. Bromura de etidium este considerată a fi cel mai convenabil colorant folosit pentru detectarea fragmentelor de ADN în gelul de agaroză, deoarece se intercalează între baze sau între cele două catene și emite radiații fluorescente, vizibile în lumină ultravioletă;

- cu ajutorul unei pipete automate într-un microtub se realizează amestecul de Loading Buffer (soluție albastră de bromfenol glicerol) 1 μl cu 9 μl produs amplificat rezultat din reacția PCR secundar. Se face o omogenizare prin pipetări repetate și apoi se preia proba și se introduce într-un godeu din gelul de electroforeză. În paralel, într-un alt microtub se prepară markerul PCR, adică standardul ADN, față de care se etalonează gelul sau față de care se estimează talia ampliconilor obținuți. Acest marker, care va migra full, conține: 1 μl Loading Buffer, 1 μl ADN Ladder de mărime 100 bp și 8 μl apă sterilă. De obicei, această mixtură se așează în primul godeu.

Standardul de talie moleculară ADN a fost reprezentat de markerul PCR (ADN Ladder 100 bp) care conține 11 benzi de la 50 bp până la 1000 bp. Martorul negativ a fost reprezentat de apa deionizată.

După migrarea probelor în gelul de agaroză, imaginea gelului cu fragmentele de ADN migrat a fost fotografiat în mod tradițional, cu un sistem Polaroid, cu expunere de câteva secunde, folosind un transluminator UV (Sigma T 2202) cu lungimea de undă de cca. 300 nm. Preluarea imaginii s-a realizat cu ajutorul sistemului E.A.S.Y. RH Herolab Image 2 Win PC (Herolab GmbH Laborgerate), iar prin utilizarea programului de calculator USI s-a calculat mărimea fragmentelor amplificate.

Pentru o identificare mai clară și sigură a speciilor și genotipurilor de *Cryptosporidium* spp. la bovine se recomandă efectuarea în continuare a analizei polimorfismului lungimii fragmentului restricționat (RFLP) a produsului PCR secundar (ADN amplificat) cu ajutorul endonucleazelor *Vspl* și *Sspl* (32). În această etapă s-a trecut la prepararea următoarelor mixturi: 4 μl *Sspl* (New England BioLabs Buffer), 22 μl apă distilată și 4 μl enzimă - pentru specie; 4 μl *Vspl* (Promega Buffer D), 24 μl apă distilată și 4 μl enzimă - pentru genotip. Din aceste amestecuri a fost transferat 30 μl într-un alt tub la care s-a adăugat 10 μl produs PCR secundar. Mixtura obținută s-a incubat în baia de apă la 37° C, timp de 2 ore, după care din produsul rezultat s-a efectuat electroforeză orizontală în gel de agaroză 1,5 % după tehnica descrisă anterior. Imaginea gelului cu fragmentele de ADN migrat, precum și calcularea mărimii fragmentului amplificat, au fost efectuate prin același procedeu prezentat la "nested PCR" (PCR cuibărit).

Rezultate și discuții

Pe baza analizei genei SSU-rRNA, la toate cele 22 de izolate, metoda "nested PCR" (PCR cuibărit) a dezvăluit că, dimensiunea fragmentelor amplificate a fost de ~ 850 bp. Mărima acestor benzi a sugerat faptul că, organismele caracterizate din punct de vedere genetic aparțin genului *Cryptosporidium*. Analiza polimorfismului lungimii fragmentului restricționat (RFLP) a produsului "nested PCR" final (PCR cuibărit) cu ajutorul endonucleazei *SspI* a relevat două benzi distincte la regiunile 444 și 247 bp. Acest fapt sugerează că, este vorba de un parazitism fie cu *Cryptosporidium parvum* fie cu *Cryptosporidium hominis*. Diferențierea dintre aceste două specii s-a făcut cu ajutorul endonucleazei *VspI* care a pus în evidență benzi la regiunile de 628 și 104 bp. Aceste mărimi indică clar că este vorba despre un parazitism cu *C. parvum*.

Rezultatele acestor investigații de biologie moleculară, efectuate în premieră națională, demonstrează faptul că, la vițeele în prima lună de viață din zona de vest a României singura specie de *Cryptosporidium* implicată în infecție a fost *Cryptosporidium parvum*. Această semnalare susține rezultatele mai multor studii efectuate în diferite arii geografice.

Un exemplu concret ar fi studiul îndelungat al lui care, în vederea determinării prevalenței speciilor și genotipurilor genului *Cryptosporidium*, au efectuat o amplă anchetă epidemiologică la bovinele cu vârste de la o zi până la doi ani în diferite ferme din statul Maryland (S.U.A) [Santin și col., 2008]. Rezultatele investigațiilor confirmă faptul că, specia *C. parvum* a fost singura specie identificată la vițeele în prima lună de viață sau la cei neîntârcați. Pe lângă această specie, mai sunt prezentate alte două specii și un genotip cu implicații majore în criptosporidioza bovină. Speciile *C. bovis* și genotipul de căprioară sunt mai frecvente la vițeele de după înțărcare (fiind semnalate în proporție de 80%, respectiv 60% dintre speciile identificate) iar specia *C. andersoni* apare îndeosebi la juninci și vaci de lapte. Aici trebuie menționat faptul că, aceste ultimele două specii și un genotip pot fi puse în evidență doar prin analiza polimorfismului lungimii fragmentului restricționat (RFLP) al genei SSU-rRNA cu ajutorul endonucleazei *MbolI*, urmat de analiza secvențială bidirecțională a ADN-ului amplificat cu ajutorul unui secvențializator specific. Această endonuclează poate diferenția *C. parvum* de *C. bovis* și de genotipul de căprioară [Feng și col., 2006; Santin și col., 2008; Xiao și col., 2001].

Cu cinci ani în urmă, aceleași investigații au fost făcute pe coasta de est a Statelor Unite. Aceste studii au demonstrat că *C. parvum*, cea mai comună specie de criptosporidie, a constituit 85% din infecțiile la vițeele neîntârcați și doar 1% la cei înțârcați [Santin și Trout, 2008].

Un alt studiu recent (2006), efectuat în India, a arătat că infecțiile criptosporidiene la vițeele înțârcați și neîntârcați se datorează unei singure specii *C. parvum* [Roy și col., 2006]. Rezultate similare au fost obținute și în Australia, Germania, Noua Zeelandă, Portugalia și Ungaria [Beckher și col., 2004; Learmonth și col., 2003; Mendonça și col., 2007; Plutzer și Karanis, 2007; Thomaz și col., 2007].

În următorul tabel sunt prezentate speciile și genotipurile de criptosporidii identificate prin metode moleculare pe baza analizei genei SSU-rRNA în diferite țări.

Tabel 22

Identificarea speciilor și genotipurilor de *Cryptosporidium* la bovinele de diferite vârste pe baza analizei genei SSU-rRNA în diferite țări

Țara	Nr. de probe analizate sau izolate	Vârsta	Specie/genotip Prevalență	Referenți
Australia	6 izolate	0-12 săptămâni	100%+ <i>C. parvum</i>	Beckher și col., 2004
Brazilia	9 izolate	<2 luni	8 izolate+ <i>C. parvum</i> 1 izolat+ <i>C. bovis</i>	Thomaz și col., 2007
Canada	143	vițee/vaci	21.7%+ <i>C. parvum</i> 1.4%+ <i>C. bovis</i>	Cocklin și col., 2007
China	6 izolate	vițee înțârcați și neîntârcați	5 izolate+ <i>C. bovis</i> 1 izolat CGC	Feng și col., 2006
Danemarca	154 izolate	nespecificat	50.6%- <i>C. parvum</i> 37.0%- <i>C. bovis</i> 7.8%+GC 1.9% + <i>C. suis</i> 0.7 % +genotip suin	Langkjaer și col., 2007

			de tip II 1.9 %+ alte izolate	
Germania	134	<1 lună	100%+ <i>C. parvum</i>	Broglia și col., 2008
India	12 izolate	viței înțărcați și neânțărcați	11 izolate+ <i>C. parvum</i> 1 izolat+ <i>C. bovis</i>	Feng și col., 2006
India	940	0-12 luni	17,7%+ <i>C. parvum</i>	Roy și col., 2006
Irlanda de Nord	224 izolate	<1 lună	95.1%+ <i>C. parvum</i> 3.6%+ <i>C. bovis</i> 1.3%+CGC	Thompson și col., 2006
Noua Zeelandă	658	viței/vaci	5.3%+ <i>C. parvum</i>	Learnmont și col., 2003
Portugalia	70 izolate	viței/vaci	100%+ <i>C. parvum</i>	Mendonça și col., 2007
Mai multe state din S.U.A	393	5 zile-2 luni	35.1%+ <i>C. parvum</i> 3.6%+ <i>C. bovis</i> 2.0%+CGC	Santín și col., 2004
Mai multe state din S.U.A	447	3-11 luni	0.2%+ <i>C. parvum</i> 14.5%+ <i>C. bovis</i> 3.4%+ <i>C. andersoni</i> 8.1%+CGC	Santín și col., 2004
Mai multe state din S.U.A	571	1-2 ani	0.7%+ <i>C. parvum</i> 4.2%+ <i>C. bovis</i> 5.1%+ <i>C. andersoni</i> 1.8%+CGC 0.2%+ <i>C. suis</i>	Fayer și col., 2007
Maryland (S.U.A.)	190 izolate	0 zile -2 ani	110 izolate+ <i>C. parvum</i> 45 izolate+ <i>C. bovis</i> 33 izolate+ <i>C. andersoni</i> 2 izolate+CGC	Santín și col., 2008
Michigan (S.U.A.)	248	vaci/viței	22.6%+ <i>C. parvum</i> 1.6%+ <i>C. andersoni</i>	Peng și col., 2003
New York (S.U.A.)	115	nespecificat	60.8%+ <i>C. parvum</i> 36.5%+ <i>C. bovis</i> 2.6%+CGC	Starkey și col., 2006
Georgia (S.U.A.)	32	variabil	6 izolate + <i>C. parvum</i> 15 izolate+ <i>C. bovis</i> 6 izolate +CGC 1 izolat + <i>C. parvum</i> / <i>C. andersoni</i> 1 izolat + <i>C. bovis</i>	Feng și col., 2006
Scoția	411	nespecificat	99.5%+ <i>C. parvum</i> 0.5%+ <i>C. hominis</i>	Smith și col., 2005
Ungaria	22 izolate	nespecificat	21 izolate+ <i>C. parvum</i> 1 izolat+CGC	Plutzer și Karanis, 2007
Vietnam	266	<1 an	33.5%+ <i>C. parvum</i> 5,6%+ <i>C. andersoni</i> 3,4%+pentru ambele	Nguyen și col., 2007
Wales (Țara Galilor)	101	variabil	7 din 16 probe +au fost <i>C. andersoni</i>	Robinson și col., 2006
Zambia	32 izolate	1-90 zile	22 izolate + <i>C. parvum</i> 10 izolate+ <i>C. bovis</i>	Geurden și col., 2006

Legendă: CGC=*Cryptosporidium* - genotipul de căprioară; "+"= pozitiv

Din tabel se observă că cea mai comună și răspândită specie este *C. parvum*, ea fiind prezentă la toate categoriile de vârstă aproape în toate regiunile, iar la bovine se întâlnesc mai frecvent trei specii și un genotip: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* și genotipul de căprioară. Prevalența infecției variază în limite destul de largi de la o zonă geografică la alta. *C. parvum* afectează în principal tineretul înainte de înțarcare [Beckher și col., 2004; Broglia și col., 2008; Thomaz și col., 2007; Thompson și col., 2006].

Fiecare specie a genului *Cryptosporidium* infectează un număr limitat de specii de animale. În momentul în care aria infectivității parazitului cuprinde și omul, protozoarul dobândește o semnificație aparte, cu implicații asupra sănătății publice. Bazându-ne pe câteva studii efectuate în diferite regiuni ale lumii, într-adevăr se poate spune că transmiterea directă a lui *C. parvum* de la animale la oameni este bine documentată [Current și col., 1983; Peng și col., 2003; Stancic și col., 2003]. Sușele zoonotice de *C. parvum* reprezintă mai mult de 60 % din criptosporidiile izolate de la om [Xiao și col., 2004].

Cunoștințele vagi ale practicienilor și îngrijitorilor despre această boală, fac ca, în această parazitoză, controlul să fie greu de realizat și adesea ineficient. Conștientizarea existenței unui pericol permanent de infectare, de către persoanele care vin în contact direct cu vițeei, este un factor esențial în prevenirea acestei parazitozoonoze, mai ales când este vorba de o specie zoonotică.

Verificarea continuă a proprietăților genetice, în concordanță cu evoluția biologiei moleculare, ar trebui să joace cel mai important rol în definirea sau descrierea speciilor de criptosporidii.

Concluzii

1. Prin analiza moleculară a genei SSU-rRNA (18S) a oocisturilor de *Cryptosporidium*, de la vițeei din prima lună de viață în zona de vest a României, s-a identificat un parazitism cu specia *Cryptosporidium parvum*.

2. Aceste tehnici de biologie moleculară în criptosporidioza vițeeilor au fost efectuate pentru prima dată în România.

2. IDENTIFICAREA MOLECULARĂ (PCR) A SPECIILOR DE CRIPTOSPORIDII LA OAMENI ÎN ZONA DE VEST A ROMÂNIEI

Introducere

Criptosporidioza, ca sporozooză neonatală oportunistă este considerată de unii autori printre primii trei-patru enteropatogeni de la om. Ea constituie o problemă majoră în majoritatea țărilor dezvoltate dar și în cele în curs de dezvoltare. Cele mai mari probleme apar în pediatrie, mai ales în țările în care condițiile igienice sunt precare. Impactul negativ al criptosporidiilor exercitat asupra copiilor în primele luni de viață se manifestă printr-un sindrom de diaree având ca rezultat deshidratarea și stagnarea creșterii [Fayer și col., 2007; Thompson, 2003].

Foarte mult timp s-a crezut că singurul agent etiologic răspunzător pentru apariția criptosporidiozei umane este *C. parvum*. Aceasta datorită lipsei înțelegerii anumitor criterii de diferențiere legate de morfologie, caractere biologice, moleculare și genetice ale speciilor din genul *Cryptosporidium*. La ora actuală, datorită utilizării analizelor genetice care diferențiază speciile de criptosporidii unele de altele, se cunosc foarte bine deosebirile existente între diferitele oocisturi de origine umană care din punct de vedere morfologic „par a fi identice”. Astfel, numeroase studii au arătat faptul că, două specii de criptosporidii: *C. parvum* și *C. hominis* sunt răspunzătoare de majoritatea infecțiilor cu criptosporidii la om [Alves și col., 2001; Guyot și col., 2001; Mc Lauchlin și col., 2000; Morgan și col., 2000; Ong și col., 1999; Peng și col., 1997; Sulaiman și col., 2000; Xiao și col., 2001].

Mai târziu, în urma caracterizărilor genetice, alte trei specii: *C. meleagridis*, *C. felis* și *C. canis* au fost găsite în infecțiile criptosporidiene la oamenii bolnavi de SIDA (HIV) din Statele Unite, Kenya și Elveția [Morgan și col., 2000; Pieniazek și col., 1999]. Studii mai recente au confirmat prezența acestor protozoare la indivizii imunocompromiși și din alte părți ale lumii [Alves și col., 2001; Gatei și col., 2002; Guyot și col., 2001; Tiangtip și col., 2002].

La oameni, pe lângă speciile de criptosporidii prezentate, au mai fost identificate și altele cum ar fi: *C. muris*, genotipul de căprioară și genotipul suin de tip I [Guyot 2001, Ong 2002, Tiangtip, Xiao Bern-2002].

Prin studiul realizat s-a urmărit evidențierea aplicabilității tehnicii de biologie moleculară, PCR, în diagnosticul etiologic al criptosporidiozei umane în zona de vest a României.

Materiale și metodă

Investigațiile epidemiologice au fost efectuate în perioada septembrie 2007-mai 2008 la un lot de 107 persoane format din adulți și copii provenind din diferite medii (urban și rural) ale județului Timiș. Persoanele investigate în număr de 107 au prezentat simptomatologie diversă ca urmare a scăderii imunității generată de o posibilă infestare cu criptosporidii, în cadrul unui studiu asupra criptosporidiozei privită ca una din cele mai importante zoonoze.

Copii în număr de 35 aveau vârste cuprinse între două luni și opt ani, iar dintre aceștia 20 au provenit din mediul urban iar restul de 15 din mediul rural.

Dintre cei 72 de adulți cu vârste cuprinse între 18 și 78 de ani, 35 au fost de origine din mediul urban iar restul de 37 erau din mediul rural (tabel 23).

Cu privire la sexul pacienților din numărul total de copii 20 au fost de sex masculin din care 11 au provenit din mediul urban, și 15 de sex feminin din care șase au provenit din mediul rural. Din numărul total de adulți 29 au fost de sex masculin din care 17 au provenit din mediul rural, și 43 de sex feminin din care 23 au provenit din mediul urban (tabel 23).

Tabel 23

Date epidemiologice cu privire la pacienții de la care s-au prelevat probe de fecale								
Numarul total de pacienti investigati	107							
Vârsta pacienților	Copii (n=35)				Adulți (n=72)			
Sexul	20 masculin		15 feminin		29 masculin		43 feminin	
Mediul de proveniență	9 rural	11 urban	6 rural	9 urban	17 rural	12 urban	20 rural	23 urban

Legendă n=în număr de...

Fiecărui pacient i s-a întocmit o foaie de observație clinică în care s-a făcut referire la starea de sănătate și la diagnosticul de internare.

Printre principalele afecțiuni diagnosticate cu efect imunosupresiv se numără următoarele: infecții cu *Escherichia coli* enteropatogen, enterocolită acută cu sindrom de deshidratare, gastroduodenită acută, hepatită toxică cronică sau virală, infecții cu virusul HIV, sindrom icteric, sindrom febril sau tuberculoză pulmonară. La copii, au fost efectuate examene coproparazitologice complementare prin metoda Willis.

Probele de fecale au fost prelevate individual în coprocultoare sterile, depozitate la 4° C și prelucrate în decurs de 24 de ore în cadrul Laboratorului de Parazitologie și Boli Parazitare al Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara.

În scopul evidențierii oocisturilor de criptosporidii fecalele au fost examinate prin metoda colorării Ziehl-Neelsen modificată de Henriksen și prin testul imunoenzimatic ELISA.

- În acest ultim caz s-a utilizat kit-ul **BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 070) (Bio-X Diagnostics, Belgia)** care este un kit de diagnostic antigenic „in vitro” a oocisturilor de *C. parvum* din fecale și respectă principiile tehnicii ELISA dublu – sandwich, având următoarea componență: două microplăci: cu câte 96 de camere de microtitrare care sunt saturate cu anticorpi monoclonali specifici pentru *Cryptosporidium parvum*
- soluția de spălare, care se va dilua în proporție de 1:20 cu apă distilată;
- soluția de diluție pentru diluarea probelor de fecale în proporție de 1:1;
- conjugatul
- matorul pozitiv și negativ;
- soluția de cromogen (tetrametilbenzidina) și substratul enzimatic (hidrogen peroxid);
- soluția de stopare (acid fosforic 1M)

Anticorpusul legat la placă recunoaște și fixează antigenul din proba de cercetat. Acesta recunoaște și fixează un al doilea anticorp anti-antigen (preparat pe altă specie) care la rândul lui reacționează cu anticorpusul anti al doilea anticorp cuplat cu enzima (conjugat imunoenzimatic). Prin descompunerea substratului specific se produce oxidarea unui cromogen ce își schimbă culoarea

Principiul testului se bazează pe faptul că anticorpii monoclonali cu care sunt impregnate camerele de microtitrare „capturează” antigenele agenților patogeni corespunzători din probele de fecale.

Modul de lucru este redat schematic și are următoarele etape:

1. - Componentii kitului ELISA se aduc la temperatura camerei cu o jumătate de oră înainte de începerea lucrului
2. Diluarea soluției de diluție (Dilution Buffer) cu apă distilată în proporție de 1:5 (adică de 5X).
3. Diluarea probelor de fecale cu soluția de diluție (Dilution Buffer) în proporție de 1:1
4. Diluarea soluției de spălare (Washing Solution) în proporție de 1:20 (adică de 20X).
5. Așezarea fecalelor în godeurile microplăcii (100 μl) și incubare timp de o oră la temperatura camerei.
6. Spălarea microplăcii de trei ori (3X) cu soluție de spălare diluată anterior.
7. Diluarea conjugatului în proporție de 1:50 cu soluție de diluție (Dilution Buffer) (de exemplu pentru o placă diluați 250 μl de conjugat cu 12.25 ml de diluant). Adăugați 100 μl de conjugat diluat în fiecare godeu după care incubați timp de o oră la temperatura camerei.
8. Spălarea microplăcii de trei ori (3X) cu soluție de spălare diluată anterior.
9. Diluarea soluției de indicator (chromogen) extemporaneu în cantitate de 10 ml, adică 12 picături de soluție chromogen TMB (500 μl) se dizolvă în 9.5 ml (Substrat Solution)- pentru o placă întregă sau 6 picături cu 4.75 ml pentru o jumătate de placă. Adăugarea cromogenului în cantitate de 100 μl într-un microgodeu. Incubare timp de 10 minute la temp camerei.
10. Adăugarea a 50 μl soluție de stopare.
11. Citirea probelor la 450 nm lungime de undă.

Interpretare: valorile densităților optice finale ale probelor de cercetat s-au obținut prin scăderea valorii densității optice a matorului negativ din valoarea densității optice a fiecărei probe obținută la citire. Limita inferioară a pozitivității pentru fiecare antigen este de 0,150 densitate optică finală. Probele care au o densitate mai mică decât valoarea menționată anterior sunt considerate negative (88).

Metoda Ziehl-Neelsen modificată de Henriksen și Pohlenz a fost o altă metodă prin care am încercat să evidențiem criptosporidiile. Prin această metodă criptosporidiile apar ca elemente rotunde sau ovoide, de 4-6μm, culoare roșie vie pe un fond verde. Citoplasma lor ste granulată, cu un centru, adesea, mai clar și conținând 0-6 corpusculi întunecați.

Prin această tehnică alte elemente neacidorezistente din fecale sunt colorate prin trecerea prin acid sulfuric și se colorează ulterior în verde datorită contracolorării. Celulele, bacteriile și levurile apar, deci, verzi diferențiindu-se ușor de criptosporidii. Alte coccidii se colorează tot în roșu-viu, dar sunt de dimensiuni mai mari. Această metodă are avantajul că este fiabilă, se realizează ușor, citirea este simplă, evită confuzia oochisturilor cu levurile sau alte particule din fecale și lamele pot fi conservate. Totuși, metoda necesită un timp mai lung și este necesară o atenție sporită și o oarecare experiență în momentul decolorării cu acidul sulfuric [Dărăbuș și col., 1996; Imre și col., 2008].

Probelor pozitive (în număr de patru din 107 examinate) li s-a adăugat bicromat de potasiu 2% pentru coservare, după care s-a trecut la o etapă premergătoare reacției polimerazice în lanț (PCR).

Tehnica concentrării oochisturilor de *Cryptosporidium* spp., extracția ADN-ului, reacția de polimerizare în lanț (PCR) respectiv analiza polimorfismului lungimii fragmentului restricționat (RFLP) au fost făcute conform metodologiei de lucru descrisă în capitolul III.B.1.

Rezultate și discuții

În urma examinării materiilor fecale prin metodele colorării Ziehl-Neelsen modificată de Henriksen și Pohlens (folosită ca și metodă standard) respectiv ELISA (kit-ul BIO K 070), din cele 35 de probe recoltate de la copii, în patru probe s-au identificat oochisturi de criptosporidii. În probele de fecale recoltate de la adulți, în număr de 72, nu s-au pus în evidență oochisturi de criptosporidii. Vârsta copiilor de la care s-au identificat oochisturi de criptosporidii a fost de: șase ani și patru luni, patru ani, doi ani și patru luni respectiv de trei luni cu proveniență din mediul rural. Cu privire la sex doi dintre copii erau de sex masculin și doi de sex feminin. Toate fecalele în care s-au identificat criptosporidii aveau aspect diareic, iar diagnosticul de internare a copiilor a fost de enterocolită acută cu sindrom de deshidratare.

Așadar din totalul de 107 probe de fecale diareice și nediareice în patru probe (utilizând testul ELISA) au fost identificate oochisturi de criptosporidii. Aceasta ar însemna o pozitivitate de 3,7%.

Pe baza analizei genei SSU-rRNA a oochisturilor din probele pozitive, la cele patru izolate, metoda "*nested PCR*" (PCR cuibărit) a dezvăluit că, dimensiunea fragmentelor amplificate a fost de ~ 850 bp. Din punct de vedere genetic, mărimea acestor benzi indică faptul că organismele caracterizate aparțin genului *Cryptosporidium*. Analiza RFLP a produsului "*nested PCR*" final (PCR cuibărit) cu ajutorul endonucleazei *SspI* a relevat două benzi distincte la regiunile 444 și 247 bp. Acest fapt sugerează că, este vorba de un parazitism fie cu *C. parvum* fie cu *C. hominis*. Diferențierea dintre

aceste două specii s-a făcut cu ajutorul endonucleazei *VspI* care a pus în evidență benzi la regiunile de 556 și 104 bp. Aceste mărimi indică clar că este vorba despre un parazitism cu *C. hominis*.

Rezultatele acestor investigații de biologie moleculară demonstrează faptul că, singura specie de *Cryptosporidium* implicată în criptosporidioza umană a fost *C. hominis*. Spre deosebire de infecția la animale, criptosporidioza la om nu are specificitate de vârstă, deși incidența la tineret poate fi mai ridicată datorită faptului că, posibilitățile de expunere sunt mai mari iar probabilitatea unei imunități instalate datorate unei expuneri anterioare este mai mică [Checkley și col., 1998].

Un aspect interesant ar fi neidentificarea protozoarului la adulți cu toate că, majoritatea dintre ei sufereau de boli cu efect imunosupresant cum ar fi: infecții cu virusul HIV, hepatită toxică cronică sau virală, sindrom icteric și febril sau tuberculoză pulmonară. Pe plan mondial, cele mai severe cazuri de criptosporidioză au fost semnalate la pacienții infectați cu virusul imunodeficienței umane (HIV) [Alves și col., 2001; Fayer și col., 2000; Fayer și col., 2007]. Transmiterea izolatului uman de *C. hominis* de la o persoană infectată la alta (transmitere antroponică), izbucnirea frecventă a criptosporidiozei în grădinițe, creșe și centre de îngrijire a copiilor, dobândirea caracterului nosocomial al bolii și infectarea odată cu hrana, confirmă importanța transmiterii interumane a bolii [Xiao și col., 2001].

Cu toate că la nivel mondial, în etiologia criptosporidiozei umane au fost implicate o gamă largă de specii zoonotice de criptosporidii (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* și *C. canis*) în condițiile țării noastre s-a identificat doar o singură specie. Este adevărat că, și numărul izolatelor analizate a fost mai redusă.

Până nu demult *C. parvum* a fost considerată ca fiind singura specie de *Cryptosporidium* infectantă pentru om. Utilizarea unor metode de genotipizare prin mijlocul anilor '90 a permis identificarea a două genotipuri (I și II) în cadrul acestei specii "standard" de la mamifere. Mai târziu, aceste două genotipuri au devenit *C. parvum* în "sensul strict" respectiv *C. hominis*, ambele cu infectivitate pronunțată pentru persoanele imunocompetente și imunocompromise [Xiao și col., 2004]. În fecalele umane, pe baza analizei subsecvențiale a genei SSU-rRNA, s-a pus în evidență prezența și a altor specii de criptosporidii cum ar fi: *C. canis*, *C. felis* și *C. meliagridis* [Pieniazek și col., 1999]. Alte specii care au mai fost semnalate în cazuri izolate de la om sunt *C. muris* [Katsuda 2006] și *C. suis* [Xiao și col., 2002]. La pacienții cu criptosporidioză, pe lângă speciile enumerate anterior, au mai fost întâlnite și genotipuri ale genului *Cryptosporidium* cum ar fi: genotipul de căprioară [Ong și col., 2002], genotipul suin de tip I [Ong 2002], genotipul *C. andersoni* – like [Leoni 2006] genotipul verveita de tip I (W17) [Feltus 2006], genotipul de sconcs [Nichols 2006] și *C. hominis* genotipul de maimuță [Mallon 2003].

Dintre speciile de *Cryptosporidium* patogene pentru om doar două (*C. parvum* și *C. hominis*) sunt responsabile de majoritatea infecțiilor, acestea fiind considerate specii zoonotice majore [Xiao și Ryan, 2004].

Au fost raportate diferențe geografice cu privire la răspândirea acestor două specii. Dintr-un studiu mai recent efectuat în Marea Britanie se desprinde că, prin analiza a 13112 de probe de fecale de origine umană cu criptosporidii, speciile implicate au avut următoarea distribuție: *C. hominis* 50,29 %, *C. parvum* 45,6 %, *C. hominis* și *C. parvum* 0,5 %, *C. meleagridis* 0,8 %, *C. felis* 0,2 %, *C. canis* 0,02 %, *C. suis* 0,01 %, genotipul de căprioară 0,05 %, genotipul CZB 141 0,01 % și genotipul de sconcs 0,01 %. Un procent de 2,6 dintre izolate au fost specii sau genotipuri nedefinite [Fayer și col., 2007]. Este foarte puțin probabil ca acești agenți etiologici prezentați anterior să fie implicați ca agenți patogeni majori în criptosporidioza umană. Imunosupresia nu reprezintă o condiție necesară pentru ca infecția să se poată dezvolta cu oricare dintre aceste specii.

De asemenea în țările europene, deși în studiile mai vechi apare *C. parvum* ca agent patogen major și mai des întâlnit decât *C. hominis*, studii mai recente au constatat că *C. hominis* are o prevalență mai mare decât *C. parvum*. Astfel, în Olanda prin studiul a 91 de izolate umane: 70% au fost *C. hominis*, 19% au fost *C. parvum*, 10% o combinație între *C. parvum* și *C. hominis* și 1% au fost *C. felis* [Wielinga și col., 2008]. În Spania, Llorente și col. (2007) au identificat *C. hominis* în 59 din 92 probe de la copii imunocompetenți și în 10 din 16 probe de la adulți infectați cu HIV (63,8%) [Llorente și col., 2007]. În schimb *C. parvum* a fost semnalat la 28 de copii și 6 adulți (31,5%) având o prevalență mai mare la copii din zonele rurale decât la cei din zonele urbane, lucru semnalat și în condițiile țării noastre.

În S.U.A., Canada, Australia, Japonia și în țările în curs de dezvoltare *C. hominis* a fost specia mai frecvent întâlnită la om decât *C. parvum* [Peng și col., 1997].

În Noua Zeelandă, prin analiza a 423 de cazuri de criptosporidioză umană, la 46,8% s-a semnalat specia *C. hominis* și la 52,7% *C. parvum* [Learnmont și col., 2003].

O prevalență mai mare a speciei *C. parvum* este întâlnită la om în Estul Mijlociu. În urbanizatul Kuwait City aproape toate cazurile de criptosporidioză la copii au fost cauzate de *C. parvum* [Sulaiman și col., 2005]. În Iran 7 din 8 pacienți cu HIV și 4 din 7 copii au avut criptosporidioză cauzată de *C. parvum* iar restul de *C. hominis* [Meamar și col., 2007].

În Turcia, din patru cazuri de criptosporidioză la copii, toate au fost cauzate de *C. parvum* [Tamer și col., 2007].

În Peru, unde o proporție semnificativă din infecțiile cu criptosporidii la oameni se datorează speciilor zoonotice, nu s-au constatat diferențe semnificative între copii și adulții infectați cu HIV, în ceea ce privește distribuția celor cinci specii de criptosporidii comune: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* și *C. canis* [Xiao și col., 2001].

Se pare, dar rămâne nedovedit, că extinderea infecției cu *C. parvum* la oameni în câteva regiuni ale lumii se datorează creșterii intensive în special a rumegătoarelor asociată cu existența unor concentrații mari de animale tinere.

Trebuie luat în considerare și faptul că, multe alte specii de criptosporidii neidentificate încă la oameni, pot fi implicate ca agenți patogeni majori în izbucnirea criptosporidiozei umane. Acest lucru poate fi favorizat de schimbările socio-economice și ale mediului înconjurător [Xiao și col., 2004].

Concluzii

- ❖ Prin analiza moleculară a genei SSU-rRNA (18S) a oocisturilor de *Cryptosporidium*, izolate de la oameni din zona de vest a României, s-a identificat un parazitism cu specia *Cryptosporidium hominis*.
- ❖ Aceste tehnici de biologie moleculară în criptosporidioza umană au fost efectuate pentru prima dată în România.

3. SUBTIPIZAREA SPECIEI *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* DE LA VIȚEI DIN VESTUL ROMÂNIEI PRIN ANALIZA SECVENȚIALĂ A GENEI GP60

Materiale și metode

Studiul a fost realizat în perioada februarie - mai anul 2008, pe un număr de 12 izolate de *Cryptosporidium parvum* de origine bovină cu vârste cuprinse între șapte și 45 de zile. Viței de rasă Holstein-Friză au provenit din două efective de vaci de lapte (20-50 de viței/efectiv), din două localități ale județelor Bihor și Arad, cu antecedente diareice și prezența protozoarului *Cryptosporidium* spp. în efectiv.

Extracția ADN-ului din oocisturi și amplificarea PCR a genei GP60 s-a făcut prin "*metoda MiniBeadBeaters/Silica*" descrisă de Alves și col. în 2001 și prezentată în capitolul III.B.1. [Alves și col., 2001]. Protocolul "*nested PCR*" (PCR cuibărit) a utilizat amplificarea unui fragment de mărimea a ~850 bp a genei GP60 respectând metodologia de lucru descrisă de Alves și col. în 2003. În unele cazuri s-a mai utilizat amplificarea unui alt fragment de ~ 400 bp a aceleași gene, după tehnica descrisă de Sulaiman și colaboratorii în 2005.

Secvențializarea ADN-ului și analiza filogenetică s-a realizat prin secvențializarea bidirecțională a produsului PCR utilizând autosecvențializatorul ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cu ajutorul programului ClustalX (<ftp://www.ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) secvențele de nucleotide obținute au fost aliniate și comparate în conformitate cu secvențele referențiale din Banca de Gene.

Rezultate și discuții

Secvențializarea și analiza filogenetică a produsului PCR amplificat a genei GP60 a arătat că, cele 12 izolate de *C. parvum* de origine bovină din zona de vest a României, aparțin unui singur subtip familial IIa.

Distribuția subtipului familial IIa a speciei *C. parvum* în cele două localități ale județelor Bihor și Arad sunt prezentate în tabelul 24.

Tabel 24

Distribuția unor subtipuri familiale GP60 în două localități vestice ale României, obținute prin analiza secvențială a unor izolate de *C. parvum*

Subtipuri Gp60	Săntful mic (nr. Probe pozitive)	Utviniș (nr. Probe pozitive)
IlaA15G2R1	7	1
IlaA16G1R1	0	4

În ferma din localitatea Săntful Mic (județul Bihor) toate izolatele de *C. parvum* au aparținut unui singur subtip familial IlaA15G2R1.

În ferma din localitatea Utviniș (județul Arad) patru probe (80%) din cinci analizate au aparținut subtipului familial IlaA16G1R1, iar un singur izolat subtipului familial IlaA15G2R1. Diferențele dintre aceste două subtipuri sunt minore și constau în numărul de repetiții ale tripletei de aminoacizi TCA, TCG și/sau TCT.

Distribuția geografică a subtipurilor familiale GP60 a speciei *Cryptosporidium parvum* la bovine este prezentată în următorul tabel.

Tabel 25

Subtipuri GP60 a speciei *C. parvum* identificate la bovine (după Santin și Trout, 2007)

Origine geografică	Număr de probe	Subtipuri gp60 a speciei c. Parvum (număr de probe)	Referenți
Canada	2	IlaA16G3R1 (2)	Strong și col. 2000
U.S.A.	1	IlaA18G5R1 (1)	
Portugalia	72	IlaA15G2R1 (61)	Alves și col. 2003, 2006
		IlaA16G2R1 (7)	
		IldA17G1 (4)	
U.S.A.	33	IlaA15G2R2 (10)	
		IlaA16G2R1 (8)	
		IlaA16G2R1 (8)	
		IlaA16G1R1 (3)	
		IlaA16G3R1 (2)	
Slovenia	4	IlaA16G3R2 (2)	Stantic-Pavlinic și col 2003
		IlaA17G1R1 (4)	
Italia	1	IlaA13G2R1 (1)	Wu și col., 2003
Japonia	1	IlaA16G2R1 (1)	
Marea Britanie	2	IlaA20G3R1 (2)	Chalmers și coll., 2005
Japonia	3	IlaA15G2R1 (3)	Abe și col., 2006
U.S.A.	6	IlaA15G2R1 (6)	Feng și col., 2006
India	9	IlaA15G2R1 (5)	
		IlaA13G2R2 (1)	
		IlaA14G2R1a (1)	
		IlaA14G2R1b (1)	
		IdA15G1 (1)	
Irlanda de Nord	214	IlaA18G3R1 (120)	Thompson și col., 2006
		IlaA15G2R1 (28)	
		IlaA17G2R1 (19)	
		IlaA19G4R1 (15)	
		IlaA20G3R1 (6)	
		IlaA17G3R1 (5)	
		IlaA19G3R1 (5)	
		IlaA20G5R1 (3)	
		IlaA18G2R1 (2)	
		IlaA20G2R1 (2)	
IlaA16G3R1 (1)			

		IlaA17G1R1 (1)	
		IlaA18R1 (1)	
		IlaA19G2R1 (1)	
		IlaA20G4R1 (1)	
		Ila-necunoscute (5)	
		Familie nouă (1)	
Canada	36	IlaA15G2R1 (10)	Trotz-Williams și col. 2006
		IlaA16G2R1 (9)	
		IlaA16G3R1 (8)	
		IlaA16G1R1 (4)	
		IlaA13G2R1 (2)	
		IlaA17G2R1 (2)	
U.S.A. (16 ferme în 8 state)	175	IlaA18G3R1 (1)	Xiao și col., 2007
		IlaA15G2R1 (134)	
		IlaA15G2R2 (10)	
		IlaA11G2R1 (9)	
		IlaA18G2R1 (9)	
		IlaA17G2R1 (7)	
		IlaA19G2R1 (3)	
		IlaA11G2R1+	
		IlaA15G2R2 (1)	
		IlaA11G2R1+	
IlaA15G2R1 (1)			
IlaA18G2R1+			
IlaA19G2R1 (1)			

În marile țări industrializate rezultatele analizei secvențiale a genei GP60 stau la baza teoriei transmiterii zoonotice a criptosporidiozei. Din tabel se desprinde că majoritatea izolatelor de la bovine aparțin subtipului familial Ila a speciei *C. parvum*, subtip identificată și la oameni. Subtipul familial anthropozoonotic Ilc nu a fost încă semnalat la bovine. În cadrul subtipului familial Ila cel mai comun subtip din lume este IlaA15G2R1, acesta fiind identificat și la majoritatea cazurilor analizate (66,6%) în partea de vest a României. De exemplu în Portugalia 61 din 72 de izolate (Alves 2003, 2006), în India cinci din nouă izolate [Feng și col., 2006] sau în S.U.A. 135 din 175 de izolate [Xiao și col., 2007] au avut acest subtip familial.

În Irlanda de Nord s-a observat o diversitate genetică mai mare în cadrul alelei Ila. Cel mai comun subtip familial a fost IlaA18G3R1 (120 din 214) urmat de subtipurile IlaA15G2R1 (28 din 214) și IlaA17G2R1 (19 din 214)(vezi tabel 24) [Thompson și col., 2006].

Prevalența mai crescută a subtipului IlaA15G2R1 la vițeii din întreaga lume a fost frecvent identificată și la oamenii din Australia, Japonia, Kuweit, Irlanda de Nord, Portugalia, Slovenia și Statele Unite [Santin și Trout, 2007]. Acest lucru sugerează faptul că, subtipul Ila se poate difuza cu ușurință în populația de bovine și poate fi transmis și la om. Această subtipizare a speciei *C. parvum* promite o unealtă adevărată în analiza surselor de infecție și înțelegerea dinamicii transmiterii criptosporidiozei, însă toate acestea chiar și la nivel mondial se află la un nivel de pionerat.

Concluzii

- ❖ Secvențializarea și analiza filogenetică a produsului PCR amplificat a genei GP60 a arătat că, cele 12 izolate de *C. parvum* de origine bovină din zona de vest a României, aparțin unui singur subtip familial Ila.
- ❖ Aceste tehnici de biologie moleculară în criptosporidioza vițeilor au fost efectuate pentru prima dată în România și aduc contribuții majore la cunoașterea criptosporidiozei pe plan național și mondial.

IV. A. TESTAREA EFICACITĂȚII ANTICRIPTOSPORIDIENE A UNOR MEDICAMENTE

a. Activitatea unui supliment nutrițional în infecția naturală cu *Cryptosporidium* spp. la viței

Cu toate că au fost încercate peste 200 de medicamente în tratamentul specific și simptomatic al criptosporidiozei, până azi nu se cunoaște un medicament realmente eficace. Totuși unele din produsele experimentate au redus sau chiar au stopat eliminarea oocisturilor. A fost încercată eficacitatea terapeutică a antibioticelor, sulfamidelor, anticoccidicelor, antihelminticelor, antimalaricelor și antifungicelor. Rezultate încurajatoare au fost obținute prin utilizarea: lactatului de halofuginonă, paromomicinului, lasalocidului, sulfaquinoxalinei, decoquinatului sau al α -ciclodextrinei [Stockdale și col., 2007].

În absența unui tratament specific, și în special la viței cu diaree severă, terapia simptomatică este indispensabilă. Deși datele privind utilizarea colostrului și a unor substanțe energizante sau antiinfecțioase sunt contradictorii, totuși, având în vedere faptul că, de obicei infecția este mixtă, coexistând și bacterii și/sau virusuri, acesta nu poate să aibă decât un rol benefic. Administrarea colostrului diluat în proporție de 1:1 cu soluții electrolitice și substanțe nutritive, duce la o diminuare cu 50% a extensivității și intensității infecției criptosporidiene la viței [Dărăbuș, 1996]. Spring și col. (2000) au demonstrat acțiunea antibacteriană a unui supliment nutrițional observând aderența și eliminarea enteropatogenilor *E. coli* și *Salmonella* spp. la fibrele hidrofobe de lecitină și mannanoligozaharide (MOS).

Având în vedere aceste considerente s-a urmărit determinarea unei posibile eficacități a unei surse de electroliti și glucoză cu administrare orală în infecția naturală cu *Cryptosporidium* spp. la viței.

Materiale și metode

Studiul include trei efective de viței (20-50 de viței/efectiv) de rasă Holstein-Friză, din trei localități ale județelor Arad și Timiș, cu antecedente diareice și prezența protozoarului *Cryptosporidium* spp. în efectiv. Viței investigați, cu vârste de până la 30 de zile, au fost repartizați după naștere în boxe individuale cu așternut de paie. În cele trei ferme, cu o singură excepție, nu s-au efectuat dezinfecții. Toți viței au beneficiat în prima zi de viață de colostru după care s-a trecut la hrănirea cu lapte praf. Într-o fermă s-au efectuat vaccinări împotriva unor boli virale (rotavirus serotipul G6, G10 și coronavirus) respectiv bacteriene (*E. coli* K99 și *Clostridium perfringens* tipul C toxoid) cu un vaccin viu atenuat.

Din cele trei efective s-au format două grupuri de viței cu sindrom de diaree și care au fost tratați pe cale orală timp de șapte zile. Animalelor din grupul I (grupul placebo) în număr de șase li s-a administrat 100 ml de apă de robinet amestecat cu 2 litri de lapte praf de două ori/zi. Grupul II de viței, (grupul D) în număr de nouă, a beneficiat de un tratament cu 2 litri de lapte praf amestecat cu aproximativ 100 grame produs testat. Preparatele au fost administrate de către îngrijitori, care au primit două recipiente mate colorate diferit conținând cele două substanțe mai sus amintite. Îngrijitorii nu au fost informați de conținutul recipientelor. Tratamentul a început în ziua în care viței au prezentat primele semne clinice de diaree.

Produsul testat este o sursă importantă de energie care: îmbunătățește absorbția fluidelor, corectează rapid și continuu acidoza metabolică respectiv leagă și elimină unii enteropatogeni (ex. *E. coli* și *Salmonella* spp.) datorită compoziției în fibre hidrofobe de lecitină și mananoligozaharide (MOS). Totodată este compatibil cu apa, laptele sau înlocuitorii de lapte și prezintă o palatabilitate crescută pentru viței. Conține o gamă largă de minerale și electroliti cum ar fi: ionii de sodiu, clor, potasiu, bicarbonat, citrat, acetat; precum și numeroase substanțe nutritive: glucoză, lactoză, glicină, fibre hidrofobe de lecitină și mananoligozaharide (MOS).

Fiecare vițel luat în studiu a fost examinat de trei ori pe parcursul tratamentului și încă odată la o săptămână după terminarea acestuia. La examenul clinic s-au consemnat următoarele date: performanțe generale, apetit, temperatură, consistența fecalelor (normale, semilichide sau lichide) la fel ca și nivelul deshidratării pe zile (zilele zero, patru, șapte și paisprezece). De fiecare dată când viței au fost examinați clinic, au fost colectate probe de fecale care au fost prelucrate pentru prezența *Cryptosporidium* spp. prin metoda etalării directe sau prin colorarea Ziehl-Neelsen modificată de Henriksen. Numărul oocisturilor în 10 câmpuri microscopice alese randomic a fost clasificată în patru categorii: niciunul, slab (1-4 oocisturi), mediu (5-10 oocisturi) și crescut (>10 oocisturi). În plus, fiecare probă a fost examinată prin testul ELISA (Digestiv ELISA kit[®]; Bio-X, Belgium) pentru alți trei enteropatogeni: rotavirus, coronavirus și *E. Coli* F5. Pentru diferențele între datele observate în diferite zile și între cele două grupuri rezultatele au fost interpretate prin testul χ^2 .

Rezultate și discuții

La începutul tratamentului (ziua 0) la grupa placebo nu a fost semnalată prezența oochisturilor de *Cryptosporidium* spp. în probele de fecale. La grupa D 11,5% dintre viței s-au dovedit a fi excretori de oochisturi. În ziua a patra 83,3% dintre animalele din grupul I, respectiv 77,7% din grupul II au excretat oochisturi. În ziua a șaptea 83,3% respectiv 88,8% dintre vițeii din cele două grupuri au fost excretori de oochisturi de *Cryptosporidium* spp. La ultima recoltare (ziua 14), 33,3% dintre vițeii din grupul placebo respectiv 44,5% dintre vițeii din grupul D încă mai eliminau oochisturi (tabel 26).

Tabel 26

Prevalența și intensitatea excreției oochisturilor de *Cryptosporidium* spp. la cele două grupuri de viței în perioada experimentului

Ziua	Grupul	Oochisturi excretate				Prevalența (%)
		Niciunul (%)	Slab (%)	Mediu (%)	Crescut (%)	
Ziua 0	I	100	0	0	0	0
	II	88,9	11,1	0	0	11,5
Ziua 4	I	16,6	16,6	50	16,6	83,3
	II	22,2	11,1	22,2	44,4	77,7
Ziua 7	I	16,6	16,6	16,6	50	83,3
	II	11,1	11,1	66,6	11,1	88,8
Ziua 14	I	66,6	0	16,6	16,6	33,3
	II	55,5	11,1	22,2	11,1	44,5

Pe parcursul a două săptămâni de investigații (zilele zero, patru, șapte și paisprezece) nu au fost semnalate diferențe semnificative ($p > 0,05$) între cele două grupuri cu privire la excreția de oochisturi.

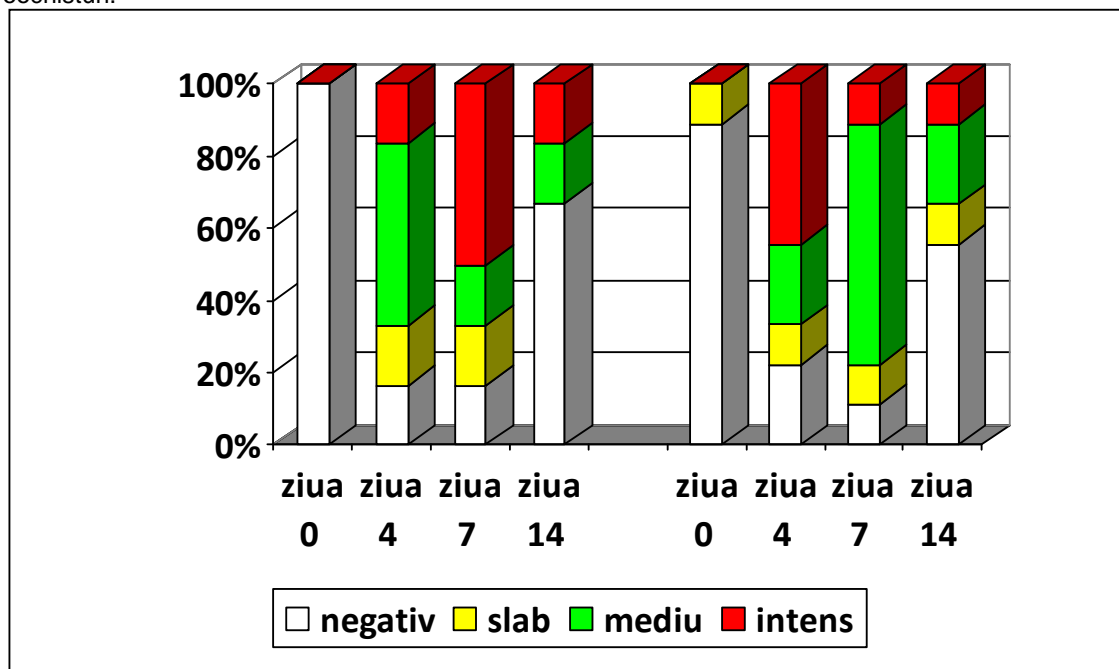


Fig.12. Reprezentarea grafică a prevalenței și intensității infecției cu *Cryptosporidium* spp. în funcție de eliminările de oochisturi

Starea generală a animalelor (temperatură, apetit, facies, temperament) în ziua zero a fost asemănătoare, majoritatea vițeilor din cele două grupuri fiind în stare bună. La următoarea dată când au fost făcute investigații (ziua patru) starea animalelor din grupul placebo a fost depreciată vizibil, acest lucru menținându-se până în ziua a șaptea de tratament. Vițeii din grupul D au avut o stare generală relativ bună și constantă pe tot parcursul a două săptămâni de investigații.

În ziua a patra de examinare s-a constatat o scădere distinct semnificativă ($p < 0,01$) a diareei la grupul D comparativ cu grupul placebo. Această scădere a devenit foarte semnificativă ($p < 0,001$) în ziua a șaptea. În ultima zi de investigație procentul vițelilor cu diaree a scăzut distinct semnificativ ($p < 0,01$) la grupul placebo respectiv semnificativ ($p < 0,05$) la grupul D comparativ cu ziua precedentă în care s-au făcut examinări (fig. 13). Pe parcursul studiului, apetitul s-a schimbat foarte puțin, diferențele fiind nesemnificative ($p > 0,05$). În ziua a patra de examinare la aproximativ 30% în fecalele vițelilor din grupul placebo s-au semnalat urme de strii de sânge. Deshidratarea a avut un traseu similar cu diareea, fiind în procent mai mic la grupul D decât la grupul placebo încă din ziua a patra de investigație.

La grupul placebo s-a remarcat o corelație directă între excreția de oochisturi și prezența diareei, cele două caractere evoluându-se în paralel (fig. 12 și 13). Această observație a fost valabilă și pentru starea generală a animalelor din grupul respectiv care s-a înrăutățit odată cu menținerea diareei și a excreției de oochisturi. Nu s-au înregistrat corelații între excreția de oochisturi și severitatea diareei.

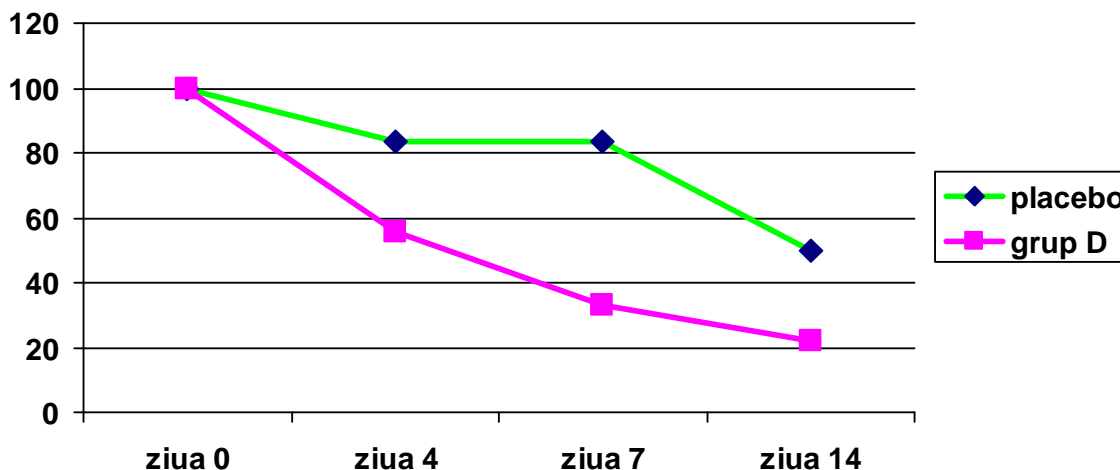


Fig. 13. Reprezentarea grafică a evoluției diareei la cele două grupuri pe parcursul experimentului

La grupul D, spre deosebire de grupul placebo, creșterea excreției de oochisturi n-a fost acompaniată de înrăutățirea stării generale care s-a îmbunătățit încă din ziua a patra de investigații. Totodată s-a remarcat o scădere a procentului de viței excretori de fecale diareice însoțită de o îmbunătățire a stării generale.

La examenul fecalelor (zilele zero, patru, șapte și paisprezece) prin testul ELISA cu kit-ul Bio-K 151 (Digestiv ELISA kit®; Bio-X, Belgium) s-au evidențiat infecții cu rotavirusuri. Infecții cu *E. coli* F5 și coronavirusuri nu au fost diagnosticate.

Sinopticul probelor pozitive la cei doi enteropatogeni este prezentată în tabelul 27.

Tabel 27

Zile	Grupe	<i>Cryptosporidium</i> singur (%)	<i>Cryptosporidium</i> + rotavirus (%)	Rotavirus singur (%)
Ziua 0	Placebo	0	0	50
	Grup D	0	11,5	0
Ziua 4	Placebo	33	50	0
	Grup D	55,5	22,2	11,1
Ziua 7	Placebo	50	33,3	16,6
	Grup D	22,2	66,6	0
Ziua 14	Placebo	33,3	0	33,3
	Grup D	11,1	33,3	0

Prezența rotavirusurilor în cele două grupuri a fost semnalată preponderent la vițelii care proveneau din efective în care nu se practica vaccinarea împotriva unor enteropatogeni.

Diagnosticarea infecțiilor cu rotavirus încă din prima zi de examinare (tabel 27) a contribuit în mare măsură la creșterea îmbolnăvirilor și a excreției de oochisturi. Acest lucru pune sub semnul întrebării eficacitatea medicamentului testat asupra excreției de oochisturi de *Cryptosporidium* spp. deci, pentru demonstrarea adevăratului efect este necesară o monoinfecție doar cu protozoar.

Așa cum era de așteptat la grupul placebo, încă din prima zi de investigație, diareea a fost corelată cu scăderea performanțelor generale și cu apariția semnelor clinice ale deshidratării.

Prezența sau chiar creșterea excreției de oochisturi la grupul D (zilele patru-șapte) demonstrează ineficacitatea produsului testat (supliment nutrițional) asupra oochisturilor de *Cryptosporidium* spp. Cu toate acestea acest produs, deși nu a avut o acțiune anticriptosporidiană, a determinat reducerea perioadei cu diaree și ameliorări clinice, prin neutralizarea germeilor patogeni grefați pe leziunile produse de criptosporidii. Acțiunea antibacteriană a produsului testat a fost demonstrată de Spring și col. (2000) care au observat aderența și eliminarea enteropatogenilor *E. coli* și *Salmonella* spp. la fibrele hidrofobe de lecitină și mannanoligozaharide (MOS) [Spring și col., 2000]. Pe de altă parte aceste investigații demonstrează că, în lipsa unui tratament specific, în criptosporidioză, terapia cu o mixtură de substanțe energizante, săruri minerale și substanțe cu acțiune antimicrobiană este foarte importantă. Această afirmație se bazează pe scăderea procentului de viței excretori de fecale diareice însoțită de o îmbunătățire a stării generale la grupul D (fig. 12 și 13).

Nu s-au făcut comparații cu alte cercetări, deoarece, din studiul monografic cercetat, rezultă că acest produs nu a fost încă testat pe animale în criptosporidioză.

Concluzii

- ❖ Produsul testat nu reduce eliminările de oochisturi de *Cryptosporidium* spp.
- ❖ Sursa de electroliți și glucoză produce ameliorări clinice evidente în criptosporidioză prin reducerea diareilor la viței, și consecutiv, o îmbunătățire a stării generale.

b. Testarea eficacității anticriptosporidiene a produsului Scourban Plus®

Criptosporidioza, produsă de specii ale genului *Cryptosporidium*, este considerată o importantă boală parazită care determină diaree, deshidratare, scăderea în greutate și uneori moartea animalelor de fermă. La mieii nou născuți perioada prepatentă este de aproximativ cinci zile iar semnele clinice se mențin de la cinci zile până la două săptămâni.

Simptomul predominant este diareea ușoară până la severă însă, și alte semne ca depresia, anorexia și durerea abdominală sunt prezente. Un număr mare de oochisturi (10^8 - 10^{10} oochisturi/g) sunt prezente în fecalele diareice. Scăderea în greutate și mortalitatea asociate cu această boală induc pierderi economice importante pentru fermier.

Multitudinea medicamentelor testate până în acest moment cum sunt: lactatul de halofuginonă, paromomicinul și cyclodextrinul au demonstrat eficacitate în tratamentul și chemoprofilaxia criptosporidiozei la mieii nou născuți. Pe lângă aceste medicamente, și altele cum ar fi: sulfamidina, sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina, sulfadimetoxina au fost utilizate cu succes în combaterea acestei protozooze. În literatura de specialitate sunt citate numeroase cazuri când infecției criptosporidiene se pot asocia și alți agenți infecțioși cum ar fi: infecții produse de *E. coli* F5, *Salmonella* spp. sau *Clostridium* spp. Combinarea unor substanțe medicamentoase active pentru criptosporidii cu o medicație antiinfecțioasă și cu alte substanțe minerale și energizante, ar constitui o unealtă promițătoare în combaterea sindromului de diaree a tineretului ovin.

Având în vedere cele expuse anterior și că produsul Scourban Plus® (Bomac®) întrunește aceste calități, în acest studiu s-a urmărit determinarea unei posibile eficacități a acestui produs în combaterea criptosporidiozei la mieii nou născuți.

Materiale și metode

Studiul a fost efectuat pe un efectiv de 12 miei nou-născuți de rase autohtone care au fost împărțiți randomic și în mod egal în trei grupuri diferite.

Primul grup (grupul mieilor infectați și netratați) a constituit grupul martor.

Mieii din grupul II (grupul mieilor infectați și tratați preventiv) au fost tratați preventiv cu șase ore înainte de inocularea de oochisturi de *Cryptosporidium* spp. cu 0,5 ml/kg produs și încă timp de șapte zile după acesta.

Al treilea grup a fost constituit din miei infectați și tratați terapeutic cu 1ml/kg Scourban Plus® timp de șapte zile după apariția oochisturilor în fecale.

Mieii au fost infectați experimental în primele 24 de ore de după naștere cu 10^6 oochisturi de *Cryptosporidium* spp. suspendate în 5 ml de apă distilată sterilă. Inoculul a fost obținut din fecalele recoltate de la viței bolnavi de criptosporidioză de rasă Holstein-Friză. S-a respectat un protocol de concentrare (metoda apă-eter), purificare (Percoll[®] gradient) și cuantificare a oochisturilor, descrise în prealabil de Lorenzo și col. (1993). Fiecare grup de mieii a fost repartizat în boxe separate beneficiind de aceleași condiții stricte de igienă și de creștere și îngrijire. Criteriile de evaluare a eficacității tratamentului au fost: eliminarea de oochisturi, perioada prepatentă, perioada patentă și prezența diareei pe timpul tratamentului.

Materiile fecale au fost colectate zilnic de la toți mieii investigați, direct din rect depozitate în coprocultoare sterile și examinate în ziua recoltării. În funcție de consistența lor, fecalele au fost clasificate în: diareic lichide, moi și nediareic solide. În scopul evidențierii parazitismului cu *Cryptosporidium* spp. fecalele au fost prelucrate prin metoda etalării directe și examinate prin microscopie la obiectivul de imersie (ob. X 1000). Numărul oochisturilor în 10 câmpuri microscopice alese randomic a fost clasificată în cinci categorii: niciunul, foarte slab (un oochist) slab (2-5 oochisturi), mediu (6-10 oochisturi) și crescut (>10 oochisturi).

Produsul testat (Scourban Plus[®]) se prezintă sub formă de suspensie de mai multe substanțe active care conține: sulfamide (sulphadimidine, sulphaguanidine, sulphadiazine) antibiotice (sulfat de streptomycină, sulfat de neomicină) minerale și electroliți (clorură de sodiu, gluconat de calciu, sulfat de magneziu, clorură de potasiu) precum și numeroase substanțe nutritive (kaolin, pectin și glicin). Pentru diferențele între datele observate în diferite zile și între cele trei grupuri rezultatele au fost interpretate prin testul χ^2 .

Rezultate și discuții

Mieii din grupul martor (infectați experimental dar netratați) au început să excrete oochisturi de *Cryptosporidium* spp. încă din ziua a cincea și șasea de viață. Intensitatea eliminării oochisturilor a fost maximă la vârsta de șapte zile. Perioada patentă a fost de 9-12 zile. La majoritatea mieilor eliminarea de oochisturi a fost însoțită de excreția de fecale diareice timp de 7-9 zile (tabel 27).

Tabel 27

Vârsta mieilor (în zile)	Intensitatea eliminării de oochisturi și felul fecalelor											
	Grupul martor				Grupul preventiv				Grupul terapeutic			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
5	1 ^d	1 ^d	0 ^d	2 ^d	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	2 ^d	1 ^d	3 ^d	0 ⁿ
6	3 ^d	2 ^d	1 ^d	2 ^d	0 ⁿ	1 ^m	0 ⁿ	0 ⁿ	2 ^d	1 ^d	1 ^d	1 ⁿ
7	4 ^d	3 ^d	3 ^d	3 ^d	1 ^d	1 ^m	1 ^d	0 ⁿ	3 ^d	2 ^m	1 ^m	1 ^m
8	4 ^d	3 ^d	3 ^d	2 ^d	2 ^d	1 ^m	1 ^d	0 ⁿ	2 ^d	1 ^m	1 ^m	1 ^m
9	3 ^d	2 ^d	3 ^d	2 ^d	1 ^d	0 ⁿ	1 ^m	0 ⁿ	1 ^d	0 ^m	1 ^m	1 ⁿ
10	2 ^d	2 ^d	2 ^d	2 ^d	1 ^d	0 ⁿ	1 ^m	0 ⁿ	1 ^m	0 ^m	0 ⁿ	1 ⁿ
11	2 ^d	1 ^d	1 ^d	1 ^d	1 ^d	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	1 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	1 ⁿ
12	2 ^d	1 ^d	1 ^d	1 ^m	0 ^m	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	1 ⁿ
13	1 ^d	1 ^d	1 ^m	1 ^m	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ
14	1 ^m	1 ⁿ	0 ⁿ	1 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ
15	1 ^m	1 ^m	0 ⁿ	0 ^m	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ
16	1 ⁿ	0	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ

Legendă: d=fecale diareice; m=fecale moi; n= fecale nediareice;

0=niciun oochist; 1= un oochist pe câmp; 2= doi-cinci oochisturi pe câmp; 3= șase-zece oochisturi pe câmp; 4 = peste 10 oochisturi pe câmp;

La mieii din grupul preventiv (infectați experimental și tratați preventiv) excreția de oochisturi a început din ziua a șasea respectiv a șaptea de viață, perioada prepatentă fiind semnificativ mai lungă ($p < 0,05$) decât în cazul grupului martor. La acest grup numărul oochisturilor excretate a fost mult mai redusă comparativ cu grupul martor ($p < 0,01$). Perioada patentă a fost semnificativ mai redusă ($p < 0,05$) decât la grupul anterior (3-5 zile). Peak-ul eliminării oochisturilor a fost ziua a 8-a de viață. Doar la doi din trei mieii excretori de oochisturi fecalele au avut aspect diareic. Până în ultima zi de tratament preventiv, diareea s-a oprit la toți mieii din acest grup. La un miel infecția experimentală nu s-a realizat.

Majoritatea mieilor din grupul terapeutic (infecțați experimental și tratați terapeutic) au început să excrete oochisturi încă din ziua a cincea de viață. Intensitatea eliminării oochisturilor în această zi precum și felul fecalelor au fost aproape identice cu grupul martor. Peak-ul eliminării oochisturilor pentru toți mieii din acest grup a fost ziua a șaptea de viață. Perioada prepatentă a fost semnificativ mai scurtă ($p < 0,05$) decât la grupul preventiv și identică cu grupul martor. Numărul oochisturilor excretate a fost mai redusă decât la grupul martor dar mai crescută decât la grupul preventiv. Perioada patentă a fost de 4-7 zile. Acest interval este semnificativ mai redus ($p < 0,05$) decât cel întâlnit la grupul martor. La doi din patru miei diareea s-a redus după două zile de tratament, dar la unul s-a menținut până în a cincea zi. Un miel a continuat să excrete oochisturi chiar dacă aspectul fecalelor a fost nediareic (tabel 27).

Rezultatele acestui studiu au arătat în mod clar că tratamentul profilactic și terapeutic cu produsul Scourban Plus[®], a redus semnificativ intensitatea eliminării oochisturilor de *Cryptosporidium* spp. la mieii nou născuți precum și excreția de fecale diareice. De asemenea, în cazul grupului preventiv perioada prepatentă a fost semnificativ mai lungă ($p < 0,05$) decât la celelalte două grupuri. În cazul grupurilor cu tratament preventiv și terapeutic severitatea diareei a fost mai redusă.

Atașarea sporozoiților de *Cryptosporidium* spp. la membrana enterocitului și invazia celulară sunt două etape esențiale în patogeniza criptosporidiozei. În acest mecanism este implicat galactoz-N-acetyl-galactosamina (Gal/GalNAc) un epitop specific glicoproteinelor de pe suprafața enterocitelor și care, se găsește pe suprafața sporozoitului și mediază procesul de atașare a cestora. În unele lucrări este semnalată inhibarea acestui factor de către unele substanțe active cum ar fi sulfamidele și 2,4,6-triiodofenolul [Castro-Hermida și col., 2008; Fayer, 1992]. Este posibil ca și în cazul de față să fie vorba despre o asemenea activitate din partea celor trei sulfamide, pe de altă parte medicația antiinfecțioasă a contribuit în mare măsură la neevoluția altor infecții supraadăugate. Substanțele minerale, electrolitii și energizantele au contribuit la scăderea eliminării fecalelor diareice lucru demonstrat în cazul activității unui supliment nutrițional în infecția naturală cu *Cryptosporidium* spp.

Trebuie subliniat faptul că, la toate animalele tratate nu s-au semnalat simptome de toxicitate sau inapetență iar medicamentul testat se poate administra cu ușurință.

Concluzii

- ❖ Activitatea anticriptosporidiană a produsului Scourban Plus[®] demonstrată în acest studiu sugerează că acest medicament poate fi utilizat cu succes în controlul criptosporidiozei mieilor nou născuți atât preventiv cât și terapeutic.

IV. B. ÎNTOCMIREA UNUI PROTOCOL TIP DE CONTROL PARAZITOLIC

Mijloacele profilactice ce stau la îndemâna medicului veterinar în criptosporidioză sunt destul de reduse pentru că: boala este obscur cunoscută în practica veterinară, rezistența parazitului în mediul extern este ridicată, parazitul este infectant imediat după eliminare, are o specificitate de gazdă largă, puține dezinfectante sunt active asupra oochisturilor și, nu în ultimul rând, pentru că un număr mic de medicamente sunt eficiente și adesea rezultatele sunt inconstante. De aceea, orice program de control parazitologic trebuie să pornească de la o bună cunoaștere a biologiei parazitului și potențialului său biotic, a relației gazdă-parazit și, mai ales, de la o perfectă cunoaștere a epidemiologiei bolii. Dintre măsurile obligatorii ce trebuie luate se desprind cele privind distrugerea formelor infectante din mediu, perfecționarea tehnologiei de creștere, luarea unor măsuri împotriva rezervorilor biologici naturali și chimioprofilaxia.

a. Distrugerea formelor infectante din mediu

Extraordinara răspândire geografică și identificarea criptosporidiilor la un număr foarte mare de specii de animale denotă o bună adaptare a biologiei parazitului la variațiile condițiilor din mediul extern și de la locul de parazitare. În condițiile obișnuite de mediu oochisturile sunt rezistente. Animalele infectate elimină în mediu oochisturi care pot reprezenta o sursă de infecție imediat după eliminarea lor în mediu. Prolificitatea parazitului este foarte mare și se traduce prin excrețarea de milioane de oochisturi pe gramul de fecale la animalele parazitare. Materiile fecale protejează oochisturile de desicacție și cresc impermeabilitatea peretelui lor la moleculele de talie mică, ceea ce le face mai puțin vulnerabile la factorii letali din mediul ambiant. Deși numeroși agenți fizici și chimici au fost testați în criptosporidioză, puțini s-au dovedit a fi realmente eficiente. Doar aldehida formică 10% și amoniacul 5% distruge complet viabilitatea oochisturilor după un contact de 24 de ore, lucru greu de realizat în condiții de teren. De asemenea, hipocloritul de sodiu, în soluție 50%, fumigația cu vapori de formol sau

amoniac au o acțiune distructivă asupra criptosporidiilor. Având în vedere rezistența mare a criptosporidiilor la agenți chimici și fizici s-ar putea lua în considerare o dezinfecție complexă ce ar consta în: curățire mecanică și spălare prelungită cu apă caldă (70°C) sau vapori sub presiune, dezinfecție chimică și vid sanitar.

b. *Perfecționarea tehnologiilor de creștere*

Sistemul de creștere al animalelor este o latură importantă în epidemiologia bolii, lucru de care trebuie să se țină cont în controlul acestei parazitoză. Creșterea animalelor pe grătare este avantajoasă pentru că face ca dejecțiile să fie îndepărtate în mare parte, micșorând contactul cu acestea. De asemenea, este bine ca materialele din care sunt construite adăposturile și, mai ales, pardoseala să fie ușor de curățat și spălat. La păsări sistemul de creștere în baterii permite o eliminare rapidă a dejecțiilor și contactul redus al păsărilor cu elementele infectante. Igiena adăposturilor este foarte importantă, cu cât dejecțiile vor fi îndepărtate mai frecvent din adăposturi, cu atât contactul animalelor și ingestia de oochisturi va fi mai redusă. Acest lucru este valabil mai ales în adăposturile pentru viței, miei, iezi- specii la care frecvența bolii este mai mare. Este bine să se apeleze la o sterilizare biotermică a gunoierului de grajd sau sterilizare prin fermentare metanică cu obținere de biogaz. În sistemele de creștere cu grătare și suspensie a dejecțiilor pe pernă de apă se va avea grijă ca acestea să fie frecvent evacuate pentru a nu se produce inundări și contaminări ale adăposturilor. Împrăștierea, înainte de sterilizare, a dejecțiilor pe pășuni poate constitui o sursă de infecție pentru animale receptive. Și apele uzate pot constitui, în cazul în care provin din unități sau ferme unde evoluează boala, surse de infecție. Periodic, se va face controale privind prezența și concentrația oochisturilor de *Cryptosporidium spp.* din apă.

Igiena alimentației poate să influențeze incidența infecției, mai ales, la viței. Se are în vedere igiena mulsului și a ustensilelor care sunt utilizate pentru alăptare, de aceea se va acorda importanță cuvenită decontaminării acestora. Totodată instituirea unui vid sanitar care să țină cont de potențialul biotic al parazitului ar putea reprezenta o măsură eficace pentru diminuarea riscului infecției. Această măsură se pretează pentru toate speciile receptive.

c. *Măsuri împotriva rezervorilor biologici naturali*

Se cunoaște foarte bine că oochisturile de *Cryptosporidium spp.* își păstrează infectivitatea după un pasaj pe șobolan, două pasaje pe iezi și 12 pasaje pe șoareci. Această conservare în "vivo", poate explica în parte unele eșecuri în practică a metodelor de dezinfecție, rozătoarele pot fi suspectate ca sursă de infecție heteroloagă pentru animalele de interes economic, dar la fel și pisicile care pot ajunge în magazinele de furaje. De aceea deratizările repetate și interzicerea accesului pisicilor în depozitele de furaje pot fi utilizate ca mijloace de reducere a infecției. Congenerii excretori reprezintă sursa de infecție cea mai importantă. Ei sunt constituiți din purtători sănătoși (tineret sau adulte), animalele trecute prin boală și animalele bolnave. Ca măsuri ce trebuie luate în acest context, se numără: separarea animalelor bolnave, evitarea contactului animalelor excretoare cu cele receptive, lotizarea animalelor, creșterea separată a tineretului de adulte etc.

d. *Chimioprofilaxia*

Puține medicamente din cele testate s-au dovedit a avea o activitate profilactică. În plus este neeconomică utilizarea unor medicamente, care nu sunt deloc ieftine, pentru profilaxia criptosporidiozei, în condițiile în care rezultatele sunt inconstante. O măsură ofensivă în controlul criptosporidiozei combină tratamentul simptomatic cu cel specific. Utilizarea lactatului de halofuginonă, cel mai eficient medicament disponibil pentru tratarea criptosporidiozei bovine, ar reprezenta o soluție. Pe lângă acest medicament se mai pot utiliza cu succes paromomycinul, lasalocidul, serul bovin concentrat (BSC), sulfaquinoxalina, decoquinatul sau α -ciclodextrina. Având în vedere localizarea parazitului și relația specială criptosporidie-gazdă, relatărilecu privire la utilizarea vaccinării în criptosporidioză sunt cvasinule. Protecția imunitară este, mai ales, locală și mai puțin umorală. Dintre produsele comerciale de pe piața românească recomandăm produsul Diakur Plus® și Scourban Plus®, ultimul dintre ele fiind socotit un produs eficient în tratamentul profilactic și curativ al criptosporidiozei.

Bibliografie

1. **ABD-EL-WAHED, M.M.** 1999. *Cryptosporidium* infection among sheep in Qalubia Governatore, Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 29: 113-118
2. **ABE, N., MATSUBAYASHI, M., KIMATA, I., ISEKI, M.** 2006. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitol. Res.* 99: 303-305.
3. **ABOU-EISHA, A.M., ABDEL-AAL, A.A.** 1995. Prevalence of some zoonotic parasites in dog faecal deposits in Ismailia city. *Assiut Vet. Med. J.* 33: 1995.
4. **ABRAHAM, G., ROEDER, P.L., ROMAN ZEWDU** 1992. Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. *J. Tropical Animal Health and Production*, 24:1573-1589.
5. **ALONSO-FRESAN, M.U., GARCIA-ALVAREZ, A., SALAZAR-GARCIA, F., VAZQUEY-CHAGOYAN, J.C., PESACADOR-SALAS, N., SALTIJERAL-OAXACA, J.,** 2005. Prevalence of *Cryptosporidium* in asymptomatic sheep in family flocks from Mexico State. *J. Vet. Med.* 52: 482-483.
6. **ALVES, M., MATOS, O., ANTUNES, F.** 2001. Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 95:627-632.
7. **ALVES, M., XIAO, L., LEMOS, V., ZHOU, L., CAMA, V., DA CUNHA, M.B., MATOS, O., ANTUNES, F.** 2005. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo. *Parasitol. Res.* 97: 108-112.
8. **ALVES, M., XIAO, L., SULAIMAN, I., LAL, A.A., MATOS, O., ANTUNES, F.** 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2744-2747.
9. **ARROWOOD, M.J., STERLING, C.R.,** 1989. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1490-1495.
10. **ATWILL, E.R., SWEITZER, R.A., PEREIRA, M.G., GARDNER, I.A., VAN VUREN D. A., BOYCE W.M.** 1997. Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3946-3949.
11. **BECKHER, I.K., ROBERTSON, I.D., FRASER, D.M., PALMER, D.G., THOMPSON, R.C.,** 2004. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Vet. Parasitol.* 123: 1-9.
12. **BORNAY-LLINARES, F.J., DA SILVA, A.J. MOURA, I.N.S., MYJAK, P., PIETKIEWICZ, H., KRUMINIS- LOZOWSKA, W., GRACZYK, T.K. , PIENIAZEK, N.J.** 1999. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1455-1458.
13. **BRENNER, J., ELAD, D., MARKOVICS, A., GRINBERG, A., TRAININ, Z.,** 1993. Epidemiological study of neonatal calf diarrhoea in Israel-a one-year survey of faecal samples. *Isr. J. Vet. Med.* 48, 113-116.
14. **BROGLIA, A., RECKINGER, S., CACCIÓ, S.M., NÖCKLER, K.** 2008. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Vet. Parasitol.*, 154: 8-13.
15. **BUGG, R.J., ROBERTSON, I.D., ELLIOT, A.D., THOMPSON, R.C.A.** 1999. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. *Vet. J.* 157: 295-301.
16. **CASTRO-HERMIDA, J.A., GARCIA-PRESEDO I, GONZALEZ-WARLETA, M., MEZO, M., FENOY, S., RUEDA, C., AGUILA, C.,** 2008. Activity of an anti-inflammatory drug against cryptosporidiosis in neonatal lambs. *Vet. Parasitol.*, 155:308-313.
17. **CAUSAPÉ, A.C., QUÍLEZ, J., SANCHEZ-ACEDO, C., DEL-CACHO, E., LOPEZ-BERNAD, F.** 2002. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 104: 287-298.
18. **CAUSAPÉ, A.C., QUÍLEZ, J., SÁNCHEZ-ACEDO,, DEL CACHO, E.** 1996. Prevalence of intestinal parasites, including *Cryptosporidium parvum*, in dogs in Zaragoza city, Spain. *Vet. Parasitol.* 67: 161-167.
19. **CHALMERS, R.M., FERGUSON, C., CACCIÒ, S., GASSER, R.B., ABS EL-OSTA, Y.G., HEIJNEN, L., XIAO, L., ELWIN, K., HADFIELD, S., SINCLAIR, M. AND STEVENS, M.** 2005. Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *Int. J. Parasitol.* 35: 397-410.
20. **CHECKLEY, W., EPSTEIN, L. D., GILMAN, R.H., BLACK, R.E., CABRERA, L., STERLING, C.R.,** 1998. Effects of *Cryptosporidium parvum* infection in Peruvian children: growth faltering and subsequent catch-up growth. *Am. J. Epidemiol.*, 148:497-506.
21. **CIRAK, V.Y., BAUER, C.** 2004. Comparison of conventional coproscopical methods and commercial coproantigen ELISA kits for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dogs and cats. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 117: 410-413.

22. **COCKLIN, T., FARBER, J., PARRINGTON, L., DIXON, B.** 2007. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet. Parasitol.*, **150**: 297-305.
23. **CURRENT, W.L., REESE, N.C., ERNST, J.V., BAILEY, W.S., HEYMAN, M.B., WEINSTEIN, W.M.**, 1983. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N. Engl. J. Med.*, **308**:1252-1257.
24. **DĂRĂBUȘ, GH.**, 1996. Criptosporidioza: cercetări privind etiologia, epidemiologia, patogenia, diagnosticul și tratamentul în infecțiile naturale și experimentale., Teză de doctorat, facultatea de Medicină Veterinară –Timișoara.
25. **DE GRAAF, C.D., VANOPDENBOSCH, E., ORTEGA-MORA, L.M., ABBASSI, H., PEETERS, J.E.**, 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.*, **29**:1269-1287.
26. **DE la FUENTE, R., GARCIA, A., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A., LUZON, M., CID, D., GARCIA, S., ORDEN, J.A., GOMEZ-BAUTISTA, M.**, 1998. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Preventive Veterinary Medicine* **36**: 145-152.
27. **DE la FUENTE, R., LUZON, M., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A. GARCIA, A., CID, D., ORDEN, J.A., GARCIA, S., SANZ, R., GOMEZ-BAUTISTA, M.**, 1998. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-days-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet Parasitol.* **80**: 179-185.
28. **EDERLI, B.B., RODRIGUES, M.F., CARVALHO, C.B.** 2005. Oocysts of the genus *Cryptosporidium* in domiciliated dogs from city of Campos dos Goytacazes, the State of Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **14**: 129–131.
29. **EGYED, Z., SRÉTER, T., SZÉLL, Z., VARGA I.**, 2002. Characterization of *Cryptosporidium* spp. recent developments and future needs. *Vet. Parasitol.*, **111**:103-114.
30. **EL-AHRAF, A., TACAL, J.V., SOBIH, M., AMIN, M., LAWRENCE, W., WILCKE, B.W.** 1991. Prevalence of cryptosporidiosis in dogs and human beings in San Bernardino County, California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **198**: 631–624.
31. **EPE, C., COATI, N., SCHNIEDER, T.** 2004. Results of parasitological examination of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **111**: 243–247.
32. **FAGAN, J.G., DWYER, P.J., QUINLAN, J.G.**, 1995. Factors that may affect the occurrence of enteropathogens in the faeces of diarrhoeic calves in Ireland. *Irish Vet. J.* **48**, 17-21.
33. **FARIZAWATI, S., LIM, Y.A., AHMAD, R.A., FATIMAH, C.T. SITI-NOR, Y.** 2005. Contribution of cattle farms towards river contamination with *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Sungai Langat Basin *Trop. Biomed.* **22**: 89–98.
34. **FAYER, R.**, 1992. Activity of sulfadimethoxine against cryptosporidiosis in dairy calves. *J. Parasitol.* **78**:534-537
35. **FAYER, R., MORGAN, U., UPTON, S. J.**, 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitology.*, **30**:1305-1322.
36. **FAYER, R., SANTIN, M., TROUT, J.M., GREINER, E.** 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1- to 2-year-old dairy cattle in eastern United States. *Vet. Parasitol.* **135**:105-112.
37. **FAYER, R., SPEER, C., DUBEY J.**, 1997. The general biology of *Cryptosporidium*, p. 1-41. In R. Fayer (ed), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
38. **FAYER, R., TROUT, J.M., XIAO, L., MORGAN, U.M., LAL, A.A., DUBEY, J.P.** 2001. *Cryptosporidium canis* from domestic dogs. *J. Parasitol.* **87**: 1415-1422.
39. **FAYER, R., XIAO, L.**, 2007. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Second Edition. CRC Press., Boca Raton, Fla.
40. **FELTUS, D.C., GIDDINGS, C.W., SCHNECK, B.L., MONSON, T., WARSHAUER, D., MCEVOY, J.M.** 2006. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* **44**(12): 4303–4308.
41. **FENG, Y., ORTEGA, Y., HE, G., DAS, P., XU, M., ZHANG, X., FAYER, R., GATEI, W., CAMA V., XIAO, L.** 2006. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Parasitol.* **144**:1-9.
42. **FONTANARROSA, M.F., VEZZANI, D., BASABE, J., EIRAS, D.E.** 2006. An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. *Vet. Parasitol.* **136**: 283–295.

43. GARCIA, A., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A., ORDEN, J.A., CID, D., SANZ, R., GOMEZ-BAUTISTA, M., FUENTE, R., 2000. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comp. Immun. Microbiology & Inf. Diseases.*, **23**: 175-183.
44. GATEI, W., SUPUTTAMONGHOL, Y., WAYWA, D., ASHFORD, R.W., BAILEY, J., GREENSILL, W.J., BEECHING, N.J., HART, C.A., 2002. Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **96**:797-802.
45. GEURDEN, T., GOMA, F.Y., SIWILA, J., PHIRI, I.G.K., MWANZA, A.M., GABRIEL, S., CLAEREBOUT, E., VERCRUYSSSE J. 2006. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia *Vet. Parasitol.* **138**: 217–222.
46. GRACZYK, T.G., CRANFIELD, M.R., FAYER, R. 1996. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (IFA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**: 274-279.
47. GUSELLE, N., APPELBEER A.J., OLSON M.E. 2003. Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet. Parasitol.* **113**: 7–18.
48. GUYOT, K., FOLLET-DUMOULIN, A., LELIEVRE, E., SARFATI, C., RABODORININA, M., NEVEZ, G., CAILLIEZ, J.C., CAMUS, D., DEI-CAS, E., 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.*, **39**:3472-3480.
49. IMRE, K., DĂRĂBUȘ, GH., ILIE, M., PALCA MIRELA, 2007 - Studii morfometrice asupra oocisturilor de criptosporidii, în preparatul nativ, izolate de la viței - publicat la București în *Scientific Works- Veterinary Medicine C Series LII* 2007 pag. 428-433; ISSN: 1222 – 5304.
50. IMRE, K., DĂRĂBUȘ, GH., ILIE, M., PALCA MIRELA, 2007 - Studiu epidemiologic prin ELISA asupra parazitismului cu criptosporidii și alți enteropatojeni, la viței– publicat la Cluj – Napoca în *Bulletin USAMV- CN, 64/2007 (1-2)* pag. 454-458; ISSN: 1843-5270.
51. IMRE, K., DĂRĂBUȘ, GH., ILIE, M.S., MIRELA PALCA, TAMASY L. 2008. EVALUATION OF SOME DIAGNOSIS METHODS IN CRYPTOSPORIDIOSIS in *Scientific Works- Veterinary Medicine C Series LII* 2007 pag. 428-433.
52. IMRE¹, K., PĂCURAR,² C.-comunicare- 2008 - Identificarea oocisturilor de criptosporidii din etalatul de fecale prin imunofluorescență directă - La sesiunea de comunicări științifice Iași, 5-6 iunie 2008; vol. (51)/2008; ISSN 1454-7406.
53. JOACHIM, A., KRULL, T., SCHWARZKOPF, J., DAUGSCHIES, A., 2003. Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Vet. Parasitol.*, **112**:277-288.
54. JOHNSON M.W., FITZGERALD, G.R., WELTER, M.W., WELTER, C.J., 1992. The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. *Vet. Med.* **4**:382-386.
55. JOHNSTON, J., GASSER, R.B. 1993. Copro-parasitological survey of dogs in Southern Victoria. *Aust. Vet. Pract* **23**: 127–131.
56. JOHNSTON, S.P., BALLARD, M.M., BEACH, M.J., CAUSER, L., and WILKINS, P.P. 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 623-626.
57. KAMINJOLO, J.S., ADESIYUN, A.A., LOREGNARD, R., KITSON-PIGGOTT, W. 1993. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in livestock in Trinidad and Tobago. *Vet. Parasitol.* **45**: 209–213.
58. KANETA, Y. NAKAI, Y. 1998. Survey of *Cryptosporidium* oocysts from mature cattle in a slaughterhouse *J. Vet. Med. Sci.* **60**: 585–588.
59. KATSUDA, K., KOHMOTO, M., KAWASHIMA, K., TSUNEMITSU, H., 2006. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs *J. Vet. Diagn. Invest.* **18**:350-354
60. KHUBNANI, H., SIVARAJAN, K., KHUBNANI, A.H. 1997. Study of cryptosporidiosis in a rural area of Maharashtra *Indian J. Pathol. Microbiol.* **40**: 33–36.
61. KIM, J.T., WEE, S.H., LEE, C.G. 1998. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in canine fecal samples by immunofluorescence assay. *Kor. J. Parasitol.* **36**: 147–149. (Coreea)
62. KOUDELA, B., VITOVEC, J., DAT, D.T., LAN, P.D. 1986. Preliminary communication on cryptosporidiosis of pigs in Vietnam. *Folia Parasitol.* **33**: 301–304.
63. KOYAMA, Y., SATOH, M., MAEKAWA, K., HIKOSAKA, K. AND NAKAI Y. 2005. Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan. *Vet. Parasitol.* **130**: 323–326.
64. KUMAR, D., SREEKRISHNAN, R., DAS, S. S. 2004. Cryptosporidiosis in man and animals in Pondicherry. *Ind. J. Anim. Sci.* **74**: 261–263.
65. LANGKJAER, R.B., VIGRE, H., ENEMARK, H.L., MADDOX-HYTTEL, C. 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology.* **134**: 339- 350.

66. LEARMONTH, J.J., IONAS, G., PITA, A.B., COWIE, R.S. 2003. Identification and genetic characterisation of *Giardia* in *Cryptosporidium* strains in human and dairy cattle in the waikato Region of New Zealand. *Water Sci. Technol.* **47**: 21-26.
67. LEONI, F., AMAR, C., NICHOLS, G., PEDRAZA-DIAZ, S., MCLAUCHLIN, J. 2006. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2,414 humans with diarrhea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.* **55**: 703-707.
68. LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., HOERR, F.J., 1990. Small intestinal cryptosporidiosis in cockatiels associated with *Cryptosporidium baileyi*-like oocysts. *Avian Dis.*, **34**:791-793
69. LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., OWENS, D.S., MORGAN, U.M., MEAD, J.R., BLAGBURN, B.L., 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle. (*Bos taurus*). *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47**:91-95.
70. LLORENTE, M.T., CLAVEL, A., GONZALEZ, I. M.P., VAREA, M., SERAL, C., BECERRIL, R., SUAREZ, L., GOMEZ-LUS, R., 2007. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitol. Int.* **56**: 201-205.
71. LORENZO, M.J., ARES-MAYAS, M.E., VILLACORTA, I., DURAN, D., 1993. Effect of ultraviolet disinfection of drinking water on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Parasitol.* **79**:67-70
72. MADDOX-HYTTEL, C., LANGKJÆR, R.B., ENEMARK, H.L. AND VIGRE, H. 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs-occurrence and management associated risk factors. *Vet. Parasitol.* **141**: 48-59.
73. MAHDI, N.K., ALI, N.H. 2002. Cryptosporidiosis among animal handlers and their livestock in Basrah, Iraq. *East Afr. Med. J.* **79**: 550-553.
74. MAJEWSKA, A.C., WEMER, A., SULIMA, P., LUTY, T. 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. *Vet. Parasitol.* **89**: 269-275.
75. MALLON, M., MACLEOD, A., WASTLING, J., SMITH, H., REILLY, B., AND TAIT, A. 2003A. Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *J. Mol. Evol.* **56**, 407-417.
76. MCLAUCHLIN, J., AMAR, C., PEDRAZA-DIAZ, S., NICHOLS, G.L., 2000. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J. Clin. Microbiol.*, **38**:3984-3990.
77. MEAMAR, A.R., GUYOT, K., CERTAD, G., DEI-CAS, E., MOHRAZ, M., MOHEBALI, M., MOHAMMAD, K., MEHBOD, A.A., REZAIE, S., REZAIAN, M., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals in Iran. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1033-1035.
78. MENDONÇA, C., ALMEIDA, A., CASTRO, A., DELGADO, L.M., SOARES, S., CORREIA DA COSTA, J.M., CANADA, N. 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet. Parasitol.* **147**:47-50.
79. MIŠIĆ, Z., KATIĆ-RADIVOJEVIĆ, S. A., KULIŠIĆ, Z. 2003. *Cryptosporidium* infection in nursing, weaning and post-weaned piglets and sows in the Belgrade district. *Acta Vet.* **53**: 361-366.
80. MIŠIĆ, Z., KATIĆ-RADIVOJEVIĆ, S. A., KULIŠIĆ, Z. 2006. *Cryptosporidium* infection in lambs and goat kids in Serbia. *Acta Vet.* (Beograd) **56**: 49-54.
81. MOGA MÂNZAT, R., 2001. Boli produse de *E. coli*, în Boli infecțioase ale animalelor – Bacterioze, sub red. MOGA MÂNZAT, R., Ed. Brumar, Timișoara (pag 1-25)
82. MOGA MÂNZAT, R., 2005. Boli virotice și prionice ale animalelor. Ed. Brumar, Timișoara (rota - 528-530; corona 307; /rota-530-531; corona 307-312)
83. MORGAN, U.M., MONIS, P.T., XIAO, L., LIMOR, J., SULAIMAN, I.M., RAIDAL, S., O'DONOGHUE, P., GASSER, R., MURRAY, A., FAYER, R., BLAGBURN, B.L., LAL, A.A., THOMPSON, R.C., 2001. Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.*, **31**:289-296.
84. MORGAN, U.M., WEBER, R., XIAO, L., SULAIMAN, I., THOMPSON, R. C., NDIRITU, W., LAL, A.A., MOORE, A., DEPLAZES, P., 2000. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J. Clin. Microbiol.*, **38**:1180-1183.
85. MORGAN, U.M., XIAO, L., LIMOR, J., GELIS, S., RAIDAL, S.R., FAYER, R., LAL, A.A. ELLIOT, A., THOMPSON, R.C., 2000. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). *Aust. Vet. J.*, **78**:182-183
86. NACIRI, M., LEFAY, M.P., MANCASSOLA, R., POIRIER, P., CHERMETTE, R., 1999. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Vet. Parasitol.*, **85**: 245-257.

87. **NAGY, B.** 1995. Epidemiologic data on *Cryptosporidium parvum* infection of mammalian domestic animals in Hungary. *Magyar Allatorvosok Lapja* **50**: 139–144.
88. **NGUYEN, S.T., NGUYEN, D.T., LE, D.Q., LE HUA, L.N., NGUYEN, T.V., HONMA, H., NAKAI, Y.** 2007. Prevalence and first genetic identification of *Cryptosporidium* spp. in cattle in central Viet Nam. *Vet. Parasitol.* **150**:357-361.
89. **NICHOLS, R.A., CAMPBELL, B.M., SMITH, H.V.** 2006. Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* oocysts isolated during water monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5428–5435.
90. **NIZEYI, J.B., CRANFIELD, M.R., GRACZYK, T.K.** 2002. Cattle near the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda, as a reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* for local community and free-ranging gorillas. *Parasitol. Res.* **88**: 380–385.
91. **O'DONOGHUE, P.J., THAM, V.L., DE SARAM, W.G., PAULL, K.L., MCDERMOTT, S.** 1987. *Cryptosporidium* infections in birds and mammals and attempted cross-transmission studies. *Vet. Parasitol.* **26**: 1–11.
92. **ONG, C.S., EISLER, D.L., ALIKHANI, A., FUNG, V.W., TOMBLIN, J., BOWIE, WR., ISAAC-RENTON, J.L.,** 2002. Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**:263-268.
93. **ONG, C.S.L., EISLER, D.L., GOH, S. H., TOMBLIN, J., AWAD-EL-KARIEM, F.M., BEARD, C.B., XIAO, L.H., SULAIMAN, I., LAL, A., FYFE, M., KING, A., BOWIE, W.R., ISAAC-RENTON, J.L.** 1999. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis outbreaks and transmission in British Columbia, Canada. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **61**:63-69.
94. **OTTO, V.P., ELSCHNER, M., GÜNTNER, H., SCHULZE, F.,** 1995. Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Rotaviren, Coronaviren, Kryptosporidien und enterotoxigenen *E. coli* im Kot durchfallkranker Kälber. *Tierärztl Umschau* **50**, 80-86.
95. **PARK, J.H., GUK, S.M., HAN, E.T., SHIN, E.H., KIM, J.L., CHAI, J.Y.** 2006. Genotype analysis of *Cryptosporidium* prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* **44**: 27-33.
96. **PENG, M.M., WILSON, M.L., HOLLAND, R.E., MESHNICK, S.R., LAL, A.A., XIAO, L.** 2003. Genetic diversity of *Cryptosporidium* in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. *Parasitol. Res.* **90**:175-180.
97. **PENG, M.M., XIAO, L., FREEMAN, A.R., ARROWOOD, M.J., ESCALANTE, A.A., WELTMAN, A. C., ONG, C.S., MAC-KENZIE, W.R., LAL, A.A., BEARD, C.B.,** 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg. Infect. Dis.*, **3**:567-573.
98. **PÉREZ, E., KUMMELING, A., JANSSEN, M.M.H., JIMÉNEZ, C., ALVARADO, R., CABALLERO, M., DONADO, P., DWINGER, R.H.,** 1997. Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilárán, Costa Rica. *Preventive Veterinary Medicine* **33**: 195-205.
99. **PIENIAZEK, N.J., BORNAY-LLINARES, F.J., SLEMENDA, S.B., DA SILVA, A.J., MOURA, I.N., ARROWOOD, J., DITRICH, O., ADDISS, D. G.,** 1999. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerg. Infect. Dis.*, **5**:444-449.
100. **PLUTZER, JUDIT, KARANIS, P.** 2007. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Vet. Parasitol.* **146**:357-362.
101. **POHJOLA, S.** 1984. Survey of cryptosporidiosis in feces of normal healthy dogs. *Nord. Vet.-Med.* **36**: 189–190.
102. **QUÍLEZ, J., SÁNCHEZ-ACEBO, C., DEL CACHO, E., CLAVEL, A., CAUSAPÉ, AC,** 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* **66**, 139-146.
103. **QUÍLEZ, J., SÁNCHEZ-ACEDO, C., CLAVEL, A., DEL CACHO, E., LÓPEZ-BERNAD, F.** 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* **67**: 83–88.
104. **REYNOLDS, DJ, MORGAN, JH, CHANTER, N, JONES, PW, BRIDGER, JC, DEBNEY, TG, BUNCH, KJ.** 1986. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Vet. Rec.* **119**, 34-39.
105. **ROBINSON, G., THOMAS, A.L., DANIEL, R.G., HADFIELD, S.J., ELWIN, K., CHALMERS, R.M.** 2006. Sample prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium andersoni* within a dairy herd in the United Kingdom. *Vet. Parasitol.* **142**:163-167.
106. **ROY, S.S., SARKAR, S., BATABYAL, S., PRAMANIK, K.A., DAS, P.** 2006. Observations on the epidemiology of bovine cryptosporidiosis in India. *Vet. Parasitol.*, **141**: 330-333.
107. **RYAN, U.M., XIAO, L.,** 2008. *Cryptosporidium* in birds. In *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. pag 395 Second Edition by Fayer, R., and Xiao, L., C.R.C. Press
108. **SANTIN, M., TROUT, J.M.** 2008. *Livestock in Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Second Edition. CRC Press., Boca Raton, Fla. 2007.

109. SANTIN, M., TROUT, J.M., FAYER, R. 2007. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet. Parasitol.* 146: 17–24.
110. SANTIN, M., TROUT, J.M., FAYER, R. 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet. Parasitol.*, 155:15-23.
111. SANTIN, M., TROUT, J.M., XIAO, L., ZHOU, L., GREINER, E., FAYER, R., 2004. Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.*, 122:103-117.
112. SANTIN, M., TROUT, J.M., XIAO, L., ZHOU, L., GREINER, E., FAYER, R., 2004. Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.*, 122:103-117.
113. SIMPSON, J.W., 1992. Cryptosporidiosis in newborn red deer (*Cervus elaphus*). *Vet. Rec.* 130:116-118.
114. SIMPSON, J.W., BURNIE, A.G., MILES, R.S., SCOTT, J.L., LINDSAY, D.I. 1988. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* infection in dogs in Edinburgh. *Vet. Rec.* 123: 445 (Simpson)
115. SMITH, H.V., NICHOLS, R.A., MALLON, M., MACLEOD, A., TAIT, A., REILLY, W.J., BROWNING, L.M., GRAY, D., REID, S.W., WASTLING, J.M. 2005. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. *Vet. Rec.* 156:710-711.
116. SNODGRASS, D.R., TERZOLO, H.R., SHERWOOD, D., CAMPBELL, I., MENZIES, J.D., and SYNGE B.A., 1986. Aetiology of diarrhoea in young calves. *The Veterinary Record* 119:31-34.
117. SOLANA, A., GÓMEZ-TEJEDOR, C., MARCOTEGUI, M.A., CASTRO, J.M., 1985. Diarrea de los terneros. Estudio preliminar de la incidencia de rotavirus en España. *Med. Vet.* 2, 299-304.
118. SPRING P., WENK C., DAWSON K.A., NEWMAN K.E. 2000. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Science* 79: 205-211.
119. SRÉTER, T., VARGA, I., 1999. Cryptosporidiosis in birds—a review. *Vet. Parasitol.* 87:261-279
120. STANTIC-PAVLINIC, M., XIAO, L., GLABERMAN, S., LAL, A.A., ORAZEN, T., RATAJ-VERGLEZ, I., LOGAR, A.J., BERCE, I., 2003. Cryptosporidiosis associated with animal contacts. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 115:125-127.
121. STARKEY, S.R., KIMBER, K.R., WADE, S.E., SCHAAF, S.L., WHITE, M.E., MOHAMMED, H.O. 2006. Risk factors associated with *Cryptosporidium* infection on dairy farms in a New York State watershed. *J. Dairy Sci.* 89: 4229-4236.
122. STARKEY, S.R., ZEIGLER, P.E., WADE, S.E., SCHAAF, S., MOHAMMED H.O. 2006. Factors associated with shedding of *Cryptosporidium parvum* versus *Cryptosporidium bovis* among dairy cattle in New York State. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229:1623-1626.
123. STERLING, C.R., ARROWOOD, M.J., 1986. Detection of *Cryptosporidium* sp. infections using a direct Immunofluorescent assay. *Pediatr. Infect. Dis.* 5:139-142.
124. STOCKDALE, D.H., SPENCER, J.A., BLAGBURN L.B., 2007. Prophylaxis and chemotherapy in cryptosporidiosis. pp. 255-289 In R. Fayer (ed), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
125. STRONG, W.B., GUT, J., NELSON, R.G. 2000. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect. Immun.* 68: 4117–4134.
126. STURDEE, A.P., BODLEY-TICKELL, A.T., ARCHER, A., CHALMERS, R.M., 2003. Long term study of *Cryptosporidium* prevalence on lowland farm in the United Kingdom. *Vet. Parasitol.* 116: 97-113.
127. SULAIMAN, I.M., HIRA, P.R., ZHOU, L., AL-ALI, F.M., AL-SHELAHI, F.A., SHWEIKI, H.M., IQBAL, J., KHALID, N., XIAO, L., 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin Microbiol.* 43: 2805–2809.
128. SULAIMAN, I.M., MORGAN, U.M., THOMPSON, R.C., LAL, A.A., XIAO, L., 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:2385-2391.
129. SVOBODOVA, V. KONVALINOVA, J., SVOBODOVA, M. 1994. Coprological and serological findings in dogs and cats with giardiasis and cryptosporidiosis. *Acta Vet. Brno* 63: 257–262.
130. TAMER, G.S., TURK, M., DAGCI, H., PEKTAS, B., GUY, E.C., GURUZ, A.Y., UNER, A., 2007. The prevalence of cryptosporidiosis in Turkish children, and genotyping of isolates by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Saudi Med. J.* 28: 1243–1246.
131. THOMAZ, A., MEIRELES, M.V., SOARES, R.M., PENA F.J.H., GENNARI, S.M. 2007. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state São Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 150:291-296.

132. THOMPSON, H.P., DOOLEY, J.S.G., KENNY, J., McCOY, M., LOWERY, C.J., MOORE, J.E., XIAO, L. 2006. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol. Res.* **100**:619-624.
133. THOMPSON-ANDREW, R.C. ARMSON, A., RYAN, U.M., 2003. *Cryptosporidium*: from molecules to disease. *First. Ed. Elsevier*, Amsterdam.
134. TIANGTIP, R., JONGWUTIWES, S., 2002. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health.*, **7**:357-364.
135. TROTZ-WILLIAMS, L.A., MARTIN, D.S., GATEI, W., CAMA, V., PEREGRINE, A.S., MARTIN, S.W., NYDAM, D.V., JAMIESON, F., XIAO, L. 2006. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitol. Res.* **99**: 346–352.
136. VILLACORTA, I., ARES-MAZAS, E. AND LORENZO, M.J. 1991. *Cryptosporidium parvum* in cattle, sheep and pigs in Galicia (N.W. Spain). *Vet. Parasitol.* **38**: 249–252.
137. VIOR, C., CĂTANĂ, V., COSOROABĂ, I., DĂRĂBUȘ, GH., ȘTEFAN, N., POPOVICI, V., ȚIBRU, I., 2002. Elemente de epidemiologie a bolilor transmisibile. Ed. Orizonturi Universitare, Timișoara.
138. WATANABE, Y., YANG, C.H., OOI, H.K. 2005. *Cryptosporidium* infection in livestock and first identification of *Cryptosporidium parvum* genotype in cattle feces in Taiwan. *Parasitol. Res.* **97**: 238–241.
139. WEE, S.H., JOO, H.D. KANG, Y.B. 1996. Evaluation for detection of *Cryptosporidium* oocysts in diarrheal feces of calves. *Korean J. Parasitol.* **34**: 121–126.
140. WEITZEL, T., DITTRICH, S., MOHL, I., ADUSU, E., JELINEK, T., 2006. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:656-659;
141. WIELER, L.H., ILIEFF, A., HERBST, W.B., VIELER, E., BAUERFEIND, R., FAILING, K., KLOS, H., WENGERT, D., BALJER, G., ZAHNER, H., 2001. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *J. Vet. Med* **48**:151-159.
142. WIELINGA, P.R., DE VRIES, A., VAN DER GOOT, T.H., MANK, T., MARS, M.H., KORTBEEK, L.M., VAN DER GIESSEN, J.W.B., 2008. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int. J. Parasitol.* **38**, 809–817.
143. WU, Z., NAGANO, I., BOONMARS, T., NAKADA, T. AND TAKAHASHI, Y. 2003. Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP single standard conformational polymorphism analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4720–4726.
144. XIAO, L., BERN, C., ARROWOOD, M., SULAIMAN, I., ZHOU, L., KAWAI, V., VIVAR, A., LAL, A. A., GILMAN, R.H., 2002. Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. *J. Infect. Dis.*, **185**:1846-1848.
145. XIAO, L., BERN, C., LIMOR, J., SULAIMAN, I., ROBERTS, J., CHLECKLEY, W., CABRERA, L., GILMAN, R.H., LAL, A.A. 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.*, **183**:492-497.
146. XIAO, L., FAYER R., RYAN, U., 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health, *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**:72-97.
147. XIAO, L., HERD, R. AND RINGS, D. 1993. Diagnosis of *Cryptosporidium* on a sheep farm with neonatal diarrhea by immunofluorescence assays. *Vet. Parasitol.* **47**: 17–23.
148. XIAO, L., HERD, R.P. AND BOWMAN, G.L. 1994. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. *Vet. Parasitol.* **52**: 331–336.
149. XIAO, L., RYAN, U.M. 2004. *Cryptosporidiosis*: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **17**:483-490.
150. XIAO, L., ZHOU, L., SANTÍN, M., YANG, W. AND FAYER, R. 2007. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitol. Res.* **100**: 701–706
151. XIAO, L.H., ESCALANTE, L., YANG, C.F., SULAIMAN, I., ESCALANTE, A.A., MONTALI, R., FAYER, R., LAL, A.A. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**:1578-1583.
152. YU, J.R., SEO, M. 2004. Infection status of pigs with *Cryptosporidium parvum*. *Korean J. Parasitol.* **42**: 45–47.
153. http://harta.infoturism.ro/Romania/Bihor/harta/harta_Bihor.jpg
154. http://harta.infoturism.ro/Romania/Timis/harta/harta_Timis.jpg
155. <http://www.roturism.com/img/judete/Arad.jpg> (Arad harta)
156. <http://www.turism-romania.ofertacazare.ro/wp-content/uploads/2007/09/caras.jpg>
157. ***** (BIO 073) (Bio-X Diagnostics, Belgia)- Anti *Cryptosporidium parvum* monoclonal antibody labeled with fluorescein isothiocyanate – reagent for direct immunofluorescence - prospect 2007.

- 158.***** BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 070) (Bio-X Diagnostics, Belgium)- Antigenic ELISA diagnostic kit for *Cryptosporidium parvum* in cattle - prospect 2007.
- 159.***** BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151) (Bio-X Diagnostics, Belgium)- Antigenic ELISA diagnostic kit for Rotavirus, Coronavirus, *E. coli* attachment factor F5 and *Cryptosporidium parvum* in cattle - prospect 2007.
- 160.Test strips for the detection of *Cryptosporidium parvum* (BIO-K 155)-Bio-X Diagnostics-Belgia – prospect 2007.