

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM BIJ KALVERENT.G. Timmerman¹, T. Geurden², G. Opsomer¹, E. Claerebout²¹Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde, UGent²Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie, UGent
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

Tom.Timmerman@UGent.be, Thomas.Geurden@UGent.be

SAMENVATTING

Cryptosporidium parvum is een protozoaire parasiet die de dunne darm van kalveren infecteert. Vooral jonge kalveren tot 30 dagen oud zijn gevoelig. De prevalentie varieert van 2% tot 54% en op geïnfecteerde bedrijven kan de cumulatieve prevalentie oplopen tot 100%. Kalveren worden voornamelijk besmet door direct contact met geïnfecteerde kalveren of door opname van oöcysten uit de omgeving. De infectie kan leiden tot diarree, gewichtsverlies, groeivertraging en sterfte. Een bijkomende infectie met andere darmpathogenen kan de symptomen verergeren. Na een prepatente periode van gemiddeld 3 à 4 dagen scheiden de kalveren infectieuze oöcysten uit, waardoor ze op hun beurt de omgeving en andere kalveren kunnen besmetten. De diagnose gebeurt door het aantonen van oöcysten in de feces. Hiervoor zijn verschillende technieken beschikbaar. De behandeling van de parasiet is moeilijk, daar geen enkel product 100% effectief is tegen *C. parvum*. Er kan zowel preventief als curatief behandeld worden met halofuginone lactaat in combinatie met een sterk doorgedreven desinfectie en hygiëne van de omgeving.

INLEIDING

Cryptosporidiose bij het rund kan worden veroorzaakt door *C. parvum* en *C. andersoni* (vroeger *C. muris*). Deze laatste infecteert de fundusklieren van de lebmaag bij volwassen dieren en kan een verminderde melkgifte veroorzaken (Esteban en Anderson, 1995). Het belang van deze infecties is eerder beperkt. Belangrijker zijn de infecties met *C. parvum*, die een belangrijke oorzaak zijn van diarree bij neonatale en immunosuppressieve kalveren, maar ook bij de mens. De parasiet werd voor het eerst ontdekt bij de muis (Tyzzer, 1912), maar het belang van *C. parvum* bij kalveren werd pas in het begin van de jaren zeventig erkend toen de parasiet voor het eerst geassocieerd werd met diarree (Panciera *et al.*, 1971). Heden ten dage is de parasiet bekend als een belangrijke oorzaak van diarree bij jonge kalveren (tot 30 dagen) (Moore en Zeman, 1991). De parasiet komt veelvuldig voor als enige pathogeen, maar is niet zelden ook geassocieerd met andere enteropathogenen, zoals Rotavirus, Coronavirus, *Giardia duodenalis* of *Salmonella* ('neonatale diarree complex') (Tzipori *et al.*, 1983).

In dit overzichtsartikel wordt dieper ingegaan op de epidemiologie, het pathogeen belang, de immuniteitsopbouw, de diagnose, de genotypering, het zoonotisch aspect en de behandeling en preventie van *C. parvum* bij kalveren.

CLASSIFICATIE

C. parvum behoort tot het fylum Sporozoa, klasse Sporozoasida, subklasse Coccidiasina, orde Eucoccidiorida, suborde Eimeriorina, familie Cryptosporidiidae en genus *Cryptosporidium* (O'Donoghue, 1995). Tot op heden bevat het genus 10 erkende species (Fayer *et al.*, 2000a; Morgan *et al.*, 1999) (Tabel 1), maar meer species worden onderzocht (Fayer *et al.*, 2001).

Zoals de huidige classificatie eruit ziet, wordt *Cryptosporidium* bij de coccidia gerekend. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat *Cryptosporidium* dichter bij de gregarin en (Apicomplexa: Gregarinasina) staat dan bij de coccidia (Carreno *et al.*, 1999; Hijjawi *et al.*, 2002). Dit zou mede het falen van coccidiostatica in de behandeling van *Cryptosporidium* kunnen verklaren.

Tabel 1. Officieel erkende *Cryptosporidium* spp. (naar O'Donoghue, 1995; Fayer *et al.*, 2000a).

Parasiet species	Gastheer	Plaats van infectie	Oöcystlengte (μm)	Oöcystbreedte (μm)
<i>C. parvum</i>	zoogdieren	darmen	4,5-5,4	1,0-1,3
<i>C. andersoni</i>	rund	lebmaag	6,0-8,1	5,0-6,5
<i>C. saurophilum</i>	stinkdier	maag, dunne darm	4,4-5,6	4,2-5,2
<i>C. meleagridis</i>	vogels (kalkoen)	darmen	4,5-6,0	1,0-1,3
<i>C. baileyi</i>	vogels (kip)	bursa, cloaca, trachea	5,6-6,3	1,2-1,4
<i>C. serpentis</i>	reptielen	maag	5,6-6,6	1,0-1,3
<i>C. nasorum</i>	vissen	dunne darm, maag	3,5-4,7	1,3
<i>C. wrairi</i>	cavia	dunne darm	4,8-5,6	4,0-5,0
<i>C. felis</i>	kat	dunne darm	3,2-5,1	3,0-4,0
<i>C. muris</i>	muis	dunne darm	6,5-7,6	4,3-5,8

LEVENSCYCLUS

C. parvum heeft een directe en homoxene levenscyclus. Dit betekent dat alle ontwikkelingsstadia voorkomen in de eindgastheer. Na orale opname van de oöcysten komen de sporozoieten vrij in de maag of in de darm langs een naadvormige opening in de oöcystwand (Fayer *et al.*, 1998). De vrijgekomen sporozoieten worden 48 uur later ter hoogte van het ileum aangetroffen. Ze hechten zich vast aan de borstelzool van de enterocyten door het uitbouwen van een karakteristieke vasthechtingszone en dringen de cel binnen. Vanaf dan worden ze trofozoieten genoemd (O'Donoghue, 1995).

Onder de microscoop heeft de borstelzool een granulaire uitzicht en zitten de trofozoieten schijnbaar aan de lumenale zijde van de enterocyten. Elektronenmicroscopisch onderzoek heeft echter aangetoond dat *C. parvum* intracellulair gelegen is, maar wel extracytoplasmatisch, in parasitofore vacuoles. Deze vacuoles worden afgelijnd door gastheerspecifieke membranen die ontstaan door elongatie en fusie van de microvilli (Spano en Crisanti, 2000) (Fig. 1). De trofozoieten ondergaan een asexuele proliferatie. De eerste asexuele vermenigvuldiging of merogonie resulteert in 8 merozoieten. Deze komen vrij uit de parasitofore vacuole en dringen andere epitheliale cellen binnen, waar ze een nieuwe asexuele vermenigvuldiging ondergaan. Hieruit ontstaan ofwel 8 merozoieten die weer vrijkomen en nieuwe cellen infecteren, ofwel 4 merozoieten die geen verdere merogonie ondergaan maar zich aan de epitheelcel vasthechten en seksuele stadia of gamonten vormen (O'Donoghue, 1995; de Graaf *et al.*, 1999b).

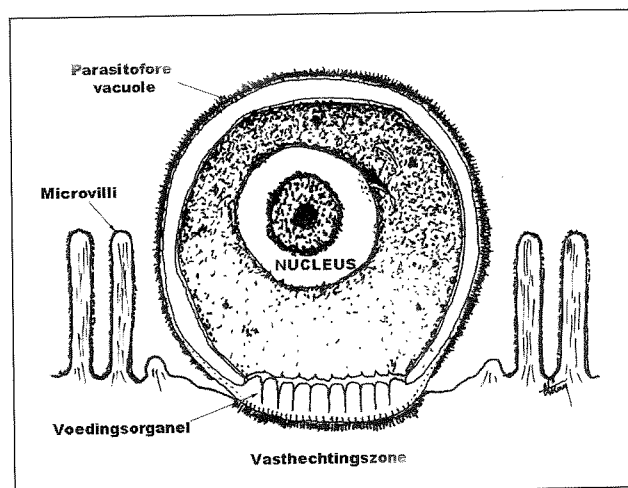


Fig. 1. Schematische voorstelling van een *C. parvum* trofozoiet (Naar Pohlenz *et al.*, 1978).

Na het beëindigen van de ongeslachtelijke vermenigvuldiging differentiëren de vastgehechte merozoieten zich in mannelijke microgamonten en vrouwelijke macrogamonten. De microgamonten vormen zich om tot microgametocyten waarin tot 16 niet-geflagelleerde microgameten gevormd worden. De macrogamonten ontwikkelen zich tot ongekernde macrogametocyten. Deze worden bevrucht door rijpe microgameten. Hieruit ontstaan zygoten. Deze worden reeds 72 uur na een infectie aangetoond. De zygoten ondergaan een verdere asexuele ontwikkeling, wat leidt tot de productie van gesporuleerde oöcysten met 4 sporozoieten, die met de feces uitgescheiden worden. Gemiddeld duurt de prepatente periode 3 à 4 dagen, maar ze kan ook tot 14 dagen duren (O'Donoghue, 1995).

Twee typen oöcysten worden in de darm gevormd. De meeste oöcysten zijn dikwandig en dubbelgelaagd en worden met de feces uitgescheiden. Sommige

oöcysten zijn evenwel dunwandig, excyteren in dezelfde gastheer en leiden tot een auto-infectie (O'Donoghue, 1995; de Graaf *et al.*, 1999b; Spano en Crisanti, 2000). Waarschijnlijk zijn deze dunwandige oöcysten de oorzaak van persisterende, chronische infecties die kunnen ontstaan bij een gastheer zonder verdere blootstelling aan oöcysten van exogene oorsprong (de Graaf *et al.*, 1999b).

Recent werden twee extracellulaire vormen van *C. parvum* beschreven. De eerste vorm ontstaat rechtstreeks uit de sporozoieten die vrijkomen uit oöcysten en ontwikkelt zich extracellulair om paren te vormen en te encyteren. Een tweede extracellulaire vorm zou een gamontstadium zijn (Hijjawi *et al.*, 2002). Wat het belang is van beide stadia in de levenscyclus van *C. parvum* is niet gekend.

EPIDEMIOLOGIE

Voorkomen

C. parvum infecties bij kalveren komen wereldwijd voor. De prevalentie varieert van 2% tot 54% (Anderson en Hall, 1982; Sobieh *et al.*, 1987; Ongerth en Stibbs, 1989; Nouri en Toroghi, 1991; Villacorta *et al.*, 1991a; Kaminjolo *et al.*, 1993; Viring *et al.*, 1993; Garber *et al.*, 1994; Quilez *et al.*, 1996a; Mtambo *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 1997a en b; Maldonado-Camargo *et al.*, 1998; Ruest *et al.*, 1998; Lefay *et al.*, 2000; Sischo *et al.*, 2000; Wade *et al.*, 2000). Deze grote verschillen zijn onder meer te verklaren door het verschil in leeftijd van de bestudeerde kalveren en door de diagnostische test die wordt gebruikt (zie diagnose). De parasiet komt het meeste voor bij kalveren jonger dan een maand. De prevalentie bij oudere kalveren en bij volwassen koeien is lager (Xiao en Herd, 1994; Nydam *et al.*, 2001). Bovendien speelt ook de aard van de studie een rol. Cross-sectionele studies, met één staalname per kalf, geven vaak een onderschatting van de prevalentie, omdat de uitscheiding van *C. parvum* intermitterend is (O'Handley *et al.*, 1999). Wanneer kalveren vanaf de geboorte wettelijk worden bemonsterd, wordt een cumulatieve incidentie tot 100% vastgesteld (Xiao en Herd, 1994).

Transmissie

Kalveren worden besmet door feco-orale overdracht van infectieuze oöcysten (de Graaf *et al.*, 1999b). Op besmette bedrijven wordt de helft van de kalveren reeds geïnfecteerd vóór de leeftijd van 10 dagen (Castro-Hermida *et al.*, 2002a). De infectie gebeurt door

direct contact met een dier dat oöcysten uitscheidt. Vooral andere kalveren spelen een rol in de epidemiologie (Xiao *et al.*, 1993; Atwill *et al.*, 1998; O'Handley *et al.*, 1999), maar ook het moederdier vormt een bron van infectie. Scott *et al.* (1995), Mtambo *et al.* (1997), Atwill *et al.* (1999), Faubert en Litvinsky (2000) en Fayer *et al.* (2000b) toonden aan dat volwassen dieren vaak geïnfecteerd zijn zonder evenwel symptomen te vertonen. Bovendien zouden moederdieren rond de partus meer oöcysten uitscheiden, met een verhoogde infectiedruk in de kraamstal tot gevolg (Faubert en Litvinsky, 2000). Anderen spreken deze 'periparturient rise' echter tegen (Atwill *et al.*, 1998). Het bestaan van deze volwassen dragers zou mede oorzaak zijn van de overdracht van infecties naar het volgende kalfseizoen (Fayer *et al.*, 2000b).

Voorts kan een kalf zich besmet worden vanuit de omgeving (Mohammed *et al.*, 1999; Huetinck *et al.*, 2001; Castro-Hermida *et al.*, 2002b) of door indirect contact met door feces besmet materiaal, zoals melkemma's (Mtambo *et al.*, 1997). De oöcysten zijn zeer resistent en overleven lang in de omgeving, waardoor kalveren besmet kunnen worden tot meer dan een jaar nadat de oöcysten uitgescheiden werden. (Angus, 1987; Atwill *et al.*, 1998).

C. parvum wordt ook beschreven bij andere diersoorten, zoals schapen (Causapé *et al.*, 2002), geiten (Mason *et al.*, 1981; Tzipori *et al.*, 1982) en varkens (Quilez *et al.*, 1996b). Deze dieren kunnen door direct of indirect contact de besmetting overdragen op kalveren, maar hun rol is eerder beperkt. Daarnaast kunnen eenden, ganzen en insecten als mechanische vector een rol spelen in de verspreiding van *C. parvum* (Fayer *et al.*, 2000a). Ook de mens zou kalveren kunnen besmetten, maar meestal is de infectieroute omgekeerd (Angus, 1987; Chalmers *et al.*, 1997; O'Handley *et al.*, 1999). Bij de mens zijn de meeste uitbraken te wijten aan besmet drinkwater (Graczyk *et al.*, 2000), maar infecties via besmet voedsel (Saini *et al.*, 2000) en via de lucht (Fayer *et al.*, 2000a) werden eveneens beschreven. Deze infectiewegen zijn evenwel van ondergeschikt belang in de epidemiologie van *C. parvum* bij kalveren.

Risicofactoren

Vele factoren kunnen een rol spelen in het aanslaan of de verspreiding van een *C. parvum* infectie. Verschillende van deze risicofactoren hebben te maken met een verhoogde infectiedruk. Zo is het aantal infecties het hoogst in het kalfseizoen en dit door de aanwezigheid van een groter aantal gevoelige dieren

(Huetinck *et al.*, 2001). Ook de lengte van het kalfseizoen speelt hierbij een rol: hoe langer het kalfseizoen, hoe hoger de infectiedruk (Hoar *et al.*, 2001).

Kalveren worden meestal besmet in de afkalfstal of in de kalverboxen. Op bedrijven met meerdere koeien in de afkalfstal werd een hoger percentage besmette kalveren teruggevonden (Garber *et al.*, 1994). Ook de bedding in de afkalfstal speelt een belangrijke rol: stro verhoogt de kans op infectie daar de oöcysten zeer goed overleven in dit vochtig en warm microklimaat. Afkalfstallen met een volle betonnen vloer zonder bedding verlagen het risico op infectie (Mohammed *et al.*, 1999).

Ook in de kalverboxen hangt een mogelijke besmetting af van de infectiedruk. Wanneer de kalverbox dagelijks wordt gereinigd, is de kans op infectie kleiner dan wanneer de kalverboxen slechts om de maand gereinigd worden (Castro-Hermida *et al.*, 2002a; Mohammed *et al.*, 1999). Bij kalveren die op stro opgesteld staan, kan het bijstrooien de infectiedruk verminderen (Mohammed *et al.*, 1999). Wel moeten steeds zo proper mogelijke werktuigen worden gebruikt en het liefst apart per leeftijdsgroep, zonet wordt de infectie verspreid via de werktuigen (Maldonado-Camargo *et al.*, 1998; Sischo *et al.*, 2000). De kalveren in groep of binnen opstallen verhoogt eveneens de kans op infectie (Quigley *et al.*, 1994; Ruest *et al.*, 1998).

Naast de infectiedruk is de immuniteit van het kalf van belang. Intercurrente ziekten, immunodeficiënties en immunosuppressieve therapieën verminderen de algemene weerstand, met superinfecties van onder andere *C. parvum* tot gevolg, (Casey, 1991; de Graaf *et al.*, 1999b). Een verstoring van de intestinale flora, bijvoorbeeld door verandering van voer, kan leiden tot een verhoogde uitscheiding van de parasiet (Maldonado-Camargo *et al.*, 1998).

PATHOGENESE EN KLINISCHE SYMPTOMEN

C. parvum geeft aanleiding tot een verminderde activiteit van de intracellulaire enzymen, evenals van de enzymen (lactase, maltase) aanwezig ter hoogte van de borstelzoo. Het eerste zou te wijten zijn aan een vrijstelling van toxische metaboliëten die dan direct doorheen de vasthechtingszone in de gastheer cel terecht komen. Het tweede zou een weerspiegeling zijn van de graad van mucosabeschadiging. Door de onverteerde lactose verhoogt de osmotische gradiënt en wordt vocht aangetrokken naar het darmlumen. Dit wordt nog versterkt in de dikke darm waar de lactose

door bacteriën omgezet wordt in vrije vetzuren die op hun beurt vocht aantrekken (Angus, 1987). Erge infecties gaan eveneens gepaard met een verhoogd verlies van absorberende cellen. De combinatie van deze veranderingen in de darm geeft aanleiding tot een verminderde vertering en absorptie zodat uiteindelijk diarree ontstaat (Angus, 1987).

Bij dissectie ziet men een gele, waterige darminhoud, hyperemie van de darmmucosa en dehydratatie (Casey, 1991). Op histopathologisch onderzoek werd een milde tot matige atrofie van de jejunale en ileale villi met occasioneel brugvorming en fusie vastgesteld. Elektronenmicroscopisch werd gezien dat de microvilli normaal waren, behalve op de plaatsen waar een parasiet vastzat op de enterocyten. Op deze plaatsen bleken de microvilli verdwenen of vervormd (Sanford en Josephson, 1982; Ruest *et al.*, 1997). Bovendien vonden ze een hoog aantal mononucleaire cellen en enkele neutrofielen in de lamina propria. Bij zwaar geïnfecteerde dieren werd de parasiet zelfs teruggevonden in het duodenum, caecum en het colon (de Graaf *et al.*, 1999b; Pearson *et al.*, 1982; Sanford en Josephson, 1982). Met elektronenmicroscopie vonden Heine *et al.* (1984) cytoplasmatische vacuolisatie van de enterocyten en een onregelmatigheid in de lengte van de microvilli. Bovendien konden trofozoieten, meronten en macrogameten aangetoond worden in de microvilli (Pearson *et al.*, 1982; Sanford en Josephson, 1982).

Klinisch veroorzaakt *C. parvum* een intermitterende diarree bij kalveren van 5 tot 30 dagen oud (Fayer *et al.*, 2000a). Kalveren van 6 tot 8 weken oud vertonen bij infectie minder erge symptomen en nog oudere kalveren zijn ongevoelig (Angus, 1987). De feces bij klinisch zieke dieren zijn waterig en geel-groen tot melkachtig van kleur, eventueel met bloed, fibrinevlokken en mucus. In de meeste gevallen is de diarree zelflimiterend na enkele dagen. Persistierende diarree veroorzaakt vaak een duidelijk gewichtsverlies en soms uitmergeling. Andere symptomen zijn abdominale pijn, steatorrhoea, apathie en anorexie. In gevallen van erge dehydratatie treden zwakte en collaps op. Ongecompliceerde infecties met *C. parvum* hebben een hoge morbiditeit maar een lage mortaliteit (Angus, 1987).

Bij het opstellen van een differentiaal diagnose dient rekening gehouden te worden met Rotavirus, Coronavirus, *Salmonella* spp., *Eimeria* spp., *Giardia duodenalis* en Boviene Virale Diarree. Al deze infecties, samen met nutritionele factoren en managementsfactoren, kunnen bijdragen tot het 'neonataal

diarree complex'. Deze gecombineerde infecties veroorzaken veel ergere klinische symptomen, waarbij de mortaliteit hoog kan oplopen. (Otto *et al.*, 1995; de Graaf *et al.*, 1999b; Naciri *et al.*, 1999; O'Handley *et al.*, 1999).

IMMUNITEIT

De immuniteit voor *C. parvum* is specifiek, lokaal en celgemedieerd. Bij een primaire infectie is er een veralgemeende stijging van de cytotoxische T-cellen in het epitheel, in de lamina propria en ter hoogte van de Peyerse platen van het ileum (Pasqualli *et al.*, 1997; Canals *et al.*, 1998). Bij een secundaire infectie is de immuunrespons eerder gelokaliseerd ter hoogte van de plaats van infectie (Abrahamsen, 1998). In de drainerende ileo-caecale lymfeknopen is er geen stijging van lymfocyten (Pasqualli *et al.*, 1997; Canals *et al.*, 1998). Dit wijst op een lokale immuunrespons ter hoogte van de darmmucosae, eerder dan een veralgemeende immuunrespons. Ook kon men geen correlatie vaststellen tussen de uitscheiding van oöcysten in de feces en de aanwezigheid van specifieke immunoglobulinen in het serum (Quilez *et al.*, 1996b). Bij muizen heeft men vastgesteld dat B-cellen geen essentiële rol spelen in de afweer tegen *C. parvum* en dat de rol van de humorale afweer wellicht beperkt is (Wangxue *et al.*, 2003).

Vooraf kalveren jonger dan een maand zijn gevoelig voor *C. parvum*, maar of er een echte leeftijdsresistentie bestaat tegen *C. parvum* is nog onduidelijk. Kalveren die in een *C. parvum* vrije ruimte worden opgevoed zijn nog gevoelig voor infectie op de leeftijd van 3 maanden (Harp *et al.*, 1990; de Graaf *et al.*, 1999a), maar de symptomen zijn minder ernstig dan bij jongere dieren. Bij muizen is de leeftijdgebonden resistentie gecorreleerd met de ontwikkeling van intestinale flora, maar of de rumen- of darmflora een rol speelt bij oudere kalveren is niet gekend. Kalveren die eerder al geïnfecteerd werden, hebben wel een goede afweer tegen infectie, wat wijst op een specifieke afweer tegen *C. parvum* (Harp *et al.*, 1990).

DIAGNOSE

Bij de diagnose van *C. parvum* moet rekening gehouden worden met de intermitterende uitscheiding van oöcysten. Vooral bij lage uitscheiders kan dit leiden tot vals negatieve resultaten. Bij een klinische infectie kan de uitscheiding oplopen tot 10^8 oöcysten per gram mest (Mohammed *et al.*, 1999; Uga *et al.*,

2000; Nydam *et al.*, 2001), wat de diagnose door het aantonen van oöcysten in de feces vergemakkelijkt.

Microscopie

De conventionele microscopische diagnostieken bestaan uit het kleuren van fecesuitstrijkjes, eventueel na de concentratie van het staal. Er bestaan verschillende technieken die de wand en/of de inhoud van de oöcysten kleuren. De oöcysten zijn sferisch tot ellipsvormig, hebben een grootte van ongeveer 4-6 μm en moeten met een immersiemicroscop worden bekeken (Fayer *et al.*, 2000a). De meest gebruikte technieken zijn de gemodificeerde Ziehl-Neelsen kleuring en de Heines carbolfuchsin kleuring.

Bij de gemodificeerde Ziehl-Neelsen kleuring worden de oöcysten rood gekleurd, terwijl de achtergrond tegenkleurt. Bij de Heines carbolfuchsin worden de oöcysten lichtroze tot bleekgrijs gekleurd, naargelang het soort licht dat de microscoop ontwikkelt. De achtergrond is roze-rood (Heine, 1982). Bij microscopisch onderzoek komen soms lichtgekleurde structuren voor die lijken op oöcysten ("ghosts") (Henriksen en Pohlenz, 1981), wat de interpretatie moeilijk maakt en wat ervaring vereist van de onderzoeker. Bovendien zijn deze technieken tijdrovend en hebben ze een lage gevoeligheid bij lichte infecties. Daarentegen kan met deze technieken een snelle diagnose bekomen worden bij klinische infecties (Fayer *et al.*, 2000a). Verschillende sedimentatie- en flottatiemethoden worden gecombineerd met microscopisch onderzoek om de sensitiviteit te verhogen. Ondanks het bestaan van deze concentratietechnieken worden heel wat positieve stalen niet gedetecteerd (Fayer *et al.*, 2000b).

Immunologische technieken

Tot deze technieken behoren onder meer de immunofluorescentie (IF), antigeen enzym-linked immunosorbent assay (ELISA), reverse passieve haemagglutination (RPH), solid-phase kwalitatieve immunochromatografische assays (dip sticks) en immunoserologie op basis van IF en ELISA. Al deze technieken werden ontwikkeld om *C. parvum* bij de mens op te sporen, maar kunnen ook gebruikt worden bij kalveren. De sensitiviteit en specificiteit van deze testen bij kalveren zijn echter niet gekend.

De IF kan zowel kwalitatief als kwantitatief worden gebruikt voor de detectie van *C. parvum* oöcysten in feces (Fig. 2). De detectielimiet ligt op 1000 oöcysten per gram feces (Xiao en Herd, 1993). De commer-

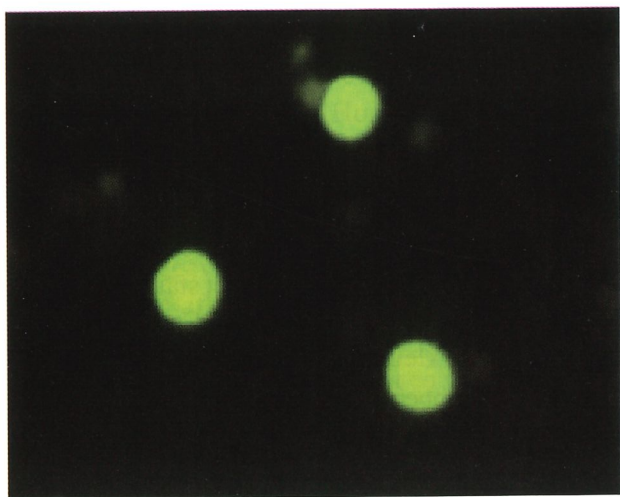


Fig. 2. Oöcysten van *C. parvum* gelabeld met immuno-fluorescentie antilichamen.

ciële ELISA's detecteren antigeen in de feces en hebben als voordeel dat grote hoeveelheden stalen tegelijkertijd verwerkt kunnen worden (Otto *et al.*, 1995). RPH is een techniek op basis van hemagglutinatatie van oöcysten aan anti-*C. parvum* gelabelde schaaperythrocyten (Farrington *et al.*, 1995). Al deze technieken hebben een goede sensitiviteit en specificiteit vergeleken met de microscopische onderzoekstechnieken (Farrington *et al.*, 1995; Otto *et al.*, 1995). Een nadeel is dat ze alle duur zijn en dat gespecialiseerde apparatuur nodig is. Dipsticks zijn daarentegen zeer gebruiksvriendelijk en hebben daarenboven een goede gevoeligheid en specificiteit (Depierreux *et al.*, 2001). Het opsporen van antistoffen in het bloed blijkt onbruikbaar te zijn als diagnosemethode, omdat detecteerbare antistoffen meestal pas verschijnen na een patente infectie (O'Donoghue, 1995; Quilez *et al.*, 1996b).

Moleculaire technieken

Polymerase Chain Reaction (PCR) biedt een goed alternatief voor de conventionele diagnostieken. Bovendien is PCR in staat om een onderscheid te maken tussen de verschillende *Cryptosporidium* species en genotypen (Awad-El-Kariem *et al.*, 1994). Alhoewel PCR uitermate geschikt is voor stalen met weinig oöcysten, heeft het ook zijn beperkingen. Vals positieve resultaten kunnen bekomen worden door detectie van vrije nucleïnezuuren, dode micro-organismen of labcontaminatie (Fayer *et al.*, 2000a). Vals negatieve kunnen ontstaan door denaturatie van DNA. Bovendien kan PCR niet in elk labo uitgevoerd worden. Gespecialiseerde labo's en dure apparatuur zijn nodig om PCR uit te voeren.

GENOTYPERING EN ZOONOTISCH ASPECT

Zoals reeds eerder vermeld bevat het genus *Cryptosporidium* tien officieel aanvaarde species (Xiao *et al.*, 2002). Vier daarvan werden reeds beschreven bij het rund: *C. parvum*, *C. andersoni* (Enemark *et al.*, 2002), *C. felis* (Bornay-Llinares *et al.*, 1999) en *C. canis* (Fayer *et al.*, 2001). Enkel *C. parvum* wordt veelvuldig beschreven bij kalveren als primaire oorzaak van diarree (de Graaf *et al.*, 1999b).

Er bestaan verschillende genotypen van *C. parvum*: een humaan genotype (type 1) dat enkel wordt gevonden bij de mens en dat door sommige auteurs *C. hominis* wordt genoemd (Morgan-Ryan *et al.*, 2002) en een bovine genotype (type 2) dat bij veel diersoorten voorkomt (McLauchlin *et al.*, 1999). Daarnaast werd recentelijk een rund-specifiek genotype beschreven: *C. parvum* bovine B (Xiao *et al.*, 2002).

In tegenstelling tot de duidelijke genetische verschillen tussen het humane en het bovine genotype van *C. parvum*, is er weinig variatie binnen de genotypen. Microsatellietanalyse van 94 *C. parvum* humane en bovine isolaten toonde aan dat het humane genotype kon onderverdeeld worden in 2 subgenotypen en het bovine genotype in 4 subgenotypen (Caccio *et al.*, 2000).

De mens wordt geïnfecteerd door direct contact met dieren of andere mensen, of door besmet voedsel en drinkwater (Robertson *et al.*, 2002). Een aantal grote uitbraken, die toegeschreven werden aan met *C. parvum* besmet drinkwater, heeft de bezorgdheid omtrent het zoönotisch aspect in de hand gewerkt (Graczyk *et al.*, 1997). De rol die de rundveehouderij speelt in de contaminatie van oppervlaktewater, is onduidelijk. Desondanks worden runderen als een belangrijke besmettingsbron gezien (Ong *et al.*, 1996; Anderson, 1998; Graczyk *et al.*, 2000). In Europa worden bij de mens meer infecties veroorzaakt door het bovine genotype dan door het humane genotype (McLauchlin *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2001; Guyot *et al.*, 2001), wat toegeschreven wordt aan de intensieve veeteelt, onder meer in gebieden waar drinkwater wordt gewonnen (Heitman *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2002).

BEHANDELING EN PREVENTIE

Tot op heden bestaan er nog geen geneesmiddelen die 100% effectief zijn voor de behandeling van klinisch zieke kalveren. Noch sulfonamiden, amprolium noch monensin, die alle effectief zijn tegen *Eimeria* spp. en *Isospora* spp., beïnvloeden het infectiever-

loop (Moon *et al.*, 1982; Fayer, 1992). Dit kan verklaard worden doordat *Cryptosporidium* niet tot de coccidia behoort maar tot de gregarinen (Carreno *et al.*, 1999). Paromomycine, een antibioticum dat tot de neomycinegroep behoort, wordt in de humane geneeskunde met goed resultaat gebruikt in de behandeling van cryptosporidiose bij immunosuppressieve patiënten (Armitage *et al.*, 1992; Bissuel *et al.*, 1994; Trad *et al.*, 2003). Bij kalveren en geiten resulteerde een behandeling met paromomycine gedurende tien dagen aan een dosis van 100 mg/kg, onder experimentele omstandigheden, in een daling van de oöcystuitscheiding en van het aantal diarreegevallen (Fayer *et al.*, 1993; Mancassola *et al.*, 1995). Onder natuurlijke omstandigheden werd de incidentie van cryptosporidiose bij kalveren echter niet gereduceerd door hetzelfde behandelingsschema (Grinberg *et al.*, 2002).

In België is enkel halofuginone lactaat geregistreerd voor de preventieve en curatieve behandeling van *C. parvum* infecties bij kalveren. Zowel bij preventief als curatief gebruik heeft halofuginone lactaat een cryptosporidiostatisch effect. Onder experimentele omstandigheden werden na behandeling geen klinische symptomen waargenomen en werden geen oöcysten teruggevonden in de mest tot een aantal dagen na het stopzetten van de behandeling (Naciri *et al.*, 1993). Onder natuurlijke omstandigheden werd een daling van oöcystenuitscheiding en diarree met 44% vastgesteld (Lefay *et al.*, 2001). Na curatieve behandeling met halofuginone scheidt 98% van de dieren geen oöcysten meer uit en worden geen klinische symptomen meer waargenomen. Vanaf 7 dagen na het stopzetten van de behandeling scheidden sommige dieren weer oöcysten uit, zij het in lage hoeveelheden. De behandeling elimineert de infectie niet volledig, waardoor specifieke immuniteit kan worden opgebouwd. Toxiciteit werd enkel bij hoge dosissen vastgesteld (500 µg/kg) (Villacorta *et al.*, 1991b). Het product kan irriterend zijn voor de mucosae en mag niet op een lege maag worden toegediend. Daarom wordt halofuginone het best toegediend gemengd met melk of propyleenglycol. De preventieve behandeling moet gestart worden tijdens de eerste 24 tot 48 uur na de geboorte en dit gedurende 7 opeenvolgende dagen. Ook de curatieve behandeling duurt 7 opeenvolgende dagen en wordt het best zo snel mogelijk na het ontstaan van de symptomen gestart (het liefst binnen de 24 uur). Bij zwaar geïnfecteerde dieren is ondersteunende therapie nodig. Recent werd het cryptosporidiostatisch effect van beta-cyclodextrin, een oplosmiddel gebruikt in de farmaceutische indus-

trie, beschreven. Voor commerciële toepassing is evenwel nog verder onderzoek vereist (Castro-Hermida *et al.*, 2001).

Aangezien medicatie niet 100% effectief is, zijn preventieve maatregelen belangrijk. Naast het verhogen van de niet-specifieke en specifieke immuniteit, bijvoorbeeld door het toedienen van colostrum, zijn vooral omgevingsmaatregelen van belang. Desinfectie van de omgeving is een eerste belangrijke maatregel. Dit is echter niet eenvoudig daar *C. parvum* resistent is tegen vele ontsmettingsmiddelen. De parasiet is resistent tegen ionoforen, cresylzuur, natriumhypochloriet, benzalkonium chloride en natriumhydroxide (Casey *et al.*, 1991). Volgens Fayer (1995) is geen enkel chloorbevattend desinfectans effectief. Desinfectantia, zoals ammoniumhydroxide en waterstofperoxide, zijn effectief bij langdurige blootstelling (Campbell *et al.*, 1982). Enkele gasvormige desinfectantia (ammoniak, ethyleenoxide en methylbromide) zouden ook kunnen gebruikt worden voor de ontsmetting van aarde, instrumenten en gebouwen die gecontamineerd zijn met oöcysten (Fayer *et al.*, 1996). Daarnaast bestaat ook nog een aantal technieken, zoals ozonisatie en UV-licht, die toegepast worden voor drinkwaterontsmetting. Deze technieken zijn goed werkzaam, maar zijn niet toepasbaar in de kalverhuisvesting (Peeters *et al.*, 1989; Korich *et al.*, 1990; Lorenzo-Lorenzo *et al.*, 1993). Het enige wat een totale vernietiging van de oöcysten bewerkstelligt, is uitdroging (Anderson *et al.*, 1986) of branden (Ruest *et al.*, 1998). Stomen zou ook effectief zijn (Angus, 1987; Harp en Goff, 1998). Daar het verlagen van de infectiedruk door desinfectie alleen moeilijk is, speelt het management in de kalverhuisvesting een grote rol. Kalveren worden tijdens de eerste levensmaand het best individueel opgesteld (Heath *et al.*, 1992; Castro-Hermida *et al.*, 2002b) en bij voorkeur buiten (Quigley *et al.*, 1994), in propere boxen, waarbij de mest niet van het ene kalf naar het ander kan stromen. Wanneer een ziek dier wordt opgemerkt, moet het dadelijk worden geïsoleerd (Tartera, 2002). Er moeten aparte laarzen, werkkledij en materiaal voor de verzorging van zieke dieren voorzien worden en deze mogen niet gebruikt worden bij de gezonde dieren. Dit is nodig om de mechanische overdracht van oöcysten te vermijden (Maldonado-Camargo *et al.*, 1998). Het materiaal dient nadien grondig gereinigd en ontsmet te worden. Na elk kalfseizoen moeten de kalverboxen gereinigd en ontsmet te worden, gevolgd door een periode van leegstand. Ter preventie van cryptosporidiose bij zoogkalveren moeten de stallen regelmatig gereinigd en ontsmet worden,

moet de bezettingsdichtheid beperkt worden aan de hand van compartimentatie en wordt er het best gewerkt met leeftijdsgroepen om het contact tussen oudere en jongere kalveren te vermijden. Indien het weer het toelaat, moeten de dieren zo snel mogelijk op de weide geplaatst worden om de infectiedruk te verlagen (G. Hoflack, PUO, 2003).

Vaccinatie tegen *C. parvum* zou in de toekomst een goed alternatief preventiemiddel kunnen vormen. Actieve vaccinatie door orale toediening van gelyofiliseerde oöcysten kort na de geboorte gaf goede resultaten onder experimentele omstandigheden (Harp *et al.*, 1995), maar faalde in natuurlijke omstandigheden (Harp en Goff., 1998). Bovendien staat de interferentie met de colostrale immuniteit en de lage antistoftiters na primaire vaccinatie, een goede werking van een actieve vaccinatie in de weg (de Graaf *et al.*, 1999a). Een passieve vaccinatie via biestmelk biedt goede perspectieven. Zowel bij runderen (Perryman *et al.*, 1999) als bij geiten (Sagodira *et al.*, 1999a) gaf de immunisatie van het moederdier met een recombinant *C. parvum* proteïne een goede bescherming. Immunisatie met recombinante proteïnen of DNA-vaccinatie kan subcutaan gebeuren (Perryman *et al.*, 1999), maar geeft betere resultaten bij mucosale im-

munisatie, bijvoorbeeld intra-nasaal (Sagodira *et al.*, 1999a; Watts en Kennedy, 1999). Bij muizen gaf de intra-nasale immunisatie met een DNA-vaccin, naast een toename van het aantal T-lymfocyten, een stijging van specifieke Ig A in het ileum tot 1 jaar na inoculatie (Sagodira *et al.*, 1999b).

CONCLUSIE

C. parvum speelt een belangrijke rol in het neonaal diarree complex bij kalveren en is bovendien een zoönose die niet ongevaarlijk is voor de mens. De prevalentie bij kalveren over de hele wereld is hoog en preliminaire gegevens tonen aan dat ook in Vlaanderen de parasiet sterk verspreid is. Grote verliezen kunnen vermeden worden, onder meer door een goede hygiënische huisvesting, biestverstrekking en preventieve behandeling op probleembedrijven. In de toekomst kan vaccinatie een belangrijke rol spelen in de preventie van cryptosporidiose.

LITERATUUR

De volledige referentielijst kan aangevraagd worden bij de eerste auteur.