

# SLUTRAPPORT - Carolina Oweson

---

## **Släckt kalk som desinfektion mot kryptosporidier**

### **Bakgrund**

Projektets mål är att utreda om släckt kalk kan avdöda kryptosporidieocystor och därmed fungera som ett effektivt desinfektionsmedel mot kryptosporidier i stallar och på så sätt undvika smittspridning inom en besättning. Kryptosporidier är en grupp encelliga parasiter som orsakar mag-tarmlidande och diarré hos djur och människor. Parasiterna är frekventa i svenska besättningar och kryptosporidieinfektion är en av de vanligaste orsakerna till diarré hos unga kalvar. Kalven är besättningens framtid och är mycket känslig för infektioner. I besättningar med diarréproblematik är djurvälståndet hos kalvarna dessvärre eftersatt. Diarré orsakar en rad symptom som buksmärter och uttorkning och kan orsaka kroniska problem som nedsatt tillväxt eller göra kalven känslig för ytterligare infektioner. Diarré är ett lidande som i stor utsträckning kan förebyggas genom bra och väl fungerande rengörings- och smittskyddsrutiner. Förekomsten av kryptosporidier i svenska mjölkbesättningar undersöktes i en doktorsavhandling på Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU, och man kunde påvisa att parasiterna förekommer i mycket stor utsträckning (Silverlås, 2010). En nyligen genomförd studie där diagnostikprover från Svenska Djurhälsovårdens kalvpaket ingick visade att de besättningar som har hög diarréförekomst och ibland även hög dödlighet hos kalvar ofta har *C. parvum* inom besättningen och mängden oocystor i proverna talar för ett mycket högt smittryck i dessa besättningar (Silverlås *et al.*, 2013).

Diarré till följd av kryptosporidieinfektion kan åtföljas av slöhet, anorexi, feber, uttorkning och sänkt allmäntillstånd. Inkubationstiden är 2-7 dagar. Kalven återhämtar sig oftast spontant inom 1-2 veckor men variationen är stor mellan olika individer (Tzipori *et al.*, 1983). Samtidig infektion med andra agens som rotavirus och coronavirus kan förvärra och förlänga sjukdomen eller orsaka dödsfall. Infektionsdosen vid smitta av kryptosporidier är mycket låg och ett par till 100 oocystor kan räcka för infektion. Utsöndringen av aktiva oocystor är däremot hög och kan uppgå till  $10^{10}$  oocystor under sjukdomsperioden.

Kryptosporidier är mycket tåliga i miljön och resistenta mot de desinfektionsmedel som vanligtvis rekommenderas (Fayer & Xiao, 2008). Kombinationen låg infektionsdos, hög utsöndring och hög tålighet i miljön gör att ett högt infektionstryck snabbt kan byggas upp och bidra till att kalvsjukligheten blir hög. Det som visat sig effektivast för att minska viabiliteten, alltså aktivitet och kapacitet att infektera, hos parasiterna är UV-ljus i kombination med uttorkning. UV-ljus är inte alternativt att desinficera stallar på grund av risker, kostnader och möjligheter att använda på ett nödvändigt sätt. Uttorkning av boxar kan dessutom vara svårt att hinna med vid högt kalvningstryck. Kalk höjer pH kraftigt och är användbart som desinfektionsmedel mot bakterier och virus (Zintl *et al.* 2010). Nya studier visar att kalk skulle kunna vara ett fungerande desinfektionsmedel mot kryptosporidier. Dessa studier genomfördes på avloppsslam (Graczyk *et al.*, 2008) samt på vattenlösning och gödsel/halm spikad med oocystor, det vill säga att känd mängd är tillsatt (Zintl *et al.* 2010) för

att undersöka kalks avdödande effekt på kryptosporidier på det material som sedan skall användas som gödsel. Båda studierna visade dock att användandet av kalk minskade den totala mängden oocystor samtidigt som andelen viabla oocystor i proven ökade (Zintl *et al.*, 2010; Graczyk *et al.*, 2008), vilket indikerar att en upprepad användning av kalk kan behövas för en effektiv desinficering. Än finns inte några studier gjorda på effekten av torr kalk på ytor som golv och väggar i stallmiljö för att förhindra smittspridning i preventivt syfte. Vi vet alltså inte vilken nytta kalk i pulverform skulle kunna ha på ytor som rengjorts ordentligt eller där gödsel åtminstone skrapats bort.

Torr, släckt kalk är smidigt att använda och strös lätt ut på underlaget. Kalk kan användas som desinfektion samtidigt som boxen torkar upp istället för att ytterligare blöta ner miljön som vid användning av till exempel Virkon, som rekommenderas som desinfektionsmedel nu. Om släckt kalk är effektivt även mot kryptosporidier har det fördelar både för kalvhälsan och för humanhälsan. Det ger djurägarna ett enkelt och effektivt sätt att desinficera kalvboxarna. Ett minskat smittryck hos kalvar i besättningar med *C. parvum* gör att diarréproblemen kan begränsas. Det minskade smittrycket gör också att människor som kommer i kontakt med dessa kalvar utsätts för mindre risk att själva smittas.

## Material och metoder

Vi har använt oss av isolerade och renade kryptosporidieoocystor av den zoonotiska sjukdomsalstrande arten *Cryptosporidium parvum* (isolat från *Moredun*, Edinburgh, UK) och testat släckt kalk i fyra olika koncentrationer; 0, 0.1, 0.25 och 0.5 kg/m<sup>2</sup> under olika exponeringstid; 1, 4, 16 och 48 timmar. Studien har gjorts i två steg. Steg 1) innebar att vi testade kalkens effekt på oocystor applicerade på små glasytor, som vi sedan studerade i mikroskop. Steg 1 gjordes för att utvärdera om kalk har en signifikant effekt på oocystorna. Oocystorna, ca 20 000 oocystor, fick torka in på objektsglasen för att sedan exponeras för kalk i olika koncentrationer och tider. Efter exponering togs kalken bort och de oocystor som satt på objektglaset analyserades oocystorna med hjälp av infärgning 1 h. med monoklonala fluorescerande antikroppar (FITC) mot protein på oocystans yta (Crypto Cel Reagent, *Cellabs*) samt 20 min. med DAPI-infärgning (Fluoroshield with DAPI, *Sigma-Aldrich*). Objektglaset undersöks därefter i fluorescensmikroskop och infärgade oocystor räknades. FITC är kryptosporidiespecifik, ger grönt fluorescerande oocystor och användes för att räkna det totala antalet oocystor i provet samt antalet starkt respektive svagt infärgade oocystor för att bedöma andelen oocystor med delvis nedbruten cellvägg. DAPI färgar in DNA i levande oocystor och användes för att bedöma viabilitet av oocystorna.

I Steg 2) gick vi vidare och testade kalkens effekt på oocystor applicerade på 15x15 cm plattor av plywood, som är ett material som många djurägare använder i kalvboxar. Efter kalkexponeringen skrapades oocystorna av med hjälp av lite vatten samt en vass skalpell. Oocystorna torkade in på objektsglas, ca.1000 oocystor, och fick sedan samma behandling som i Steg 1.

Alla insamlade datapunkter sammanställs i en databas och bearbetas statistiskt. Genom att vi har mätvärden för olika tidpunkter kan diagram sammanställas för att visa den effekt kalk har på oocystmängd och viabilitet över tid vid olika koncentrationer. Vi kan också

beräkna statistiska modeller för ungefärlig minsta effektiva koncentration vid olika behandlingstider utifrån effekten vid de olika koncentrationerna som använts i studien.

## Resultat

Både tid och koncentration hade var för sig effekt på totalantalet oocystor, andelen starkt FITC-infärgade och andelen DAPI-infärgade oocystor. Vi kunde se att FITC-infärgningen på en stor andel oocystor bleknade väldigt fort vid beräkning av antalet oocystor. Andelen starkt infärgade oocystor, alltså normalt infärgade oocystor, minskade med ökad exponeringstid och koncentration av kalk. Samtidigt som andelen viabla oocystor minskar med ökad exponeringstid och koncentration av kalk. Detta kunde vi se vid både exponering av objektsglas och på plywoodplattor.

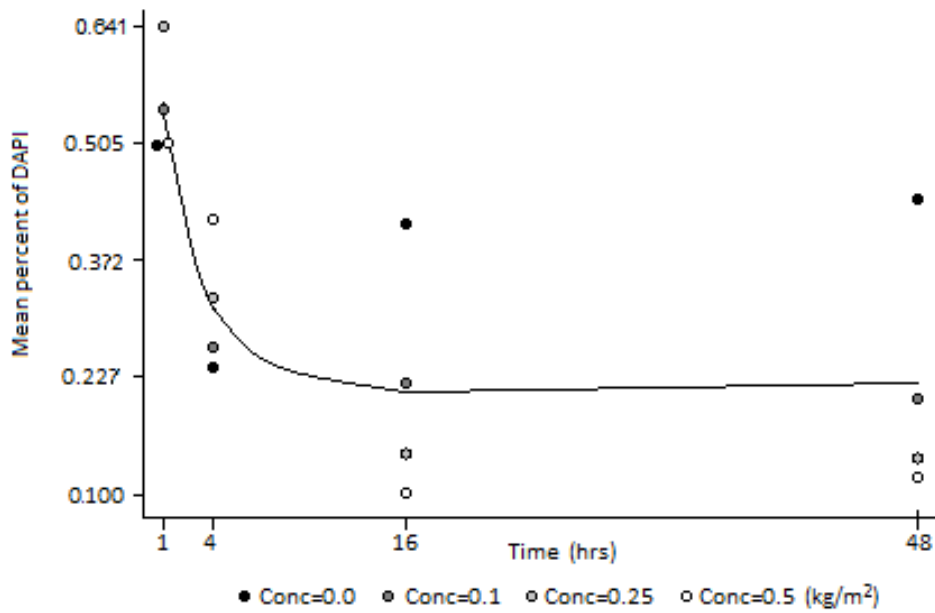
**Tabell A.** *Exponering på objektsglas.* Medelvärden för antal FITC-infärgade oocystor per synfält i mikroskopet, andelen starkt FITC-infärgade av totalantalet infärgade oocystor samt andelen oocystor som är infärgade med DAPI av totalantalet infärgade oocystor vid olika exponeringstider och koncentrationer av släckt kalk. Varje värde representerar medelvärdet för tre synfält vid nio olika exponeringar.

Kalk koncentration (kg/m <sup>2</sup> )	Exponeringstid (h.)			
	1	4	16	48
FITC (N)				
0	122.0	119.8	118.7	120.7
0.01	114.9	109.4	111.9	104.6
0.025	113.9	122.6	106.9	99.7
0.05	119.3	120.4	98.7	82.1
STARK FITC (%)				
0	100.0	99.6	98.2	96.6
0.01	93.0	83.1	35.2	26.7
0.025	76.7	65.6	35.0	28.6
0.05	69.3	48.5	18.5	26.4
DAPI (%)				
0	50.4	50.3	41.0	43.9
0.01	54.7	24.6	22.6	20.9
0.025	64.2	27.0	14.5	14.0
0.05	50.3	32.8	10.2	11.8

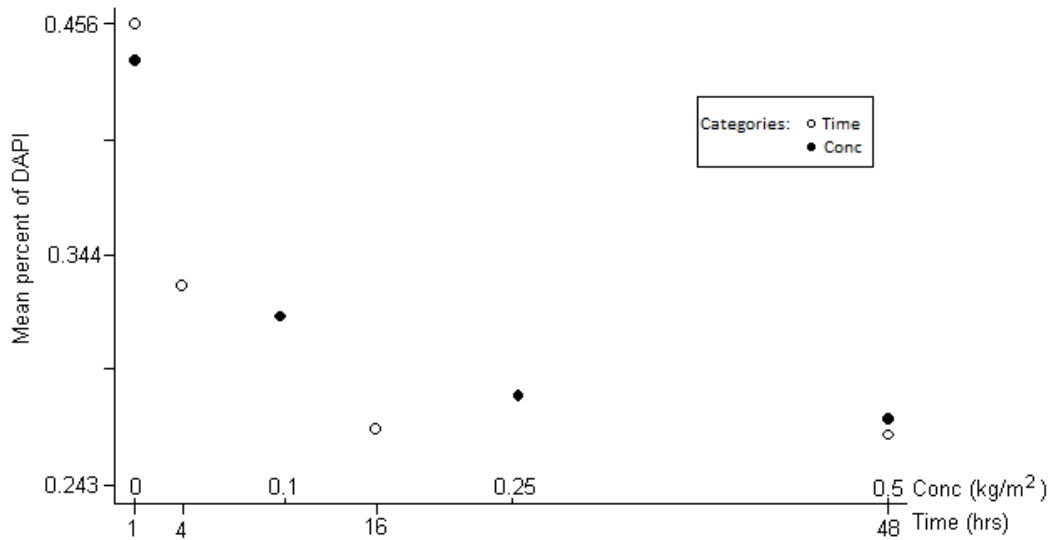
**Tabell B.** *Exponering på plywoodplatta.* Medelvärden för antal FITC-infärgade oocystor per synfält i mikroskopet, andelen starkt FITC-infärgade av totalantalet infärgade oocystor samt andelen oocystor som är infärgade med DAPI av totalantalet infärgade oocystor vid olika exponeringstider och koncentrationer av släckt kalk. Varje värde representerar medelvärdet för antalet oocystor på hela brunnen vid sex olika exponeringar.

Kalk koncentration (kg/m <sup>2</sup> )	Exponeringstid (h.)			
	1	4	16	48
FITC (N)				
0	766.3	805.5	760.7	732.3
0.01	723.2	751.7	713.7	679.3
0.025	727.3	719.0	705.7	633.7
0.05	738.0	735.7	695.3	605.7
STARK FITC (%)				
0	100.0	100.0	100.0	100.0
0.01	98.9	96.8	89.6	85.3
0.025	96.9	94.8	89.1	81.9
0.05	94.9	92.6	87.5	79.4
DAPI (%)				
0	46.2	43.7	42.1	43.1
0.01	46.7	33.3	25.7	23.6
0.025	43.5	28.6	21.7	21.3
0.05	46.0	28.5	18.1	18.3

Viabiliteten hos de exponerade kryptosporidieoocystorna minskar med exponeringstid och koncentration. Detta visar vi i Figur 1 och 2 nedan. Vi har beräknat ett medelvärde för varje tidpunkt i kombination med koncentration och med hjälp av statistik analyserat skillnaderna dem emellan. Vi kan se att oocystornas viabilitet minskar vid exponering av släckt kalk.



**Figur 1.** Diagram för objektsglas. Tid och koncentration kombinerat med ett medelvärde per kombination samt en kurva för det totala medelvärdet vid varje tidpunkt



**Figur 2.** Diagram för Plywood-platta. Tid och koncentration kombinerat med ett medelvärde per kombination samt en kurva för det totala medelvärdet vid varje tidpunkt

## Diskussion

Målet med projektet har varit att visa om släckt kalk fungerar desinficerande på kryptosporidier. I besättningar med *C. parvum* kan diarré förekomma hos nära 100 % av kalvarna och dödligheten kan överstiga 10 %, sannolikt på grund av ett extremt smittryck (observation, pågående projekt, C. Silverlås). Om vi kan hitta ett effektivt desinfektionsmedel mot kryptosporidier är därför mycket vunnet ur kalvhälsosynpunkt, då smittrycket i så fall kan sänkas med enkla åtgärder. Våra resultat visar att släckt kalk har effekt på viabiliteten, livsdugligheten, hos *C. parvum*. Oocystorna förändras i utseende och överlevnad. Verkningsstiden har större effekt än effekten av ökad mängd kalk. Vår rekommendation till djurägare med diarréproblem är att försöka sprida ett så jämnt lager med kalk som möjligt över ytan. Vi skulle även rekommendera att kalken får verka under så lång tid som möjligt.

Vi kan genom detta försök bedöma att det finns en nytta i att använda släckt kalk som desinfektionsmedel mot kryptosporidier i stallmiljö. Vi har endast testat rena oocystor, vilket innebär att kalken täcker oocytan direkt. I ett stall är inte alltid kryptosporidieocystorna helt exponerade. Detta gör att påvisad effekt kan ta något längre tid än i dessa experiment. Studien visar på att det behövs vidare forskning med försök i besättningar med diarréproblem för att verifiera att det fungerar i stallmiljö med en aktiv verksamhet. Vi har kunnat lägga märke till att djurägare vi rekommenderat kalkning i stallet vid rengöring har kunnat se en viss minskning av problem med diarré. Om detta beror på kalksteget vid rengöring eller en generell förändring och mer noggrannhet vid rengöring alternativt något annat vet vi inte än. Detta är däremot av stort intresse att följa upp och göra större studie av.

Bättre kalvhälsa ger förutom bättre välfärd hos kalvarna minskad arbetsbörda för djurägaren då sjuka kalvar kräver extra omvårdnad, samt sannolikt bättre tillväxt med lägre inkalvningsålder och högre mjölkproduktion. Förutom kalvarnas välfärd är det därför ekonomiskt försvarbart för djurägarna att försöka identifiera hur man bäst förebygger problem. Eftersom zoonotisk smitta förekommer, är det även relevant ur humansynpunkt att hitta effektiva åtgärder för att minska smittrycket hos kalvar.

## Referenser

- Anderson, B.C. (1986). Effect of drying on the infectivity of cryptosporidia-laden calf feces for 3- to 7 day old mice. *Am J Vet Res* 47(10), 2272-2273.
- Fayer, R. & Xiao, L. (2008). *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. 2 edition. CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Graczyk, T.K., Kacprzak, M., Neczaj, E., Tamang, L., Graczyk, H., Lucy, F.E. & Girouard, A.S. (2008). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of sanitization treatments on pathogen inactivation. *Environ Res* 106(1), 27-33.
- Silverlås, C. (2010) *Cryptosporidium* Infection in Swedish Dairy Cattle - Prevalence, species distribution and associated management routines. Dissertation thesis, SLU Uppsala
- Silverlås, C., Emanuelson, U., de Verdier, K. & Björkman, C. (2009). Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. *Prev Vet Med* 90, 242-253.

- Tzipori, S., Smith, M., Halpin, C., Angus, K.W., Sherwood, D., Campbell, I., 1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *Vet. Rec.* 112, 116-120.
- Zintl, A., Keogh, B., Ezzaty-Mirhashemi, M., De Waal, T., Scholz, D. & Mulcahy, G. (2010). Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in the presence of hydrated lime. *Vet Rec* 166(10), 297-300.

## **Publikationer**

Resultaten från den här studien planerar vi att publicera i *Veterinary Parasitology* under våren 2014.

## **Slutsatser**

Vi har kunnat se att användning av släckt kalk har en tydlig effekt på kryptosporidieocyster. Oocystorna påverkas redan efter av kort tids exponering, men mest effekt har kalken om den får tid att verka. Vår rekommendation när man använder släckt kalk i stallar är att låta strö ut ett jämnt lager kalk över den rengjorda ytan och låta det verka över natt, för störst effekt.

## **Resultatförmedling till näringen**

Projektet har presenterats vid olika konferenser och workshops bland annat har det presenterats vid Djurhälso-och utfodringskonferensen, Uppsala augusti 2012, internationella konferensen "Apicowplexa", Lissabon, oktober 2012 samt på Veterinärkongressen i Uppsala, november 2012.