

Wioletta Rożej¹, Elżbieta Gołąb¹, Maria Waloch¹, Maria Wąsik², Małgorzata Sadkowska-Todys³,
Michał Czerwiński³, Tadeusz H. Dzbeński¹.

WYSTĘPOWANIE *CRYPTOSPORIDIUM* U DZIECI I OSÓB DOROSŁYCH Z BIEGUNKĄ O NIEUSTALONEJ ETIOLOGII

THE OCCURRENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM* IN A GROUP OF CHILDREN AND ADULTS WITH DIARRHOEA OF UNDETERMINED EARLIER AETIOLOGY

1. Zakład Parazytologii Lekarskiej, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny,
2. Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieków Rozwojowych, Samodzielny Publiczny Dziecięcy Szpital Kliniczny, Warszawa,
3. Zakład Epidemiologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

STRESZCZENIE

W Polsce od 2001 roku kryptosporydioza znajduje się w wykazie zakażeń i chorób zakaźnych podlegających ustawowemu obowiązkowi zgłaszania, ale dotychczas nie zgłoszono ani jednego jej przypadku. Ponieważ liczba przypadków biegunki o nieustalonym czynniku etiologicznym jest wysoka, a w publikacjach naukowych opisywane są inwazje *Cryptosporidium* u ludzi, można przyjąć, że w procesie diagnostycznym pasożyt ten nie jest rozważany wśród potencjalnych czynników chorobotwórczych. W celu wstępnego oszacowania rozpowszechnienia kryptosporydiozy zbadano próbki kału 246 dzieci i osób dorosłych z biegunką o nieustalonej etiologii oraz 34 dzieci zdrowych. W wyniku przeprowadzonych badań oocysty pasożyta wykryto w kale 36 dzieci w wieku do 4 roku życia. Zarażenie *Cryptosporidium* najczęściej występowało u dzieci w wieku od 12 do 48 miesiąca życia (47,5%). Odsetek inwazji w tej grupie wieku był statystycznie istotnie wyższy niż w grupie dzieci w wieku do 12 miesiąca życia oraz u dzieci powyżej 48 miesiąca życia, gdzie wynosił odpowiednio: 16,2% ($p = 0,0018$) i 7,7% ($p \leq 0,001$). Na podstawie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) stwierdzono, że wyizolowane z prób oocysty należały do gatunku *Cryptosporidium parvum* i/lub *Cryptosporidium hominis*. Nie stwierdzono przypadków zarażenia wśród dzieci zdrowych oraz wśród chorych osób dorosłych. Ponieważ inwazje *Cryptosporidium* wykryto u dzieci z biegunką, której czynnika etiologicznego nie ustalono w trakcie rutynowo prowadzonych badań mikrobiologicznych, wskazane wydaje się wprowadzenie do schematu diagnostyki zakażeń przewodu pokarmowego dzieci badań w kierunku kryptosporydiozy.

Praca finansowana z grantu MedVetNet, projekt WP22 Zoop-Net.

Słowa kluczowe: *Cryptosporidium*, biegunka, czynnik etiologiczny, rozpowszechnienie

ABSTRACT

In Poland since 2002 it is required to report the cases of human cryptosporidiosis, but so far none has been recorded. The aim of this study was to present some preliminary results of a study on the incidence of *Cryptosporidium* as a pathogen in children and adults with diarrhoea of undetermined aetiology. In 36 out of 246 stool samples collected from hospitalized patients with diarrhoea of undetermined aetiology, invasive parasite oocysts were detected. All positive results were obtained in a group of children aged up to 4 years (47.5%). The percentage of invasion in this age group was statistically significantly higher than in the group of children aged 12 months and children over 48 months of age, which was respectively 16.2% ($p = 0.0018$) and 7.7% ($p \leq 0.001$). On the basis of Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) it was found that oocysts isolated from stool samples belonged to species of *Cryptosporidium parvum* and/or *Cryptosporidium hominis*. In adults with diarrhoea, and among healthy children, no oocysts of *Cryptosporidium* were found. The analysis of the results demonstrated that *Cryptosporidium* is one of a cause of diarrhoea in young children in Poland. This is an indication for the introduction of tests for cryptosporidiosis to the schedule of routine diagnostics of gastrointestinal infections in children.

This work has been partly funded by Med-Vet-Net. Workpackages 22 Met-Vet-Net is an EU-funded.

Key words: *Cryptosporidium*, diarrhoea, aetiology agent, prevalence

WSTĘP

Czynnikiem etiologicznym kryptosporydiozy są pasożytnicze pierwotniaki przewodu pokarmowego należące do rodzaju *Cryptosporidium* (1). Ich inwazje zlokalizowane są na ogół w komórkach nabłonkowych jelita cienkiego, chociaż w niektórych przypadkach mogą obejmować również nabłonek dróg żółciowych i trzustki. Objawy, najczęściej w postaci wodnistej biegunki z dużą ilością śluzu, nudności i wymiotów, bólów brzucha oraz podwyższonej temperatury ciała, pojawiają się między drugim a dziesiątym dniem od momentu zarażenia. U osób immunokompetentnych inwazja ma na ogół postać łagodną i po około dwóch tygodniach ulega samoograniczeniu (2). Natomiast u osób z niedoborami odporności jej przebieg jest przewlekły i przy braku leczenia prowadzi do wyniszczenia organizmu, a w skrajnych przypadkach może być nawet przyczyną śmierci (3). W wyniku przeprowadzonych w ostatniej dekadzie badań stwierdzono, że biegunki powodują najczęściej *Cryptosporidium parvum* i *Cryptosporidium hominis*, chociaż opisano też przypadki choroby wywołanej przez inne gatunki i genotypy *Cryptosporidium*, w tym: *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* oraz *C. meleagridis* (4, 5, 6). Dawka infekcyjna jest bardzo niska, obliczono bowiem, że 10-30 oocyst może wywołać chorobę (7, 8). Inwazje *Cryptosporidium* są wynikiem spożycia oocyst pasożyta zawartych w zanieczyszczonej kałem wodzie lub żywności, czy też przeniesionych na rękach po bezpośrednim kontakcie z zarażonym człowiekiem lub zwierzęciem. Zakażona osoba wydalą w jednym stolcu 10^8 – 10^9 oocyst, a proces wydalania może trwać nawet do 50 dni po ustaniu objawów biegunki (9, 10).

W Polsce niewiele laboratoriów diagnostycznych prowadzi badania w kierunku kryptosporydiozy, dlatego wiedza dotycząca rozpowszechnienia *Cryptosporidium* w naszym kraju i jego udziału w wywoływaniu biegunek u ludzi jest istotnie ograniczona. Celem przedstawionej pracy było wstępne oszacowanie częstości występowania *Cryptosporidium* jako czynnika etiologicznego biegunki u dzieci i osób dorosłych.

MATERIAŁ I METODY

Zbadano 246 próbek kału pobranego od 122 dzieci i 124 dorosłych z biegunką o nieustalonej etiologii. Wśród dzieci było 65 dziewczynek i 57 chłopców w wieku od 1 miesiąca do 9 r.ż. (średnia: dwa i pół roku), hospitalizowanych w dwóch warszawskich szpitalach pediatrycznych w okresie od połowy kwietnia do końca października 2006 r. Wśród dorosłych zbadano 55 pacjentów z województwa mazowieckiego i lubelskiego, u których zachorowanie miało charakter sporadyczny

oraz 69 pacjentów z 16 różnych ognisk zakażeń pokarmowych z terenu województw kujawsko-pomorskiego i łódzkiego.

Grupę kontrolną stanowiły próbki kału 34 dzieci zdrowych w wieku od 3 do 8 lat, zamieszkałych w Warszawie i Podkowie Leśnej.

Badania mikroskopowe. Rozmazy kału barwione metodą Ziehl-Neelsena badano w mikroskopie świetlnym. Po zastosowaniu metody immunofluorescencji bezpośredniej (zestaw MeriFluor *Cryptosporidium/Giardia* firmy Meridian) rozmazy badano w mikroskopie fluorescencyjnym.

Badania molekularne. DNA z próbek kału izolowano za pomocą zmodyfikowanej metody *Boom* i wsp. (11) wykorzystując urządzenie NucliSens-mini-MAG firmy *Biomerieux*. W reakcji nested PCR amplifikacji poddawano fragmenty genu COWP kodującego białko otoczki *Cryptosporidium sp.* wykorzystując startery zewnętrzne BCOWP-F (5'-ACCGCTTCTCAACAACCATCTTGTCCTC-3') oraz BCOWP-R (5'-CGCACCTGTTCCCACTCAATGTAAACCC-3') i startery wewnętrzne Cry 15 (5'-GTAGATAATGGAAGAGATTGTG-3') oraz Cry 9 (5'-GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG-3') (12).

Reakcja PCR przebiegała według schematu: aktywacja polimerazy w 95°C przez 15 min, 40 cykli z temperaturą przyłączania starterów 55°C przez 30 s, przy zachowanych temperaturach denaturacji: 95°C przez 30 s i wydłużania łańcucha 72°C przez 60 s, oraz etap końcowy 72°C przez 10min. W nPCR zastosowano warunki: 35 cykli w układzie 95°C przez 30 s, 65°C przez 30 s, 72°C przez 60 s, etap końcowy: 72°C przez 10 min.

Wyniki w postaci swoistego prążka o wielkości 553 pz odczytywano w świetle UV, po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

Różnicowanie gatunkowe izolatów *Cryptosporidium* prowadzono techniką RFLP (polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych) przy użyciu trzech enzymów restrykcyjnych: FspB I (Bfa I), Ssp I oraz Vsp I (Ase I) firmy *Fermentas*. Wyniki odczytywano w świetle UV po przeprowadzeniu elektroforezy produktów w 4,5% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny.

Analizy statystyczne. Do analiz statystycznych zastosowano test chi-kwadrat oraz test Fishera. Analizę wykonano w oparciu o program SAS.

WYNIKI

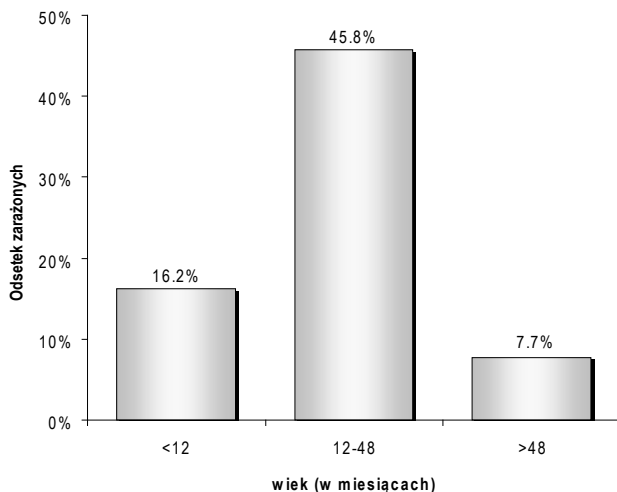
Oocysty *Cryptosporidium* wykryto w próbkach kału uzyskanego od 36 dzieci (Tab I). Wśród zarażonych były 23 dziewczynki i 13 chłopców w wieku od 6

miesiąca do 4 r.ż. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w liczbie zarażonych wśród dziewczynek i chłopców ($p = 0,128$). Zarażenie *Cryptosporidium* najczęściej występowało u dzieci w wieku od 12 do 48 miesiąca życia – 47,5%. Odsetek inwazji w tej grupie wieku był statystycznie istotnie wyższy niż w grupie dzieci w wieku do 12 miesiąca życia oraz u dzieci powyżej 48 miesiąca życia, gdzie wynosił odpowiednio: 16,2% ($p = 0,0018$) i 7,7% ($p \leq 0,001$) (Ryc. 1). Nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie w częstości występowania zarażeń między dziećmi w wieku do 12 miesięcy i dziećmi powyżej 48 miesięcy życia.

Tabela I. Liczba pacjentów zarażonych *Cryptosporidium sp.* w badanych grupach.

Table I. The number of infected with *Cryptosporidium sp.* in the examined groups of patients.

Badani	Liczba zbadanych pacjentów	Liczba zarażonych <i>Cryptosporidium</i>
Dzieci chore (n = 122):		
dziewczynki	65	23
chłopcy	57	13
Chore osoby dorosłe (n = 124)		
zachorowania sporadyczne	55	0
zachorowania z ognisk	69	0
Dzieci zdrowe	34	0
Razem	280	36



Ryc. 1. Występowanie zarażeń *Cryptosporidium sp.* u dzieci z biegunką w poszczególnych grupach wieku

Fig. 1. The presence of *Cryptosporidium spp* oocysts in children with diarrhoea in different age groups

W próbkach kału chorych osób dorosłych oraz w próbkach uzyskanych od dzieci zdrowych nie stwierdzono obecności oocyst *Cryptosporidium*.

Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych uzyskanych izolatów wykazała ich przynależność do gatunku *Cryptosporidium parvum* i/lub *Cryptosporidium hominis*.

DYSKUSJA

W Stanach Zjednoczonych w latach 1995–2007 zapadalność na kryptosporydiozę kształtowała się w granicach 0,9–1,4 przypadków zarażeń na 100 000 mieszkańców, a według szacunkowych danych z Europy za rok 2005 wynosiła ona 1,9 przypadków na 100 000 osób (13). W naszym kraju nie zgłoszono dotychczas ani jednego przypadku kryptosporydiozy, chociaż od roku 2001 istnieje ustawowy obowiązek rejestracji tej choroby (Dz. U. z dnia 31 października 2001 r.). Ponieważ liczba przypadków biegunki o nieustalonej etiologii jest wysoka, a w publikacjach naukowych opisywane są przypadki zarażeń *Cryptosporidium* u ludzi, należy założyć, że w Polsce pasożyt ten nie jest rozważany jako potencjalny czynnik chorobotwórczy (14).

Dzieci są szczególnie podatne na zarażenia pasożytami jelitowymi, w tym *Cryptosporidium*. W przeprowadzonych badaniach własnych zarażenie *Cryptosporidium* stwierdzono u 36 ze 122 (29,5%) zbadanych dzieci hospitalizowanych w Warszawie. We Wrocławiu w latach 2002–2003 pasożyta wykryto u 5 z 76 zbadanych immunokompetentnych dzieci z przewlekłą biegunką, hospitalizowanych w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia oraz u 3 z 26 pacjentów z przewlekłą biegunką hospitalizowanych w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej. W badaniach przeprowadzonych we Wrocławiu *Cryptosporidium* częściej występowało u dzieci starszych w wieku 5–18 lat (12,5%), niż u młodszych dzieci w wieku od 5 tygodni do 4,5 roku (6,4%) (15). Natomiast wśród dzieci hospitalizowanych w Warszawie odsetek zarażonych dzieci w wieku od 12 do 48 miesiąca życia (47,5%) był istotnie wyższy, niż w grupie dzieci starszych (47,5% v. 7,7%; $p \leq 0,001$). Podobne wyniki otrzymano dla innych krajów europejskich. Analiza danych zgłoszonych przez kraje do sieci BSN (*European Basic Surveillance Network*) przeprowadzona przez *Semenę* i *Nicholsa* w 2005 r. wykazała, że najwyższe ryzyko zarażenia *Cryptosporidium* występuje w grupie dzieci poniżej 5 r.ż. (5,7 przypadków na 100 000), natomiast u dzieci w wieku 5–14 lat jest prawie o połowę niższe (2,5 przypadków na 100 000). Również w Stanach Zjednoczonych przypadki kryptosporydiozy najczęściej wykrywano u dzieci młodszych w wieku od 1 roku do 9 lat (16).

Cryptosporidium często powoduje powstawanie ognisk chorobowych obejmujących wiele osób zarażonych (14). W przeprowadzonej pracy nie wykryto przypadków kryptosporydiozy w żadnym z 16 badanych ognisk zakażeń pokarmowych. Z analizy dostępnych danych epidemiologicznych z tych ognisk wynika, że w żadnym z nich woda nie była źródłem zakażenia, natomiast *Cryptosporidium* wykrywane jest przede

wszystkim w ogniskach wodnopochoodnych. W Stanach Zjednoczonych od 1984 do 2007 roku zgłoszono do Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorobom (CDC) 143 wodnopochoodne ogniska kryptosporydiozy. Piętnaście (10,5%) z tych ognisk było powiązanych z wodą pitną, a 128 (89,5%) z wodą wykorzystywaną do celów rekreacyjnych (16). W Polsce trudno jest ocenić, czy woda stanowi zagrożenie, ponieważ dotychczas nie prowadzono badań obowiązkowych wody pitnej na obecność oocyst *Cryptosporidium*, chociaż od roku 2007 istnieją do tego podstawy prawne (Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi – Dz. U. z dnia 6 kwietnia 2007 r.). Natomiast badania przeprowadzone dla celów naukowych wykazały obecność oocyst pierwotniaka w wodzie z kranu pobranej w Poznaniu. Oocysty wykryto w 1 z 12 zbadanych szklanek wody pitnej pobranej z kranu (17). Oocysty *Cryptosporidium* wykryto także w próbkach wód powierzchniowych pobranych w Poznaniu i jego okolicach oraz w Trójmieście (17, 18, 19).

Badanie genetyczne zebranych izolatów *Cryptosporidium* przeprowadzono za pomocą RFLP, które jest metodą bardziej ekonomiczną aniżeli sekwencjonowanie, niestety nie pozwala odróżnić gatunku *C. hominis* od *C. parvum*. Pierwszy z wymienionych gatunków występuje wyłącznie u ludzi, podczas gdy drugi jest pasożytem ludzi i zwierząt (20). W badaniach przeprowadzonych przez Bajer i wsp., wśród *Cryptosporidium* wyizolowanych od hospitalizowanych w Polsce dzieci z pierwotnymi niedoborami odporności, stwierdzono gatunki: *C. hominis*, *C. meleagridis* i *C. parvum*, natomiast u zbadanych osób immunokompetentnych, lub pacjentów z immunosupresją wtórną stwierdzano wyłącznie zarażenia gatunkiem *C. parvum* (21). Zwierzęcy rezerwuary pasożyta znacznie podwyższa ryzyko nabycia inwazji. W przeprowadzonych uprzednio badaniach *Cryptosporidium* wykryto u 12,1% psów oraz 8,6% kotów spośród 347 zdrowych zwierząt domowych z terenu Warszawy (22). Wstępne badania genetyczne zebranych izolatów wykazały występowanie u tych zwierząt chorobotwórczego dla ludzi *Cryptosporidium parvum*. Ponieważ szacuje się, że około 60% rodzin w Polsce ma psa lub kota, należy przyjąć, że poziom skażenia środowiska *Cryptosporidium* jest wysoki oraz wziąć pod uwagę możliwość bezpośredniego przeniesienia zarażenia ze zwierząt domowych na dzieci (23).

Uzyskane wyniki badań wskazują, że *Cryptosporidium* jest potencjalnym czynnikiem etiologicznym biegunki u małych dzieci w Polsce. Wskazane wydaje się więc wprowadzenie badań w kierunku kryptosporydiozy do schematu rutynowej diagnostyki laboratoryjnej zakażeń przewodu pokarmowego u dzieci.

PIŚMIENNICTWO

- Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF. Cryptosporidiosis. N Engl J Med 2002;346:1723–1731.
- Hunter RR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 2002;15:145–154.
- Huang DB, White AC. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. Gastroenterol Clin N Am 2006;35:291–314.
- Smith HV, Cacciò SM, Cook N, Nichols RAB, Tait A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. Vet Parasitol 2007;149(1-2):29–40.
- Caccio SM, Pozio E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. Expert Rev Anti Infect Ther 2006;4:429–443.
- Llorente MT, Clavel A, Goñi MP, Varea M, Seral C, Becerril R, Laura Suarez, Rafael Gómez-Lus. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. Parasitol Int 2007;56(3):201–205.
- DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. New Engl J Med 1995; 332:855–859.
- Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR, DuPont HL. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. J Infect Dis 1999;180:1275–1281.
- Chappell CLL, Okhuysen PC, Sterling CR, DuPont HL. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. J Infect Dis 1996;173:232–236.
- Jokipii L, Jokipii AMM. Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. New Engl J Med 1986; 315:1643–1647.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen .L, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 1990;28(3):495–503.
- Llorente MT, Clavel A, Goñi MP, Varea M, Seral C, Becerril R, Suarez L, Gómez-Lus R. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. Parasitol Int 2007;56:201–205.
- Semenza JC, Nichols G. Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. Euro Surveill 2007;12(5):E13–4.
- Baumann A, Sadkowska-Todys M. Zatrucia i zakażenia pokarmowe w Polsce w 2007 roku. Przegl Epidemiol 2009;63:213–220.
- Wesołowska M, Mowszet K, Wróbel G, Jankowski S. Cryptosporidiosis in children with chronic diarrhea. Wiad Parazytol. 2004;50(3),393–6.
- Yoder JS, Beach MJ. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. Exp Parasitol 2010;124(1):31–39.
- Sulima P, Werner A, Majewska AC. Occurrence of intestinal protozoan parasite in drinking water supply in Poznań – microscopic, immunologic and molecular studies. Wiad Parazytol 2001;47(suppl 2):46.

18. Nowosad P, Kuczyńska-Kippen N, Słodkiewicz-Kowalska A, Majewska AC, Graczyk TK. The use of rotifers in detecting protozoan parasite infections in recreational lakes. *Aquatic Ecol* 2007;41:47–54.
19. Szostakowska B, Kruminis-Łozowska W, Graczyk TK, Myjak P. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in surface waters of Tri-city and its vicinity. Abstracts of International Conference “Biological and Chemical Factors of Environmental Contamination”, Warsaw, 2005 23–25 June, 21.
20. Caccio SM, Pozio E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006;4(3):429–43.
21. Bajer A, Bednarska M, Caccio SM, Wolska-Kuśnierz B, Heropolitanska-Pliszka E, Bernatowska E, Wielopolska M, Paziewska A, Welc-faleciak R, Siński E. Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human clinical cases in Poland. *Parasitol Res* 2008;103:37–42.
22. Rożej W, Caccio SM, Waloch M, Gołąb E. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infection among children and pets in the Warsaw area. 4th Annual Scientific Meeting 11-14 June 2008 Saint Malo. *Med-Vet-Net Abstract Book*.
23. Smith HV, Caccio SM, Cook N, Nichols RA, Tait A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol* 2007;149(1-2):29–40.

Otrzymano: 30.10.2009 r.

Zaakceptowano do druku: 12.01.2010 r.

Adres do korespondencji:

Mgr Wioletta Rożej

Zakład Parazytologii Lekarskiej

Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego

– Państwowego Zakładu Higieny

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

tel. (022) 54 21 220

e-mail: wrozej@pzh.gov.pl