

***Cryptosporidium parvum*-infektion hos nötkreatur**

Bakgrund och syfte

Cryptosporidium parvum är en encellig parasit som infekterar tarmslemhinnan och orsakar diarrésjukdom hos ett stort antal arter varmblodiga djur, inklusive nötkreatur och människa. Dess livscykel omfattar olika utvecklingsstadier i tarmcellerna hos infekterade individer. Så småningom utsöndras parasiten med avföringen i form av mikroskopiska så kallade oocystor. Oocystorna, som är det smittsamma stadiet av parasiten, är oerhört motståndskraftiga och kan överleva många månader i omgivningen. Mottagliga djur och människor infekteras genom konsumtion av mat eller vatten som förorenats med oocystor. Då parasiten kan spridas från djur till människa är kryptosporidios en zoonos. Det är oklart om det är djur eller andra personer som är den vanligaste smittkällan för människor.

Kryptosporidios drabbar hos nötkreatur framför allt kalvar och ger oftast en ganska okomplicerad diarré. Vid saminfektion med bakterier och virus kan sjukdomen dock bli allvarlig. Även till synes friska kalvar kan bära på smittan. Man tror att också vuxna djur kan bära på parasiten utan att vara sjuka och därmed fungera som smittkälla för kalvarna. Hos människor drabbas både barn och vuxna som får kraftig diarré och magsmärtor i 1-2 veckor. Sjukdomen är hos både nötkreatur och människor självläkande förutsatt att patienten är immunkompetent.

Diagnosen kryptosporidios baseras på kliniska symptom och att oocystor påvisas i avföring från patienten. Vill man påvisa oocystutskiljning hos subkliniskt infekterade individer måste proverna koncentreras innan de analyseras. Molekylärbiologiska metoder kan användas för att genetiskt karakterisera de påvisade parasiterna och för att studera den genetiska variationen mellan olika isolat. Med hjälp av information om vilka genotyper och subgenotyper som förekommer kan man utreda smittvägarna mellan djur, och mellan djur och människor.

Avsikten med denna pilotstudie var att etablera och utvärdera metoder som kan användas för kartläggning av förekomst och spridningsvägar för *C. parvum* hos svenska nötkreatur.

Material och metoder

Koncentrerings- och reningsmetoden som användes är en natriumkloridflotationsmetod som utvecklats vid Danmarks Fødevarerforskning (DFVF). Efter flotationen färgades provet med fluoresceinmärkta antikroppar mot kryptosporidium och avlästes i fluorescensmikroskop. För utvärderingen användes kryptosporidie-oocystor som ursprungligen isolerats från en dansk mjölkbesättning 1990 och sedan dess propagerats i kalvar vid DFVF ("the Copenhagen calf laboratory isolate", CPB-0) och som tillhandahölls av Dr Heidi Enemark, DFVF.

De molekylärbiologiska metoder som etablerades är modifierade versioner av tekniker som tidigare beskrivits (McLauchlin et al, J Clin Microbiol 1999, 37, 3153; Xiao et al Appl Environm Microbiol 1999, 65, 3386; McLauchlin et al, Vet Parasitol 2000, 83, 1).

Fem mjölkbesättningar besöktes och provtogs under studiens gång. Dessutom användes nötkreatursprover från kliniskt sjuka djur som vi fick från den diagnostiska verksamheten vid SVAs avdelning för parasitologi och avdelning för lantbrukets djur.

Resultat och diskussion

Studien omfattar två delar. I den första delen har vi i samarbete med Danmarks Fødevareforskning i Köpenhamn etablerat och utvärderat en metod för att rena och koncentrera *Cryptosporidie*-oocystor hos subkliniskt infekterade djur. Med hjälp av denna kan vi nu detektera så låga nivåer som 72 oocystor per gram träck med en återfinningsgrad (recovery rate) av 52% (Andersson 2004). Faecesprover insamlades vid ett tillfälle från 20 kor i en mjölkbesättning där *C. parvum* tidigare påvisats hos kalvarna. Vi kunde påvisa *C. parvum* i 2 av de 20 korna. Detta bekräftade att det även i Sverige förekommer subklinisk infekterade kor som utskiljer oocystor med träcken (Andersson 2004).

Vi satte upp en metod för att extrahera oocyst-DNA direkt från träckprover för PCR-analys, samt två olika molekylärbiologiska testsystem för att karakterisera kryptosporidieisolat. 18S rRNA-genen analyseras med PCR och restriktionsenzymanalys för att säkerställa att parasiten verkligen är *C. parvum* och inte någon annan kryptosporidieart. För att särskilja mellan genotyp 1 och 2 av *C. parvum* analyseras en gen som kodar för ett oocystprotein (COWP). Bland annat dessa molekylärbiologiska metoder har vi senare använt för att karakterisera ett 30-tal bovina isolat. Majoriteten av de isolat som undersöktes var som förväntat av genotyp 2. Dock fann vi också en inte tidigare beskriven *C. parvum*-genotyp som vi kallar genotyp 3. Den påträffades i en mjölkbesättning i Mellansverige som under en längre tid haft problem med kalvdiarré. Prover togs från totalt 20 kalvar i besättningen vid 2 olika tillfällen med ett halvårs mellanrum och denna nya *C. parvum* genotyp 3 återfanns hos 4 av kalvarna (Björkman & Mattsson 2006).

I projektets andra del utformades ett frågeformulär som kan användas för att identifiera individ- och besättningsrelaterade faktorer som kan bidra till att besättningar har hög prevalens av *Cryptosporidium* och/eller kryptosporidierelaterade diarréproblem. Formuläret testades i fyra besättningar och några veterinärer i Svenska djurhälsovården fick lämna synpunkter på formulärets utformning. En modifierad form av formuläret används nu i en prevalensstudie vi nu genomför med ekonomiskt stöd från Formas (Formas Dnr 221-204-273).

Konklusion

Denna pilotstudie har resulterat i att vi nu har etablerade metoder vid SLU/SVA för att påvisa och karakterisera *C. parvum*-infektion samt utformat ett frågeformulär som kan användas för att identifiera riskfaktorer för infektion och sjukdom.

Publikationer

Andersson, S. Kryptosporidieinfektion hos nötkreatur - Utvärdering av en ny metod för påvisande av subklinisk infektion. Examensarbete vid Sveriges lantbruksuniversitet, Veterinärmedicinska fakulteten, Veterinärprogrammet vol. 2004:7. <http://epsilon.slu.se/archive/00000081/>

Björkman, C. & Mattsson, J.G. 2006. Persistent infection in a dairy herd with an unusual genotype of bovine *Cryptosporidium parvum*. FEMS Microbiology Letters. 254, 71-74.

Övrig resultatförmedling till näringen

Då detta är en pilotstudie avsedd att generera metoder att användas i fortsatta undersökningar har den inte genererat resultat som är av direkt intresse för näringen. Djurägare och veterinärer informeras dock i samband med att vi nu har känsliga metoder för att påvisa och spåra kryptosporidieinfektion. De fortsatta studierna har uppmärksammats i tidskriften Husdjur (Jakten på kryptosporidier har startat, Husdjur 5, 2006).