



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Utvärdering av snabbtester för att identifiera *Cryptosporidium* spp. hos kalv

Linda Larsson

Uppsala

2013

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:4

Evaluation of rapid tests to identify *Cryptosporidium* spp. in calves

Linda Larsson

Huvudhandledare: Charlotte Silverlås, Institutionen för kliniska vetenskaper; SLU

Biträdande handledare: Karin Troell, Institutionen för virologi, immunbiologi och parasitologi, SVA

Examinator: Camilla Björkman, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0736, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: Cryptosporidium, parvum, bovis, ryanae, andersoni, snabbtest, ELISA, kalv
Key words: Cryptosporidium, parvum, bovis, ryanae, andersoni, rapid, test, ELISA, calf*

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>

ISSN 1652-8697

Examensarbete 2013:4

INNEHÅLL

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INTRODUKTION	3
Kalvhälsa och kalvdiarré	3
<i>Cryptosporidium parvum</i> och dess livscykel	3
Klinisk sjukdom och behandling	4
Zoonotisk smitta	4
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	5
<i>Cryptosporidium bovis</i>	5
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	5
Åldersfördelning av <i>Cryptosporidium</i> spp. hos nöt	6
Olika metoder för att detektera <i>Cryptosporidium</i> spp.	8
Konventionella metoder	8
PCR	9
Andra metoder	9
Syfte med studien	9
Inledande arbete	9
Genomförande	10
MATERIAL OCH METODER	11
Prover	11
Reningsmetod med saltflotation	12
FASTest® CRYPTO Strip av Mega Cor Diagnostik, ”Megacor”	13
Fassisi® Crypto av Fassisi, ”Fassisi”	13
Bovine Enterichek Crypto av Biovet®, ”Enterichek”	15
Bovine Rotavirus-Coronavirus, <i>Escherichia coli</i> K99 (F5+) and <i>Cryptosporidium parvum</i> antigen test kit (ELISA) Pathasure® Enteritis 4 av Biovet®, ”ELISA”	15
RESULTAT	16
<i>Cryptosporidium parvum</i>	16
<i>Cryptosporidium bovis</i>	18
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	19
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	20
Testernas tillförlitlighet	20
Delstudie inriktad på träck innehållande <i>C. bovis</i>	21

Svinn av tester	22
DISKUSSION	22
Artspecificitet	22
Frysning av prover och dess påverkan på detektionsgränser	23
Falskt positiva och negativa utslag	25
Framräknade känsligheter för testerna	25
Användarvänlighet	25
Alternativ till snabbtester	26
SLUTSATSER	26
Tack!	26
LITTERATURFÖRTECKNING	27
Bilaga 1	30

SAMMANFATTNING

Cryptosporidium parvum är en parasit som orsakar mild till allvarlig diarré hos unga kalvar. Den sprids snabbt i en besättning och det är önskvärt att snabbt kunna identifiera patogenen för att bryta smittkedjan. I svenska mjölkbesättningar dominerar dock *Cryptosporidium bovis* hos unga kalvar och även kryptosporidiearterna *C. ryanae* och *C. andersoni* har återfunnits i åldersgruppen. Form och storlek på *C. andersoni* skiljer sig från det övriga arterna men de andra kan inte morfologiskt skiljas åt. Tre snabbtest och en ELISA som sägs vara *C. parvum*-specifika testas och utvärderas i denna studie med hjälp av frysta och färska träckprover med varierande oocystkoncentrationer av kryptosporidiearterna *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* och *C. andersoni*. Inget av testen var specifikt för *C. parvum*. Testerna var jämförbara och känsligheten för de olika arterna var av samma storleksordning. Det krävdes färre oocystor per gram färsk träck än av frusen träck för att påvisa kryptosporidier.

SUMMARY

The parasite *Cryptosporidium parvum* cause mild to severe diarrhea in young calves. It can be spread quickly in a herd and it is of high interest to be able to identify the pathogen as soon as possible to break the infection chain. The dominating *Cryptosporidium* species in calves in Swedish dairy herds is however the non-pathogenic *C. bovis* and the species *C. ryanae* and *C. andersoni* have also been identified in pre-weaned Swedish calves. Shape and size differentiate *C. andersoni* from the three other species, but those three cannot be morphologically separated. Three fast tests and one ELISA that are claimed to be *C. parvum* specific are tested and evaluated in this study, using frozen and fresh faeces samples with varying oocyst concentrations of *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* or *C. andersoni*. None of the four tests were specific for *C. parvum*. The tests were comparable and showed detection levels in the same range for the different *Cryptosporidium* species. Less oocysts per gram fresh faeces than for frozen were needed to obtain positive test results.

INTRODUKTION

Kalvhälsa och kalvdiarré

God hälsa är viktig för att främja tillväxt hos kalvar. Snabb tillväxt leder till tidigare könsmognad och därmed förkortad tid till första inseminering av kvigor. Dessa faktorer ger i sin tur förbättrad produktion och ekonomi liksom minskade veterinärkostnader. Det är önskvärt att snabbt identifiera sjukdomsframkallande agens för att snarast kunna häva ett utbrott i besättningen. Därför har flera snabbtest för olika patogener tagits fram.

Två kategorier av sjukdomar dominerar hos kalv - luftvägslidande och diarré. *Cryptosporidium parvum* är tillsammans med rotavirus, coronavirus och *Escherichia coli* F5+ en av de huvudsakliga diarrépatogenerna hos kalv. Vart och ett av dessa namngivna infektionsämnen kan ensamt orsaka diarré eller förekomma i saminfektion med en annan patogen (Silverlås, 2010b; Björkman *et al.*, 2003). Rotavirus är vanligast och som andra agens kommer *C. parvum*. Även *Giardia intestinalis* är vanligt förekommande i svenska besättningar, men räknas inte som en av de främsta patogenerna (Björkman *et al.*, 2003). Detta arbete berör snabbtester avsedda för att identifiera *C. parvum*, vilken kan orsaka livshotande infektioner och leder till försämrad tillväxt hos kalvar och därför tillhör de viktigare patogenerna hos kalv.

***Cryptosporidium parvum* och dess livscykel**

Släktet Cryptosporidiiæ innehåller minst 25 olika arter *Cryptosporidium*. De flesta arter är värdspecifika men några arter, t ex *C. parvum* kan infektera olika värddjur.

Cryptosporidium parvum har förutom nötboskap flera andra däggdjur inklusive människa som värd. Mogna oocystor, det vill säga parasitens infektiösa stadium, är 4,6 - 5,4 µm x 3,8 - 4,7 µm (Silverlås, 2010b). Oocystorna innehåller fyra sporozoiter, som frisätts i ileum då de utsätts för magsaft och gallsalter (Fayer, 2008a; Foster & Smith, 2009). Sporozoiterna invaderar enterocyternas mikrovilli, vilka sväller, fuserar och bildar ett membran runt sporozoiterna. Sporozoiterna uppehåller sig därmed intracellulärt men extracytoplasmiskt. De kan dock invadera magtarmkanalen ända från abomasum till colon (Foster & Smith, 2009).

Sporozoiterna växer till och kallas då trofozoiter. När de mognat kallas de meronter och dessa producerar åtta merozoiter som frisätts i tarmlumen och återinvaderar tarmepitelet. Merozoiterna mognar och differentieras till ett sexuellt stadium. De blir mikrogamonter (hanliga) eller makrogamonter (honliga). I mikrogamonterna bildas könsceller som frisätts. Om en könscell fuserar med en makrogamont bildas det en zygot som sedan mognar ut till en oocysta, som sporulerar innan den släpper från värdcellen (Elsheikha & Khan, 2011; Rimhanen-Finne, 2006; Fayer, 2008a). Två typer av oocystor bildas, tjock- och tunnväggiga. Majoriteten av oocystorna är tjockväggiga och dessa följer med träcken ut och äts upp av ett nytt djur. De tunnväggiga oocystorna kan autoinfektera djuret genom att frisätta sporozoiterna direkt i ileum innan de följer med träcken ut, vilket vidmakthåller infektionen.

Denna kombination av asexuell och sexuell förökning sker snabbt. Den minsta dosen för att orsaka infektion hos en kalv med normalt immunförsvar är under 100 oocystor och en sjuk kalv kan utsöndra i storleksordningen 10^8 oocystor per gram träck (Casemore *et al.*, 1997). Oocystorna kan överleva länge i fuktig miljö utanför värdjuret (Taylor *et al.*, 2007). Stor vikt bör därför läggas vid noggrann rengöring och upptorkning av kalvboxar i ladugårdar där *C. parvum* påträffas. I så gott som alla svenska ladugårdar finns åtminstone någon art av *Cryptosporidium* (Silverlås *et al.*, 2009a).

Klinisk sjukdom och behandling

Klinisk sjukdom hos kalvar ses oftast hos de yngsta kalvarna i samband med överbeläggning, dålig hygien och stress. Symptomen är diarré, avmagring och dålig tillväxt. Unga kalvar infekteras av oocystor i omgivningen, parasiten replikeras och kalven utsöndrar en stor mängd oocystor som de yngre kalvarna får i sig.

Parasiten skadar tarmens epitelceller vilket leder till retraktion av villi och minskad enzymatisk aktivitet (Klein *et al.*, 2008). Villusatrofi sker genom apoptos och eventuellt också genom cytotoxiner från *C. parvum*. Epitelbarriären upprätthålls genom krypthyperplasi. Epitelpermeabiliteten ökar efter en kryptosporidieinfektion men mekanismen bakom detta är inte utredd. Absorption av vatten och natrium sker tillsammans med införsel av glukos eller glutamin till cellerna, men den totala absorptionen av kolhydrat, fett och aminosyror minskar. Malabsorptionen leder till osmotisk diarré då mycket näringsämnen finns kvar i tarmen. Beroende på infektionsdos och om kalven är drabbad av andra patogener samtidigt kan infektionen variera från mild till dödlig (Foster & Smith, 2009; Radostitis *et al.*, 2007).

På grund av parasitens speciella placering i epitelcellerna är det svårt att ta fram något botemedel. Medicin som passerar mag-tarmkanalen når inte innanför tarmepitelet där parasiten uppehåller sig och preparat som tas upp i tarmepitelcellerna är heller inte verksamma då parasiten befinner sig utanför cytoplasman men är inkapslad (Foster & Smith, 2009). Orala vaccin och antibiotika i förebyggande syfte har använts utan bevisad framgång (Foster & Smith, 2009; Harp & Goff, 1998). Halofuginone är en coccidiostatika som begränsar diarrén och urskiljningen av oocystor hos smittade kalvar, men det är inget botemedel mot infektionen (Silverlås *et al.*, 2009b). Det har gjorts lyckade försök att vaccinera dräktiga kor för att kalven ska få i sig antikroppar i råmjölken (Burton *et al.*, 2011). I försöket hade kalvarna signifikant högre mängd antikroppar i blodet än kalvar som drack råmjölk från ovaccinerade kor.

Förebyggande arbete som att sätta in kalvar i en miljö fri från smitta är det mest effektiva sättet att undvika fekal-oral smitta. Rena vattenkällor och god hygien i kalvboxarna är tillsammans med ett starkt immunförsvar genom tillräcklig mängd råmjölk det bästa sättet att begränsa infektionen (Elsheikha & Khan, 2011). Utvärdering av släckt kalk som desinfektionsmedel pågår på SLU 2012-2013.

Zoonotisk smitta

Cryptosporidium parvum finns hos många olika djurslag och dessa kan smitta varandra. Olika anledningar till varför människor infekteras av *C. parvum* kan vara kontaminerat vatten

eller livsmedel som bevattnats med kontaminerat vatten, intag av kalvträck eller cirkulation i humanpopulationen utan inblandning av djur (Hendrix & Robinson, 2011). I Sverige blev utbrotten i Östersund och Skellefteå år 2010-2011 uppmärksammade, då totalt mer än 40 000 människor insjuknade i kryptosporidios. I båda fallen rörde det sig om vattenburna utbrott av den humana arten *C. hominis* och inte *C. parvum* som man först misstänkte. Troligtvis rörde det sig om en sekundärsmitta där en person urskiljde oocystor. Avloppsvatten hade svämmat över barriärerna så att oocystorna i råvattnet inte avlägsnats och avdödats innan det nått Storsjön, varifrån dricksvattnet togs (Smittskyddsinstitutet, 2011).

Cryptosporidium andersoni

Cryptosporidium andersoni är en av ytterligare tre kryptosporidier som finns hos nöt. Den har avlånga oocystor, 7,4 (6,0 - 8,1) μm x 5,5 (5,0 - 6,5) μm och predilektionsstället är abomasum. De invaderar borstkanten i magsäckens körtlar vilket leder till förhöjda nivåer pepsinogen i plasman, förhöjt pH i abomasum (4,5 - 5,0) och en upp till tre gånger så tjock, blek och granulomatös abomasal mucosa än normalt hos det infekterade djuret (Anderson, 1998). Infektionen är kronisk och subklinisk men kan ge minskad mjölkproduktion. (Taylor *et al.*, 2007; Anderson, 1998). *Cryptosporidium andersoni* är vanligast hos ungdjur och vuxna men kan ses från tre veckors ålder i enstaka fall (Anderson, 1998; Bowman, 2009; Fayer *et al.*, 2006; Fayer *et al.*, 2007; Santín *et al.*, 2004; Silverlås *et al.*, 2009a). Innan *C. andersoni* identifierades som en egen art med hjälp av molekylära metoder misstog man den för den gnagarspecifika *C. muris* och antog att den spreds mellan möss och nöt (Anderson, 1998).

Cryptosporidium bovis

Cryptosporidium bovis har måtten 4,6 (4,2 - 4,8) μm x 4,9 (4,8 - 5,4) μm (Fayer *et al.*, 2005). Det är oklart huruvida den orsakar klinisk sjukdom hos nötboskap, men den florerar i många svenska besättningar, invaderar liksom *C. parvum* epitelcellerna i tunntarmen, men orsakar subkliniska infektioner. Detta är den vanligaste arten hos svenska kalvar. Hos några kalvar med diarré har man återfunnit *C. bovis* som ensamt infektionsämne, vilket pekar åt att parasiten kan orsaka diarré (Silverlås *et al.*, 2012b). Den förekommer i Sverige från en veckas ålder och tar över som dominant art från och med från kalvens andra eller tredje levnadsvecka (Silverlås, 2010b). Enligt Santín *et al.* (2004), vilka först beskrev arten, är det främst kalvar mellan två och sju månader som blir infekterade, men kalvarna drabbas inte av diarré (Fayer *et al.*, 2005; Santín *et al.*, 2004). Oocystor av *C. bovis* innehåller fyra sporozoiter. Genetiskt liknar parasiten till stor del *C. ryanae* och *Cryptosporidium* deer genotype (Fayer *et al.*, 2005).

Cryptosporidium ryanae

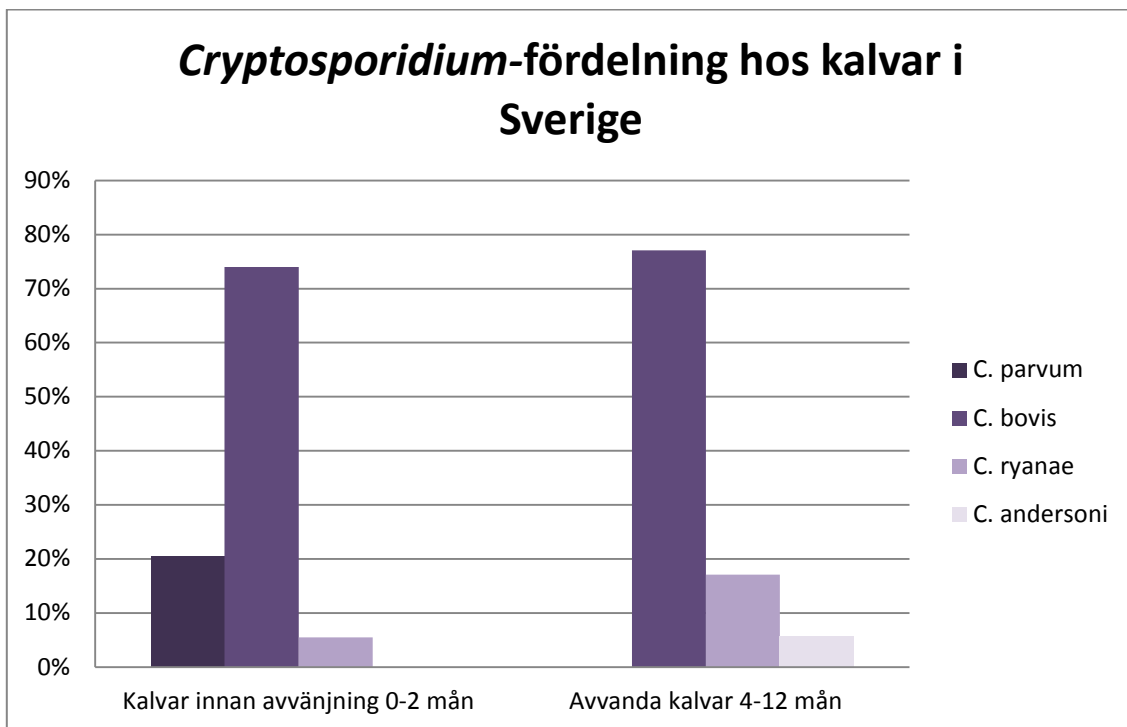
Den fjärde nötspecifika kryptosporidiearten hos nöt är *Cryptosporidium ryanae*. Den beskrevs som en egen art första gången 2008. Innan detta benämndes den ”*Cryptosporidium* deer-like genotype” pga. stora likheter i rDNA med *Cryptosporidium* deer genotype. Den har de minsta oocystorna av arterna som infekterar nöt, 3,7 (2,9 - 4,4) μm x 3,2 (2,9 - 3,7) μm . *Cryptosporidium ryanae* är till skillnad från *C. parvum* värdspecifik för nöt. Prepatensperioden är cirka 11 dagar men i en svensk studie hittades manifest infektion hos en 8 dagar gammal kalv (Silverlås & Blanco-Penedo, 2012a). Oocystutsöndringen varar i 15 - 17

dagar. Arten har påträffats i USA, Asien, Afrika och Europa. Det är osäkert hur många sporozoiter en oocysta innehåller men man har sett en eller två. Liksom *C. parvum* infekterar *C. ryanae* tunntarmen (Fayer *et al.*, 2008b).

Tjocklek på oocystornas skal skiljer sig inte mellan *C. parvum*, *C. bovis* och *C. ryanae*. Längd-/breddförhållandet varierar något mellan de tre arterna och är 1,1, 1,1 respektive 1,2 men skillnaderna är så små att de inte kan skiljas åt morfologiskt. Molekylära metoder som till exempel PCR-RFLP eller PCR och sekvensering krävs för att identifiera vilken art det rör sig om.

Åldersfördelning av *Cryptosporidium* spp. hos nöt

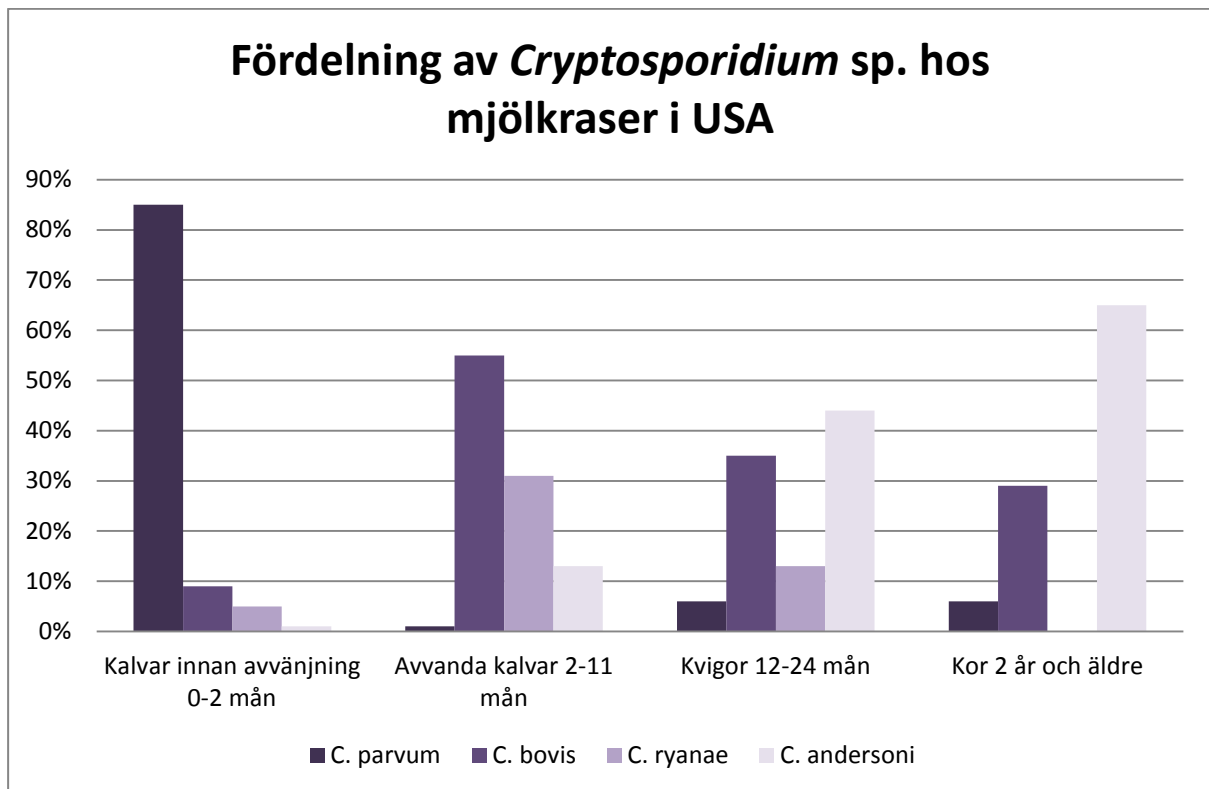
Prevalensen av *Cryptosporidium* spp. är olika för olika åldersintervall hos nöt. Silverlås *et al.* (2009a) gjorde en prevalensstudie i 50 svenska besättningar med mer än 50 kor år 2005-2007. De olika kryptosporidiearterna fördelade sig enligt Figur 1 (Silverlås *et al.*, 2010a). Av de upp till två månader gamla kalvar som var infekterade med *Cryptosporidium* hade 74 % *C. bovis*, 20,5 % *C. parvum* och 5,5 % *C. ryanae*. Av de infekterade kalvar som var 4-12 månader hade 77,1 % *C. bovis*, 17,1 % *C. ryanae* och 5,7 % *C. andersoni*. Totalt artbestämdes 93 prover från kalvar i åldern 0-2 månader och 69 prover från kalvar i åldern 4-12 månader.



Figur 1. Artfördelningen av *Cryptosporidium* spp. i Sverige år 2005-2007. Data hämtade ur Silverlås *et al.* (2010 a).

Fördelningen av *Cryptosporidium* spp. ser olika ut i olika länder och skiljer sig också mellan mjölk- och kött djur. Fayer *et. al* (2007) undersökte punktprevalensen hos mjölkkraser år 2005, 2006 och 2007 i USA, där samma arter finns som i Sverige. *Cryptosporidium parvum* utgjorde 85 % av kryptosporidieinfektionerna hos unga kalvar men avtog sedan tvärt efter sex veckors ålder och var ovanlig hos djur äldre än två månader. *Cryptosporidium andersoni*

ökade successivt med ålder och dominerade hos äldre djur. *Cryptosporidium bovis* och *C. ryanae* var vanligast hos avvanda kalvar och avtog sedan. Prevalensen av *C. ryanae* var försumbar för kor som var två år eller äldre. En illustration av fördelningen av olika *Cryptosporidium* spp. hos olika åldrar hos nöt visas i Figur 2 och data är hämtade från Fayer *et al.* (2007).



Figur 2. De fyra huvudsakliga bovina *Cryptosporidium* spp. i olika åldersspann hos djur med kryptosporidios. Data från Fayer *et al.* (2007).

Feltus *et al.* (2008) undersökte prevalensen av dessa fyra kryptosporidiearter hos köttdjur i USA. Studien innefattade 43 positiva djur, vilket var 20,3 % av alla provtagna djur. Hos 6-8 månader gamla djur som var infekterade hade 50 % och 34 % *C. bovis* resp. *C. ryanae*. Varken *C. parvum* eller *C. andersoni* hittades i denna grupp. Av fem kryptosporidieinfekterade kor över två år hade tre *C. andersoni*, en *C. ryanae* och en *C. bovis*.

Sannolikheten att ett slumpmässigt träckprov från en ej avvand kryptosporidieinfekterad kalv ska innehålla en annan kryptosporidieart än *C. parvum* är alltså ca 80 % i Sverige och 15 % i USA. Sannolikheten att hitta *C. parvum* hos kalvar äldre än två månader är i princip obefintlig i Sverige, medan motsvarande siffra för USA är < 10 %. Om snabbtester som sägs vara artspecifika för *C. parvum* visar positivt även för de övriga kryptosporidiearterna som förekommer hos kalv (0-2 månader) skulle det alltså i Sverige innebära 80 % felaktiga mätvärden i en punktprevalensundersökning av denna djurgrupp. Artfördelningen skiljer sig dock väsentligt åt hos kalvar med diarré. I en studie gjord av Silverlås *et al.* (2012b) på svenska kalvar med diarré och kryptosporidieinfektion orsakades 93,2 % av *C. parvum* och 6,8 % av *C. bovis*.

Olika metoder för att detektera *Cryptosporidium* spp.

Träckprov är en icke-invasiv metod som kan upprepas vid olika tidpunkter på samma djur. Oocystkoncentrationen i träcken följer en klockformad kurva med låga nivåer i början av patensperioden följt av en kraftig ökning några dagar senare och en kraftig minskning i slutet. Ju fler sporozoiter som invaderat tarmepitelet några dygn tidigare, desto större tarmskada har kalven och desto fler oocystor utskiljs också i träcken.

Ett alternativ är att analysera tarmen och dess innehåll post mortem, men detta lämpar sig enbart i forskningssyfte. Fördelen med obduktion är att olika stadier i parasitens livscykel kan analyseras och att man kan uppskatta infektionens omfattning.

Kryptosporidieocystor är ofärgade, transparenta och små och därför svåra att se i vanligt ljusmikroskop (Bowman, 2009). Det går att använda faskontrastmikroskop eller differentialinterferenskontrast för att förstärka konturerna av oocystorna så att man kan differentiera oocystor från övrigt träckinnehåll.

Konventionella metoder

Vid höga oocystkoncentrationer i träcken (klinisk infektion) kan den undersökas direkt. Om man letar efter en subklinisk infektion med färre oocystor i träckprovet, kan dessa koncentreras genom flotation, till exempel i mättad saltlösning eller Sheather's sockerlösning (Garcia *et al.*, 1983). En annan metod är Percoll's gradientcentrifugering (Kar *et al.*, 2011). Saltflotation har visat sig ge högre renhet, högre oocystutvinning och bättre utrensning av degenererade oocystor än både Sheather's sockerlösning och Percoll's gradientcentrifugering (Kar *et al.*, 2011).

Om oocystorna färgas kan ett vanligt ljusmikroskop användas. En populär färgning är modifierad Ziehl-Neelsen. Röda oocystor ses då på blå bakgrund. En annan vanlig färg är karbolfuchsin som lämnar oocystorna ofärgade men färgar in allt debris rött. Båda metoderna skiljer oocystor från jästsvampar. (Garcia *et al.*, 1983; Kar *et al.*, 2011). Flera andra färgningar och kombinationer av färgningar har provats med varierande resultat, till exempel Giemsa, het safranin-metylenblå, modifierad Kohn's mm. Giemsa färgar till exempel in oocystorna bra men också fekala jästsvampar och annat debris.

Oocystornas viabilitet kan undersökas genom infärgning med 4,6'diamino-2-fenylindol dihydroklorid (DAPI) som binder till DNA i oskadade oocystor. Kärnorna i sporozoiterna ser då blå ut i UV-ljus (Campbell *et al.*, 1992).

Infärgning med ett fluorescerande ämne och visualisering i fluorescensmikroskop är en metod som tydligt synliggör oocystor. Färgen består av fluorescein som är bundet till antikroppar som binder till oocystväggen. Fluorescensmikroskop har en ultraviolett ljuskälla och filter och i belysningen lyser de infärgade oocystorna gröna (Bowman, 2009). Oocystorna är lätta att urskilja men morfologin syns inte så tydligt. Dessutom ser man ibland även ospecifik fluorescens som inte kommer från *Cryptosporidium* (Garcia *et al.*, 1983).

Morfologiskt kan man särskilja *C. andersoni* från de mindre arterna *C. parvum*, *C. ryanae* och *C. bovis* men de tre senare kan inte särskiljas från varandra. Därför kan mikroskopi inte användas för att artbestämma *Cryptosporidium*, utan man erhåller bara en kvantifiering av oocystorna i träckprovet.

PCR

Arter inom genus *Cryptosporidium* liknar varandra molekylärt i stor utsträckning, men det finns genetiska skillnader som gör att de går att skilja från varandra. DNA-baserade tekniker som PCR lämpar sig för artbestämning (Taylor *et al.*, 2007). De markörer man använder för att skilja de olika arterna åt är framför allt -18S rRNA-genen, men även 70 kDa Heat shock protein (HSP70)-, *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP)- och aktingenerna. För artbestämning kan PCR-produkterna antingen sekvenseras eller digererats av restriktionsenzymer (RFLP) så att de klipps i olika stora fragment och således färdas olika långt i gelelektrofores (Silverlås, 2010b).

Om djuret är infekterat av två olika kryptosporidiearter kan det bli problematiskt att identifiera båda med PCR, framför allt om man använder sekvensering. Den art som dominerar infektionen eller den arten vars gensegment har högst affinitet för PCR-primern amplifieras betydligt mer och identifieras, medan övriga arter kan undgå observation genom att de inte bli tillräckligt uppförökade (Xiao & Ryan, 2008). Genom subtypsanalys av 60 kDa glycoprotein (GP60)-genen är det ändå möjligt att identifiera *C. parvum* i prover som också innehåller *C. bovis*, *C. ryanae* och *C. andersoni*. GP60-genen är inte lika konserverad mellan arterna, och därför amplifieras bara *C. parvum*, *C. hominis* och ibland *C. meleagridis* med dagens metoder (Feng *et al.*, 2007). På detta sätt kan lindriga infektioner av *C. parvum* upptäckas, även då andra arter dominerar (Feng *et al.*, 2007).

Andra metoder

Det finns också några kommersiella snabbtester och antigen-ELISA-tester framtagna för att påvisa *Cryptosporidium* spp. i träckprover. Det är osäkert om de kan skilja mellan de olika kryptosporidiearterna.

Syfte med studien

Syftet med detta arbete var att utvärdera tre snabbtester och en ELISA-test avsedda för att påvisa *C. parvum*-infektion hos nötkreatur. Avsikten var i första hand att undersöka om testerna kunde skilja mellan *C. parvum* och de tre andra kryptosporidiearter som är vanliga hos nötkreatur. Dessutom undersöktes hur låga oocystnivåer som kunde detekteras.

Inledande arbete

För att kunna utvärdera snabbtesternas känslighet och pålitlighet krävs att träckprovets oocystkoncentrationer är kända. En reningsmetod med saltflotation kombinerad med färgning och avläsning i fluorescensmikroskop användes i denna studie för att kvantifiera oocystkoncentrationerna i träckproven. Innan studierna genomfördes lärde sig författaren använda dessa metoder, identifiera och differentiera kryptosporidieoocystor från till exempel cystor av *Giardia* spp. och debris, skilja på vilka oocystor som viabla och ska räknas och

vilka som inte ska inkluderas i mätningarna samt studera och jämföra formen på *C. andersoni* med övriga kryptosporidiearter.

Med syfte att träna författaren att utföra mätningar med det ELISA-test som utvärderas i studien gjordes innan en separat ELISA-studie på 20 träckprover tillsammans med tränad personal. Då mättes förekomst av rotavirus med ett liknande ELISA-test.

Genomförande

Arbetet omfattar två delar; en större studie där prover innehållande olika mängder av de fyra arter som dominerar hos nötkreatur, d.v.s. *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* och *C. andersoni*, testades samt en delstudie inriktad på *C. bovis*.

De snabbtester som användes var:

- Fassisi® Crypto av Fassisi
- FASTest® CRYPTO Strip av Mega Cor Diagnostik
- Bovine Enterichek Crypto av Biovet®

Dessutom användes ett ELISA-test för fyra kalvpatogener inklusive *C. parvum*:

- Pathasure® Enteritis 4 av Biovet®: Bovine Rotavirus-Coronavirus, *Escherichia coli* K99 (F5+) and *Cryptosporidium parvum* antigen test kit

Snabbtesterna och ELISAn ska enligt tillverkarna vara artspecifika för *C. parvum* samt ha hög sensitivitet och specificitet, se vidare nedan. Snabbtester och ELISAn fanns tillgängliga när projektet startade.

För ett prov användes ett test Fassisi, ett Megacor och två Enterichek och dessa mätningar utfördes samtidigt.

OPG (oocystor per gram orenad träck) räknades fram för samtliga träckprov genom att använda en reningsmetod med saltflotation, följt av infärgning med fluorescens och räkning i fluorescensmikroskop. Metoden beskrivs nedan. För prov L22 och L23 gjordes OPG-räkningarna innan mätningarna med snabbtesterna utfördes, medan OPG för övriga prover räknades fram i efterhand. De spikade provernas faktiska OPG efter rening sammanföll väl med angiven spikning och därför redovisas spikningens OPG. Eftersom vattenproverna inte renades räknades inte OPG fram för dem.

Samtliga tester utfördes blindat i så måtto att författaren vid utförandet enbart hade löpnumret och inte någon sammanställning över OPG-värdena tillgänglig. Prov L1-L12 analyserades blindat genom att bara författarens handledare visste vad proverna innehöll. Prov L13-L21 och prov L46-L49 analyserades också blindat då författaren inte visste vilket prov som hennes handledare hade spikat till vilken koncentration oocystor.

Avsikten var att undersöka varje träckprov med alla tester, men vissa prov innehöll för lite träck för att kunna testas med ELISAn och två prov innehöll även för lite material för reningsmetoden.

MATERIAL OCH METODER

Prover

Till studiens mätningar användes olika sorters träckprover samt några vattenprover som alla beskrivs nedan. Proverna finns även listade efter löpnummer i Bilaga 1.

Färska prover från sjuka kalvar yngre än sex veckor erhöles från rutindiagnostiken på SVA (L25-L33). Dessa prov var inte analyserade med PCR-RFLP men baserat på kalvarnas ålder och att proverna var tagna i besättningar med kalvdiarréproblem bedömdes oocystorna med stor sannolikhet vara *C. parvum* (Silverlås et al., 2012b).

För att samla in färska träckprov med *C. bovis* besöktes en besättning med känd *C. bovis*-infektion där det inte påvisats *C. parvum*. Träckprover togs från två kalvar som var under två månader gamla med klinisk sjukdom i form av diarré och avmagring (L22, L23).

För studien behövdes träckprover som vardera innehöll endast en de fyra kryptosporidiearter som är vanliga hos nötkreatur. Antal tester var begränsat och det var viktigt att undersöka ett flertal prover från varje (känd) art. Då det inte var möjligt att få tag på färska, artbestämda prover med *C. andersoni* och *C. ryanae* – bland annat på grund av arternas ovanlighet – användes också frysta träckprover som tidigare blivit analyserade med PCR i kombination med antingen sekvensering eller RFLP (Silverlås et al., 2009a; Silverlås et al., 2010a). Frysta träckprov med olika kryptosporidiearter som hade ungefärligt önskat OPG vid infrysningen söktes därför upp i databaser och plockades fram ur frysar. Dessa prov innehöll arterna *C. parvum* (L1, L6), *C. andersoni* (L5, L9, L11), *C. bovis* (L2, L4, L7, L10, L12, L42-L45) eller *C. ryanae* (L3, L34-L40). Ett fryst prov från en sjuk kalv yngre än sex veckor från en kalvdiarrébesättning donerades från rutindiagnostiken (L24). Detta prov hade inte blivit analyserat med PCR-RFLP men bedömdes ändå innehålla *C. parvum* (se ovan).

För att ringa in testernas detektionsnivå för *C. parvum* användes en serie så kallade spikade prover. Färsk träck tagen från en äldre frisk ko, delades upp till flera delar och olika mängder färska *C. parvum*-oocystor tillsattes av huvudhandledaren (L8, L13, L14, L16-L21). Dessa prov frystes därefter ned några dagar innan de analyserades och klassades som frysta. Ett prov spikades inte utan användes som negativ kontroll (L15).

Prov med avjoniserat vatten spikades av huvudhandledaren till bestämda koncentrationer med färska *C. parvum*-oocystor (L46-L49) med syfte att ringa in detektionsnivåerna närmare.

Med avsikt att samla in fler färska träckprov med oocystor av *C. bovis* besöktes gården med konstaterad *C. bovis*-smitta ytterligare en gång och 10 slumpvis utvalda kliniskt friska kalvar som var över två månader gamla provtogs (L50-L59). Dessutom togs då ett prov från en lika gammal kalv med diarré (L41). Dessa prover användes i delstudien inriktad på *C. bovis*.

Reningsmetod med saltflotation

Reningsmetoden som användes i studien är tidigare beskriven i ett studentarbete av Andersson (2004) och reningen utförs på följande sätt:

I ett 50 ml provrör vägs 1 gram faeces. 4 ml destillerat vatten tillsätts och röret vortexas och skakas så att all faeces löses upp. 4 ml mättad NaCl tillsätts och röret skakas så att inga partiklar finns kvar i toppen av röret.

Röret vortexas 10 sekunder, skakas tre gånger, vortexas 10 sekunder och centrifugeras i 2750 varv/min i en minut. Oocystorna antas då finnas i supernatanten, vilken försiktigt överförs till ett nytt 50 ml provrör. Röret fylls upp med avjoniserat vatten till 50 ml. Samma pipett som användes vid överföringen används för påfyllningen för ta tillvara på eventuella oocystor som fastnat i den.

Röret centrifugeras i 2750 varv/min i 10 min. Nu antas oocystorna finnas bland pelleten i botten. Supernatanten suggs försiktigt bort, pelleten vortexas tills den löses upp och nytt avjoniserat vatten tillsätts upp till 50 ml. En ny centrifugering görs i 2750 varv/min i 10 min. Supernatanten suggs bort. Innehållet överförs till ett 10 ml rör och röret vortexas tills pelleten är upplöst och fylls upp till 10 ml med avjoniserat vatten. Pipetten rensas med det tillsatta vattnet så att inga oocystor förloras.

En sista centrifugering görs i 2750 varv/min i 10 min. Supernatanten suggs bort tills det är 1,5 ml kvar i röret. Innehållet vortexas så att pelleten löses upp och finfördelas.

60 µl av koncentratet (1,5 ml) sätts till en brunn på ett objektglas och får torka i rumstemperatur eller i 37 °C. När det är torrt fixeras provet i aceton i 10 min.

För infärgning sätts 20 µl fluoresceinbindande monoklonala antikroppar (FITC) på brunnen och glaset inkuberas i en timme i mörkt utrymme och rumstemperatur. Den FITC som används (Crypto Cel, Cellabs) binder bara till kryptosporidieocystor, men kan inte urskilja olika arter inom detta genus. Efter inkuberingen tvättas brunnen två gånger med 100 µl PBS-buffert och bufferten aspireras efter tvätten. 10 µl monteringsvätska sätts på brunnen och ett täckglas läggs på. Springan vid täckglasets sidor försluts med nagellack för att brunnen inte ska torka.

Antal oocystor i provet räknas i fluorescensmikroskop i 200 x förstoring. Det är oocystornas vägg som färgas in med fluoresceinet och som ses lysande gröna i mikroskopet. Metoden har en lägsta detektionsnivå på 50-100 OPG (Anderson, 2004).

Uppskattningsvis antas att hälften av alla oocystor vara kvar i provet efter rening. Det renade provet rymmer 1500 µl och varje brunn rymmer 60 µl. Därför kan man i varje brunn räkna $\frac{1}{2} \cdot \frac{60}{1500} = \frac{1}{50}$ av oocystorna i 1 gram orenad träck. Antal oocystor i 1 gram träck blir således

50·antal oocystor i brunnen. Om träcken innehåller mycket fett, som hos icke avvanda kalvar, används istället två brunnar med 30 µl i vardera, då lagret i en brunn med 60 µl blir opakt och oocystorna svåra att urskilja.

FASTest® CRYPTO Strip av Mega Cor Diagnostik, "Megacor"

Testet baseras på en immunokromatografisk testremsa. Det innehåller två monoklonala antikroppar, varav den ena typen är bundna till rörliga latexpartiklar och den andra till kontrollzonen på testremsan. Om träckprovet innehåller *C. parvum* binder oocystorna till antikropparna på latexpartiklarna, enligt produktresumén. Då komplexet migrerar till testzonen fäster komplexet dit och testlinjen färgas röd. Resterande mobila antikroppar migrerar till kontrollzonen och binder till den andra antikroppen i kontrollzonen varvid det bildas en blå linje där, se Figur 4. Färgintensiteten beror på mängden antigen i träckprovet.

Mätning: Med en tillhörande liten sked tas ungefär 0,4 gram träck. Detta stoppas ned i ett rör med buffert. Rörets kork sätts på och röret skakas om så att provet mixas med bufferten. Testremsan sänks ned i lösningen och vätskan suggs upp under minst en minut. Testremsan läggs sedan plant och avläses efter fem minuter. Om positivt resultat uppstår först efter 10 minuter har testet inget diagnostiskt värde enligt tillverkaren.

Enligt produktspecifikationen är sensitiviteten för *C. parvum* 96,7 % och specificiteten 99,9 %. Klein *et al.* (2009) uppmätte sensitiviteten till 100 % och specificiteten till 94,6 %.

I Figur 3 visas teststickan och buffertlösningen av Megacor i mitten.

Det fanns 50 tester till projektet. Dessutom fanns även fyra utgångna tester (2009) som användes till en sidostudie av *C. bovis*.

Fassisi® Crypto av Fassisi, "Fassisi"

Detta test bygger liksom Megacor på en immunologisk metod. En liten plastpinne används för att ta upp träck som mixas med buffert. Tre droppar av vätskan sätts i en provbrunn och absorberas av en uppsugningsdyna på testremsan, se Figur 3 till höger i bild. Genom kapillärkraft suggs vätskan längs remsan, passerar testlinjen och når kontrollinjen som då färgas röd, se Figur 4.

Vätskan blandas då med guldbundna antikroppar på konjugatpadden. Om provet innehåller antigen bildas i testregionen en sandwich mellan antigen, guldbundna antikroppar och antikroppar som är bundna till testlinjen. Testlinjen färgas då röd. Om inte antigen finns i provet binder inte de guldbundna antikropparna till de fixerade antikropparna och ingen testlinje syns.

Mätning: Avläsning kan göras först efter 5-10 minuter efter att dropparna tillsatts. Om testlinjen uppkommer inom 20 minuter räknas testet som positivt. Även svaga testlinjer är positiva. Testet uppges ha en sensitivitet för *C. parvum* på 92 % och en specificitet på 99 %. 50 tester fanns att tillgå för projektet.



Figur 3. Från vänster till höger: mätsticka och buffertrör Bovine Enterichek Crypto från Biovet®, mätsticka och buffertrör FASTest® CRYPTO Strip från Mega Cor Diagnostik och buffertbehållare med dropplatta Fassisi® Crypto från Fassisi.



Figur 4. Kontrollinjer synliga för ett prov (L34) med mycket låg koncentration av *C. ryanae*, (negativa testresultat). Från vänster till höger: Enterichek, Megacor och Fassisi. Om provet hade testat positivt hade en röd testlinje varit synlig nedanför respektive kontrollinje.

Bovine Entericheck Crypto av Biovet®, "Entericheck"

Till vänster i bild i Figur 3 ser man mätsticka och buffert för detta snabbtest. Färsk träck tas med en tillhörande sked och läggs i ett rör med buffert och homogeniseras i denna. En testremsa stoppas ned i röret och en padd suger upp vätskan. Testremsan står och fuktas i röret i 10 minuter och det är viktigt att se att vätskan migrerar till toppen av testremsan. Kontrollinjen färgas då röd av vätskan, se Figur 4. Avläsning kan göras direkt men om testlinjen är svaga kan man vänta i upp till fem minuter på ett positivt resultat.

Även detta test är uppbyggt på kolloidala guldbundna antikroppar mot *C. parvum* på en konjugatbädd. Ett immunokomplex med kromogen bildas när anti-*C. parvum*-antikroppar immobiliseras på en testlinje efter att vätskan sugits genom reaktionsmembranet med hjälp av kapillärkraft i bädden.

Testet har sensitiviteten 81,5 % och specificiteten 98,6 % för *C. parvum* jämfört med en PCR-metod (Cho *et al.*, 2012).

Det fanns 100 tester av denna sort att tillgå.

Bovine Rotavirus-Coronavirus, *Escherichia coli* K99 (F5+) and *Cryptosporidium parvum* antigen test kit (ELISA) Pathasure® Enteritis 4 av Biovet®, "ELISA"

Tvättvätska som tillhör testförpackningen späds 1:10 med avjoniserat vatten. Faecesproverna späds 1:10 med den utspädda tvättvätskan och homogeniseras. De grova partiklarna tillåts sjunka till botten. Två droppar av supernatanten sugas upp med plastpipett och sätts i varje brunn, förutom i brunn 1 och 2 där två droppar positiv respektive negativ kontroll sätts. Brunnarnas botten är bestrukt med antikroppar mot *Cryptosporidium* och övriga tre testpatogener.

Plattan med brunnarna inkuberas i 23 +/- 2 °C under 30 minuter. Sedan töms brunnarna och sköljs fem gånger med tvättvätskan. Vätskan slås försiktigt ut mot papper varje gång. Det antigen som bundit in till antikropparna i botten av brunnarna sitter fast och resten av vätskan sköljs bort.

För test av kryptosporidieinfektion sätts två droppar konjugat med anti-*Cryptosporidium* antikroppar till varje brunn. Plattan inkuberas sedan i 23 +/- 2 °C under 30 minuter. Konjugatet fäster då in till antigenet. Efter detta sköljs alla brunnar fem gånger med tvättvätskan och vätskan slås ur försiktigt efter varje sköljning.

Tre droppar substrat sätts i varje brunn och plattan inkuberas i mörker 23 +/- 2 °C under 10 minuter. Konjugatet orsakar en färgreaktion så att substratet blir blålila i de brunnar där antigen bundit in till antikropparna. Plattan skakas om och kan avläsas okulärt direkt. I många ELISA-tester tillsätts ett ämne så att färgreaktionen stoppas vid ELISA-diagnostik, men i detta test saknas detta. I detta försök användes dock även en spektrofotometer med våglängden 492 nm för att avläsa optisk densitet (OD). OD för våglängden 620 nm subtraherades för att kompensera för testplattans färg.

Sensitivitet och specificitet för testet uppges inte på bipacksedeln men tillverkarens kontakt uppgav att både sensitivitet och specificitet var 100 % (André Broes, Biovet-inc., personligt meddelande).

Det fanns 94 möjliga testbrunnar på plattan förutom de som användes för positiv och negativ kontroll. Konjugatet med anti-*Cryptosporidium* antikroppar såg ut att kunna bli den begränsande faktorn då andra konjugat är tänkta att användas i 75 % av brunnarna.

RESULTAT

Alla tester i projektet är av binär natur, det vill säga att antingen visas ett positivt resultat genom en färgreaktion eller så ses ingen reaktion. Detta åskådliggörs med "1" för positivt resultat och "0" för negativt resultat. Dock sågs ibland en mycket svag reaktion och författaren har valt att presentera dessa resultat som "svag". Färska prover markeras med "fä", frusna med "fr" och spikade träck- och vattenprover med "spik".

Cryptosporidium parvum

I Tabell 1 visas resultaten för alla träckprov och vattenlösningar som innehöll *C. parvum*-oocystor i olika koncentrationer mätt i OPG. Samtliga prover användes en gång för test med Megacor, Fassisi och ELISA. Då dubbelt så många tester av Enterichek fanns att tillgå jämfört med de andra testerna, testades varje prov med *C. parvum* två gånger med Enterichek, förutom provet med $2,5 \cdot 10^2$ OPG, som bara testades en gång.

Mätningar på prover som innehöll *C. parvum* visade att Megacor gav ett svagt utslag för $3,7 \cdot 10^4$ OPG färsk träck, vilket innebär att detektionsnivån för färsk träck bör ligga runt det värdet. Testet hade en ungefärlig detektionsgräns på $1 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^5$ OPG för frusen träck.

För mätningarna gjorda med Fassisi var detektionsgränsen för *C. parvum*-innehållande färska prover $< 3,7 \cdot 10^4$ OPG då det gav ett klart positivt utslag på mätstickan. Detektionsnivån för *C. parvum* i frusen träck var ungefär tre gånger så hög, $1 \cdot 10^5$ OPG, då denna nivå gav en svag markering på mätstickan

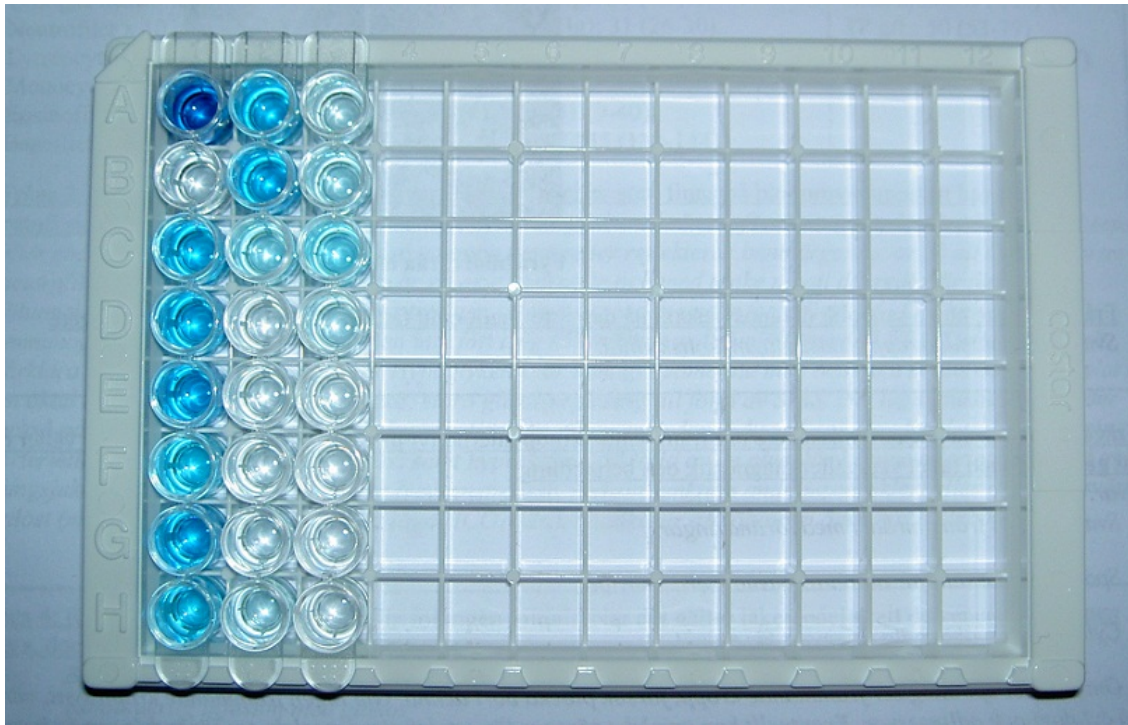
Enterichek hade liksom Megacor en ungefärlig detektionsgräns på $< 3,7 \cdot 10^4$ OPG för färsk träck. Motsvarande detektionsnivå för *C. parvum* i frusen träck var $1 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^5$ OPG.

Det färska träckprovet med $3,7 \cdot 10^4$ OPG testade positivt även med ELISA-testet, så detektionsnivån för *C. parvum* i färsk träck låg också under $3,7 \cdot 10^4$ OPG. För frusen träck var detektionsgränsen dock lägre, $7,5 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^5$ OPG.

Tabell 1. Oocystkoncentrationer (OPG) av *C. parvum* använda i försöket och resultat av mätningarna med de olika testerna presenterade som "0" (negativt), "1" (positivt) eller "svag" (svagt synligt färgomslag). Färiska prover markeras med "fä", frusna med "fr" och spikade prover med "spik". Vattenlösningar anges med "va". Ent. = Enterichek. Löpnummer angivet i sista kolumnen.

OPG	Fassisi	Megacor	Ent. 1	Ent. 2	ELISA	Kvalitet	Nr
0	0	0	0	0	0	fr, spik	L15
$1,0 \cdot 10^2$	0	0	0	0	0	fr, spik	L18
$2,5 \cdot 10^2$	0	0	0	-	0	fr, spik	L8
$5,0 \cdot 10^2$	0	0	0	0	0	fr, spik	L14
$7,5 \cdot 10^2$	0	0	0	0	0	fr, spik	L21
$1,0 \cdot 10^3$	0	0	0	0	0	fr, spik	L16
$2,5 \cdot 10^3$	0	0	0	0	0	fr, spik	L19
$5,0 \cdot 10^3$	0	0	0	0	0	fr, spik	L13
$1,0 \cdot 10^4$	0	0	0	0	0	fr, spik	L20
$2,5 \cdot 10^4$	0	0	0	0	0	va, spik	L49
$3,7 \cdot 10^4$	1	svag	1	1	1	fä	L33
$3,8 \cdot 10^4$	0	0	0	0	0	va, spik	L47
$5,0 \cdot 10^4$	0	0	0	0	0	va, spik	L46
$7,5 \cdot 10^4$	0	0	0	0	0	va, spik	L48
$1,0 \cdot 10^5$	svag	0	0	0	1	fr, spik	L17
$2,1 \cdot 10^5$	1	1	1	1	1	fr	L24
$6,3 \cdot 10^5$	1	1	1	1	1	fä	L27
$6,8 \cdot 10^5$	1	1	1	1	-	fä	L30
$1,1 \cdot 10^6$	1	1	1	1	1	fä	L29
$1,2 \cdot 10^6$	1	1	1	1	1	fä	L25
$1,8 \cdot 10^6$	1	1	1	1	1	fä	L31
$4,7 \cdot 10^6$	1	1	1	1	1	fä	L28
$5,9 \cdot 10^6$	1	1	1	1	1	fä	L32
$8,5 \cdot 10^6$	1	1	1	1	1	fä	L26

OD för brunnarna överensstämde väl mot den uppskattade färgintensiteten i brunnarna. Den positiva och negativa kontrollen hade en OD på 1,9 respektive 0,067. OD-värdena för proven låg mellan 0,077 och 0,91. De tre prover som var svagast men positiva vid den okulära bedömningen ses i rad H, kolumn 2 (L39), i rad A, kolumn 3 (L42) samt i rad D, kolumn 3 (L45). OD-värdena hos dessa prov var 0,138, 0,115 respektive 0,114 (Figur 5). Alla prover som okulärt bedömdes negativ hade OD-värden under 0,1 (OD 0,077 - 0,097).



Figur 5. Resultat av en ELISA-körning. Positiv kontroll med optisk densitet 1,9 i rad A, första kolumnen, negativ kontroll rad B, första kolumnen. De tre lägsta positiva proverna ses i rad H, kolumn 2, i rad A, kolumn 3 samt i rad D, kolumn 3. Optisk densitet hos dessa prov var 0,138, 0,115 respektive 0,114.

Cryptosporidium bovis

I Tabell 2 visas OPG i alla träckprover med *C. bovis* och resultatet av mätningarna. Samtliga prover användes en gång för test med Megacor, Fassisi och ELISA. Alla prover utom de med $1,1 \cdot 10^3$ och $6,5 \cdot 10^4$ OPG testades en extra gång med Enterichek.

För *C. bovis* var resultatet av de tre snabbtesterna Fassisi, Megacor och Enterichek mer svårtolkade då varje test gav minst ett svagt utslag på mycket låga koncentrationer.

Detektionsgränsen för färsk träck med Megacor ligger troligen runt $3 \cdot 10^4$ OPG, då det blev ett negativt och ett positivt resultat för koncentrationer i denna nivå. Det första klart positiva testet med Megacor för de frusna proverna var ett med $6,5 \cdot 10^4$ OPG. Ett svagt positivt prov hade koncentrationen $5,5 \cdot 10^4$ OPG. Detektionsgränsen bör alltså ligga någonstans däremellan, ca $6 \cdot 10^4$ OPG. Den högsta koncentrationen på $7,6 \cdot 10^5$ OPG gav positivt utslag. Dock testade ett fruset prov med bara 900 OPG svagt positivt.

För Fassisi låg detektionsnivån för färska prov runt $2,6 \cdot 10^4$ OPG, då denna koncentration gav ett svagt positivt resultat. För de frusna proverna var detektionsgränsen för *C. bovis* svåruppskattad men antogs vara ungefär $1 \cdot 10^5$ OPG, då $1,2 \cdot 10^5$ OPG liksom den högsta koncentrationen på $7,6 \cdot 10^5$ gav en tydlig markering på mätsticken. Även lägre koncentrationer som $1,1 \cdot 10^3$, $5,5 \cdot 10^4$ och $6,5 \cdot 10^5$ OPG gav svaga utslag på mätsticken.

Tabell 2. Oocystkoncentrationer (OPG) av *C. bovis* använda i försöket och resultat av mätningarna med de olika testerna presenterade som "0" (negativt), "1" (positivt) eller "svag" (svagt synligt färgomslag). Färska prover markeras med "fä" och frusna med "fr".

OPG	Fassisi	Megacor	Ent. 1	Ent. 2	ELISA	Kvalitet	Nr
$9,0 \cdot 10^2$	svag	svag	svag	0	0	fr	L7
$1,1 \cdot 10^3$	svag	0	1	-	0	fr	L2
$3,1 \cdot 10^3$	0	0	0	0	0	fr	L12
$2,4 \cdot 10^4$	0	0	svag	0	0	fr	L4
$2,6 \cdot 10^4$	svag	1	svag	0	1	fä	L22
$3,4 \cdot 10^4$	1	0	0	0	0	fä	L23
$5,5 \cdot 10^4$	svag	svag	0	0	1	fr	L42
$6,5 \cdot 10^4$	svag	1	svag	-	1	fr	L10
$1,2 \cdot 10^5$	1	1	0	0	1	fr	L43
$1,7 \cdot 10^5$	0	0	0	0	1	fr	L45
$7,6 \cdot 10^5$	1	1	0	0	1	fr	L44

Vad gäller *C. bovis*-testerna för Entericheck var det enda prov som testade klart positivt ett med låg koncentration, $1,1 \cdot 10^3$ OPG. Den högsta koncentrationen $7,6 \cdot 10^5$ OPG gav negativt utslag vid båda mätningarna.

ELISA-mätningarna av proverna med *C. bovis* gav liknande resultat som mätningarna gjorda på proverna med *C. parvum*. Detektionsgränsen för färsk träck uppskattades till $3,0 \cdot 10^4$ OPG, det vill säga ungefär medelvärdet av de två mätningarna på färsk träck som gav positivt och negativt utslag. För de frysta proverna uppskattades detektionsgränsen till ungefär $5,0 \cdot 10^4$ OPG.

Cryptosporidium ryanae

Sju träckprov med olika koncentrationer av *C. ryanae* användes, se Tabell 3. Alla prov kördes i alla tester förutom $2,5 \cdot 10^5$ OPG som inte kördes i ELISA, då det fanns för lite träck.

Tabell 3. Oocystkoncentrationer (OPG) av *C. ryanae* använda i försöket och resultat av mätningarna med de olika testerna presenterade som "0" (negativt) eller "1" (positivt). Alla prover var frusna, "fr".

OPG	Fassisi	Megacor	Ent. 1	Ent. 2	ELISA	Kvalitet	Nr
$3,5 \cdot 10^2$	0	0	0	-	0	fr	L3
$5,0 \cdot 10^2$	0	0	0	0	0	fr	L36
$1,0 \cdot 10^3$	0	0	0	0	0	fr	L34
$4,9 \cdot 10^3$	0	0	0	0	0	fr	L35
$2,0 \cdot 10^4$	0	0	0	0	0	fr	L38
$2,5 \cdot 10^5$	0	0	0	0	-	fr	L40
$1,1 \cdot 10^6$	0	0	0	0	1	fr	L39

Enterichek testades i dubbel uppsättning förutom i koncentrationen $3,5 \cdot 10^2$ OPG som bara användes en gång.

Ingen koncentration testade positivt på något test, förutom den högsta koncentrationen $1,1 \cdot 10^6$ OPG som var positiv i ELISAn. Detektionsnivån i ELISAn ligger alltså under $1,1 \cdot 10^6$.

Cryptosporidium andersoni

Endast tre koncentrationer av *C. andersoni* fanns att tillgå, med 150 OPG, 450 OPG och $1,7 \cdot 10^5$ OPG. Alla koncentrationerna testades två gånger med Enterichek. De två lägre koncentrationerna, 150 OPG och 450 OPG, gav negativt resultat på alla tester. Den högre, $1,7 \cdot 10^5$ OPG, gav positivt utslag på ELISA och Fassisi men inget utslag på Megacor. Enterichek gav ett negativt och ett svagt positivt utslag för den högre koncentrationen, se Tabell 4.

Tabell 4. Oocystkoncentrationer (OPG) av *C. andersoni* använda i försöket och resultat av mätningarna med de olika testerna presenterade som "0" (negativt), "1" (positivt) eller "svag" (svagt synligt färgomslag). Alla proverna var frusna, "fr".

OPG	Fassisi	Megacor	Ent. 1	Ent. 2	ELISA	Kvalitet	Nr
$1,5 \cdot 10^2$	0	0	0	0	0	fr	L11
$4,5 \cdot 10^2$	0	0	0	0	0	fr	L9
$1,7 \cdot 10^5$	1	0	svag	0	1	fr	L5

Känsligheten hos testerna låg alltså under den högre koncentrationen $1,7 \cdot 10^5$ OPG hos ELISA och Fassisi och runt denna nivå för Enterichek. Det krävs fler koncentrationsnivåer för att hitta detektionsgränsen. Fler mätningar med olika koncentrationsnivåer krävs också för att undersöka om Megacor kan användas till *C. andersoni*.

Testernas tillförlitlighet

För att jämföra testernas tillförlitlighet sammanställdes resultaten från 45 prov (L1, L6, L37 och L41 strukna ur studien) och testernas sensitivitet och specificitet räknades ut. För ELISAn användes 43 prov (L30 och L40 saknades). Två cut-off-värden användes för att skilja mellan positiva och negativa prover, $2,6 \cdot 10^4$ OPG för färsk träck och $5,5 \cdot 10^4$ OPG för frusen träck. Dessa cut-off-värden baseras på ELISAs detektionsnivå för *C. bovis*. Sant positiva prover definierades som de proven med *Cryptosporidium* spp. lika med eller över cut-off som gett positiva utslag på testerna. Positiva utslag på *Cryptosporidium* spp. under cut-off klassades som falska positiva. Sant negativa prover var de prover under cut-off som gett negativa resultat. Slutligen klassades de prover över eller lika med cut-off som gett negativt resultat som falskt negativa.

Med de givna cut-off nivåer som användes varierade sensitiviteten hos testerna mellan 51 % och 82 %, medan specificiteten varierade mellan 91 % och 100 %, se Tabell 5.

Tabell 5. Sensitivitet och specificitet för de fyra testerna baserat på $2,6 \cdot 10^4$ OPG (färsk träck) respektive $5,5 \cdot 10^4$ OPG (frusen träck) som cut-off. Svaga utslag räknas som positiva.

		Fassisi (n=45)				Megacor (n=45)	
		$\geq 2,6 \cdot 10^4$	$< 2,6 \cdot 10^4$			$\geq 2,6 \cdot 10^4$	$< 2,6 \cdot 10^4$
T+		18	2	T+		15	1
T-		5	20	T-		8	21
		Sensitivitet 78 %				Sensitivitet 65 %	
		Specificitet 91 %				Specificitet 95 %	

		Enterichek (n=45)				ELISA (n=43)	
		$\geq 2,6 \cdot 10^4$	$< 2,6 \cdot 10^4$			$\geq 2,6 \cdot 10^4$	$< 2,6 \cdot 10^4$
T+		23	3	T+		18	0
T-		22	38	T-		4	21
		Sensitivitet 51 %				Sensitivitet 82 %	
		Specificitet 93 %				Specificitet 100 %	

Då testerna är utformade för att mäta endast *C. parvum* räknades även sensitivitet och specificitet fram för endast de prover som innehöll denna kryptosporidieart. Cut-off för testerna sattes då till $3,7 \cdot 10^4$ OPG för färsk träck och $1 \cdot 10^5$ OPG för frusen träck, vilket överensstämmer med ELISAs respektive detektionsnivåer för *C. parvum*.

Med givna cut-off nivåer varierade "sensitiviteterna" hos testerna mellan 71 % och 79 %, medan "specificiteterna" för alla tester blev 100 % för mätningar på endast prover med *C. parvum*, se Tabell 6.

Tabell 6. Sensitivitet och specificitet hos de fyra testerna baserat på $3,7 \cdot 10^4$ OPG (färsk träck) respektive $1 \cdot 10^5$ OPG (frusen träck) som cut-off. Svaga utslag räknas som positiva.

		Fassisi, <i>C. parvum</i> (n=24)				Megacor, <i>C. parvum</i> (n=24)	
		$\geq 3,7 \cdot 10^4$	$< 3,7 \cdot 10^4$			$\geq 3,7 \cdot 10^4$	$< 3,7 \cdot 10^4$
T+		11	0	T+		10	0
T-		3	10	T-		4	10
		Sensitivitet 79 %				Sensitivitet 71 %	
		Specificitet 100 %				Specificitet 100 %	

		Enterichek, <i>C. parvum</i> (n=24)				ELISA, <i>C. parvum</i> (n=23)	
		$\geq 3,7 \cdot 10^4$	$< 3,7 \cdot 10^4$			$\geq 3,7 \cdot 10^4$	$< 3,7 \cdot 10^4$
T+		20	0	T+		10	0
T-		8	19	T-		3	10
		Sensitivitet 71 %				Sensitivitet 77 %	
		Specificitet 100 %				Specificitet 100 %	

Delstudie inriktad på träck innehållande *C. bovis*

Alla prov (L50-L59) insamlade från de friska kalvarna i den *C. bovis*-infekterade besättningen innehöll så låga oocystkoncentrationer att de inte kunde användas i den större studien, se Tabell 7. För att styrka detta användes ändå fyra Megacor-tester med utgången datum (2009)

för att analysera proven med de fyra högsta koncentrationerna. De visade alla negativt resultat.

Tabell 7. Oocystkoncentrationer (OPG) av *C. bovis* i träck från 10 kalvar äldre än två månader gamla kalvar i en *C. bovis*-positiv besättning.

OPG	Megacor	Kvalitet	Nr
0	0	fä	L50
0	0	fä	L51
0	0	fä	L52
0	0	fä	L53
0	0	fä	L54
0	0	fä	L55
$2,5 \cdot 10^2$	0	fä	L56
$4,0 \cdot 10^2$	0	fä	L57
$1,1 \cdot 10^3$	0	fä	L58
$2,0 \cdot 10^3$	0	fä	L59

Prov L41 togs även från en tre månader gammal kalv med diarré i denna besättning. Vid analys av detta träckprov räknades ca $6 \cdot 10^4$ infärgade, runda oocystliknande strukturer per gram, men dessa hade en diameter på cirka 2 och maximalt 2,5 μm och var alltså för små för att vara en av de fyra, eller någon annan, *Cryptosporidium* spp. Inga normala oocystor sågs i detta prov. Ett snabbtest av vardera sorten användes för detta prov. Provet visade svagt positivt resultat för Megacor och negativt för Fassisi och Enterichek.

Svinn av tester

Under mätningarna nådde prover inte upp till testernas kontrollinjer för ett prov Fassisi, ett prov Megacor och tre prover Enterichek. En teststicka Enterichek stoppades av misstag i ett buffertrör från Megacor. Tre tester Enterichek föll mot buffertrörets kant eller doppades i bubblor från bufferten, varvid provmaterial hamnade längre upp på teststickan än uppsugningskudden. Då ett test förstördes byttes det ut mot ett nytt test.

DISKUSSION

Artspecificitet

I denna studie detekterade alla fyra tester *Cryptosporidium* spp. men inget av testerna var artspecifikt för *C. parvum* vilket uppgavs av tillverkarna.

En aspekt att fundera över är den kliniska betydelsen av att snabbtesterna inte är *C. parvum*-specifika. Snabbtesterna är främst tänkta att användas vid kalvdiarré som misstänks vara orsakad av *C. parvum*. Av de kryptosporidiepositiva svenska kalvarna utan diarré har bara 20,5 % *C. parvum*, resterande bär på andra arter (Silverlås *et al.*, 2010a). Om *C. bovis* och *C. ryanae* skulle orsaka liknande symptom hos kalvar som *C. parvum* kan vi anta att nära 80 % av de positiva testerna skulle reagera på *C. bovis* eller *C. ryanae* istället för på *C. parvum*, på grund av artfördelningen bland svenska kalvar yngre än två månader. Dock är

det *C. parvum* som till 93,2 % står för den kryptosporidieorsakade diarrén hos unga kalvar i Sverige (Silverlås *et al.*, 2012b), och därmed den vanligaste art man skulle hitta med hjälp av snabbtest hos dessa kalvar. Då större andel *C. parvum* hittas hos kryptosporidieinfekterade kalvar i USA borde *C. parvum* orsaka ännu högre andel av de kryptosporidieorsakade diarréerna. Diarré orsakad av övriga kryptosporidier kan då antas försumbar och testernas relevans är således mycket hög. Detta under förutsättning att träcken innehåller tillräckligt hög OPG.

På grund av arternas likhet borde inte testerna göra skillnad på art utan bara på oocystkoncentration. En trolig förklaring till att det nästan bara är *C. parvum* som återfinns hos diarrékalvar är att bara *C. parvum* är tillräckligt patogen för att oocystkoncentrationen ska kunna uppföras nog mycket. Klinisk sjukdom i form av diarré och avmagring sågs hos de djur som gav positiva *C. bovis*-resultat men OPG i träckproven var relativt låga. Då dessa två kalvar var under två månader vid provtagningstillfället går det å andra sidan inte utesluta att även *C. parvum* nu fanns i besättningen även parasiten inte påvisats där vid tidigare undersökningar.

Många åtgärder bör vara densamma vid diarré hos kalvar i en besättning oavsett vilken patogen eller vilka patogener som kalven är smittad av, nämligen isolering och understödjande terapi av sjuka kalvar samt förebyggande arbetande i form av noggrann sanering och upptorkning av kalvboxarna mellan kalvarna. Då *C. bovis* sannolikt förekommer i de flesta besättningar skulle syftet med det förebyggande arbetet vid påvisad *C. bovis*-infektion hos diarrékalvar handla om att dämpa smittrycket. Det kan även röra sig om saminfektioner med andra patogener.

Vad gäller *C. andersoni* är den mycket ovanlig hos kalvar yngre än två månader. Så länge testerna används för diagnostik vid kalvdiarré saknar det praktisk betydelse om de även detekterar *C. andersoni*.

Att Megacor gav svagt utslag på de för små oocystliknande strukturerna i delstudien om *C. bovis* kan antingen bero på att de var atypiska kryptosporidier av en av de fyra bovina arterna i studien eller en annan ännu okänd kryptosporidieart. En annan möjlig förklaring är att det var debris som på något sätt liknade kryptosporidier till den grad att testet reagerade positivt på det. Koncentrationen, $6 \cdot 10^4$ per gram, låg över detektionsnivån för färsk träck, vilket ju möjliggör en positiv testreaktion.

Frysning av prover och dess påverkan på detektionsgränser

Förvaring av prover under lång tid i frys tycks inte förstöra möjligheten att få positiva utslag på testerna. Dock återfanns färre oocystor när proverna tinades upp än vad som uppmätts innan nedfrysning. Hur stor del av oocystorna som destruerats i frysen varierade mellan träckproven. Det är tänkbart att infrysningstiden kan ha haft betydelse.

Både oocystorna och träcken som användes för att blanda spikad träck av känd oocystkoncentration var färsk. Efter att proverna spikats frystes träcken under några dygn

innan mätningarna utfördes och proverna klassas som frysta. Dessa prover borde dock inte ha hunnit bli lika påverkade av frysningen som övriga i projektet.

Snabbtesterna är utformade för att användas direkt i ladugården. Då detektionsgränserna var lägre för färsk än för frusen träck kommer testerna med säkerhet att ge större andel positiva resultat än i denna studie.

I denna studie hade FASTest® CRYPTO Strip ungefärliga detektionsgränser på $3,7 \cdot 10^4$ för *C. parvum* och $3,0 \cdot 10^4$ för *C. bovis*, vilket är i samma storleksordning. Det är logiskt att alla arter borde ha samma detektionsnivåer, då de är mycket lika. För frusen träck var motsvarande värden $< 2 \cdot 10^5$ OPG respektive $6 \cdot 10^4$ OPG. En möjlig orsak till skillnaden i känslighet kan vara att *C. parvum*-proven hade frysförvarats under längre tid.

Fassisi® Crypto, som är det snabbtest för *C. parvum* som finns på marknaden i Sverige idag, hade en detektionsnivå på under $3,7 \cdot 10^4$ OPG för *C. parvum* och cirka $2,6 \cdot 10^4$ OPG för *C. bovis*, ($1 \cdot 10^5$ OPG för frysta prover av båda arterna) vilket är jämförbara värden. Troligtvis ligger detektionsnivån för *C. andersoni* på samma nivå och åtminstone under $1,7 \cdot 10^5$ OPG för frysta prover som inte utsatts för tuffare frysförvaring än i denna studie.

Bovine Enterichek Crypto hade en ungefärlig detektionsgräns på $< 2 \cdot 10^5$ OPG för *C. parvum*. Med de resultat som framkommit i studien verkar testet inte kunna användas för att påvisa de andra arterna, vilket gjorde testet mer specifikt för *C. parvum* än de andra. Däremot gav testet positiva utslag för låga koncentrationer av *C. bovis*, vilket sänkte tillförlitligheten hos testet då det samtidigt gav negativt resultat för mycket höga koncentrationer av *C. bovis*.

Inget snabbtest gav utslag på *C. ryanae*, ens med koncentrationen $1,1 \cdot 10^6$ OPG. Då arterna liknar varandra så mycket att de bara kan särskiljas med molekylära metoder skulle en möjlig förklaring kunna vara en något annorlunda genuppsättning som orsakar sämre frysresistens. En annan teori är att någonting i oocystornas kapsel faktiskt skiljde sig åt jämfört med övriga kryptosporidiearter i studien, vilket gör att antikropparna inte kunde binda in.

Det enda test som visade positivt utslag för *C. ryanae* var *Cryptosporidium*-komponenten i Pathasure® Enteritis 4 (ELISA) och för detta krävdes koncentrationen $8 \cdot 10^5$ OPG i den testade frysta träcken. Detta test hade ungefärliga detektionsgränser på $< 3,7 \cdot 10^4$ OPG för *C. parvum*, $3,0 \cdot 10^4$ OPG för *C. bovis*, $< 1,1 \cdot 10^6$ OPG för *C. ryanae* (frost) och $< 1,7 \cdot 10^5$ OPG för *C. andersoni* (frost), vilket inte heller motstrider att alla kryptosporidiearter kan ha samma detektionsnivå om de testas färskt.

Då få prov använts och de olika testernas detektionsgränser tycktes vara av samma storleksordning kunde ingen signifikant skillnad i känslighet ses mellan snabbtesterna. ELISA-tester är ofta känsligare för lägre antigen och även denna ELISA var något känsligare för lägre OPG än snabbtesterna för frysta prov.

För att utvärdera detektionsnivåerna noggrant behöver fler än ett prov per koncentration användas och då bara av färskt prover.

Falskt positiva och negativa utslag

Både Fassisi, Megacor och Enterichek gav positiva utslag på mycket låga koncentrationer av *C. bovis*. Enligt Megacor beror färgintensiteten på testlinjen av kvantiteten antigen i provet men på instruktionen står det att för mycket träck i provet också kan leda till inkomplett eller avsaknad av testlinje. Då instruktionen för träckdosering har följts vid testningen borde inte kvantiteten av träck förklara problemet med utslagen för de låga koncentrationerna. Entericheks två negativa utslag för *C. bovis* vid den högsta koncentrationen är oförklarliga med tanke på positiva lågkoncentrerade proven. Det kan röra sig om falska positiva lågkoncentrerade prov eller falska negativa högkoncentrerade prov.

Framräknade känsligheter för testerna

Sensitiviteter och specificiteter kan inte korrekt räknas fram med endast känt positiva träckprover, vilket var det som användes i denna studie, utan för detta krävs att även negativa prover ingår. De framräknade måtten syftar endast till att kvantitativa jämförelser skulle kunna göras mellan snabbtesterna och relaterade till ELISAn. Då få prover ingick i studien kunde ett mätvärde påverka de framräknade värdena väsentligt och därför bör inte alltför stor vikt läggas vid de exakta värdena.

Användarvänlighet

Tidsåtgången för ett Fassisi-test är minst sex minuter (preparering och deposition av vätskan tar cirka en minut och avläsning ska ske fem minuter efter depositionen). Vid otydligt resultat kan teststickan läsas av 20 minuter efter att vätskan tillsatts men avläsningen får inte ske senare, vilket kräver punktlighet av användaren. Det kan vara besvärligt att föra in träck till utrymmet med buffertlösning då det ska passera en smal passage. I två av 49 prover nådde inte vätskan fram till kontrollinjen, troligen på grund av för stora träckpartiklar. Testlinjen och kontrollinjen syntes ofta tydligt.

En mätning med Megacor tar även den en minut att utföra och resultatet kan avläsas efter sex minuter. Testresultatet är dock stabilt över tid efteråt, vilket är smidigt då andra uppgifter kan utföras i lugn och ro efter den första minuten. Test- och kontrollinjen syntes oftast tydligt på mätstickan. Teststickan är ergonomisk då den sticker upp två millimeter ovanför kanten på buffertröret och lätt kan tas upp ur röret. Dessutom är stickan tillräckligt bred för märkningsytan lätt ska kunna användas.

Entericheks teststicka ska stå i buffertlösningen i 10 minuter och resultatet kan sedan avläsas direkt eller efter ytterligare fem minuter om resultatet är otydligt, så testet kräver punktlighet. Buffertlösningen skummar lätt när träcken blandas med bufferten vilket är störande då användaren uppmanas att homogenisera träcken noga i bufferten men undvika skumbildning. Mätstickan är kortare än buffertbehållaren vilket gör det svårt att ta upp stickan. Stickan är också så smal att den är svår att skriva på. Både test- och kontrollinjen framträder något svagt. Den medföljande skeden rymmer ungefär den dubbla volymen mot vad som avses i de andra testerna vilket gör det lättare att dosera korrekt.

ELISAn fungerar mycket bra för att detektera kryptosporidier men lämpar sig bara att använda i laboratorium eller på veterinärstation istället för direkt i ladugården eftersom pipetter, rena och torra ytor samt bra belysning är önskvärt. Dessutom kräver testet totalt 70 minuter i väntetid, totalt cirka en halv dags arbetstid för preparation och mätning av cirka 25 prover.

Alternativ till snabbtester

Det är en stor fördel för djurägare att vara anslutna till Svenska djurhälsovården AB (SvDhV), då de istället för att lita till snabbtester kan gå med i SvDhVs stora eller lilla kalvpaket, där proverna tillsammans med ”kalvremissen” skickas till SVA för diagnostik. I årsavgiften för båda paketen ingår förutom information och diagnostik en årlig besättningsutredning (www.svdhv.org) vilket skulle kunna leda till väsentliga förbättringar avseende hygien och produktion. När man vill remittera träckprov till SVA för diarréutredning ska prover från 3-5 kalvar skickas in, oavsett om man är medlem i något kalvpaket eller inte. Då ökar sannolikheten att detektera smittan, vilket är viktigt då olika djur kan finnas i olika stadier i infektionen och utsöndringen av oocystor kan variera kraftigt. Med samma resonemang bör träck från 3-5 sjuka kalvar analyseras med snabbtester om man väljer att använda sig av sådana.

SLUTSATSER

Alla tester detekterade *Cryptosporidium* spp. i träck med tillräckligt hög nivå OPG. Inget av testerna i studien var artspecifikt för *C. parvum*. Färsk träck hade lägre detektionsnivå än frusen träck. En viss mängd antigen krävdes för att se färgreaktionen på snabbtesterna. Detektionsnivåerna uppmätta i denna studie var i samma storleksordning både beträffande de olika testerna och också arterna. Av de använda testerna upplevde författaren Megacor som mest och Enterichek som minst användarvänlig. För att kunna ringa in detektionsnivåerna för de olika arterna noggrannare med de fyra testerna bör fler träckprover och oocystkoncentrationer användas, och då bara färsk träck. Vid besättningsproblem bör prover tas från 3-5 kalvar. Ett bra alternativ till att använda snabbtester är att använda ett av Svenska djurhälsovårdens kalvpaket och göra en besättningsutredning.

Tack!

Stort tack till min huvudhandledare Charlotte Silverlås, som föreslagit projektet, introducerat mig i labbarbetet, spikat prover, kommit med många kloka råd och gett mig noggrann korrekturläsning av denna skrift. Tack till min biträdande handledare Karin Troell för inspiration och bra tips i skrivarbetet. Tack till min examiner Camilla Björkman för många bra åsikter om rapportens utformning. Tack till Malin Åberg för gott samarbete på träckinsamlingsresorna och för tolkningen av annorlunda strukturer i träckinneåll under mikroskåpets objektiv. Sist men inte minst tack till Helena Reineck-Bosaeus för många timmars stöttning under ELISA-körningarna och för mycket trevliga diskussioner i labbet och fikarummet.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Anderson, B.C. (1998). Cryptosporidiosis in bovine and human health. *Journal of dairy science* 81(11), 3036-3041.
- Anderson, S. (2004). *Kryptosporidieinfektion hos nötkreatur – Utvärdering av en ny metod för påvisande av subklinisk infektion*. Examensarbete Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Broes André (2012). Biovet-inc. Personlig kommunikation.
- Björkman, C., Svensson, C., Christensson, B. & de Verdier, K. (2003). *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in . *Acta veterinaria Scandinavica* 44, 145-152.
- Bowman, D. (2009). *Georgis' parasitology for veterinarians*. 9. Kina: Saunders Elsevier.
- Burton, A.J., Nydam, V.D., Jones, G., Zambriski, J.A., Linden, T.C., Cox, G., Davis, R., Brown, A. & Bowman, D.D. (2011). Antibody responses following administration of a *Cryptosporidium parvum* rCP15/60 vaccine to pregnant cattle. *Veterinary parasitology*. 175, 178–181.
- Campbell, A.T., Robertson, L.J. & Smith, H.V. (1992). Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Applied and environmental microbiology* 58(11), 3488-3493.
- Casemore, D.P., Wright, S.E. & Coop, R.L. (1997). Cryptosporidiosis – human and animal epidemiology. In: Fayer, R. (Ed.) *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 65-92. Florida: CRC Press, Boca Raton.
- Cho, Y.-I., Sun, D., Cooper, V., Dewell, G., Sahwartz, K. & Yoon, K.-J. (2012). Evaluation of a commercial rapid test kit for detecting bovine enteric pathogens in feces. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 24(3), 559–562.
- Elsheikha, H.M. & Khan, N.A. (2011). *Essentials of veterinary parasitology*. Norfolk: Caister academic press.
- Fayer, R., Santín, M. & Xiao, L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The journal of parasitology* 91, 624–629.
- Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M. & Greiner, E. (2006). Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary parasitology*. 135, 105-112.
- Fayer, R., Santín, M. & Trout, J.M. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in Eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary parasitology* 145, 260-266.
- Fayer, R. (2008a). General biology. In: Fayer, R. & Xiao, L. (Eds), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 1-42. Florida: CRC Press, Boca Raton.
- Fayer, R. Santín, M. & Trout, J.M. (2008b). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*) *Veterinary parasitology* 156, 191–198.
- Feltus, D.C., Giddings, C.W., Khaitsa, M.L. & Evoy, J.M. (2008). High prevalence of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in calves compared to mature cows in beef cow-calf operations. *Veterinary parasitology* 151, 191–195.
- Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V. & Xiao, L. (2007). Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary parasitology* 144 (1-2), 1-9.

- Foster, D.M. & Smith, G.W. (2009). Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary clinics in north America: Food animal practice* 25(1), 13–36.
- Garcia, L.S., Bruckner, D.A., Brewer, T.C. & Shimizu, R.Y. (1983). Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *Journal of clinical microbiology* 18(1), 185-190.
- Harp, J.A. & Goff, J.P. (1998). Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *Journal of dairy science* 81, 289–294.
- Hendrix, C.M. & Robinson, E. (2011) Diagnostic parasitology for veterinary technicians 3rd edition, Kina: Mosby Elsevier.
- Kar, S., Gawłowska, S., Dauschies, A. & Bangoura, B. (2011). Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Veterinary parasitology* 177, 366–370.
- Klein, D., Kern, A., Lapan, G., Benetka, V., Möstl, K., Hassl, A. & Baumgartner, W. (2009). Evaluation of rapid assays for the detection of bovine coronavirus, rotavirus A and *Cryptosporidium parvum* in faecal samples of calves. *The veterinary journal* 182,484–486.
- Klein, P., Kleinová, T., Volek, Z. & Šimůnek, J. (2008). Effect of *Cryptosporidium parvum* infection on the absorptive capacity and paracellular permeability of the small intestine in neonatal calves. *Veterinary parasitology* 152, 53–59.
- Radostitis, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. & Constable, P.D. (2007). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition, Edinburgh: Saunders Elsevier.
- Rimhanen-Finne, R. (2006) *Cryptosporidium and Giardia: detection in environmental and faecal samples*. Diss. Helsingfors: Helsingfors universitet.
- Santín, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E. & Fayer, R. (2004). Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary parasitology* 122, 103–117.
- Silverlås, C., Emanuelson, U., de Verdier, K. & Björkman, C. (2009a). Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. *Preventive veterinary medicine* 90, 242–253.
- Silverlås, C., Björkman, C. & Egenvall, A. (2009b). Systematic review and meta-analyses of the effects of halofuginone against calf cryptosporidiosis. *Preventive veterinary medicine* 91, 73-84.
- Silverlås, C., Näslund, K., Björkman, C. & Mattsson, J.G. (2010a). Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. *Veterinary parasitology* 169 (3-4), 289-95.
- Silverlås, C. (2010b). *Cryptosporidium infection in dairy cattle: Prevalence, species distribution and associated management factors*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Silverlås, C. & Blanco-Penedo, I. (2012a) *Cryptosporidium* spp. in calves and cows from organic and conventional dairy herds. *Epidemiology and infection*. May 8:1-11. doi:10.1017/. Elektroniskt publicerad, under tryckning.
- Silverlås, C., Bosaeus-Reineck, H., Näslund, K. & Björkman, C. (2012b). Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? *International journal for parasitology*. Nov 8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.009>. Elektroniskt publicerad, under tryckning.

Smittskyddsinstitutet (2011). *Cryptosporidium i Östersund, Smittskyddsinstitutets arbete med det dricksvattenburna utbrottet i Östersund 2010-2011*. Solna: Smittskyddsinstitutet 171 82 Solna Artikelnummer 2011-15-4.

Svenska djurhälsovårdens hemsida. <http://www.svdhv.org/sv/not/blanketter-och-remisser/> [2013-01-13].

Taylor, M., Coop B. & Wall R. (2007). *Veterinary parasitology*. 3rd edition, Singapore: Blackwell publishing.

Xiao, L. & Ryan, U.M. (2008). Molecular epidemiology. In Fayer, R. & Xiao, L. (Eds) *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 2. 119-172. Florida: Boca raton CRC Press.

Bilaga 1

Förteckning av alla träck- och vattenprover som användes i studierna. Löpnummer, kryptosporidieart, OPG, mätresultat, kvalitet och eventuell kommentar. Fas. = Fassisi, Meg. = Megacor, Ent. = Enterichek, *b* = prov till sidostudien inriktad på *C. bovis*.

Nr	Art	OPG	Fas.	Meg.	Ent. 1	Ent. 2	ELISA	träck	kommentar
L1	<i>parvum</i>		1	1	svag	-	1	fryst	ej renat
L2	<i>bovis</i>	1100	svag	0	1	-	0	fryst	
L3	<i>ryanae</i>	350	0	0	0	-	0	fryst	
L4	<i>bovis</i>	24400	0	0	svag	0	0	fryst	
L5	<i>andersoni</i>	168850	1	0	svag	0	1	fryst	
L6	<i>parvum</i>	-	0	0	0	0	0	fryst	ej renat
L7	<i>bovis</i>	900	svag	svag	svag	0	0	fryst	
L8	<i>parvum</i>	250	0	0	0	-	0	fryst	spikad träck
L9	<i>andersoni</i>	450	0	0	0	0	0	fryst	
L10	<i>bovis</i>	65300	svag	1	svag	-	1	fryst	
L11	<i>andersoni</i>	150	0	0	0	0	0	fryst	
L12	<i>bovis</i>	3100	0	0	0	0	0	fryst	
L13	<i>parvum</i>	5000	0	0	0	0	0	fryst	spikad träck
L14	<i>parvum</i>	500	0	0	0	0	0	fryst	spikad träck
L15	<i>parvum</i>	0	0	0	0	0	0	fryst	neg. kontroll
L16	<i>parvum</i>	1000	0	0	0	0	0	fryst	spikad träck
L17	<i>parvum</i>	100000	svag	0	0	0	1	fryst	spikad träck
L18	<i>parvum</i>	100	0	0	0	0	0	fryst	spikad träck
L19	<i>parvum</i>	2500	0	0	0	0	0	fryst	spikad träck
L20	<i>parvum</i>	10000	0	0	0	0	0	fryst	spikad träck
L21	<i>parvum</i>	750	0	0	0	0	0	fryst	spikad träck
L22	<i>bovis</i>	25600	svag	1	svag	0	1	färskt	3 v. gammal
L23	<i>bovis</i>	33500	1	0	0	0	0	färskt	8 v. gammal
L24	<i>parvum</i>	208958	1	1	1	1	1	fryst	diag. SVA
L25	<i>parvum</i>	1181700	1	1	1	1	1	färskt	diag. SVA
L26	<i>parvum</i>	8494200	1	1	1	1	1	färskt	diag. SVA
L27	<i>parvum</i>	628000	1	1	1	1	1	färskt	diag. SVA
L28	<i>parvum</i>	4680000	1	1	1	1	1	färskt	diag. SVA
L29	<i>parvum</i>	1099800	1	1	1	1	1	färskt	diag. SVA
L30	<i>parvum</i>	678600	1	1	1	1	-	färskt	diag. SVA
L31	<i>parvum</i>	1766700	1	1	1	1	1	färskt	diag. SVA
L32	<i>parvum</i>	5850000	1	1	1	1	1	färskt	diag. SVA
L33	<i>parvum</i>	36500	1	svag	1	1	1	färskt	diag. SVA
L34	<i>ryanae</i>	1000	0	0	0	0	0	fryst	
L35	<i>ryanae</i>	4900	0	0	0	0	0	fryst	
L36	<i>ryanae</i>	500	0	0	0	0	0	fryst	
L37	<i>ryanae</i>	100	0	0	0	0	-	fryst	fel prov
L38	<i>ryanae</i>	19600	0	0	0	0	0	fryst	
L39	<i>ryanae</i>	1117350	0	0	0	0	1	fryst	
L40	<i>ryanae</i>	251650	0	0	0	0	-	fryst	

L41	<i>negativ</i>	många	0	svag	0	0	-	färskt	ca 2 µm, b
L42	<i>bovis</i>	55150	svag	svag	0	0	1	fryst	
L43	<i>bovis</i>	116400	1	1	0	0	1	fryst	
L44	<i>bovis</i>	760000	1	1	0	0	1	fryst	
L45	<i>bovis</i>	171600	0	0	0	0	1	fryst	
L46	<i>parvum</i>	50000	0	0	0	0	0	färskt	spikat vatten
L47	<i>parvum</i>	37500	0	0	0	0	0	färskt	spikat vatten
L48	<i>parvum</i>	75000	0	0	0	0	0	färskt	spikat vatten
L49	<i>parvum</i>	25000	0	0	0	0	0	färskt	spikat vatten
L50	<i>bovis</i>	0	-	0	-	-	-	färskt	b
L51	<i>bovis</i>	0	-	0	-	-	-	färskt	b
L52	<i>bovis</i>	0	-	0	-	-	-	färskt	b
L53	<i>bovis</i>	0	-	0	-	-	-	färskt	b
L54	<i>bovis</i>	0	-	0	-	-	-	färskt	b
L55	<i>bovis</i>	0	-	0	-	-	-	färskt	b
L56	<i>bovis</i>	250	-	0	-	-	-	färskt	b
L57	<i>bovis</i>	400	-	0	-	-	-	färskt	b
L58	<i>bovis</i>	1100	-	0	-	-	-	färskt	b
L59	<i>bovis</i>	2000	-	0	-	-	-	färskt	b
