

Kryptosporidieinfektion hos
nötkreatur- Utvärdering av en ny
metod för påvisande av subklinisk
infektion

av

Sofie Andersson

Uppsala 2004

Kryptosporidieinfektion hos nötkreatur- Utvärdering av en ny metod för påvisande av subklinisk infektion

Sofie Andersson

Handledare: Camilla Björkman
Inst. för idisslarmedicin och epidemiologi

Bitr. handledare: Kerstin de Verdier
Avd. för idisslar- och svinsjukdomar, SVA

Examensarbete 2004:7
Veterinärprogrammet
Veterinärmedicinska fakulteten
SLU
ISSN 1650-7045
Uppsala 2004

Abstract

Cryptosporidium parvum is a protozoan parasite causing diarrhoea in many different animal species including cattle and man. It is an important enteric pathogen in neonatal calves and it is the second most common pathogen found in diarrhoeic calves in Sweden. Subclinically infected adult cattle have, in international studies, been shown to shed a low number of oocysts in faeces and this has been recognised as a potential source of infection for new-born calves. The detection methods used for diagnostic purposes are based on microscopic investigation of faecal smears. These methods have a fairly low sensitivity and samples from subclinically infected cattle have to be concentrated before analysis.

The purpose of this study was to establish and evaluate a sodiumchloride-flotation method for concentration of *C. parvum* oocysts in faecal samples and to use the method to investigate the occurrence of subclinical *C. parvum* infection in a dairy herd.

Faecal samples were collected from 5 cows, 5 calves without diarrhoea and 5 calves with diarrhoea. To 1 gram of each sample 72 oocysts were added. This was repeated twice for the samples from calves with diarrhoea and cows. Unspiked and spiked samples were treated by the flotation method and analysed using immunofluorescence microscopy. The sensitivity of the method was 80 % for the samples from calves with diarrhoea spiked with 72 oocysts/gram. 70 % and 0 % sensitivity was shown for the samples of adult cattle and calves without diarrhoea, respectively, at this oocyst level. The recovery rate for faeces from adult cattle and calf-diarrhoea was 52 % and 55 % respectively.

In the second part of the study faecal samples were collected from 20 adult cattle in a dairy herd known to have cryptosporidiosis among the calves. The herd comprised 200 cows and were situated in the south of Sweden. When the samples were concentrated and analysed for presence of *C. parvum* oocysts, oocysts were found in 2 of the samples.

The results showed that the concentration method can be used to detect low levels of oocysts in faeces from adult cattle and from calves with diarrhoea. The result from the samples collected in the dairy herd confirms that there are subclinically infected adult cattle in Sweden that shed oocysts.

Innehåll

Inledning	3
Taxonomi och morfologi	3
Livscykel	3
Klinisk bild och patogenes	4
Behandling och förebyggande åtgärder	4
Epidemiologi	5
Diagnostik	6
<i>Analys av träckprover</i>	6
<i>Koncentreringsmetoder</i>	7
<i>Färgning av histologiska snitt</i>	8
Syfte	8
Material och metoder	8
Utvärdering av koncentreringsmetoden	8
<i>Kryptosporidium parvum-oocystor</i>	8
<i>Faecesprover</i>	9
<i>Provbehandling</i>	9
<i>Koncentrering och avläsning</i>	10
Undersökning av förekomst av subkliniska smittbärare hos vuxna nötkreatur i en besättning	10
Resultat	11
Koncentreringsmetoden	11
<i>Allmänt</i>	11
<i>Formad faeces från kalv</i>	12
Besättningsprover	13
Diskussion	13
Tack till...	15
Referenser	15
Bilaga 1	18
Bilaga 2	23

Inledning

Cryptosporidium parvum är en protozo som upptäcktes och namngavs i början av 1900-talet men det dröjde ända till 1971 innan den sattes i samband med diarré på nötkreatur (Panciera et al, 1971). Sedan dess har parasiten alltmer uppmärksammats som en primärpatogen som ger upphov till diarré hos både djur och människa. Kryptosporidios är en zoonos som alltså kan smitta från djur till människor (och tvärt om). Det är framförallt barn och immunsupprimerade individer som drabbas, men flera stora vattenburna humana utbrott har visat att även vuxna immunkompetenta personer kan smittas och få kliniska symptom. I Sverige har *C. parvum* stor betydelse som enteritpatogen hos unga kalvar och den är ett av de vanligaste infektionsagens som påvisas hos kalvar med diarré. Stor del av forskningen om kryptosporidier inriktas idag på att få större kunskap om smittvägar och om var smittreservoarerna finns.

Taxonomi och morfologi

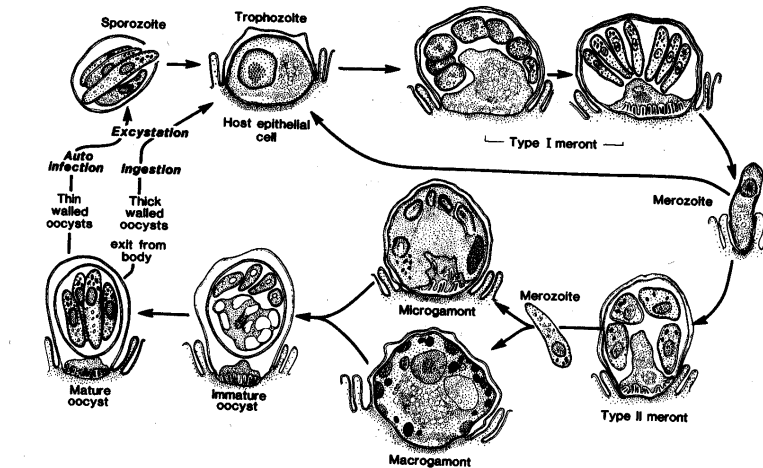
Kryptosporidierna tillhör gruppen koccidier och har många olika arter varav två har påvisats hos nötkreatur, *C. parvum* som framförallt infekterar tunntarmen och *C. andersoni* som hittats i löpmagen hos vuxna nöt (Fayer, 1997, Lindsay, 2000). *C. parvum* är inte värdspecifik utan kan infektera de flesta däggdjur. Molekylärgenetisk forskning har visat att det finns en human genotyp som endast påvisats hos primater och en bovin genotyp som har ett vidare värdspektra (Enemark, 2002).

Oocystorna som är parasitens infektiösa stadium består av fyra stycken sporozoiter som omges av en två lager tjock kapsel. I kapseln finns en sutur genom vilken sporozoiterna kan ta sig ut för att infektera värdceller. Oocystorna är sfäriska och 4-5µm i diameter. *C. parvum* och *C. andersoni* kan skiljas åt morfologiskt vid mikroskopering eftersom *C. andersoni* har en lite annan form och är större än *C. parvum*, 6 - 8 µm (Enemark, 2002).

Livscykel

Kryptosporidiernas livscykel liknar andra tarmkoccidiers (figur 1). Efter oralt upptag av värden excyterar oocystorna och släpper ut sina sporozoiter i gastrointestinalkanalen där de infekterar tarmepitelceller. En asexuell förökning sker där som resulterar i att en meront innehållande åtta stycken merozoiter bildas. När meronten rupturerar släpps merozoiterna ut i tarmlumen, infekterar nya celler och utvecklas till makro- och mikrogameter, parasitens könsceller, som sammansmälter till zygoter. Zygoterna sporulerar i tarmen och bildar oocystor som är infektiösa direkt när de lämnar värden med träcken. Detta skiljer kryptosporidier från de flesta andra koccidier som måste sporulera utanför värden för att bli infektiösa. Kryptosporidier har även förmåga till autoinfektion genom att cirka 20% av oocystorna bildar en tunnare kapsel än de andra. Dessa tunnväggiga

oocyster kan excystera innan de utskiljs med träcken och på så vis orsaka autoinfektion (Current & Garcia, 1991).



Figur 1. Schematisk bild av kryptosporidiernas livscykel. Från Dubey, Speer and Fayer 1990 "Cryptosporidiosis of man and animals" med tillåtelse av CRC Press

Klinisk bild och patogenes

Hos nötkreatur är kryptosporidiosis vanligast hos kalvar mellan 1 till 3 veckors ålder (de la Fuente et al, 1998, Uga et al, 2000, Huetink et al, 2001), men förekommer även hos äldre nötkreatur (Huetink et al, 2001). De vanligaste kliniska symptomen är depression, nedsatt aptit, lindrig feber och diarré. Diarrén kan variera mellan att vara krämig till vattnig och även blodinslag kan förekomma (Tzipori et al, 1983). Symptomen är oftast av övergående natur och en del kalvar förblir symptomfria. Durationen av de kliniska symptomen varierar. I en studie med experimentellt infekterade kalvar varade symptomen mellan 2 - 10 dagar, 3 av 22 kalvar förblev diarré fria och 1 visade inga symptom (Tzipori et al, 1983). Vid samtidig infektion med andra patogener, t ex rotavirus, coronavirus, *E. coli* eller BVDV, kan dock allvarigare sjukdom och dödsfall förekomma (Moon et al, 1978, Hall et al, 1988).

C. parvum infekterar främst distala tunntarmens epitelceller och orsakar där villi-atrofi, villi-fusion och inflammation (Tzipori et al, 1983). Skadorna på tarmepitelet leder till malabsorption och försämrad digestion vilket resulterar i diarré (Current & Garcia, 1991).

Behandling och förebyggande åtgärder

För närvarande finns ingen effektiv terapi mot kryptosporidiosis utan behandlingen inriktas på understödjande åtgärder så som vätsketerapi. Preparat som är

verksamma mot andra koccidier har ej effekt mot *C. parvum* (Enemark, 2002). Man har fått viss framgång vid behandling med ett läkemedel som heter Halocur (verksam substans är halofuginonlaktat) men behandlingen måste sättas in mycket tidigt i sjukdomsförloppet för att ha någon verkan. Andra nackdelar som bland annat smal terapeutisk bredd gör att detta kan anses som ett "sista-utvägen-preparat" (Kerstin de Verdier, personligt meddelande).

Förebyggande åtgärder är det bästa sättet att förhindra smittspridning och utbrott av kryptosporidios. Bra hygien i kalvningsbox och kalvboxar är mycket viktigt eftersom smittan sprids med faeces. Vid gruppållning av kalvar är det viktigt att grupperna inte är för stora och att späda kalvar inte blandas med äldre. Sjuka kalvar bör isoleras från gruppen så snabbt som möjligt och kalvboxar bör regelbundet tömmas för rengörning och upptorkning innan ny grupp sätts in. Adekvat råmjölksgiva till nyfödda kalvar är en annan förebyggande åtgärd som höjer kalvens allmänna motståndskraft mot infektioner (de Verdier Klingenberg & Björkman, 2000).

Epidemiologi

Kryptosporidier sprids faekal-oralt, via direktkontakt eller indirekt via kontaminerad närmiljö, foder, vatten samt livsmedel. Oocystorna är mycket resistent utaför värden och kan förbli infektiiva i flera månader i sval fuktig miljö. De är motståndskraftiga mot de flesta kommersiella desinfektionsmedel och för avdödning krävs t ex 50 % ammoniak, 10 % formalin eller värmebehandling vid temperaturer över 60°C (Current & Garcia, 1991). *C. parvum* överlever även klorinbehandling av dricksvatten (Enemark, 2002), vilket gör att vatten är en potentiell vektor för smittspridning.

C. parvum har en låg infektionsdos och en studie visat att det kan räcka med 30 oocystor från ett kalvisolat för att ge kliniska symptom hos immunkompetenta människor (Du Pont et al, 1995).

Hos nötkreatur ses infektionen främst hos neonatala kalvar. Både internationellt och i Sverige är *C. parvum*, tillsammans med rotavirus och coronavirus, ett av de vanligaste agens som påvisas vid diarré hos kalv (Snodgrass et al, 1986, Mc Donough et al, 1994, de Verdier Klingenberg & Svensson, 1998, Naciri et al, 1999, Björkman et al, 2003). Förekomsten av *C. parvum* i några svenska undersökningar varierar mellan 6 % - 19 % (Viring et al, 1993, de Verdier Klingenberg & Svensson, 1998, Björkman et al, 2003), vilket är relativt låga siffror om man jämför med internationella studier (de la Fuente, 1998, Naciri, 1999, Uga, 2000, Huetink, 2001).

Samband mellan diarré och *C. parvum*-infektion har visats i flera studier (Uga, 2000, Huetink, 2001), medan det i andra undersökningar inte gått att påvisa ett signifikant samband (Snodgrass et al, 1986, Viring et al, 1993, de Verdier Klingenberg & Svensson, 1998, Björkman et al, 2003). Svårigheten med att påvisa ett signifikant samband mellan *C. parvum* och diarré kan i vissa fall förklaras med sjukdomens olika förlopp hos olika individer. Detta har visats i en studie av Fayer et al (1998), där man bl a sett att hos 11 av 26 (42%) kalvar så pågick utskiljning

av oocystor i fler dagar än vad diarrén pågick, samt att diarrén hos många kalvar var intermittent.

Prepatensperioden för *C. parvum* hos experimentellt infekterade kalvar varierar mellan 2 och 7 dagar och utskiljning av oocystor pågår i 1-12 dagar (Fayer, 1997). Infekterade kalvar kan utskilja 10^6 - 10^7 oocystor per gram faeces under en eller flera dagar med diarré (Fayer et al, 1998, Uga et al, 2000). Vid nära kontakt mellan kalvar och vid dålig stallhygien byggs därför snabbt ett högt smittryck upp. Faktorer som hygiennivå, råmjölkutfodring och totalantal djur i en besättning påverkar risken för kryptosporidios (Mohammed et al, 1999). Den viktigaste smittkällan för kalvar anses vara andra kalvar och en närmiljö som kontaminerats med faeces från infekterade kalvar men mycket av dagens forskning inriktas på att identifiera smittreservoarerna och se hur infektionen upprätthålls i en besättning.

Subkliniskt infekterade vuxna nötkreatur har uppmärksammats som en potentiell smittkälla för unga kalvar. I en studie av Huetink et al (2001) fann man att 24 % av *C. parvum*-infekterade kalvar i en besättning började utskilja oocystor när de var yngre än en vecka, indikerande infektion kort efter födelsen, trots att de ej haft kontakt med andra kalvar (kalvhyddor på cementgolv med minst två meter emellan) och att hygien i kalvhyddorna var mycket god. Detta tyder på att smittan funnits i kalvningsboxen där kossan och kalven tillbringade några timmar tillsammans. Man kunde också påvisa oocystutskiljning i alla ålderskategorier i besättningen. För kalvar som började utskilja oocystor efter 8 dagar eller mer kunde inte smittan förklaras med kalvningsboxen med tanke på parasitens prepatensperiod utan den mest troliga smittvägen i dessa fall var enligt författarna olika mekaniska vektorer som tex djurskötare som går från kalv till kalv. Subklinisk infektion hos vuxna nötkreatur har konstaterats i flera andra undersökningar utomlands (Lorenzo Lorenzo et al, 1993, Scott et al, 1995) men aldrig i Sverige.

Förekomst av förhöjda nivåer av oocystutskiljning runt kalvning, så kallad periparturient rise har framförts som ytterligare en faktor av betydelse för smittspridning till nyfödda kalvar. Denna teori stöds av ett fåtal relativt nya studier på nötkreatur och får (Ortega-Mora et al, 1999, Faubert & Litvinsky, 2000). I andra undersökningar har dock inget samband mellan kalvning och ökad utskiljning av oocystor setts (Scott et al, 1995, Atwill et al, 1998).

Skillnader i fynd hos olika studier måste alltid värderas utifrån det faktum att det föreligger stora skillnader i sensitivitet mellan olika diagnostiska metoder

Diagnostik

Analys av träckprover

Påvisande av oocystor i faeces är det vanligaste sättet att diagnostisera kryptosporidieinfektion. Det finns olika metoder varav några beskrivs här.

Färgning av direktutstryk på objektsglas

- Modifierad Ziehl-Neelsen färgning, mZN (Henriksen & Pohlenz, 1981)

En syrafast färgningsmetod där oocystorna blir röda mot en blågrön bakgrund. Detta har länge varit den mest använda metoden för rutindiagnostik och den används på Parasitologiska avdelningen på SVA. Det är en enkel och billig teknik men för avläsningen i mikroskop krävs tränad personal. Det finns olika uppgifter om metodens känslighet, men detektionsnivån ligger i storleksordningen runt 20 000 oocystor/gram faeces (Webster et al 1997) vilket räcker för att diagnostisera klinisk sjukdom men inte för att detektera subklinisk infektion.

- Negativ färgning (Heine, 1982)

Färglösa oocystor mot en röd bakgrund. Måste läsas inom 15 min. Höga nivåer av oocystor per gram faeces krävs för positivt utslag.

- Immunfluorescens (IF)

Provet färgas med fluoresceinmärkta antikroppar mot *Cryptosporidium parvum*. Avläses i fluorescensmikroskop där oocystorna fluorescerar grönt. Detta är en dyrare metod både vad det gäller utrustning och reagenser men lättare att läsa av. Olika uppgifter om sensitivitet finns, men enligt Webster et al (1997) ligger detektionsnivån på 5000 oocystor/gram faeces. Enligt en studie av Quílez et al (1996) hade mZN färgning en sämre sensitivitet än IF medan andra inte sett någon skillnad i känslighet mellan IF och syrafasta färgningsmetoder (Ignatius et al, 1997)

Snabbtest

Dipstick från Cypress Diagnostics består av en sticka som är preparerad med antikroppar mot *Cryptosporidium parvum*, stickan doppas i provet och positivt utslag visas i form av en blå linje inom 15 minuter. Denna test används på Parasitologiska avdelningen, SVA. Vid en jämförelse av Dipstick-testet och mZN färgning blir samma prover positiva respektive negativa, men en osäkerhet finns då dipsticktestet uppvisar en svag linje. På parasitologen verifieras därför alla icke klart negativa prover med mZN (Bodil Christensson, personligt meddelande).

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Faecesprov tillsätts till brunnar belagda med monoklonala antikroppar mot *Cryptosporidium parvum*, eventuellt antigen i provet binds till antikropparna. Anti *Cryptosporidium*konjugat tillsätts och binds till eventuellt antigen. På konjugatet finns ett enzym som när substrat tillsätts bildar en färgad produkt, färgomslaget är markör för ett positivt prov, detta kan avläsas manuellt eller med spektrofotometer. Enligt Webster et al (1997) är lägsta detektionsgränsen 50.000 oocystor per gram faeces och därmed mindre känslig än mZN och Dipstick. ELISA är en relativt dyr metod som kan vara lämplig att använda när man har många prover (Christensson et al, 1996). Vid avläsning med spektrofotometer blir det en mer objektiv bedömning än med de andra metoderna.

Koncentreringsmetoder

Med de tidigare nämnda metoderna kan man diagnostisera klinisk *Cryptosporidiosis* då antalet utsöndrade oocystor per gram faeces är högt. Vid utsöndring av ett lägre

antal oocystor räcker dock inte dessa metoder till (Enemark, 2002). Olika tekniker för att koncentrera faecesprover genom att separera oocystor från debri har utvecklats, detta för att kunna utföra epidemiologiska studier och påvisa subkliniska smittbärare som utsöndrar ett lägre antal oocystor/gram.

- Formalin-etylacetat-sedimentering (FEA, Young et al, 1979).

Faecesprov suspenderas i formalin och etylacetat och skakas kraftigt, vid centrifugering skiktas provet i fyra lager, etylacetat, debri och fett, formalin samt sediment innehållande eventuella oocystor.

- Flotationsteknik. (Kuczynska & Shelton, 1999)

Genom att använda lösningar med hög densitet som sockerlösning eller mättad natriumkloridlösning får man efter centrifugering en skiktning av supernatanten där oocystorna lägger sig i vattenfasen ovanpå den mättade natriumkloridlösningen och det mesta av den fäkalade debri i pelleten. En nackdel är dock att oocystorna kollapsar efter ett antal minuter i hyperton lösning.

Färgning av histologiska snitt

Diagnos kan även erhållas genom färgning av histologiska snitt från tarmen. Dessa bör tas direkt efter avlivning och fixering av snittet bör ske omedelbart. Denna metod används inte länge i rutindiagnostik på grund av metodens invasivitet, nödvändigheten av en omedelbar provbehandling och risken för falska negativa svar då infektionen ej sprids jämt över hela tarmen (Enemark, 2002).

Syfte

Denna studie består av två delar. Ett syfte var att etablera och utvärdera en natriumkloridflotationsteknik som utvecklats på Danmarks Veterinærinstitut i Köpenhamn (DVI) för att koncentrera och rena faecesprover vid *C. parvum*-diagnostik. Det var främst metodens lämplighet vid diagnostik av subkliniska smittbärare och alltså möjligheten att detektera låga nivåer oocystor i faeces som skulle undersökas. Ytterligare ett syfte var att göra en inledande undersökning av förekomsten av subkliniska smittbärare bland vuxna nötkreatur i en svensk besättning med konstaterad *C. parvum*-infektion på kalvarna.

Material och metoder

Utvärdering av koncentreringsmetoden

I arbetet med att etablera och utvärdera känsligheten hos metoden tillsattes ett känt antal oocystor till faecesprover, så kallad spikning.

Kryptosporidium parvum-oocystor

Till detta försök användes oocystor som ursprungligen isolerats från en dansk mjölkbesättning 1990 och sedan dess propagerats i kalvar vid DVI ("the

Copenhagen calf laboratory isolate", CPB-0). Oocystorna i träck från kalvarna har därefter koncentrerats och delvis renats med natriumkloridflotationstekniken som beskrivs i bilaga 1. Från DVI fick vi en stamlösning med okänt antal oocystor per ml.

En preliminär uppskattning av antalet oocystor i stamlösningen gjordes genom att vi spädde stamlösningen 1:40 och räknade antalet oocystor i 60 μ l av denna spädning som tillsattes till brunn på objektsglas. Detta upprepades 5 gånger. Oocystorna färgades med monoklonala antikroppar riktade mot *C. parvum*. Dessa antikroppar är kopplade med ett ämne som fluorescerar vid bestrålning (vidare kallat för FITC konjugerad anti-krypto Mab). Antalet oocystor i varje brunn räknades i fluorescensmikroskop. Medelantalet oocystor i de 5 brunnarna var 259 st och således var totalantalet oocystor i stamlösningen cirka 172.600 oocystor/ml.

En noggrannare kvantifiering gjordes sedan parallellt med spikningsförsöket. Detta gjordes dels för att beräkna antalet oocystor som tillsattes till varje faecesprov och dels för att uppskatta hur mycket antalet oocystor varierar mellan olika pipetteringar. Stamlösningen spädades då 1:100. Av denna spädning tillsattes 58 μ l (vilket enligt den preliminära beräkningen skulle innehålla 100 oocystor) till vardera nio rör innehållande 1,5 ml vatten (samma slutvolym som faecesproverna har efter koncentrerings). Från vart och ett av dessa prov sattes 60 μ l till en brunn på objektsglas. Preparaten färgades och avlästes enligt beskrivning nedan. Antalet oocystor per brunn varierade mellan 1 och 5 (tabell 1). Medelantalet oocystor var 2,89 per brunn, vilket motsvarar i medeltal 72 oocystor i 58 μ l av den spädning av stamlösningen som användes för att spika faecesproverna.

Tabell 1. Antal återfunna oocystor i 60 μ l av prov där 58 μ l av stamlösningen spädd 1:100 satts till 1,5 ml vatten.

objektsglas	brunn 1	brunn 2	brunn 3
A	2	3	2
B	3	1	3
C	3	5	4

Faecesprover

Prover från 5 st mjölkkor och 5 st kalvar, (2 - 6 veckor gamla), togs rektalt på SLUs försöksgård på Kungsängen den 7/10-03. Hos samtliga dessa djur bedömdes avföringen ha normal konsistens. Prover från 2 kalvar med diarré togs rektalt från patienter på Inst. för idisslarmedicin, SLU (22/10-03). Dessutom fick vi tillgång till 3 prover som skickats till Avdelningen för idisslar- och svinsjukdomar, SVA för utredning av kalvdiarréproblem. Proverna var tagna från kalvar med diarré i olika besättningar.

Provbehandling

Till 1 gram av varje prov från korna och kalvarna med diarré sattes 58µl oocystlösning (72 oocystor) + 945µl PBS (buffrad koksaltlösning). Ytterligare 1 gram från vart och ett av dessa prover spikades sedan på samma sätt. 1 gram prov från var och en av kalvarna utan diarré spikades med 72 oocystor (58µl oocystlösning + 945µl PBS) och ytterligare 1 gram av två av dessa prover (K4 och K5) spikades med 360 oocystor (290µl oocystlösning + 710µl PBS).

Koncentrering och avläsning

Koncentrering av proverna utfördes enligt bilaga 1. Metoden beskrivs här i korthet.

Till 1 gram faeces (inklusive oocystlösning och PBS enligt ovan) i ett 50 ml rör tillsattes 3 ml dest. vatten och 4 ml mättad natriumkloridlösning. Blandningen skakades först och centrifugerades sedan i 1 minut (1540 x g) varefter supernatanten överfördes till ett nytt rör som fylldes med dest. vatten upp till 50 ml. Detta centrifugerades i 10 minuter varefter supernatanten sögs av och röret med pelleten återigen fylldes upp till 50 ml med dest. vatten. Ytterligare 2 centrifugeringar i vardera 10 minuter utfördes för att tvätta oocystorna. Efter sista centrifugeringen sögs supernatanten av tills det återstod 1,5 ml totalt inkluderande pellet och supernatant. Återstoden blandades väl och 60µl av provet pipetterades till en brunn (12 mm i diameter) på ett objektsglas.

Ytterligare 1 gram av varje prov till vilka inga oocystor tillsattes koncentrerades också för att användas som negativ kontroll. Till dessa ospikade prover tillsattes endast 4 ml dest. vatten och 4 ml mättad natriumkloridlösning. De behandlades för övrigt på samma sätt som de andra proverna.

Preparaten fick lufttorka och fixerades sedan i aceton i 10 minuter. De färgades genom att 40-50 µl FITC-konjugerad anti-krypto Mab, beroende på preparatets tjocklek, tillsattes till varje brunn. Inkubering skedde i rumstemperatur och mörker under 1 till 2 timmar. Brunnarna tvättades därefter med PBS, ett monteringsmedel tillsattes och preparatet täcktes med täckglas som förseglades med nagellack runt om för att förhindra att preparatet torkade.

Varje glas märktes med ett löpnummer och avläsning gjordes i fluorescensmikroskop vid 400 gångers förstoring. Vid avläsning var preparatets identitet okänd. Som oocystor räknades runda eller lätt ovala strukturer av storleken 4-5 µm vars kontur fluorescerade grönt. Ett prov noterades som positivt vid fynd av en eller flera oocystor per brunn. Ett prov noterades som negativt när hela brunnen avlästs utan fynd av oocystor.

Undersökning av förekomst av subkliniska smittbärare hos vuxna nötkreatur i en besättning

Proverna togs i en mjölkbesättning med cirka 200 kor i södra Sverige. Besättningen hade problem med diarré hos kalvarna och vid tidigare provtagning och rutindiagnostik på Parasitologiska avdelningen, SVA var flera av kalvarna

positiva för *C. parvum*, se bilaga 2. Faecesprover togs från 20 kor som alla var inom 10 dagar före beräknad kalvning till 16 dagar efter kalvning. Proverna insamlades vid ett tillfälle den 18/11-03 och provbehandlingen utfördes den 20-21/11-03. 1 gram av varje prov koncentrerades med den ovan beskrivna natriumkloridflotationsmetoden och 60 µl av vardera prov analyserades enligt tidigare beskrivning.

Resultat

Koncentreringsmetoden

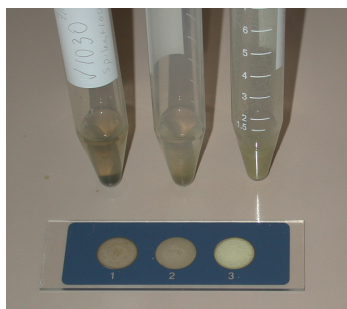
Allmänt

C. parvum påvisades inte i något av kontrollproverna (ospikade) från kalvar med diarré och mjölkkor. Av de 5 kontrollproverna från kalvar utan diarré (vidare kallad formad faeces) var 3 positiva (tabell 2).

Tabell 2. Antal återfunna *C. parvum*-oocystor i träckprover från *V* (vuxna nötkreatur), *KD* (kalvar med diarré) och *K* (kalvar utan diarré).

Prov	Antal tillsatta oocystor			
	0	72	72	360
V1	0	1	2	-
V2	0	1	0	-
V3	0	5	1	-
V4	0	3	2	-
V5	0	0	0	-
KD1	0	0	0	-
KD2	0	2	1	-
KD3	0	4	1	-
KD4	0	4	2	-
KD5	0	1	1	-
K1	1	1	-	-
K2	11	13	-	-
K3	6	5	-	-
K4	0	0	-	0
K5	0	0	-	0

Den högsta sensitiviteten erhöles vid spikning av kalvdiarréprover där 8 av 10 (80%) spikade prover avlästes positiva vid en nivå av 72 oocystor/gram. Metodens känslighet vid spikning av kofaeces-proverna var 70% (7/10, 72 oocystor/gram) Lägst känslighet påvisades vid spikning av formad faeces från kalvar, 0% (0/2) vid spikning med 72 respektive 360 oocystor/gram. Proverna från kalvar utan diarré hade efter koncentrerat ett helt annat utseende än de andra proverna både makroskopiskt, i provröret och på objektglaset (figur 2), samt mikroskopiskt. Dessa prover var mycket svåravlästa och kommenteras vidare nedan.



Figur 2. Koncentrerat prov från kofaeces i provrör och brunn till vänster. Formad faeces från kalv till höger.

Medelantalet återfunna oocystor i kofaeces- och kalvdiarréproverna var 1,5 respektive 1,6. Återfinningsgraden eller så kallad recovery rate var alltså 52% (1,5/2,89) för kofaeces och 55% (1,6/2,89) för kalvdiarré. Alltså har 48 % respektive 45% av oocystorna gått förlorade i koncentrerings- och reningsprocessen.

Formad faeces från kalv (prov K1-K5)

De tre positiva kontrollproverna (K1, K2 och K3) skickades till Parasitologiska avdelningen, SVA där de analyserades med modifierad Ziehl-Neelsen färgning, vilket är standardmetod vid rutindiagnostik. Med denna metod påvisades inga oocystor i något av de tre proverna.

Prov K4 och K5 spikades med 360 oocystor med negativt resultat Eftersom svårigheten vid avläsning till stor del uppfattades som beroende av tjockleken på preparatet så gjordes ett nytt försök till avläsning av prov K4 och K5 (spikade med 360 oocystor) där provmängden (60 µl) fördelades på två brunnar (30 µl/brunn). Resultatet av detta var att båda proverna nu avlästes som positiva. Även de ospikade, tidigare negativa proverna K4 och K5 avlästes på nytt med provmängden fördelad på två brunnar och K4 var då fortfarande negativ medan K5 var positiv, se tabell 3.

Tabell 3. Antal återfunna *C. parvum*-oocystor i träckprover från kalvar utan diarré.

Prov	Antal tillsatta oocystor				
	0	72	360	0 2 brunnar*	360 2 brunnar*
K1	1	1	-	-	-
K2	11	13	-	-	-
K3	6	5	-	-	-
K4	0	0	0	0	7 (3+4)
K5	0	0	0	4 (3+1)	10 (9+1)

*provet fördelades på två brunnar

Besättningsprover

Av de 20 provtagna korna var 2 positiva. Dessa hade kalvat 6 respektive 14 dagar före provtagning. I båda de positiva proverna hittades 1 oocysta/brunn, vilket motsvarar 48 oocystor/gram faeces om man räknar med en "recovery rate" på 52 % enligt tidigare uträkning.

Diskussion

Resultaten i denna studie visar på goda möjligheter att kunna detektera subkliniska nivåer av oocystutskiljning med den här använda natriumkloridflotationstmetoden. Vi kom fram till en känslighet på 70-80 % på en nivå av 72 oocystor per gram träck. Olika nivåer av oocystutskiljning hos symptomfria kor har påvisats i olika studier. Scott et al (1995) uppmätte nivåer mellan 35-7000 oocystor/g hos 50 friska kor och i ett annat försök hittade man 125-500 oocystor/g hos 148 symptomfria kor (Faubert & Litvinsky, 2000). I båda dessa studier använde man sockerflotation som koncentrationsmetod och man måste räkna med att ett antal oocystor förloras i processen, dvs att "recovery rate" ej är lika med 100% (Enemark, 2002). De egentliga nivåerna av oocystor som dessa kor utskiljde var därför sannolikt något högre än vad som anges. I jämförelse med de nivåer av oocystutskiljning dessa studier har funnit hos subkliniskt infekterade kor så kan man anta att en stor del av

de eventuellt subkliniskt infekterade korna i en besättning skulle upptäckas med den koncentreringsmetod som vi använt i denna studie.

Metodens begränsning ligger i svårigheten att kunna detektera mindre mängder oocystor i formad faeces från kalv. Detta beror troligen dels på större mängd fett i formad faeces från icke avvänjda kalvar samt dels på att en större andel finfördelade partiklar som har låg densitet lägger sig ovanpå natriumkloridskiktet (tillsammans med oocystorna) vid flotationen. För att komma ner på en nivå av 360 oocystor/gram fick vi lov att dela upp provmängden på två brunnar vilket blir tidsödande om man vill göra en fullständig kvantifiering, men inte fullt så tidsödande om det räcker med ett positivt alternativt negativt provresultat. Det är intressant att notera att de tre proverna från kalvar utan diarré som med denna metod visades vara infekterade med *C. parvum*, alla var negativa enligt provsvar från Parasitologiska avdelningen, SVA där de använder modifierad Ziehl-Neelsen färgning som diagnostisk metod. Med tanke på natriumkloridflotationsmetodens okänslighet vid nivåer på 360 oocystor/g och nedåt samt en nedre detektionsgräns för mZN på runt 20.000 oocystor/g (Bodil Christensson, personligt meddelande, Webster et al, 1997), så kan man dra slutsatsen att dessa till synes friska kalvar vid provtillfället troligen utskiljde nivåer mellan 360 och 20.000 oocystor/gram.

Resultatet av besättningsproverna visar att 2 av de 20 korna utskiljer oocystor. Detta bekräftar att det även i Sverige förekommer subkliniskt infekterade kor som utskiljer oocystor med träcken, vilket redan tidigare konstaterats i flera studier utomlands (Lorenzo Lorenzo et al, 1993, Scott et al, 1995). En oocysta per brunn motsvarar 48 oocystor/gram faeces om man räknar med en "recovery rate" på 52 % som denna studie visar att metoden har.

Med tanke på den låga smitt dosen och *C. parvums* höga överlevnadsförmåga kan även låga nivåer i faeces vara av epidemiologisk betydelse. Framtida användningsområde för den nya koncentreringsmetoden är framför allt epidemiologiska undersökningar där man kan tänka sig screening av hela besättningar eller vissa ålderskategorier för att få en klarare bild av prevalensen av denna infektion samt bättre kunna förstå smittvägar. Intressant vore t ex en studie av förekomst av förhöjda nivåer runt kalvning som det finns motsägande uppgifter om (Scott et al, 1994, Atwill et al, 1998, Ortega-Mora et al, 1999, Faubert & Litvinsky, 2000). Noggranna undersökningar av patensperioder, dvs antal dagar som oocystor utskiljs, skulle kunna utföras genom att följa en ev stegring och sänkning av oocystutskiljning hos smittade kalvar. Med ny kunskap inom dessa områden skulle rådgivning som ämnar till att sänka smittspridningen till och mellan kalvar kunna förbättras. Man skulle eventuellt också kunna tänka sig att använda metoden som ett redskap i besättningsutredning i besättningar med konstaterad *C. parvum* infektion och diarréproblem som visat sig vara svåra att bli av med. Även av zoonosskäl är det viktigt att få en tydligare bild av infektionsläget hos nötkreatur i Sverige.

För diagnostisering av kliniska fall kommer även i fortsättningen färgning utan föregående koncentreringsmetod samt snabbtester att vara de mest lämpliga med tanke på att dessa är mindre tids- och resurskrävande.

Tack till...

Jag vill först och främst tacka Camilla Björkman som med stort engagemang och entusiasm hjälpt mig under hela processen, från planering av studien fram till sista utskriften.

Kerstin de Verdier, för uppmuntran, värdefulla synpunkter och förmedlande av kontakt med lämplig besättning.

Heidi Enemark Larsen, för all hjälp att komma igång med metoden samt för generöst bidrag med *C. parvum* oocystor.

Bodil Christensson, för tid hon lagt ner på att ge mig en inblick i olika diagnostiska metoder.

Till sist men inte minst vill jag tacka Stiftelsen för Lantbruksforskning, för ekonomiska medel som gjort denna studie möjlig att genomföra.

Referenser

- Atwill E.R., Harp J.A., Jones T., Jardon P.W., Checel S. & Zylstra M. 1998. Evaluation of periparturient dairy cows and contact surfaces as a reservoir of cryptosporidium parvum for calfhoo infection. *American Journal of Veterinary Research* 59, 9, 1116-1121.
- Björkman C., Svensson C., Christensson B. & de Verdier K. 2003. Cryptosporidium parvum and Giardia intestinalis in calf diarrhoea in Sweden. In press, *Acta Veterinaria Scandinavica*.
- Christensson B.E., Christensson D.A., Leemans I. & Feinstein R.E. 1996. *Proceedings from 22nd Congress of Medical Technology, Norway 1996*.
- Current W.L. & Garcia L.S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 4, 3, 327-329.
- de la Fuente R., Luzón M., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Garcia A., Cid D., Orden J.A., Garcia S., Sanz R. & Gómez-Bautista M. 1999. Cryptosporidium and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrhoeic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology* 80, 179-185.
- de Verdier Klingenberg K. & Svensson L. 1998. Group A rotavirus as a cause of neonatal calf enteritis in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 39, 195-199.
- de Verdier Klingenberg K. & Björkman C. 2000. Rotavirus & Cryptosporidier Håll balansen: sänk smittrycket och höj motståndskraften! *Husdjur* 10.
- Du Pont H.L., Chappel C.L., Sterling C.R., Okhuysen P.C., Rose J.B. & Jakubowski W. 1995. The infectivity of cryptosporidium parvum in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine* 332, 855.
- Enemark H.L. 2002. *Cryptosporidium. Studies of molecular characteristics and pathogenicity. PhD thesis*. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen.
- Faubert G.M. & Litvinsky Y. 2000. Natural transmission of cryptosporidium parvum between dams and calves on a dairy farm. *Journal of Parasitology* 86, 3, 495-500
- Fayer R. 1997. General biology of cryptosporidium. In: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* ed Fayer R. CRC Press, Boca Raton 1-41

- Fayer R., Gasbarre L., Pasquali P., Canals A., Almeria S. & Zarlenga D. 1998. Cryptosporidium parvum infection in bovine neonates : dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology* 28, 49-56.
- Hall G.A., Reynolds D.J., Parsons K.R., Bland A.P. & Morgan J.H. 1988. Pathology of calves with diarrhoea in southern Britain. *Research in Veterinary Science* 45, 240-250
- Heine J. 1982. Eine einfache nachweismethode für kryptosporidien im kot. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B*, 29, 324-327
- Henriksen S.A. & Pohlenz J.F.L. 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica* 22, 594-596.
- Huetink R.E.C., van der Giessen J.W.B., Noordhuizen J.P.T.M. & Ploeger H.W. 2001. Epidemiology of cryptosporidium spp and giardia duodenalis on a dairy farm. *Veterinary Parasitology* 102, 53-67
- Ignatius R., Eisenblatter M., Regnath T., Mansmann U., Futh U., Hahn H. & Wagner J. 1997. Efficacy of different methods for detection of low cryptosporidium parvum oocysts numbers or antigen concentrations in stool specimens. *European Journal of Microbiology and Infectious Diseases* 16,732-736.
- Kuczynska E. & Shelton D.R. 1999. Method for detection and enumeration of cryptosporidium parvum oocysts in faeces, manures and soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 7, 2820-2826.
- 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. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47, 1, 91-95.
- Lorenzo-Lorenzo M.J., Ares-Mazás E. & Villacorta Martínez de Maturana I. 1993. Detection of oocysts and IgG antibodies to cryptosporidium parvum in asymptomatic adult cattle. *Veterinary Parasitology* 47, 9-15.
- Mc Donough S.P., Stull C.L. & Osburn B.I. 1994. Enteric pathogens in intensively reared veal calves. *American Journal of Veterinary Research* 55, 11, 1516-1520.
- Mohammed H.O., Wade S.E. & Schaaf S. 1999. Risk factors associated with cryptosporidium parvum infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology* 83, 1-13.
- Moon H.W., Mc Clurkin A.W., Isaacson R.E., Pohlenz J., Skartvedt S.M., Gillette K.G. & Baetz A.L. 1978. Pathogenic relationships of rotavirus, Escherichia coli and other agents in mixed infection in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 173, 577-583.
- Mtambo M.M.A., Nash A.S., Blewett D.A. & Wright S. 1992. Comparison of staining and concentration techniques for detection of cryptosporidium oocysts in cat faecal specimens. *Veterinary Parasitology* 45, 49-57.
- 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. *Veterinary Parasitology* 85, 245-257.
- Ortega-Mora L.M., Requejo-Fernández J.A., Pilar-Izquierdo M. & Pereira-Bueno J. 1999. Role of adult sheep in transmission of infection by cryptosporidium parvum to lambs: Confirmation of periparturient rise. *International Journal for Parasitology* 29, 1261-1268.
- Pancieria R.J., Thomassen R.W. & Garner F.M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology* 8, 479-484.
- Quilez J., Sánchez-Acedo C., Clavel A., del Cacho E. & López-Bernad F. 1996. Comparison of an acidfast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of cryptosporidium oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. *Veterinary Parasitology* 67, 75-81
- Scott C.A., Smith H.V., Mtambo M.M.A. & Gibbs H.A. 1995. An epidemiological study of cryptosporidium parvum in two herds of adult beef cattle. *Veterinary Parasitology* 57, 277-288.
- Snodgrass D.R., Terzolo H.R., Sherwood D., Campbell I., Menzies J.D. & Synge B.A. 1986. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Veterinary Record* 119, 31-34.

- Tzipori S., Smith M., Halpin C., Angus K.W., Sherwood D. & Campbell I. 1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: Clinical manifestations and pathological findings. *Veterinary Record* 112, 116-120.
- Uga S., Matsuo J., Kono E., Kimura K., Inoue M., Rai S.K. & Ono K. 2000. Prevalence of cryptosporidium parvum infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan. *Veterinary Parasitology* 94, 27-32.
- Weber R., Bryan R.T. & Juranek D.D. 1992. Improved stool concentration procedure for detection of cryptosporidium parvum oocysts in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 11, 2869-2873.
- Webster K.A., Giles M., Green J.A., Dawson C. & Catchpole J. 1997. *Proceedings from VIIIth International Coccidiosis Conference and European Union COST820 Workshop, 1-5 sep 1997*. Keble College, Oxford, UK
- Viring S., Olsson S.O., Alenius S., Emanuelsson U., Jacobsson S.O., Larsson B., Linde N. & Uggla A. 1993. Studies of enteric pathogens and γ -globulin levels of neonatal calves in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 34, 271-279.
- Young K.H., Bullock S.L., Melvin D.M. & Spruill C.L. 1979. Ethyl acetat as a substitute for diethyl ether in the formalin-eter sedimentation technique. *Journal of Clinical Microbiology* 10, 852-853.

Bilaga 1

Isolation and detection of Cryptosporidium oocysts from faeces

1. Sample type: Human and animal faeces

1.1 Materials and reagents:

- High quality, oocyst free water – Milli-Q or deionised.
- Saturated NaCl in water (Milli-Q or deionised) – room temperature (360g NaCl / liter).
- 50 ml conical centrifuge tubes (Corning, USA, cat 430829)
- 10 ml centrifuge tubes with volume indications (Sarstedt, Germany, cat 62.9924.283)
- Teflon printed diagnostic slides 3 wells 12 mm. (Immuno-Cell Int., Belgium, cat 61.100.03)
- Acetone (General grade) for fixing.
- Sterile phosphate-buffered saline (pH 7.2)
- FITC conjugated anti-Crypto MAb (Microgen Bioproducts Ltd., UK, cat M85)
- IFA mounting fluid (Cell Labs, UK)
- Cover Slips 24 x 50 mm. (Hounisen, DK)
- Quick drying nail polish.

1.2 Method (analysis of 1 g sample)

1.2.1 Flotation in saturated sodium chloride solution

1. Weigh 1.0 g of faeces in a 50 ml conical centrifuge tube.
2. Add 4 ml of water (Milli-Q or deionised).
- For validation, add oocysts in 1 ml PBS + 3 ml of water instead!**
3. Vortex until the suspension is of even consistency, shaking the tube 2-3 times to insure suspension of any material that has been deposited near the mouth of the tube.
4. Add 4 ml saturated NaCl in water (room temperature).
5. Shake tube to suspend any particles that may have been deposited on the lid.
6. Vortex 10 seconds. Shake tube. Vortex 10 seconds.
7. Centrifuge 1 minute at 1540 x g at room temperature.
8. Transfer supernatant to new 50 ml tube (containing approximately 42 ml of water) with a 5 ml automatic pipette, being careful not to disturb the pellet.
9. Fill tube to 50 ml with water (Milli-Q or deionised).
10. Rinse pipette tip by carefully sucking the diluted solution into the tip several times.
11. Centrifuge 10 minutes at 1540 x g (room temperature). Fast acceleration, medium brake.
12. Use vacuum to remove supernatant until there are approximately 5 ml left in the tube.
13. Vortex approximately 10 seconds until the pellet is suspended.
14. Add water (Milli-Q or deionised) to 50 ml.
15. Centrifuge 10 minutes at 1540 x g (room temperature). Fast acceleration, medium brake.
16. Use vacuum to aspirate supernatant until there are approximately 5 ml left in the tube. **DO NOT VORTEX!**
17. Carefully transfer pellet plus the remaining liquid to a 10 ml tube.
18. Use small amounts of water (Milli-Q or deionised) to wash the 50 ml tube and pipette tip several times, transferring the wash water to the 10 ml tube until it is full.
19. Centrifuge 10 minutes at 1540 x g (room temperature). Fast acceleration, medium brake.
20. Use vacuum to aspirate the supernatant until there are 1,5 ml left in the tube.
21. Vortex to suspend the pellet.

22. Insure that all liquid is at the bottom of the tube. Use the automatic pipette to mix the liquid and transfer 60 μ l to a well of a marked slide for FITC staining.
23. Dry at room temperature. The slides can now be stored for up to a few days at 5°C, but they must be allowed to dry completely again before continuing.

1.2.2 Staining and microscopy

1. Submerge the slide in room temperature acetone for 10 minutes, and allow to air dry.
2. Add 50 μ l FITC conjugated anti-crypto MAb to the well, being certain that the entire well is covered with stain, and incubate 1 hour in the dark at room temperature.
3. Use an automatic pipette to aspirate the stain, being careful not to touch the sample surface.
4. Gently drip 100 μ l PBS to the well, and carefully aspirate it off. Repeat with fresh PBS.
5. The sample may be allowed to air dry slightly, but must remain visibly damp.
6. Add 1 drop mounting medium (approximately 10 μ l) to each well, and drop a coverslip onto the slide, avoiding bubbles in the well.
7. Seal with fast drying nail polish around the edges of the coverslip to secure the lit, and to prevent drying.
8. Examine at x 200 – 250 magnification
 - a) If there are more than approximately 10^4 oocysts in the well (~ 40 oocysts per field of vision at x 250), make a 1:100 dilution (The oocyst suspension is vortexed, and 100 μ l oocyst suspension is added to 9,9ml Milli-Q water), vortex, and transfer 60 μ l to a slide well. Dry, fix and stain as above.
 - b) If there are more than approximately 10^3 oocysts in the well (~ 4 oocysts per field of vision at x 250), make a 1:10 dilution (The oocyst suspension is vortexed, and 100 μ l oocyst suspension is added to 900 μ l Milli-Q water), vortex, and transfer 60 μ l to a slide well. Dry, fix and stain as above.

- c) If there are fewer than 1000 oocysts in the well, the number can be considered reliable. (**For validation, a duplicate slide should be made and counted**).
- d) To allow reliable quantification in formed fatty stools, the 60 µl subsample should be pipetted onto 2 wells.

APPENDIX

On the first slide 4,0% of the sample is examined. The final volume of the extraction is 1,5 ml, and the volume transferred to the slide is 60 µl.

$$\frac{60\mu l}{1500\mu l} \cdot 100\% = 4,0\%$$

60 µl of a 1:10 dilution would contain 0,4% of the sample, and 60 µl of a 1:100 dilution would contain 0,04% of the sample.

Expected counts per well (assuming 100% recovery)

Spiking level	60µl undiluted	60µl diluted 1:10	60µl diluted 1:100
10 ²	4		
10 ³	40		
10 ⁴	400		
10 ⁵	4000	400	
10 ⁶	40000	4000	400

In order to determine which dilution is needed, one does not need to count all oocysts in the well first. It is possible to estimate the count by counting several representative viewing areas, and determining the average number of oocysts per viewing area.

Which dilution is needed will depend on the relationship of the actual average number of oocysts per viewing area to a calculated average.

Calculating the average number of oocysts per view cutoffs

To find the number of viewing areas in a well, count the number of viewing diameters the well has (n). The area of a single viewing is defined:

$$Area_{view} = \frac{\pi \cdot Diameter_{view}^2}{4}$$

The area of the well is defined as:

$$Area_{well} = \frac{\pi \cdot (n \cdot Diameter_{view})^2}{4}$$

The number of viewing areas (V) is therefore:

$$V = \frac{Area_{well}}{Area_{view}} = \frac{\left[\frac{\pi \cdot (n \cdot Diameter_{view})^2}{4} \right]}{\left[\frac{\pi \cdot Diameter_{view}^2}{4} \right]} = n^2$$

The cutoff for 1:100 dilution is 10^4 oocysts. The average number of oocysts per view can therefore be calculated as:

$$Oocysts_{view} = \frac{10^4}{V}$$

The cutoff for 1:100 dilution is 10^3 oocysts. The average number of oocysts per view can therefore be calculated as:

$$Oocysts_{view} = \frac{10^3}{V}$$

At 250X magnification, the 12 mm diameter wells are about 16,5 viewing areas across, so the number of viewing areas per well is:

$$V = 16,5^2 = 272$$

If there are fewer than approximately 3,7 oocysts per view area, then the slide well will contain fewer than 1000 oocysts, and no dilution is necessary. All oocysts on the slide should be counted.

If there are more than an average of 3,7 oocysts per view area, then the slide well will contain more than 1000 oocysts, and a new slide should be made from a 1:10 dilution.

If there are more than an average of 37 oocysts per view area, a new slide should be prepared from a 1:100 dilution.

Bilaga 2

Sammanställning av provresultat

Träckprover tagna från 22 kalvar i en mjölkbesättning,
Provtagningsdatum: 7 november 2003

Lab nr	<i>C. parvum</i>	<i>Eimeria</i> spp.		rotavirus	coronavirus	kalvens ålder
		opg	art			
76	-	-		-	-	1-2 v
77	-	+	50 <i>strongyloides papillosos</i>	-	-	1-2 v
80	+	-		-	-	2-3 v
81	-	-		-	-	2-3 v
82	+	-		+	-	2-3 v
83	+	-		+	-	2-3 v
84	-	+	50 <i>strongyloides papillosos</i>	-	-	2-3 v
85	-	-		-	-	2-3 v
86	-	+	11550 *	-	-	2-3 v
87	-	-		-	-	2-3 v
88	-	+	9150 **	-	-	2-3 v
89	-	+	250 <i>E. spp</i>	-	-	2-3 v
78	-	-		-	-	4 v
79	-	-		-	-	4 v
90	-	-		-	-	3-8 v
91	-	-		-	-	3-8 v
92	+	-		-	-	3-8 v
93	+	-		-	-	3-8 v
94	+	-		-	-	3-8 v
95	-	-		-	-	3-8 v
96	-	-		-	-	3-8 v
97	-	-		-	-	3-8 v

* *E. auburnensis* (80 %), *E. canadensis/wyomingensis* (20 %).

** *E. auburnensis* (50 %), *E. canadensis* (25 %), *E. wyomingensis* (25 %)

Analysmetoder:

Kryptosporidier: snabbtest + utstryk (konfirmerande)

Rotavirus: ELISA (Dako)

Coronavirus: ELISA (Cypress)

