

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**UGOTAVLJANJE POVZROČITELJEV DRISK PRI
TELETIH IN VPLIV ZDRAVLJENJA NA IZLOČANJE
OOCIST *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM***

**INFECTIOUS CAUSES OF DIARRHOEA IN CALVES
AND THE INFLUENCE OF TREATMENT ON THE
SECRETION OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*
OOCYSTS**

Barbara Jernejčič

Katarina Modrijan

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 636.2.09:612.64:616.993.1:616.34-008.314.4-078(043.2)

**UGOTAVLJANJE POVZROČITELJEV DRISK PRI TELETIH
IN VPLIV ZDRAVLJENJA NA IZLOČANJE OOCIST
*CRYPTOSPORIDIUM PARVUM***

**INFECTIOUS CAUSES OF DIARRHOEA IN CALVES AND
THE INFLUENCE OF TREATMENT ON THE SECRETION
OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* OOCYSTS**

Barbara Jernejčič

Katarina Modrijan

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom doc. dr. Jožice Ježek in somentorstvom izr. prof. dr. Jožeta Stariča na Kliniki za reprodukcijo in velike živali.

Ljubljana, 2019

KLJUČNE BESEDE

Bolezni govedi – epidemiologija – parazitologija; kriptosporidioza – parazitologija; oociste – izolacija in čiščenje; diareja – parazitologija; feces – parazitologija; kemične analize krvi; živali, novorojenci

POVZETEK

Pogosti povzročitelji drisk pri teletih so Rota in Koronavirusi ter *E. coli*, vse bolj pomemben in razširjen povzročitelj pa je zoonotičen protozoj *Cryptosporidium parvum*. V osmih večjih rejah z mlečno proizvodnjo, smo testirali teleta stara od 2 do 35 dni na prisotnost teh štirih povzročiteljev v iztrebkih, z večjim poudarkom na odkrivanju oocist *C. parvum*. Teletom smo odvzeli vzorce iztrebkov in krvi. Poleg tega smo med raziskavo beležili še ali je tele imelo drisko, opravili pa smo tudi klinične preglede in zabeležili vrednosti triasa. Vzorce iztrebkov smo testirali s hitrim testom za odkrivanje zgoraj omenjenih povzročiteljev drisk, ter jih uporabili tudi za klasično preiskavo, kjer smo iskali oociste *C. parvum*. Razmaze iztrebkov za klasično preiskavo smo pobarvali po modificirani Ziehl-Neelsen metodi in nato pregledali pod mikroskopom s pomočjo posebne mrežice. Vzorce krvi smo uporabili za biokemijske preiskave, kjer smo preverjali pasivni prenos imunosti z matere na teleta. *C. parvum* smo ugotovili v vseh preiskovanih rejah. Glede na največje število okuženih telet s *C. parvum* v eni od rej, smo tam izvedli drugi del raziskave. V raziskavo smo vključili 30 telet in jih razdelili v kontrolno skupino (10 telet) in testno skupino (20 telet). Pri testni skupini smo izvedli preventivno zdravljenje telet s halofuginonom in determinacijo oocist kriptosporidijev s klasičnim in hitrim testom. Vsa teleta vključena v drugi del raziskave, razen enega so bila primerno oskrbljena s kolostrumom. *C. parvum* se je v iztrebkih pojavil pri tri dni starih teletih, tako pri tistih z drisko, kot pri tistih brez le-te. Razlike v pojavljanju drisk so bile odvisne tudi od sočasne infekcije z drugimi patogeni in od drugih dejavnikov. Pri primerjavi rezultatov hitrih in klasičnih testov za dokaz kriptosporidioze smo ugotovili posamezna neskladja. Dajanje halofuginona je zmanjšalo število izločenih oocist pri teletih, saj je bilo na hitri test pozitivnih le 20 % telet v zdravljeni skupini in 90 % telet v kontrolni skupini. V povprečju je driska pri zdravljenih teletih trajala manj časa kot pri kontrolnih, kar kaže, da je dajanje zdravila ugodno za preventivo kriptosporidioze.

KEY WORDS

Cattle diseases – epidemiology – parasitology; cryptosporidiosis – parasitology; oocysts – isolation and purification; diarrhea – parasitology; feces – parasitology; blood chemical analysis; animals, newborn

SUMMARY

Common agents of diarrhoea in calves are Rota and Coronaviruses, *E. coli* and the increasingly more important and widely spread protozoan *Cryptosporidium parvum*. On eight large Slovenian dairy farms we tested newborn calves, aged 2 to 35 days, on the presence of these four pathogens in faeces, with emphasis on detection of *C. parvum* oocysts. We took samples of blood and faeces from the calves. We also wrote down information if the calves suffered from diarrhoea, we carried out clinical examinations and wrote down the data of trias. We tested the faecal samples with the quick test for the detection of the infectious agents listed above, and used the samples for the detection of *C. parvum* oocysts with the classic method. For the classic method, we made smears of faeces, coloured them with the modified Ziehl Neelsen stain and examined them under microscope with the help of a special net. Blood samples were used for biochemical examinations, to check the transfer of passive immunity from mother to calf. Considering the largest number of calves infected with *C. parvum* on one farm, our research continued on that farm. We included 30 calves in the research and divided them in two groups; the control group (10 calves) and test group (20 calves). Calves in the test group were treated with halofuginone. We also carried out the determination of *C. parvum* oocysts with the quick and classic test. According to the biochemical examinations of the blood samples all calves, except one included in the research were appropriately supplied with colostrum after birth. Oocysts of *C. parvum* appeared in faeces of three days old calves, both diarrhoeic and non-diarrhoeic. Differences in occurrence of diarrhoea depended upon the simultaneous infection of calves with other pathogens and other factors. After the comparison of results of both tests for determination of cryptosporidiosis some discrepancies were found. After treatment with halofuginone, number of excreted oocysts was reduced according to the quick tests where there were only 20 % of calves positive in test group, while in control group 90 % calves were positive on *C. parvum*. Diarrhoea in treated calves lasted fewer days on average as in control group, which indicates that preventive treatment with halofuginone was beneficial.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	9
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA.....	9
1.2	CILJ RAZISKOVANJA	10
1.3	DELOVNE HIPOTEZE.....	10
2	PREGLED LITERATURE	11
2.1	UVOD	11
2.2	IMUNSKI SISTEM NOVOROJENIH TELET	11
2.2.1	Kolostrum.....	12
2.2.2	Oskrba telet z mlezivom.....	12
2.2.3	Testiranje uspešnosti prenosa pasivne imunosti pri teletih	13
2.3	NAJPOGOSTEJŠI POVZROČITEJI DRISK	14
2.3.1	Rotavirus	14
2.3.2	Koronavirusi	15
2.3.3	<i>Escherichia coli</i>	15
2.3.4	<i>Cryptosporidium parvum</i>	16
2.3.4.1	Zgodovina.....	16
2.3.4.2	Razvojni krog	16
2.3.4.3	Govedo in <i>Cryptosporidium parvum</i>	19
2.3.4.4	Prevalenca	21
2.3.4.5	<i>Cryptosporidium parvum</i> kot zoonoza.....	22
2.3.5	Terapija in preventiva drisk pri novorojenih teletih	23
2.3.5.1	Preventiva in zdravljenje kriptosporidioze.....	24
3	MATERIALI IN METODE	26
3.1	ŽIVALI, VKLJUČENE V RAZISKAVO	26

3.1.1	1. del raziskave	26
3.1.2	2. del raziskave	26
3.2	ZBIRANJE PODATKOV	27
3.2.1	1.del raziskave	27
3.2.2	2.del raziskave	27
3.3	VZORČENJE IN PRIPRAVA VZORCEV	27
3.3.1	Vzorčenje	27
3.3.2	Priprava vzorcev	28
3.3.3	Biokemijske analize krvi	29
3.3.4	Preiskave iztrebkov	29
3.3.4.1	Hitri test FASTest® D4T bovine	29
3.3.4.2	Klasična metoda z modificiranim Ziehl - Neelsen barvanjem	31
3.4	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	34
4	REZULTATI	35
4.1	1. DEL RAZISKAVE	35
4.1.1	Klinični pregled	35
4.1.2	Biokemijske preiskave krvi	36
4.1.3	Preiskave iztrebkov	36
4.2	2. DEL RAZISKAVE	38
4.2.1	Klinični pregled	38
4.2.2	Biokemijske preiskave krvi	39
4.2.3	Pregled iztrebkov	40
5	RAZPRAVA	42
5.1	1. DEL RAZISKAVE	42
5.1.1	Klinični pregled	42
5.1.2	Biokemijske preiskave krvi	43

5.1.3	Preiskave iztrebkov	43
5.2	2. DEL RAZISKAVE	46
5.2.1	Klinični pregled.....	46
5.2.2	Biokemijske preiskave krvi.....	47
5.2.3	Pregled iztrebkov	49
6	SKLEPI.....	51
7	ZAHVALA	53
8	LITERATURA.....	55
9	PRILOGE.....	58
9.1	PRILOGA 1 – OBRAZCI ZA IZPOLNJEVANJE – 1. DEL RAZISKAVE	58
9.2	PRILOGA 2 – OBRAZCI ZA IZPOLNJEVANJE – 2. DEL RAZISKAVE	60
9.3	PRILOGA 3 – PRISPEVEK NA KONGRESU V BOLOGNI 2018	63
9.4	PRILOGA 4 – PRISPEVEK NA SLOVENSKEM VETERINARSKEM KONGRESU 2019	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Invazija parazita v gostiteljevi celici (Thomson in sod., 2017)	17
Slika 2: Razvojni krog <i>Cryptosporidium parvum</i> (Thomson in sod., 2017)	19
Slika 3: Hitri test FASTest® D4T bovine (pozitivni in negativni rezultat) (Jernejčič, 2018)..	30
Slika 4: Hitri test FASTest® D4T bovine in tabele z rezultati (Jernejčič, 2018).....	30
Slika 5: Fiksacija razmazov iztrebkov s 96 % metanolom (Jernejčič, 2018)	31
Slika 6: Modificirano ZN barvanje (Modrijan, 2018)	32
Slika 7: Štetje oocist pod mikroskopom (Modrijan, 2018)	32
Slika 8: Pogled skozi okular mikroskopa in vstavljena mrežica. Na sredini vidnega polja je vidna rdeče obarvana oocista kriptosporidija (Modrijan, 2018).....	33

KAZALO TABEL

Tabela 1: Starost telet, število telet (%) z drisko in povišano telesno temperaturo v posamezni reji.....	35
Tabela 2: Vrednosti celotnih serumskih beljakovin (CSB) in albuminov (Alb) pri teletih.....	36
Tabela 3: Rezultati hitrega testa FASTest® D4T bovine.....	37
Tabela 4: Primerjava hitrega testa na <i>C. parvum</i> in pregleda razmazov iztrebkov (40 vzorcev)	38
Tabela 5: Telesna temperatura in prisotnost driske pri kontrolni (K) in testni (Z) skupini telet	38
Tabela 6: Prsni obseg in čas trajanja driske (srednja vrednost in SD), primerjava med testno (Z) in kontrolno (K) skupino	39
Tabela 7: Aktivnost encima GGT in vsebnost CSB pri 2 dni starih teletih testne (Z) in kontrolne (K) skupine	40
Tabela 8: Rezultati preiskave iztrebkov s hitrim testom ter število in delež (%) telet z drisko pri testni (Z) in kontrolni skupini (K)	41

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Gastrointestinalne bolezni so najpogostejše pri teletih v prvih tednih življenja in lahko predstavljajo glavni zdravstveni problem, zlasti v večjih rejah. Najpogostejši povzročitelji drisk pri teletih so Rotavirusi, Coronavirusi, *E. coli* in v zadnjem času vedno pogostejše enocelični parazit *Cryptosporidium parvum*. *C. parvum* sodi v družino *Cryptosporidiidae*, je razširjen po celem svetu in lahko okuži vrsto različnih gostiteljev, vključno s človekom. Prvo poročilo o goveji kriptosporidiozi je bilo objavljeno leta 1971 (Panciera in sod., 1971), vendar pa kot eden glavnih povzročiteljev drisk pri teletih še vedno povzroča zaskrbljenost med kmeti in veterinarji. Razlog za skrb je predvsem v njegovem kompleksnem razvojnem krogu, ki omogoča avtoinfekcijo črevesja in negativnem vplivu na imunski sistem novorojenih telet. Dokazovanje okužbe zahteva posebne postopke za identifikacijo povzročitelja v iztrebkih. Povzroča vnetje tankega črevesja, in posledično malabsorpcijski sindrom, ki se izraža z drisko. Zdravstveno stanje in normalen razvoj novorojenih telet sta prizadeta. Oociste zajedavca so v okolju zelo odporne, zato dolgo časa vztrajajo v okolju, razen tega je za okužbo potreben zelo majhen infektivni odmerek oocist. Cepivo za kriptosporidiozo ne obstaja. Edino registrirano zdravilo oz. zdravilna učinkovina za preprečevanje in zdravljenje kriptosporidioze pri teletih je kokcidiostatik halofuginon, za katerega številne raziskave ugotavljajo, da blagodejno vpliva v eksperimentalnih kot tudi v naravnih razmerah. Za obvladovanje bolezni se priporoča dobra higiena hlevov in napajanja telet, zadostna količina kolostruma v najkrajšem možnem času po rojstvu, preventivno zdravljenje in spremljanje zdravstvenega stanja telet.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V raziskavi smo se ukvarjali s pojavljanjem drisk pri teletih v povezavi z infekcijami z Rotavirusi, Koronavirusi, *E. Coli* K99 ter s poudarkom na infekciji s *C. parvum*. V osmih velikih rejah po Sloveniji, smo testirali teleta na prisotnost teh štirih povzročiteljev, z večjim poudarkom na odkrivanju oocist *C. parvum*. Glede na največje število okuženih telet s *C. parvum* v eni izmed rej, smo raziskavo nadaljevali tam skupaj s testiranjem učinkovitost preparata halofuginona za preventivo kriptosporidioze.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

1. *Cryptosporidium parvum* je prisoten pri teletih v 8 velikih rejah črnobelih molznic v Sloveniji.
2. Driske pogosto povzročajo sočasne infekcije z različnimi povzročitelji.
3. Rezultati hitrih testov za ugotavljanje *Cryptosporidium parvum* so primerljivi s klasično metodo modificiranega barvanja po Ziehl-Neelsnu.
4. Preparat halofuginon je učinkovit za preventivo kriptosporidioze pri teletih.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 UVOD

Driske so eno najpogostejših bolezenskih stanj pri teletih v prvih 30 dneh po rojstvu. Imajo pomemben vpliv na zdravstveno stanje živali, njihov razvoj ter ekonomiko pitanja in plemenske vzreje. Za učinkovito prepoznavanje in ukrepanje je za rejca potrebno poznavanje osnovnih značilnosti imunskega sistema telet, razvoja prebavil, prehrane, nege in oskrbe novorojencev ter najpogostejših infekcijskih oz. zajedavskih bolezni (Cho in Yoon, 2014).

2.2 IMUNSKI SISTEM NOVOROJENIH TELET

Tele po rojstvu nenadoma pride iz sterilnega okolja maternice v okolje, polno najrazličnejših mikroorganizmov. Za preživetje teleta je pomembno, da je v najkrajšem času sposobno kontrolirati vdor mikroorganizmov v svoje telo. Pri novorojenih teletih je imunski sistem že razvit, vendar še ne deluje na nivoju odraslih živali, zato so prvih nekaj tednov po rojstvu bolj dovzetna za bolezni. To vmesno obdobje mladiči premostijo s prenosom imunosti od matere preko kolostruma, ki je ključnega pomena za preživetje, in jo imenujemo pasivna imunizacija. Imunski sistem teleta se razvije zgodaj v fetalnem življenju. Že pri 73 dneh brejosti je plod sposoben imunskega odgovora na nekatere antigene, postopno pridobiva sposobnost odgovora na vse večje število antigenov. Ta sposobnost se v času poroda izgubi zaradi visokega nivoja steroidnih hormonov v serumu (Tizard, 2004).

Placenta prežvekovalcev je sindesmohorialna, kar pomeni, da je horionski epitel v direktnem kontaktu s tkivi maternice. Pri takem tipu placente je popolnoma preprečen

prenos imunoglobulinov od matere na plod, zato je novorojeno tele odvisno od kolostralnih protiteles (Tizard, 2004).

Novorojena teleta so že sposobna določenega imunskega odgovora, vendar gre za primarni odgovor, ki nastopi z zakasnitvijo in nizko koncentracijo protiteles. Odpornost proti patogenim klicam je pri tem vseeno slaba, zato za preživetje nujno potrebujejo dodatna protitelesa iz kolostruma matere (Tizard, 2004).

2.2.1 Kolostrum

Kolostrum ali mleživo je izloček mlečne žleze matere. Nastaja v času presušitve oz. nekaj tednov pred porodom. Koncentracije protiteles v mleživu dosežejo 5 do 10-kratne vrednosti koncentracij v krvi matere. Sestava kolostruma se razlikuje od sestave mleka. Kolostrum prve molže ima večjo vsebnost suhe snovi, ki znaša 27 %, vsebuje 2,7 % kazeina, 16 % globulinov in albuminov, 3,4-9,0 % maščobe in 3,0 % laktoze (Andrews, 2000; White, 1993). Vsebnost suhe snovi, predvsem beljakovin oz. protiteles v prvih 4 dneh pade na raven vsebnosti v mleku. Zaradi prej opisane nezadostne imunosti novorojenih telet in visokih koncentracij zaščitnih snovi v mleživu je seveda nujno, da teleta dobijo mleživo čimprej po rojstvu. To je pomembno iz dveh razlogov: 1. koncentracija protiteles v mleživu s časom pada in 2. prepustnost črevesne sluznice za resorpcijo protiteles v kri teleta je iz ure v uro slabša. Resorpcija protiteles se v črevesju po šestih urah po rojstvu znatno zmanjša, po 12 urah je polovična, po 24 urah pa znaša le še 10 % resorpcije prvih ur po rojstvu (Andrews, 2004; Cho in Yoon, 2014).

2.2.2 Oskrba telet z mleživom

Čas hranjenja ter količina in kvaliteta zaužitega mleživa pomembno vplivajo na razvoj imunskega sistema telet in s tem na njihovo dovzetnost za okužbe. Priporočljivo je, da teleta dobijo zadostno količino mleživa (2-3 L) v prvih dveh urah po rojstvu, v prvih

šestih urah skupaj to znaša 100 – 200 g protiteles IgG. V prvih 12 urah naj bi teleta zaužila 10-15 % telesne mase mleziiva ustrezne kakovosti (vsaj 50 g/L IgG) (Andrews 2004; Cho in Yoon, 2014).

Na kvaliteto mleziiva vplivajo številni dejavniki kot so:

1. **Starost matere:** krave v prvi laktaciji proizvedejo manjšo količino mleziiva, ki je slabše kvalitete.
2. **Pasma:** mesne pasme imajo praviloma višje koncentracije protiteles Ig v mleziivu kot mlečne.
3. **Letni čas:** Koncentracije protiteles v mleziivu so najvišje pri kravah, ki so telile v decembru in januarju, ter najnižje pri telitvah v februarju in marcu.
4. **Cepljenje mater:** s cepljenjem mater v času 3 – 12 tednov pred telitvijo zagotovimo zadostno količino specifičnih protiteles v mleziivu proti najpogostejšim povzročiteljem drisk pri teletih (Rota in Koronavirus, *E.coli*).
5. **Kvalitetna presušitev:** dovolj dolgo presušitveno obdobje (6 - 8 tednov) in zdrava mlečna žleza (bakteriološko negativna) omogočata dobre pogoje za nastanek kvalitetnega mleziiva. Mastitis v presušitvi na oboleli četrti zmanjša količino mleziiva za 17 %, v primeru propada mlečne žleze pa mleziiva sploh ni (Cho in Yoon, 2014).

Do 50 % novorojenih telet ne zaužije dovolj mleziiva. Še posebej teleta, ki sesajo sama, običajno prehitro odnehajo (Andrews, 2004; Cho in Yoon, 2014).

2.2.3 Testiranje uspešnosti prenosa pasivne imunosti pri teletih

Merjenje aktivnosti encima gama-glutamil transferaze (GGT) v serumu telet je ena od posrednih metod ugotavljanja oskrbe s kolostrumom. Aktivnost GGT v kolostrumu je lahko do 1300 krat višja kot v serumu in naj bi bila odvisna od količine zaužitega

kolostruma (Braun in sod., 1982). Teleta so dovolj oskrbljena s kolostrumom, če imajo aktivnost GGT nad 50 U/L (Tyler in sod., 1999).

Količino Ig v serumu novorojenih telet lahko posredno določimo tudi s pomočjo merjenja celotnih serumskih beljakovin (CSB). Ugotavljajo, da obstaja visoka korelacija ($r = 0,87$) med količino CSB in serumskih gamaglobulinov. Ta metoda je primerna za ugotavljanje imunske zaščite telet do 6 dni po rojstvu (Brand in sod., 1996). Rezultati pod 49 g/L celotnih serumskih proteinov pomenijo slabo zaščito in veliko možnost obolevanja. Za dobro zaščitena teleta veljajo tista, ki imajo serumske beljakovine nad 55 g/L (Tyler in sod., 1998). Pri interpretaciji rezultatov je treba upoštevati, da na količino serumskih proteinov lahko vpliva dehidracija.

2.3 NAJPOGOSTEJŠI POVZROČITEJI DRISK

2.3.1 Rotavirus

Okužbe telet z rotavirusi se pojavijo 5 – 14 dni po rojstvu. Virusi so pogosto prisotni v okolju telet. Značilnost te skupine virusov je, da se lahko prenašajo tudi med nekaterimi različnimi vrstami (govedo, prašiči, drobnica), lahko pa jih na tele med porodom prenese tudi okužena mati. Klinični znaki se običajno pojavijo 1 – 3 dni po okužbi in trajajo od 5 – 9 dni (Heller in Chigerwe, 2017). Virusi prizadenejo in uničijo celice črevesnih resic, ki so zadolžene za resorpcijo vode in hranilnih snovi, zato pride do močne driske. Okužba lahko klinično prizadene od 5 % pa do 80 % telet. Smrtnost prav tako niha, pogine lahko 5 % do 60 % telet (Cho in Yoon, 2014).

2.3.2 Koronavirusi

Okužbe telet s Koronavirusi (bovini *Coronavirus*) se pojavijo 3 – 21 dni po rojstvu, lahko tudi pri starejših. Okužijo se lahko po oralni ali respiratorni poti (Heller in Chigerwe, 2017). Podobno kot rota so tudi koronavirusi precej razširjeni med populacijo. Pojavnost niha med 11 % in 80 %. Korona virusi se za razliko od rota razmnožujejo tako v črevesnih celicah, kot tudi v celicah zgornjih dihal. Virusi krožijo v zaprtih čredah in se prenašajo od starejših telet na mlajše. To je tudi eden od razlogov zakaj je izolacija novorojenih telet (igluji, posamični boksi) tako pomembna. Virus precej poškoduje sluznico tankega in debelega črevesja zato traja dalj časa, da si teleta opomorejo. Pogin telet je večji kot pri rotavirusnih infekcijah (Cho in Yoon, 2014; Hall in sod., 1988; Snodgrass in sod., 1986).

2.3.3 *Escherichia coli*

Med bakterijami, ki lahko prizadenejo novorojena teleta in povzročijo drisko, je na prvem mestu *E.coli*. Infekcija vodi do hudega vnetja črevesne sluznice. Bolezen izbruhne že 2 – 5 dni po rojstvu in jo imenujemo tudi kolibaciloza. Bakterija je vseprisotna v okolju, še posebej v slabih higienskih razmerah. Izloča enterotoksin, ki vpliva na prepustnost črevesne stene za tekočino. Posledica tega je hitro izgubljanje telesnih tekočin in močna dehidracija živali. Klinično se bolezen kaže v močni prizadetosti živali, telesna temperatura je normalna ali celo znižana, ni apetita, trebuh je zmerno napet, blato je zelo vodeno, blede rumeno do oker barve. Brez takojšnje terapije, predvsem rehidracije, antibiotikov in podpore, je prognoza zelo slaba. Bakterija lahko v septikemični obliki vdre tudi v krvni obtok, pride do sepse, kar še poslabša težko zdravstveno stanje in običajno vodi v pogin živali.

Druge bakterijske vrste (salmonele, klostridiji), ki povzročajo driske, so kljub hudim izgubam ob izbruhih, manj pogoste v primerjavi s prej naštetimi povzročitelji (Cho in Yoon, 2014; Snodgrass in sod., 1986).

2.3.4 *Cryptosporidium parvum*

Kriptosporidioza je prisotna v nekaterih rejah in najpogosteje prizadene teleta v starosti 7 – 14 dni. Bolezen ne ogroža telet z normalnim obrambnim sistemom, pri takih lahko okužba poteka asimptomatsko. Pri zmanjšani imunosti pa okužba lahko povzroči znatne škode. Je tudi zoonoza, kar pomeni, da je možen prenos na ljudi. Klinična slika bolezni ni značilna, driska je srednje močna in traja dalj časa. Na to bolezen pravzaprav posumimo ravno zaradi kroničnosti driske in neodzivnosti na klasično terapijo. Teleta so lahko apatična, ne jedo in dehidrirajo. Bolezen v nekaj dneh mine sama od sebe, v kolikor ni v času okužbe prišlo do zapletov in sekundarnih infekcij (Cho in Yoon, 2014).

2.3.4.1 Zgodovina

Gastrointestinalne težave pri novorojenih teletih so najpogosteje posledica okužbe s protozom *Cryptosporidium parvum*. *C. parvum* je prvič opisal Edvard Ernst Tyzzer leta 1907 v tankem črevesju miši. Od takrat je bilo opisanih več kot 30 različnih vrst kriptosporidijev, ki prizadenejo veliko različnih vrst gostiteljev. Veliko od teh prizadene govedo, predvsem teleta. Prvi opisani primeri pri govedu so iz leta 1971, leta 1983 pa so prvič izvedli eksperimentalno okužbo s *Cryptosporidium* spp. pri neonatalnih teletih. Kriptosporidioza danes velja za endemično bolezen pri govedu in je razširjena po celem svetu, prav tako pa *C. parvum* velja za enega glavnih svetovnih povzročiteljev enteritisov pri teletih (Panciera in sod., 1971; Thomson in sod., 2017).

2.3.4.2 Razvojni krog

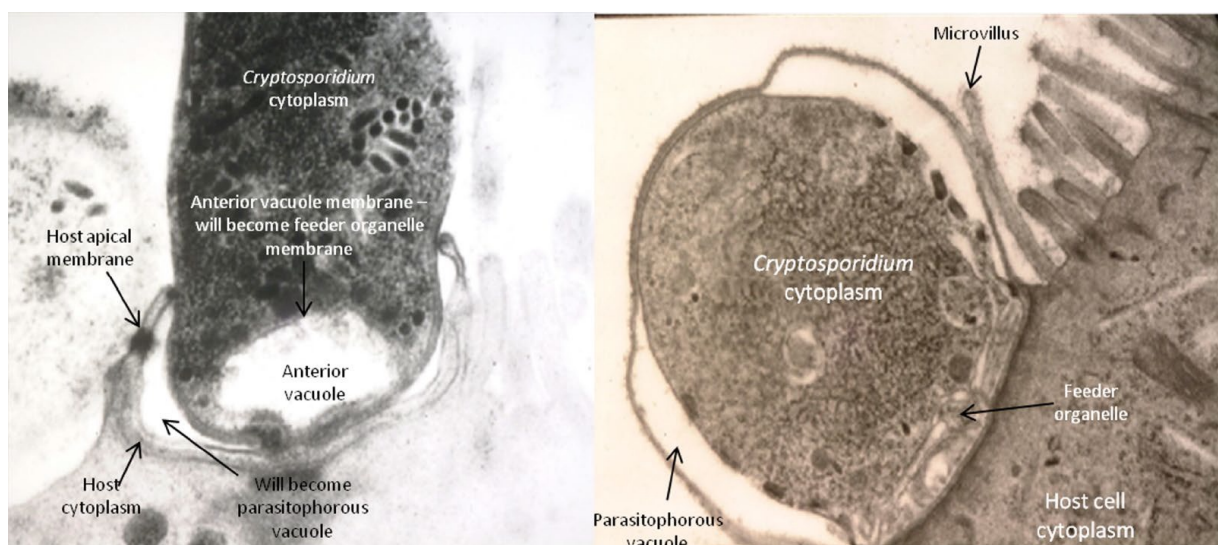
Oociste kriptosporidijev se prenašajo med gostitelji po fekalno-oralni poti, na dva različna načina:

- direktno s kontaktom z okuženimi iztrebki ali pa

- indirektno preko kontaminiranega okolja ali zaužitjem kotaminirane vode ali krme.

Po zaužitju oocist se v gastrointestinalnem traktu gostitelja zaradi telesne temperature in nizkega pH-ja začne sporulacija oocist in sproščanje štirih sporozoitov v okolje. Ti sporozoiti se pritrdijo na epitelne celice ileuma, *C. parvum* predvsem na stičišču ileuma in cekuma (Thomson in sod., 2017).

Po pritrditvi se sporozoiti nahajajo v posebni vakuoli, ki jo ustvari gostiteljeva celična membrana, vendar kljub temu ostane ekstracelularno (Heller in Chigerwe, 2017; Thomson in sod., 2017). Značilnost tega parazita je poseben hranilni organel, ki je prisoten skozi vse intracelularne stopnje razvoja in služi kot povezava med gostiteljem in parazitom in le-temu nudi vse potrebne hranilne snovi, hkrati pa ga varuje pred gostiteljevim imunskim sistemom in neugodnimi črevesnimi razmerami (Thomson in sod., 2017).



Slika 1: Invazija parazita v gostiteljevi celici (Thomson in sod., 2017)

Figure1: Invasion of parasite in host's cell (Thomson in sod., 2017)

Po razvoju hranilnega organela sporozoit postane bolj okroglast in začne tvoriti trofozoit. Tako se začne nespolno razmnoževanje in razvoj tipa I meronta, ki sprošča merozoite. Merozoiti, ki se razvijejo znotraj meronta tipa I, lahko ponovno okužijo

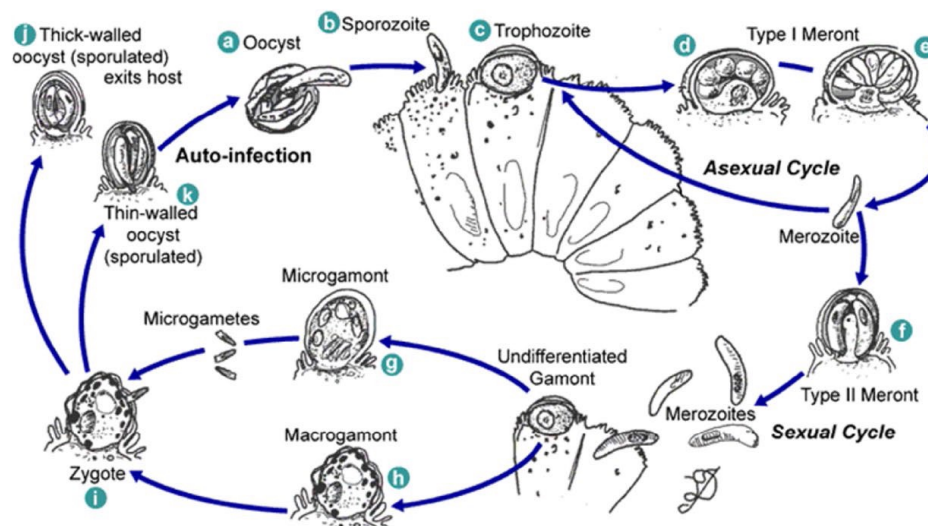
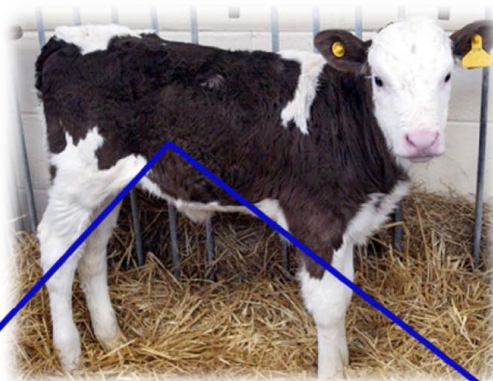
gostitelja s tem, da invadirajo sosednje epitelne celice in ponovno začnejo z nespolnim razmnoževanjem ali pa se razvijejo v meront tipa II (Thomson in sod., 2017).

Meronti tipa II sprostijo 4 merozoite, ki začnejo cikel spolnega razmnoževanja. Merozoiti invadirajo gostiteljeve celice in se diferencirajo bodisi v makrogamonte ali pa v mikrogamonte. Mikrogamonti razvijejo več jedrc in sprostijo proste mikrogamete, ki vdrejo in oplodijo makrogamete tako, da nastane zigota. Odvije se mejoza in zigota se diferencira v štiri sporozoite (Cho in Yoon, 2014; Thomson in sod., 2017).

Sporozoiti se lahko sprostijo direktno v lumen črevesja iz t.i. tankostenih oocist, ki ponovno okužijo gostitelja (avtoinfekcija), ali pa ostanejo znotraj debelostenih oocist, ki se nato izločajo z iztrebki in takoj postanejo infektivne za naslednjega gostitelja, ki to oocisto zaužije. Debelostene oociste, ki se izločajo z iztrebki, so v okolju izredno odporne na okoljske dejavnike. Preživijo lahko več mesecev v mrzlem in vlažnem okolju; izsušitev in zelo visoke temperature pa jih inaktivirajo (Cho in Yoon, 2014; Thomson in sod., 2017).

Učinkovita so razkužila na osnovi amoniaka in peroksida (Heller in Chigerwe, 2017).

Invazija *C. parvum* v enterocitih povzroči spremembe v intestinalni citoskeletni strukturi (izguba in atrofija mikrovilov). Poškodbe intestinalnega epitelija povzročijo slabšo resorpcijo hranilnih snovi, kar ima za posledico dalj časa trajajočo malnutricijo in slabši prirast živali, ter posledično slabše proizvodne rezultate (Cho in Yoon, 2014).



Slika 2: Razvojni krog *Cryptosporidium parvum* (Thomson in sod., 2017)

Figure 2: *Cryptosporidium parvum* life cycle (Thomson in sod., 2017)

2.3.4.3 Govedo in *Cryptosporidium parvum*

Pri govedu najdemo štiri različne vrste *Cryptosporidium* spp.: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* in *C. andersoni*. Edino *C. parvum* je povezan s pojavom kliničnih znakov pri novorojenih teletih, medtem ko starejše živali (nad 6 tednov) kliničnih znakov ne kažejo, so pa izločevalke oocist (Cho in Yoon, 2014; Thomson in sod., 2017; Xiao in Feng, 2008).

V raziskavi, ki so jo izvajali na Švedskem, so v šestih vzorcih iztrebkov telet starejših od 21 dni, z drisko našli *C. bovis*, kot edinega povzročitelja driske, kar bi lahko pomenilo, da ima tudi *C. bovis* patogeni potencial pri teletih (Thomson in sod., 2017).

C. andersoni je pogostejše najden pri odraslem govedu kot pri teletih, prizadene pa sirišchnik. Klinični znaki okužbe se kažejo z izgubo telesne mase in zmanjšanjem mlečnosti pri kravah (Thomson in sod., 2017; Xiao in Feng, 2008).

Razlike v starosti pri okužbah z različnimi vrstami kriptosporidijev pripisujejo spremembam okolja v črevesju tekom razvoja in rasti, zaradi sprememb v hranjenju (vrsta krme) in posledičnih sprememb mikroflore v prebavilih (Thomson in sod., 2017).

Novorojena teleta, okužena s *C. parvum*, običajno kažejo znake dehidracije, letargije, apatičnosti, neješčnosti in hude profuzne driske, v nekaterih primerih lahko okužba povzroči tudi pogin živali. Driska se običajno pojavi 2 do 4 dni po zaužitju infektivnih oocist in traja 1-2 tedna (Niine in sod., 2018). Oociste se začnejo izločati med četrtem in 12-im dnem po infekciji. Izločanje je odvisno od začetne infektivne doze in ni vedno povezano z drisko. Okužena teleta lahko izločijo tudi več kot 1×10^{10} oocist na dan, te pa lahko takoj po izločitvi okužijo novega gostitelja (Thomson in sod., 2017).

Za okužbo je potrebno zelo malo infektivnih oocist, raziskave na ljudeh pa kažejo, da je infektivna doza odvisna tudi od izolata parazita. Izolat TAMU potrebuje 9 oocist za okužbo, medtem ko je bila pri izolatu IOWA infektivna doza 87, pri izolatu UCP pa kar 1042 oocist. Podobne eksperimentalne študije so bile izvedene tudi pri novorojenih teletih starejših od enega dne, pri katerih je bilo dokazano, da je bilo potrebnih 17 infektivnih oocist *C. parvum* za pojav driske in izločanja novih oocist (Thomson in sod., 2017).

2.3.4.4 Prevalenca

Goveja kriptosporidioza je razširjena po vsem svetu in predstavlja pomemben vzrok za enteritise pri teletih. Prevalenca kriptosporidioze se razlikuje med državami in med študijami. V Veliki Britaniji se prevalenca okužb pri teletih giblje med 28-80imi odstotki (Thomson in sod., 2017).

Rezultati študije izvedene na farmi v ZDA, v katero so vključili 30 telet od rojstva do starosti enega leta, so pokazali, da je bilo 96,6 % telet pri starosti dveh tednov pozitivnih na *C. parvum* (Thomson in sod., 2017).

Razlike v prevalencah se pripisujejo različnim zasnovam študij in metodam detekcije parazita. Zelo pomembna je starost živali ob vzorčenju, saj teleta mlajša od šestih tednov najverjetneje izločajo oociste *C. parvum*, medtem ko oociste najdene v iztrebkih starejših živali običajno pripadajo drugim, nepatogenim vrstam kriptosporidijev (Thomson in sod., 2017).

Tudi vrsta vzorca (driska ali iztrebek normalne konzistence) in načini pregleda vzorcev imajo pomemben vpliv na rezultate. Metoda, ki se najpogosteje uporablja za določitev diagnoze v veterinarski medicini je mikroskopiranje. Metoda je poceni, vendar zahteva strokovno usposobljenega in izkušenega izvajalca in z njo ne moremo določiti kriptosporidijev do vrste natančno (Thomson in sod., 2017).

Zelo uporabne so molekularne metode kot je polimerazna verižna reakcija (PCR) ali PCR v realnem času (RT-PCR). Molekularne metode so mnogo bolj občutljive in dajo veliko več informacij kot mikroskopska preiskava (vrsta, genotip parazita,...). Slabost le-teh pa je, da nam dajo informacijo samo o prisotnosti parazita, ne pa tudi o njegovi količini (Thomson in sod., 2017).

2.3.4.5 *Cryptosporidium parvum* kot zoonoza

Humana kriptosporidioza je bila prvič ugotovljena leta 1976 in je do leta 1982 veljala za sporadično bolezen, ko se je drastično povečalo število okužb pri imunokompromitiranih osebah (epidemija virusa HIV/AIDS) (Kiang in sod., 2006).

Največ primerov kriptosporidioze pri ljudeh povzročata *C. parvum* (včasih imenovan *C. parvum* genotip 2) in vrsta, ki okužuje samo človeka, *C. hominis* (včasih imenovan *C. parvum* genotip 1). Ti dve vrsti povzročita več kot 90 odstotkov primerov kriptosporidioze po svetu in 96 odstotkov kliničnih primerov okužb ljudi v Veliki Britaniji (Kiang in sod., 2006; Thomson in sod., 2017). Bolezen prizadane tako imunokompromitirane kot tudi imunokompetentne osebe (Xiao in Feng, 2008).

Kriptosporidioza pri ljudeh se lahko pojavi kjerkoli po svetu, v različnih okoljih, predvsem pa v državah v razvoju s slabimi higienskimi razmerami (Thomson in sod., 2017).

Za bolezen so najbolj dovzetni otroci (mlajši od 4 let) in starejši. Kriptosporidioza je za rotavirusnimi okužbami drugi najpogostejši vzrok za drisko in smrt pri otrocih v afriških in azijskih državah. V raziskavi iz leta 2010 je bilo dokazano, da je bila driska odgovorna za 10,5 odstotkov smrti v 7,5 milijonski populaciji umrlih otrok, mlajših od petih let (Thomson in sod., 2017).

Izbruhi kriptosporidioze pri ljudeh so zelo pogosti na Švedskem že od leta 2004. Najhujša izbruha bolezni tako na Švedskem kot tudi v Evropi sta se zgodila v letih 2010 in 2011. V obeh primerih je šlo za kontaminacijo občinskega vodovoda s *C. hominis*, ki je okužila 45500 ljudi (Alsmark in sod., 2018).

Primeri bolezni se najpogosteje pojavljajo v spomladnih mesecih, ko je največ porodov pri živalih in s tem povezanimi stiki ljudi z okuženimi živalmi. Zelo pogoste so tudi okužbe veterinarjev, študentov veterinarske medicine in veterinarskih tehnikov med

praktičnim delom z živalmi in pa okužbe med obiski turističnih kmetij in pa obiski t.i. »petting zoos«, kjer ljudje pridejo v stik z okuženimi teleti (Alsmark in sod., 2018; Thomson in sod., 2017).

Človek se z oocistami okuži preko direktnega kontakta z okuženo živaljo, preko okužene vode ali hrane, okuži pa se lahko tudi s stikom okuženega človeka (Alsmark in sod., 2018; Kiang in sod., 2006).

Infekcijska doza *C. parvum* in *C. hominis* za človeka je zelo nizka, okužbo lahko povzroči manj kot 10 oocist, pri drugih vrstah kriptosporidijev pa je infektivna doza običajno višja. Inkubacijska doba traja od 2 do 10 dni (v povprečju 7 dni), najpogostejši klinični znak okužbe pa je vodena driska. Pojavijo se lahko še trebušni krči, dehidracija, slabost, bruhanje, vročina in izguba telesne mase. Pri imunokompetentnih ljudeh je okužba lahko asimptomatska in običajno izzveni sama od sebe, pri hujših primerih pa je lahko potrebna tudi hospitalizacija (Kinross in sod., 2015).

Okužbo se lahko prepreči z zmanjšanjem izpostavitve ljudi vodi in hrani kontaminirani z iztrebki okuženih živali, z učinkovito in temeljito higieno rok, predvsem med in po kontaktu s potencialno okuženimi ljudmi, teleti in drugimi živalmi (Kinross in sod., 2015; Thomson in sod., 2017).

2.3.5 Terapija in preventiva drisk pri novorojenih teletih

Pri terapiji je najpomembnejša rehidracija živali s tekočino in z elektroliti (v obliki infuzije ali pitja), preprečevanje ali zdravljenje endotoksemije ali sepse, ter splošna podpora organizmu (krma ipd.) (Heller in Chigerwe, 2017).

Antibiotiki pri virusnih infekcijah niso učinkoviti, v primeru okužb s sekundarnimi povzročitelji (koliformne bakterije, klostridiji in salmonеле) pa je njihovo dajanje smiselno. Pomembna je tudi nega živali po zdravljenju (ustrezna namestitvev in temperatura okolja, prehrana) (Cho in Yoon, 2014; Hall in sod., 1988; Meganck in sod., 2014).

Mnogo bolj, kot zdravljenje obolele živali je uspešno preprečevanje pojavljanja drisk v zgodnjem poporodnem obdobju. Pred vsem je ta ukrep bolj ekonomičen in dolgoročno učinkovitejši. Pri tem odpadejo dodatno delo pri oskrbi obolele živali, izgube zaradi zmanjšanega prirasta ali celo pogina živali, dodatna količina krme in stroški zdravljenja živali. Kaj je potrebno narediti? Izboljšati je potrebno higienske pogoje namestitve telet (čist, zračen in dovolj velik boks) in pravočasno zagotoviti zadostno količino mleziva (vsaj 3 – 4 L v prvih 6 urah po rojstvu). Teleta lahko dodatno zaščitimo tako, da cepimo njihove matere v času presušitve s cepivom, ki vzpodbudi nastanek specifičnih protiteles proti *E.coli*, rota in koronavirusom. Mlezivo teh krav je bogatejše s temi protitelesi in zato tudi učinkoviteje zaščiti tele pred okužbami in posledičnimi driskami v zgodnjem obdobju po rojstvu (Cho in Yoon, 2014; Meganck in sod., 2014).

2.3.5.1 Preventiva in zdravljenje kriptosporidioze

Kriptosporidioza je zaradi visokega števila izločenih infektivnih oocist, njihove odpornosti v okolju, nizke infektivne doze in posledično hitre okužbe novih dovzetnih gostiteljev, zelo trdovratna bolezen, ki jo je težko nadzirati. Oociste so odporne na večino razkužil, na voljo ni primernih cepiv, zdravljenje pa je zaradi omejenih možnosti velikokrat odvisno samo od podporne tekočinske terapije in nadomeščanja elektrolitov, vzpostavljanja kislinsko-baznega ravnotežja znotraj gastrointestinalnega trakta, lahko pa vključuje tudi dajanje protivnetnih zdravil ali antibiotikov (Connor in sod., 2017; Harp in Goff, 1998; Niine in sod., 2018; Thomson in sod., 2017).

Za zmanjšanje okoljske kontaminacije je zelo pomembno redno odstranjevanje iztrebkov in kontaminiranega nastilja, mehansko čiščenje z vodo pod pritiskom in s paro in razkuževanje z ustreznimi razkužili (npr. razkužila na osnovi vodikovega peroksida). Ker so oociste občutljive na visoke temperature in izsuševanje, je učinkovito tudi čiščenje z vročo vodo in sušenje (Thomson in sod., 2017).

Problem pri kriptosporidiozi je predvsem ta, da na tržišču ni veliko pripravkov, ki bi jih lahko uporabili za preventivo ali zdravljenje te bolezni, oz. le-ti niso registrirani za uporabo pri živalih. Testiranih je bilo že veliko učinkovin in pripravkov, vendar skoraj nobeno zdravljenje ni dalo zadovoljivih rezultatov. Dosegljivi so samo preparati, ki niso učinkoviti in običajno povzročijo le skrajšano izločanje oocist (Harp in Goff, 1998; Thomson in sod., 2017).

Edino registrirano zdravilo za kriptosporidiozo pri teletih je halofuginon laktat. Mehanizem njegovega delovanja ni znan, naj bi vplival na parazita v stopnji merozoita in sporozoita. To zdravilo je registrirano tako za zdravljenje kot tudi preventivo bolezni pri teletih, ne smemo pa ga uporabljati pri živalih z drisko, ki traja več kot 24 ur. Kot preventivno zdravilo ga dajemo znotraj 48 ur po rojstvu, pri že obolelih živalih pa znotraj 24 ur po nastopu kliničnih znakov (Connor in sod., 2017; Thomson in sod., 2017).

Drugo zdravilo, ki se je izkazalo kot učinkovito pri zdravljenju kriptosporidioze je antibiotik paromomicin, kljub temu pa do nedavnega ni bilo registrirano za uporabo pri teletih. Paromomicin zmanjša izločanje oocist, driska je milejša in traja manj časa. Ta antibiotik so uporabili tako v eksperimentalnih pogojih kot tudi na terenu in v obeh primerih so bili dobljeni podobni rezultati (Harp in Goff, 1998; Thomson in sod., 2017).

Testiranih je bilo tudi nekaj kokcidiostatikov. Prvi je dekokvinat, ki se ne uporablja za zdravljenje kriptosporidioze, saj se je dajanje te učinkovine izkazalo za neučinkovito, saj ne skrajša niti trajanja driske niti števila izločenih oocist. Drugi kokcidiostatik je nitazoksanid, ki je registriran za zdravljenje kriptosporidioze pri ljudeh. Testirali so ga tudi na eksperimentalno okuženih teletih, pri katerih je povzročil skrajšano izločanje oocist in ublažil drisko. Kljub temu ni registriran za uporabo pri govedu (Moore in sod., 2003; Thomson in sod., 2017).

Za zdravljenje kriptosporidioze naj bi bil uporaben tudi glukagonu-podoben peptid 2 (glucagon-like peptide 2; GLP 2). To zdravilo naj bi zmanjšalo poškodbe črevesnega epitelija in izboljšalo absorpcijo hranilnih snovi in krvni obtok skozi sluznico črevesja (Connor in sod., 2017).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ŽIVALI, VKLJUČENE V RAZISKAVO

3.1.1 1. del raziskave

V prvem delu smo v raziskavo vključili 56 telet iz osmih večjih rej goveda za prirejo mleka v Sloveniji s 160 do 400 kravami molznicami. Teleta so bila stara od 2 do 35 dni, vzorčili in pregledali pa smo po 3 do 11 telet iz posamezne reje.

3.1.2 2. del raziskave

Na podlagi rezultatov iz prvega dela raziskave, smo se zaradi težav povezanih z driskami in prekuženostjo reje s *C. parvum* ter velikega števila telitev odločili za preventivno zdravljenje telet v eni od zgoraj omenjenih rej. V raziskavo je bilo vključenih 30 telet, pri katerih je rojstvo potekalo brez zapletov in so prvi dan po rojstvu normalno sesala. Naključno, glede na čas rojstva smo določili 20 telet in jih vključili v testno skupino, ki je bila zdravljena s pripravkom Halagon (Divasa-Farmavic, S.A.), ki vsebuje halofuginon. V skladu z navodili proizvajalca so teleta dobivala pripravek enkrat na dan, sedem zaporednih dni od 2. do 9. dneva starosti (skupina označena z Z). Preostalih 10 telet je predstavljalo kontrolno skupino (označeni s K).

3.2 ZBIRANJE PODATKOV

3.2.1 1.del raziskave

Teletom smo naredili klinični pregled, izmerili trias (temperatura, dihanje, pulz) in zabeležili starost, pasmo, spol in če so imeli drisko. Prav tako smo ocenili njihovo kondicijo, preverili stanje popkov in sklepov, ter zabeležili osnovne relevantne podatke glede načina reje in reje same.

3.2.2 2.del raziskave

V drugem delu raziskave smo zabeležili datum in uro rojstva telet, njihov spol, kdaj je tele dobilo prvi in drugi obrok kolostruma (datum, ura), ter njihovo pasmo. Pred začetkom zdravljenja (2. dan), 9. dan, in 14.-16. dan smo opravili klinični pregled, izmerili vrednosti triasa (temperatura, dihanje, pulz), zabeležili prisotnost driske in izmerili prsni obseg. Prsni obseg smo izmerili še pri starosti 30-35 dni. Ves čas raziskave smo spremljali zdravstveno stanje telet in zabeležili odstopanja.

3.3 VZORČENJE IN PRIPRAVA VZORCEV

3.3.1 Vzorčenje

V prvem delu raziskave smo vsem teletom enkrat odvzeli kri in iztrebke, obenem pa pridobili vse potrebne podatke opisane v prejšnjih poglavjih.

V drugem delu raziskave pa smo vsem 30-im teletom v starosti dveh dni odvzeli vzorce krvi. Vzorce iztrebkov za hitri in klasični test smo vzeli dvakrat in sicer: prvič 9. dan po rojstvu, drugič pa med 14. - 16. dnem starosti.

Teletom smo vzorce krvi odvzeli iz vratne vene (v. *jugularis*) v serumske epruvete za biokemijske preiskave za določanje vsebnosti celotnih serumskih beljakovin in aktivnosti encima gama-glutamyltransferaze.

Vzorce iztrebkov pa smo odvzeli z namenom izvajanja dveh različnih testov (hitri test in klasična metoda z razmazi iztrebkov in modificiranim Ziehl-Neelsen barvanjem le-teh). Vzorce smo shranili v plastične vrečke in ji označili z ušesnimi številkami telet.

3.3.2 Priprava vzorcev

Vzorce iztrebkov smo teletom odvzeli za izvedbo hitrega testa FASTest® D4T bovine (Megacor, Austria) za določitev prisotnosti štirih različnih pogostih povzročiteljev drisk: *Coronavirus*, *Rotavirus*, *E. Coli* - K99 (F5) in *Cryptosporidium parvum*. Po odvzemu smo v roku 2 ur opravili hitre teste ter pripravili razmaze fecesa, vrečke z vzorci pa shranili v hladilnik.

Dodatno smo pripravili razmaze fecesa na predmetnih stekelcih za barvanje z modificirano Ziehl – Neelsen metodo, za ugotavljanje in štetje oocist *C. parvum* in jih označili z navadnim svinčnikom. Stekelca smo nato pustili sušiti na sobni temperaturi.

Serumske epruvete z vzorci krvi smo ustrezno označili, hranili na sobni temperaturi, dokler se ni serum ločil ter jih nato centrifugirali 10 min na 3000 obratih/minuto in odložili serum. Vzorce serumov smo do preiskav hranili globoko zamrznjene na temperaturi -22°C .

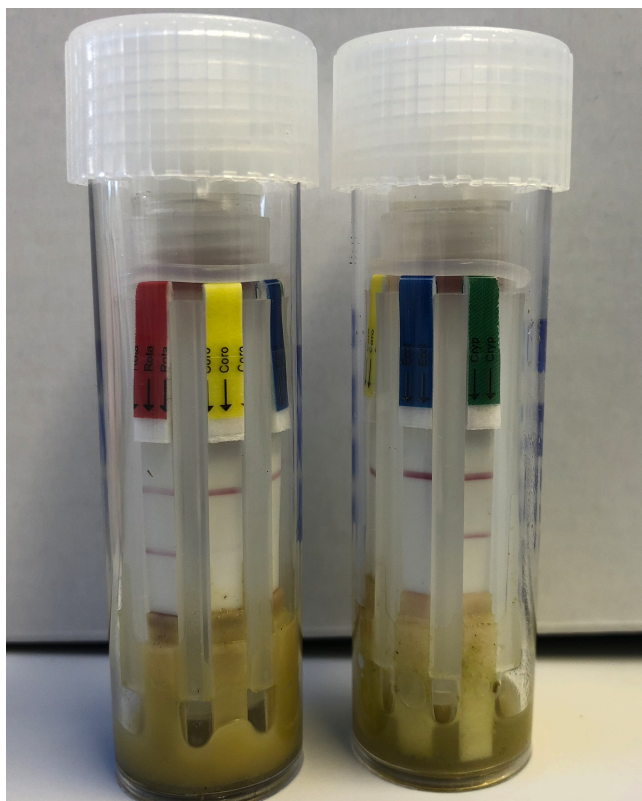
3.3.3 Biokemijske analize krvi

V vzorcih krvnih serumov smo z biokemijskim analizatorjem RX Daytona (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK) izmerili vsebnost celotnih serumskih beljakovin in albuminov v prvem delu raziskave ter vsebnost CSB in aktivnost encima gama-glutamyltransferaze v drugem delu raziskave.

3.3.4 Preiskave iztrebkov

3.3.4.1 Hitri test FASTest® D4T bovine

Hitri test FASTest® D4T bovine (Megacor, Avstrija) smo izvedli po navodilih proizvajalca tako, da smo z žličko, ki je priložena hitremu testu zajeli vzorec fecesa 1x, če je bil feces pastozen ali gost, ali 3x, če je bil feces tekoč oz. je tele imelo drisko in žličko prenesli v priložen pufer. Feces in pufer smo homogenizirali in nato prenesli v testno revolver posodico, kjer so lističi z antigeni proti določenim povzročiteljem. Posodico smo zaprli in dvakrat obrnili pokrovček, da je bil slišen pok in se je pufer z fecesom izlil v spodnji del revolverja z lističi. Posodico smo ustrezno označili z ušesno številko teleta. Po 10 minutah smo odčitali rezultate in jih vpisali v tabele. Če sta bili obarvani 2 črtici, je bil test na tistega povzročitelja pozitiven, v primeru ene obarvane črtice je bil test negativen.



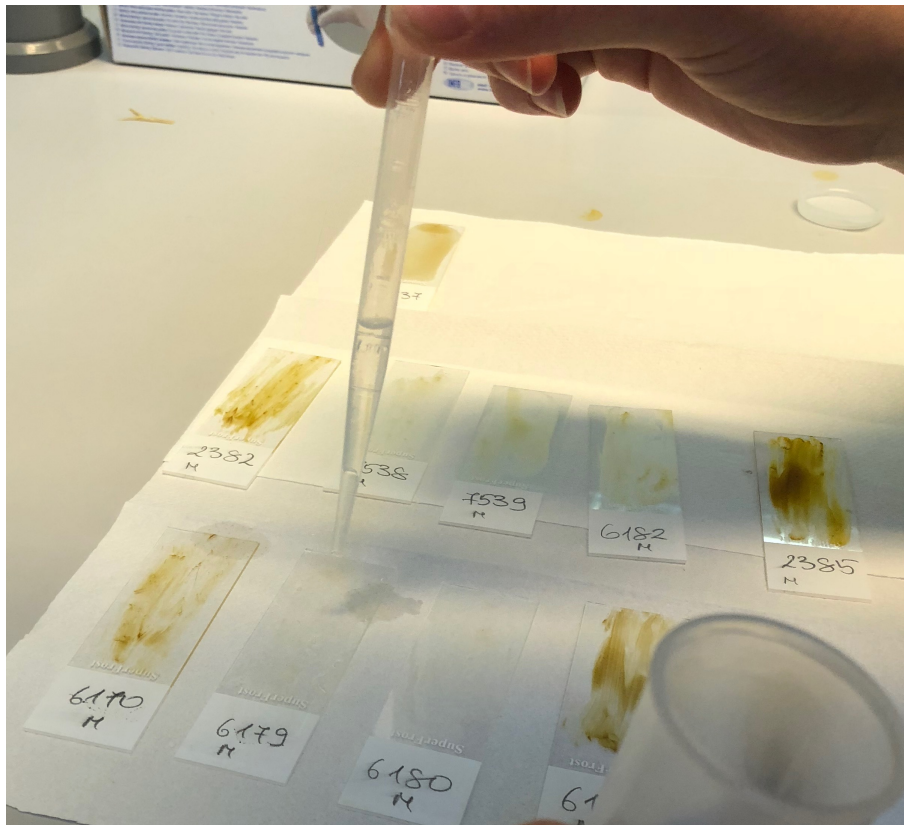
Slika 3: Hitri test FASTest® D4T bovine (pozitivni in negativni rezultat) (Jernejčič, 2018)
Figure 3: Quick test FASTest® D4T bovine (positive and negative result) (Jernejčič, 2018)



Slika 4: Hitri test FASTest® D4T bovine in tabele z rezultati (Jernejčič, 2018)
Figure 4: Quick test FASTest® D4T bovine and charts with results (Jernejčič, 2018)

3.3.4.2 Klasična metoda z modificiranim Ziehl - Neelsen barvanjem (ZN)

Posušene razmaze fecesa smo prelili s 96 % metanolom in pustili čez noč, da se posušijo na papirju.



Slika 5: Fiksacija razmazov iztrebkov s 96 % metanolom (Jernejčič, 2018)

Figure 5: Fixation of faeces smears with 96 % methanol (Jernejčič, 2018)

Predmetnice smo nato potegnili čez plamen in pričeli z barvanjem. Najprej smo stekelce prelili s koncentriranim karbol fuksinom in pustili barvati 25 minut. Nato smo sprali pod tekočo vodo in prelili s H_2SO_4 – 2 % in pustili 60 sekund. Ponovno smo sprali pod tekočo vodo. Nato smo barvali z metilenskim modrilom (1 %) in pustili 10 minut.

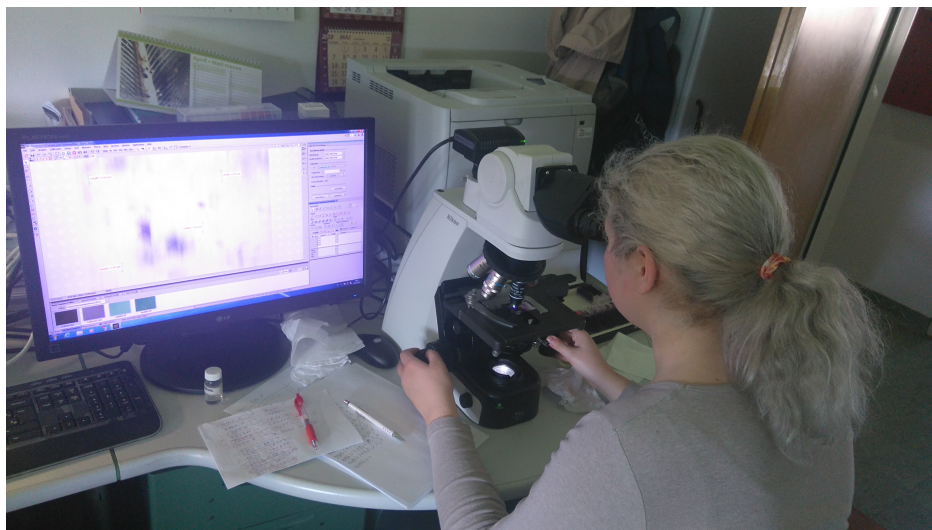


Slika 6: Modificirano ZN barvanje (Modrijan, 2018)

Figure 6: Modified ZN stain (Modrijan, 2018)

Ponovno smo sprali pod tekočo vodo. Nato smo razmaze pustili sušiti na sobni temperaturi in jih naslednji dan pospravili v škatle.

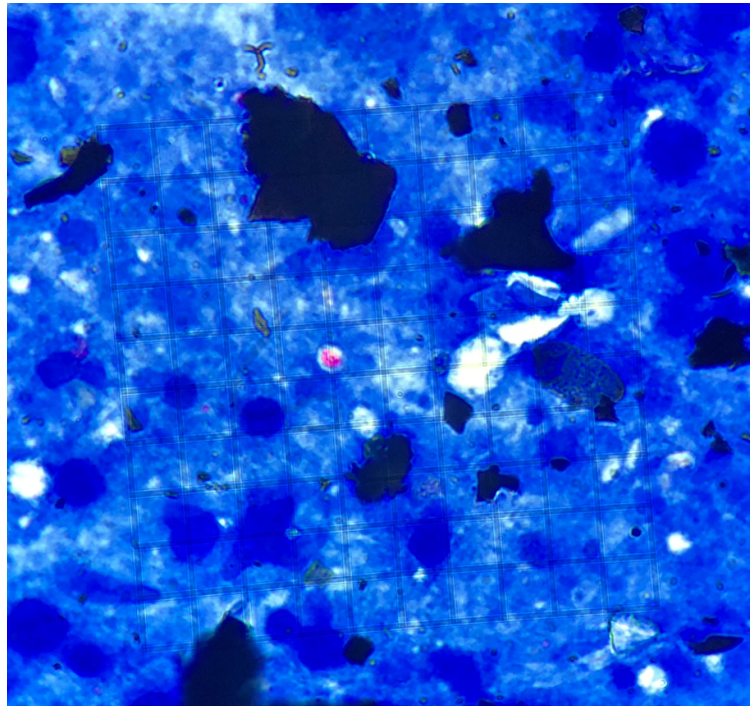
Razmaze fecesa, pobarvane z modificirano ZN metodo smo pregledali pod mikroskopom na 1000x povečavi z imerzijskim oljem in prešteli oociste kriptosporidijev.



Slika 7: Štetje oocist pod mikroskopom (Modrijan, 2018)

Figure 7: Counting the oocysts under microscope (Modrijan, 2018)

Pri tem smo si pomagali s posebno mrežico vstavljeno v okular mikroskopa s površino $10000\mu\text{m}^2$ oz. $0,01\text{ mm}^2$ ($100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$). To mrežico smo uporabili kot 1 vidno polje in prešteli vse oociste, ki so bile znotraj mrežice. Enako smo ponovili petkrat oz. prešteli pet vidnih polj/ površin mrežice, izračunali aritmetično sredino števila prešteti oocist na petih vidnih poljih.



Slika 8: Pogled skozi okular mikroskopa in vstavljena mrežica. Na sredini vidnega polja je vidna rdeče obarvana oocista kriptosporidija (Modrijan, 2018)

Figure 8: The look through ocular of the microscope and the net in it. In the middle of the vision field red *Cryptosporidium* oocyst can be seen (Modrijan, 2018)

3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

S programom SPSS (Ver. 22) smo izračunali opisno statistiko (srednja vrednost, standardna deviacija (SD)) za vrednosti biokemijskih parametrov, starost telet, čas trajanja driske in prsni obseg. Izračunali smo delež telet pozitivnih na posameznega povzročitelja, delež telet z drisko in povišano telesno temperaturo.

V drugem delu raziskave smo za primerjavo podatkov prsni obsegov, časa trajanja driske, biokemijske preiskave in števila oocist *C. parvum* v razmazih iztrebkov, med zdravljeno in kontrolno skupino telet, zaradi majhnega števila vzorcev uporabili Mann-Whitney U test neodvisnih vzorcev.

4 REZULTATI

4.1 1. DEL RAZISKAVE

4.1.1 Klinični pregled

Ob odvzemu vzorcev smo pri vseh 56 teletih opravili klinični pregled in zabeležili, če so imela drisko (tabela 1).

Tabela 1: Starost telet, število telet (%) z drisko in povišano telesno temperaturo v posamezni reji
Table 1: Age of calves, number of calves (%) with diarrhoea and high body temperature in a particular farm

Reja	Št. vzorcev	Starost (dni) Sr. vr. (Min.-Max.)	Driska-da Št. (%)	Temp. nad 39,5°C Št. (%)
1	7	19,8 (6-34)	4 (57,1 %)	0
2	8	17,0 (9-27)	4 (50,0 %)	1 (12,5 %)
3	8	7,1 (2-12)	3 (37,5 %)	0
4	11	15,6 (7-35)	7 (63,6 %)	5 (45,4 %)
5	3	13,0 (4-21)	0	0
6	7	12,8 (6-15)	6 (85,7 %)	0
7	6	17,5 (3-33)	4 (66,7 %)	0
8	6	13,2 (6-18)	3 (50,0 %)	0

Večina telet z drisko ni imela povišane telesne temperature. Povišano telesno temperaturo smo ugotovili pri treh teletih brez driske in treh z drisko.

4.1.2 Biokemijske preiskave krvi

V prvem delu raziskave smo pri 56 preiskovanih teletih opravili biokemijske preiskave krvi za oceno vnetja in dehidracije. Rezultati so prikazani v tabeli 2.

Tabela 2: Vrednosti celotnih serumskih beljakovin (CSB) in albuminov (Alb) pri teletih
Table 2: Values of total serum protein (CSB) and albumines (Alb) in calves

	CSB g/L	Alb g/L
Srednja vrednost	56,29	31,87
Standardna deviacija	4,96	2,83
Minimum	44,20	24,80
Maksimum	68,30	38,60

Pri biokemijski preiskavi krvi smo pri štirih teletih ugotovili previsoko vsebnost serumskih beljakovin. Pri treh teletih smo ugotovili previsoko vsebnost albuminov.

4.1.3 Preiskave iztrebkov

Vzorci iztrebkov telet smo preiskali s hitrim testom. Število in delež pozitivnih telet v posamezni reji so prikazani v tabeli 3.

Tabela 3: Rezultati hitrega testa FASTest® D4T bovine
Table 3: Results of quick FASTest® D4T bovine test

Reja	Št. vzorcev	Starost (dni) Sr. vr. (Min.-Max.)	Rotavirus Št. (%) pozit. vzorcev	Koronavirus Št. (%) pozit. vzorcev	<i>E. coli</i> K99 (F5) Št. (%) pozit. vzorcev	<i>C. parvum</i> Št. (%) pozit. vzorcev
1	7	19,8 (6-34)	2 (28,6 %)	2 (28,6 %)	0	5 (71,4 %)
2	8	17,0 (9-27)	5 (62,5 %)	5 (62,5 %)	5 (62,5 %)	8 (100 %)
3	8	7,1 (2-12)	5 (62,5 %)	2 (25,0 %)	1 (12,5 %)	5 (62,5 %)
4	11	15,6 (7-35)	4 (36,4 %)	2 (18,2 %)	0	8 (72,7 %)
5	3	13,0 (4-21)	0	3 (100 %)	1 (33,3 %)	1 (33,3 %)
6	7	12,8 (6-15)	3 (42,8 %)	3 (42,8 %)	1 (14,3 %)	7 (100 %)
7	6	17,5 (3-33)	3 (50,0 %)	5 (83,3 %)	2 (33,3 %)	2 (33,3 %)
8	6	13,2 (6-18)	3 (50,0 %)	1 (16,6 %)	0	5 (83,3 %)

Pri preiskavi vzorcev iztrebkov s hitrimi testi smo pri osmih teletih ugotovili negativen rezultat. Razen enega so bila to zelo mlada teleta (2-3 dni) pri katerih se okužba morda še ni dovolj razvila ali pa je šlo za teleta starejša od 33 dni, ki so lahko okužbo že prebolela.

Pri 18 teletih smo ugotovili pozitiven rezultat na enega povzročitelja driske, pri 16 teletih smo ugotovili dva povzročitelja, pri 7 teletih smo ugotovili tri povzročitelje in pri 7 teletih štiri povzročitelje sočasno.

Od povzročiteljev smo najpogosteje ugotovili *C. parvum* pri 41 teletih, sledi rotavirus pri 25 teletih, koronavirus pri 23 teletih in *E. coli* K99(F5) pri 10 teletih.

Rezultate hitrih testov za *C. parvum* smo primerjali s klasičnimi testi, rezultati so prikazani v tabeli 4.

Tabela 4: Primerjava hitrega testa na *C. parvum* in pregleda razmazov iztrebkov (40 vzorcev)

Table 4: Comparison between quick test and examination of feces smears (40 samples)

	Hitri test	Razmazi
Pozitivni	31	26
Negativni	9	14

V enem vzorcu, ki je bil pri hitrem testu negativen smo našli oociste *C. parvum* v razmazu.

4.2 2. DEL RAZISKAVE

4.2.1 Klinični pregled

Pri vseh preiskovanih teletih smo v času raziskave trikrat opravili klinični pregled (tabela 5).

Tabela 5: Telesna temperatura in prisotnost driske pri kontrolni (K) in testni (Z) skupini telet
Table 5: Body temperature and presence of diarrhoea in control (K) and test (Z) group of calves

Starost (dni)	Temp. nad 39,5°C , število (%)		Driska-da, število (%)	
	K	Z	K	Z
2	0	0	0	0
9	0	1 (5 %)	9 (90 %)	12 (60 %)
14-16	0	2 (10 %)	8 (80 %)	14 (70 %)

Povišano temperaturo smo ugotovili samo pri enem teletu starem 9 dni in dveh teletih v starosti 14-16 dni in nobeno od njih ni imelo driske.

Drisko smo ugotovili pri večjem deležu telet iz kontrolne skupine v primerjavi z zdravljeno skupino.

V času raziskave smo spremljali prirast telet s pomočjo merjenja prsnega obsega, ter čas trajanja driske. Rezultati so prikazani v tabeli 6.

Tabela 6: Prsni obseg in čas trajanja driske (srednja vrednost in SD), primerjava med testno (Z) in kontrolno (K) skupino Table 6: Chest girth and duration of diarrhoea (mean value and SD), comparison between test (Z) and control (K) group

Skupina	n	Prsni obseg (cm) 2.dan	Prsni obseg (cm) 9.dan	Prsni obseg (cm) 35.dan	Razlika p.o. (cm) 2.-35. dan	Trajanje driske (dni)
K	10	77±2	79±3	85±4	7±4	4,6±2,7
Z	20	79±3	82±3	86±4	7±3	2,8±2,9
	p	0,074	0,049*	0,422	0,914	0,091

Pri primerjavi prsnih obsegov med skupinama smo pri zdravljenih teletih ugotovili statistično značilno večji prsni obseg v primerjavi s kontrolno skupino pri starosti 9 dni. Razlika v prsnem obsegu med 2. in 35. dnevom starosti se ni statistično značilno razlikovala med skupinama.

Čas trajanja driske je bil pri zdravljeni skupini v povprečju nekoliko krajši kot pri kontrolni skupini, vendar razlika ni bila statistično značilna.

4.2.2 Biokemijske preiskave krvi

V vzorcih krvi 2 dni starih telet smo merili aktivnost encima GGT in vsebnost CSB, z namenom ugotavljanja oskrbljenosti s kolostrumom. Rezultati so prikazani v tabeli 7.

Tabela 7: Aktivnost encima GGT in vsebnost CSB pri 2 dni starih teletih testne (Z) in kontrolne (K) skupine

Table 7: The activity of GGT and content of TSP in 2 days old calves of test (Z) and control (K) group

	GGT U/L K	GGT U/L Z	CSB g/L K	CSB g/L Z
Srednja vrednost	1305	1839	62,7	68,4
Standardna deviacija	733	1127	7,8	11,7
Minimum	134	270	49,9	49,9
Maksimum	2264	4060	76,9	93,6

Rezultati biokemijske preiskave merjenja aktivnosti encima GGT in vsebnosti celokupnih serumskih beljakovin, ki posredno pokažejo oskrbljenost s kolostrumom, so pokazali, da so bila vsa teleta z izjemo enega ustrezno oskrbljena s kolostrumom. Skupini se nista statistično značilno razlikovali glede aktivnosti GGT in vsebnosti CSB.

4.2.3 Pregled iztrebkov

Teletom smo pri starosti 9 dni odvzeli vzorce iztrebkov in s hitrimi testi ugotavljali prisotnost povzročiteljev drisk. Število in delež (%) pozitivnih telet so prikazani v tabeli 8. Ob odvzemu vzorcev iztrebkov 9. in 14.-16. dan smo zabeležili, če je tele imelo drisko (tabela 8).

Tabela 8: Rezultati preiskave iztrebkov s hitrim testom ter število in delež (%) telet z drisko pri testni (Z) in kontrolni skupini (K)

Table 8: Results of quick test and number and share (%) of calves with diarrhoea in test (Z) and control (K) group

Skupina	n	9. dan n (%) pozit. vzorcev					14.-16. dan
		Rota virus	Korona virus	<i>E. coli</i> K99 (F5)	<i>Cryptosp.</i> <i>parvum</i>	Driska DA	Driska DA
K	10	3 (30 %)	2 (20 %)	0	9 (90 %)	9 (90 %)	8 (80 %)
Z	20	6 (30 %)	2 (10 %)	0	4 (20 %)	12 (60 %)	14 (70 %)

V zdravljeni skupini je bil 9. dan manjši delež telet pozitivnih na *C. parvum* in manjši delež telet z drisko v primerjavi s kontrolno skupino.

Pri 11 teletih (10 Z in 1K) 9. dan nismo ugotovili nobenega od preiskovanih povzročiteljev drisk. Šest od teh telet je vseeno imelo drisko. Pri štirih teletih, ki 9. dan niso imela driske smo ugotovili enega do dva povzročitelja drisk.

Pri štetju oocist *C. parvum* v razmazih iztrebkov (9. dan) smo pri teletih kontrolne skupine, in sicer pri šestih od 10 telet, ugotovili večje število oocist v vidnem polju (v povprečju $0,33 \pm 0,30$ oociste/ $0,01 \text{ mm}^2$) kot pri teletih iz zdravljene skupine, ki so imela vsa z izjemo enega negativen rezultat, kar v povprečju znaša $0,015 \pm 0,07$ oociste/ $0,01 \text{ mm}^2$. Razlika v številu oocist je bila statistično značilna ($p=0,010$) med skupinama.

5 RAZPRAVA

5.1 1. DEL RAZISKAVE

V raziskavo smo vključili osem večjih rej krav molznic iz Slovenije. Pregledali smo 56 telet, starih od 2 do 35 dni. V povprečju znaša na eno farmo 7 telet, kar je skladno z raziskavo Snodgrassa in sod. (1986) kjer so vzorčili 351 telet iz 32 farm, kar pa znaša v povprečju 10,9 telet na eno farmo, zato je naša študija primerljiva.

Odvzeli smo vzorce krvi in iztrebkov. Enak način odvzema vzorcev smo zasledili tudi pri raziskavi Niine in sod. (2018). Kri smo pregledovali z namenom ocene vnetja in dehidracije kot posledice driske. Iztrebke pa smo testirali s hitrim testom, da bi ugotovili prisotnost štirih najpogostejših povzročiteljev drisk.

5.1.1 Klinični pregled

Drisko je imelo 31 (55,36 %) vseh pregledanih telet na vseh osmih farmah. Incidenca neonatalne driske (driska pri teletih mlajših od 1 meseca) naj bi se v rejah krav molznic gibala okrog 21,2 % (Meganck in sod., 2014). Niine in sod. (2018) v svoji študiji v reji v Estoniji navajajo prisotnost driske pri 92 % telet starih do 6 tednov, kar je glede starosti relativno primerljiva skupina telet, vendar je v našem primeru drisko imel veliko manjši delež telet kot v omenjeni tuji študiji. Rezultati obeh študij pa kljub temu presegajo vrednosti, ki jo navaja Meganck in sod. (2014). Razlike v številu telet z drisko lahko pripisujemo večjemu številu telet v isti reji (Niine in sod., (2018); n=144) in večji možnosti prenosa povzročitelja iz enega gostitelja na drugega ali pa slabšim higienskimi pogojem v reji. Na razlike med rejami lahko poleg omenjenega vplivajo tudi razlike v oskrbi telet (oskrba s kolostrumom, napajanje).

Povišano telesno temperaturo smo odkrili samo pri 6ih teletih iz dveh rej, kar predstavlja 10,7 % telet.

5.1.2 Biokemijske preiskave krvi

Pri 56 preiskovanih teletih iz vseh 8 rej smo opravili biokemijske preiskave krvi za oceno vnetja in dehidracije. Število telet v raziskavi se nam zdi primerno, saj so nekateri drugi avtorji v študijah o vsebnosti serumskih beljakovin testirali manj telet (17 in 14) v eni reji ali na kliniki, kjer so bila teleta pripeljana na zdravljenje veterinarju kliniku (Tyler in sod.,1999; Braun in sod., 1982).

Visoka vsebnost serumskih beljakovin ob visoki vsebnosti albuminov, ki smo jo ugotovili pri treh teletih kaže na dehidracijo, ki je lahko posledica driske in s tem povezane izgube tekočine. Visoka vsebnost serumskih beljakovin ob nizki vsebnosti albuminov pri enem teletu pa kaže na prisotnost kroničnega vnetja. Povprečna vrednost serumskih beljakovin pri naših teletih je znašala 56,29 g/L, kar je primerljivo s Tyler in sod. (1999), ki so ugotovili povprečno vrednost serumskih beljakovin 56,9 g/L pri 27 preiskovanih teletih.

5.1.3 Preiskave iztrebkov

Rezultati hitrih testov so bili pozitivni na vsaj enega povzročitelja drisk pri 85,71 % telet. Od povzročiteljev smo s hitrimi testi v vzorcih iztrebkov telet na prvem mestu po pogostosti ugotovili *C. parvum*, in sicer pri 41 teletih, kar znaša 73,21 % vseh telet. Na drugo mesto smo uvrstili rotavirus, ki se je pojavil pri 25 teletih (44,64 % telet). Tretje mesto je zasedel koronavirus pri 23 teletih (41, 07 %) in pa *E. coli* K99 (F5) pri 10 teletih oz. 17,86 % na četrtem mestu po pogostosti. Snodgrass in sod. (1986) so izvedli podobno raziskavo kot je že omenjeno zgoraj, v kateri so na 32 farmah na Škotskem in severu Anglije vzorčili iztrebke 351 telet starih od 1 do 28 dni. V vsaki reji so vzorčili vsaj 4 teleta z drisko, ki predhodno niso bila zdravljena, iztrebke pa so zbirali tudi od

zdravih telet brez driske. Vzorce iztrebkov so med drugim pregledali na prisotnost *C. parvum*, rotavirusa, koronavirusa in enterotoksične *E. coli*. Ugotovili so, da je izločanje povzročiteljev večje pri teletih z drisko, vendar pa se prevalenca povzročiteljev bistveno ne razlikuje pri zdravih teletih z izjemo rotavirusa. Pri zdravih teletih je bila prevalenca rotavirusa 18 %, koronavirusa 4 %, kriptosporidija 14 %, enterotoksične *E. coli* pa niso ugotovili. Pri teletih z drisko pa so ugotovili, da je bil rotavirus v nasprotju z rezultati naših hitrih testov, najpogostejši izolirani povzročitelj, odkrili so ga pri 50 % telet. *C. parvum* so ugotovili pri 25 % telet, koronavirus pri 8 % telet in *E. coli* pri 4 % vseh telet z drisko. Pri 72 % telet z drisko je bil ugotovljen vsaj 1 povzročitelj, pri 15 % telet sta bila prisotna 2 povzročitelja, tri povzročitelje pa so ugotovili samo pri enem teletu (0-3 %). Rezultati naše raziskave se nekoliko razlikujejo od rezultatov raziskave Snodgrassa in sod. (1986) vendar lahko, kljub temu najdemo podobnosti. V obeh raziskavah so se povzročitelji pojavljali v iztrebkih tako zdravih telet, kot tudi telet z drisko. Glede na naše rezultate lahko vidimo, da imata rota in koronavirus podobno prevalenco pojavljanja v iztrebkih telet (44,64 in 41,07 %), v raziskavi Snodgrassa in sod. (1986) pa ima rotavirus precej višjo prevalenco pojavljanja kot koronavirus. Podobne rezultate beleži tudi Reynolds in sod. (1986), v raziskavi izvedeni v južnem predelu Anglije. V vseh raziskavah se od štirih preiskovanih povzročiteljev *E. coli* najmanjkrat pojavlja v iztrebkih.

Glede na rezultate naše raziskave ugotavljamo, da je *C. parvum* prisoten v vseh osmih testiranih rejah goveda v raziskavi. V štirih rejah niso bili seznanjeni z dejstvom, da je pri njih prisotna kriptosporidioza. Prevalenca pozitivnih telet na *C. parvum* na posameznih farmah se je gibala od 33,3 do 100 %. Zelo verjetno bi dobili podobne rezultate tudi pri testiranju večjega števila rej, ker se v Sloveniji ne izvajajo biovarnostni ukrepi za preprečevanje vnosa *C. parvum* v rejo.

Prevalenca *C. parvum* je variirala glede na starost telet in rejo. Oociste *C. parvum* so se začele pojavljati v iztrebkih pri tri dni starih teletih, in so bile prisotne tako v iztrebkih telet z drisko, kot pri teletih, ki driske niso imela. Razlike v pojavljanju driske pa so bile odvisne tudi od sočasne infekcije telet z drugimi povzročitelji drisk (Rotavirus, Koronavirus, *E. coli*). Snodgrass in sod. (1986) so prisotnost povzročiteljev drisk

ugotavljali pri starosti 4 dni do 4 tedne, najpogosteje pa pri starosti 5 do 10 dni kar se ujema tudi z našimi rezultati.

V svetu ugotavljajo zelo visoko prevalenco okuženosti rej goveda s protozom *C. parvum*. Thomson in sod. (2017) navajajo med 28 in 80 odstotno prevalenco okužb pri teletih v rejah v Veliki Britaniji. Tudi raziskava izvedena v reji v Združenih državah Amerike, kjer so pregledali 30 telet, kaže da je prevalenca okužb 96,6 odstotkov (na *C. parvum* je bilo pri starosti dveh tednov pozitivnih 29 telet) (Thomson in sod., 2017). Ugotovitve omenjenih raziskav glede prevalence *C. parvum* se ujemajo z rezultati naše raziskave.

Po izvedbi obeh testov za dokaz kriptosporidijev smo primerjali rezultate in pojavila so se neskladja med rezultati hitrega testa in metodo modificiranega ZN barvanja. V enem vzorcu, ki je bil pri hitrem testu negativen smo našli oociste *C. parvum* v razmazu. Pri hitrem testu je bilo na *C. parvum* pozitivnih 77,5 % in negativnih 22,5 % vzorcev, pri pregledanih razmazih pa je bilo pozitivnih 65 % vzorcev in 35 % negativnih. Do neskladij je lahko prišlo zaradi napak pri subjektivni oceni rezultata pri hitrih testih, saj se pri vseh vzorcih črtice niso močno obarvale ampak zelo šibko in blede, zato je možno da smo negativni rezultat smatrali za pozitivni in obratno, kar je privedlo do neskladij med obema testoma. Do razlik je lahko prišlo tudi zaradi možne različne občutljivosti obeh testov. Proizvajalec hitrih testov navaja zelo dobro občutljivost in specifičnost testov, ki za povzročitelje rotavirus, koronavirus in *C. parvum* znašata preko 95 %, za *E. coli* pa je občutljivost nekoliko manjša (88,9 %), specifičnost pa znaša 100 %. Pri klasični metodi lahko na rezultat vplivajo različni dejavniki (izkušnost izvajalca preiskave, debelina razmaza).

5.2 2. DEL RAZISKAVE

V tem delu raziskave smo se osredotočili na eno rejo, ki je bila po pregledu rezultatov iz prvega dela, najbolj prizadeta s povzročitelji drisk, predvsem *C. parvum*. V obdobju 2 mesecev smo pregledali in obravnavali 30 telet. 20 telet je predstavljalo zdravljeno oz. testno skupino, 10 pa kontrolno skupino.

Pred začetkom zdravljenja (2. dan), 9. dan, in 14.-16. dan smo opravili klinični pregled in odvzeli vzorce iztrebkov ter krvi, izmerili vrednosti triasa (temperatura, dihanje, pulz), zabeležili prisotnost driske in izmerili prsni obseg. Prsni obseg smo izmerili še pri starosti 30-35 dni.

Niine in sod. (2018) so v svojo študijo prav tako vključili teleta iz ene reje v obdobju 2 mesecev in vzorčili 144 telet, vendar se nam število telet ($n = 30$) v naši raziskavi zdi primerno, če opredelimo, da so reje v Sloveniji nekoliko manjše. Naša reja je v času raziskave imela okoli 400 krav molznic, v študiji Niine in sod. (2018) pa je reja imela 1800 krav molznic. Odstotek telet v naši raziskavi, glede na število krav molznic, se giblje pri 7,5 %, v študiji v Estoniji pa pri 8 %, to nam pove, da je naša študija primerljiva s študijo v tujini.

5.2.1 Klinični pregled

Drisko smo ugotovili pri večjem deležu telet iz kontrolne skupine v primerjavi z zdravljeno skupino, saj smo 9. dan drisko ugotovili pri 90 % telet iz kontrolne skupine in 60 % telet iz testne skupine. V obdobju med 14. in 16. dnevom starosti, pa je drisko imelo 80 % telet iz kontrolne skupine in 70 % iz testne skupine. V povprečju je driska pri zdravljenih teletih trajala krajši čas (2,8 dni), kot pri kontrolni skupini (4,9 dni), vendar razlika ni bila statistično značilna.

V času raziskave smo spremljali prirast telet s pomočjo merjenja prsnega obsega, ter čas trajanja driske. Razlika v prsnem obsegu telet od 2. do 35. dne je pri kontrolni skupini v povprečju znašala 6,8 cm, pri teletih zdravljene skupine pa 6,6 cm. Pri primerjavi prsnih obsegov med skupinama smo pri zdravljenih teletih ugotovili statistično značilno večji prsni obseg v primerjavi s kontrolno skupino pri starosti 9 dni. Razlika v prsnem obsegu med 2. in 35. dnevom starosti se ni statistično značilno razlikovala med skupinama.

Spremljanja prirasta telet s pomočjo merjenja prsnega obsega nismo zaznali v nobeni drugi študiji. Niine in sod. (2018) pa so spremljali prirast telet z merjenjem telesne mase telet s tehtanjem. Ugotovili so, da so teleta zdravljena s halofuginonom nekoliko slabše priraščala od kontrolne skupine, v kateri pa je bil velik pogin (67 %) zato so prirast lahko upoštevali samo pri teletih, ki so preživela. Tudi v nekaterih drugih študijah, kjer so primerjali zdravljenje s halofuginonom niso ugotovili bistvenih sprememb v prirastu zdravljenih in nezdravljenih telet (Jarvie in sod., 2005).

5.2.2 Biokemijske preiskave krvi

V preiskovani reji, kjer smo opravljali test zdravljenja s halofuginonom smo vzorčili kri za biokemijske analize aktivnosti encima GGT in vsebnosti celokupnih serumskih beljakovin pri 2 dni starih teletih v testni in zdravljeni skupini, v obdobju 2 mesecev. Vzorčenih je bilo 30 telet, od katerih jih je bilo 20 zdravljenih, 10 pa jih je bilo v kontrolni skupini. Niine in sod. (2018) so v svojo študijo prav tako vključili teleta iz ene reje v obdobju 2 mesecev, vendar so vzorčili precej večje število telet ($n = 144$), ki pa so

bila razdeljena v 3 skupine (kontrolna skupina, skupina zdravljena napačno (začetek zdravljenja 2 ali 3 dan po rojstvu in zdravljenje manj kot 7 dni) in skupina zdravljena pravilno po navodilih proizvajalca).

Rezultati biokemijske preiskave merjenja aktivnosti encima GGT in vsebnosti celokupnih serumskih beljakovin, ki posredno pokažejo oskrbljenost s kolostrumom, so pokazali, da je bilo 29 telet (96,67 %) v naši raziskavi ustrezno oskrbljenih s kolostrumom.

Povprečna vrednost celokupnih serumskih beljakovin v kontrolni skupini je bila 62,7 g/L, v zdravljeni skupini pa 68,4 g/L, kar nam pove, da so bile minimalne razlike (5,7 g/L) (tabela 7). Vsa teleta razen enega v kontrolni in zdravljeni skupini so bila primerno oskrbljena in kaže na to, da niso bila dehidrirana saj Tyler in sod. (1998) navajajo, da za dobro zaščitena teleta veljajo tista, ki imajo celokupne serumske beljakovine nad 55 g/L. Koncentracije pri teletih v naši študiji se gibljejo med 49,9 g/L in 76,9 g/L pri kontrolni skupini in 49,9 g/L in 93,6 g/L pri zdravljeni skupini, kar je malenkost večji razpon kot pri študiji v tujini, kjer je bil razpon med 52 g/L in 60 g/L CSB v testirani skupini telet (n = 27) (Tyler in sod., 1999).

Braun in sod. (1982), navajajo, da maksimalno aktivnost encima GGT dosežejo teleta 1. in 2. dan po rojstvu, le ta se giblje med 370 U/L in 5000 U/L ter je posledica absorpcije iz kolostruma. Kar je primerljivo z vrednostmi v naši raziskavi, kjer smo vzorčili teleta v 2. dnevu starosti in se je aktivnost encima GGT med teleti obeh skupin gibala med 134 U/L in 4060 U/L (tabela 7). Avtorji navajajo tudi, da naj bi aktivnost GGT bila sorazmerna s količino zaužitega kolostruma. Priporočljivo je, da teleta dobijo 2-3 L kolostruma v prvih dveh urah po rojstvu (Cho in Yoon, 2014). Glede na vrednosti GGT v naši raziskavi menimo, da so teleta dobila dovoljšno količino kolostruma v prvih nekaj urah, ko je absorpcija IgG največja.

5.2.3 Pregled iztrebkov

V tem delu smo pregledali vzorce iztrebkov, ki so bili odvzeti 9. dan, dan po končanem zdravljenju s pripravkom Halagon (Divasa-Farmavic, S.A.), ki vsebuje učinkovino halofuginon. Podobno študijo z zdravljenjem s halofuginonom (Halocur, Intervet International B.V., Boxmeer, Netherlands), smo zasledili le še v Estoniji, kjer so vzorce iztrebkov odvzeli enkrat na teden, v obdobju 6. tednov (Niine in sod., 2018). To zdravilo je registrirano tako za zdravljenje kot tudi preventivo bolezni pri teletih. Kot preventivno zdravilo ga dajemo znotraj 48 ur po rojstvu (Thomson in sod., 2017; Connor in sod., 2017).

Hitri testi na povzročitelje drisk so bili pri devetih teletih (30 % telet) pozitivni na Rotavirus, pri štirih teletih (13,3 % telet) na Coronavirus, pri vseh negativni na *E. coli* - K99 (F5), pri trinajstih teletih (43,3 % telet) pa so bili pozitivni na *C. parvum*.

V kontrolni skupini je bilo devet telet (90 % telet), ki so imela pozitiven rezultat na *C. parvum*, v zdravljeni oz. testni skupini pa so bila na *C. parvum* pozitivna štiri (20 % telet). Pri 36,7 % telet (10 Z in 1K), (tabela 8), 9. dan nismo ugotovili nobenega od preiskovanih povzročiteljev drisk.

Niine in sod. (2018), so v svoji raziskavi ugotovili 84,7 % vseh telet (122/144) pozitivnih na *C. parvum*, kljub zdravljenju z halofuginonom, kar je precej več, kot v našem primeru, kjer smo ugotovili 43,3 % vseh telet (13/30) pozitivnih na *C. parvum*.

Novorojena teleta, okužena s *C. parvum*, običajno kažejo znake dehidracije, letargije, apatičnosti, neješčnosti in hude profuzne driske. Driska se običajno pojavi 2 do 4 dni po zaužitju infektivnih oocist in traja 4 - 14 dni (Niine in sod., 2018; Connor in sod., 2017). V našem primeru smo 9. dan drisko ugotovili pri 21 teletih (70 % vseh telet), in sicer pri 9 od 10 teletih (90 % telet) iz kontrolne skupine in 12 od 20 telet (60 % telet) iz testne skupine.

V obdobju med 14. in 16. dnevom starosti, torej 5 do 7 dni po končanem zdravljenju z halofuginonom, pa je drisko imelo 22 telet (73,3 % vseh telet), 8 telet (80 % telet) iz kontrolne skupine in 14 telet (70 % telet) iz testne skupine. V povprečju je driska pri zdravljenih teletih trajala 2,8 dni, pri kontrolni skupini pa 4,9 dni, kar je v kontrolni skupini primerljivo z dolžino, ki jo navajajo drugi avtorji (Niine in sod., 2018; Reynolds in sod., 1986; Connor in sod., 2017).

Pri štetju oocist *C. parvum* v razmazih iztrebkov (9. dan), obarvanih z modificiranim barvanjem po ZN, smo pri teletih kontrolne skupine, in sicer pri šestih od 10 telet (60 % telet), ugotovili večje število oocist v vidnem polju (v povprečju $0,33 \pm 0,30$ oociste/ $0,01 \text{ mm}^2$) kot pri teletih iz zdravljene skupine, ki so imela vsa z izjemo enega (5 % telet) negativen rezultat, kar v povprečju znaša $0,015 \pm 0,07$ oociste/ $0,01 \text{ mm}^2$.

Na osnovi tega sklepamo, da je bilo zdravljenje s halofuginonom uspešno in pravilno izvedeno, saj je pri večini telet (95 % telet) prišlo do popolne prekinitve izločanja oocist. Podobne rezultate z zmanjšano produkcijo in izločanjem oocist po zdravljenju (10. dan) so ugotovili tudi nekateri drugi avtorji v novejših študijah, kjer pa ni prišlo do popolne prekinitve izločanja oocist (Niine in sod., 2018; Connor in sod., 2017).

Connor in sod. (2017) so v svoji študiji zdravili z drugimi preparati (glucagon-like peptide 2; GLP 2) in pri štetju oocist barvanih z MeriFluor *Cryptosporidium*/*Giardia* reagenti (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, OH), uporabljali imunofluorescenčno metodo mikroskopiranja. Pri njihovi zdravljeni skupini so rezultati v povprečju znašali 0,025 oociste/vidno polje. Po tem sklepamo, da je zdravljenje z halofuginonom in GLP 2 primerljivo in uspešno v preventivi proti kriptosporidiozi pri teletih.

6 SKLEPI

1. Ugotavljamo, da je *C. parvum* prisoten v vseh 8 testiranih rejah goveda v raziskavi. Zelo verjetno bi dobili podobne rezultate tudi pri testiranju večjega števila rej.
2. Ugotavljamo, da so bila teleta z drisko pogosto pozitivna na dva ali več povzročiteljev drisk. Povzročitelje drisk smo ugotovili tudi pri nekaterih teletih brez driske.
3. Po izvedbi obeh testov za dokaz kriptosporidijev so se pojavila neskladja med rezultati hitrega testa in metodo modificiranega ZN barvanja. Rezultati obeh testov, v obeh delih raziskave so bili skladni v 75 % primerov.
4. Glede na dobljene rezultate sklepamo, da je bilo zdravljenje s halofuginonom učinkovito.
5. V Sloveniji smo prvič na tak način sistematično pregledali večje število telet na prisotnost povzročitelja kriptosporidioze pri teletih *C. parvum*.
6. Uporabe mrežice za štetje oocist v obarvanih razmazih iztrebkov nismo ugotovili v nobeni tuji študiji, zato menimo, da smo prvi uporabili takšen sistem za štetje in determinacijo oocist kriptosporidijev v razmazih iztrebkov. Mrežica se je izkazala za zelo uporabno, saj je bilo štetje lažje in tudi bolj natančno ter primerljivo, tudi če sva šteli dve različni osebi. Menimo, da bi bila uporaba mrežice v okularju, v parazitoloških laboratorijih po svetu, dobrodošla pri štetju oocist kriptosporidijev in določitvi stopnje invadiranosti posamezne živali z njimi.

7. Večina preiskovanih telet, ki je bila pozitivna vsaj na enega povzročitelja je imela drisko. Drisko so imela tudi nekatera teleta, ki so bila negativna na vse preiskovane povzročitelje. Pasivna imunost je bila v vseh primerih razen enemu dobra, kar kaže da so bila teleta primerno oskrbljena s kolostrumom. Zato sklepamo, da je na pojav driske vplival kak drug dejavnik (tehnologija napajanja). Teleta smo testirali samo na 4 povzročitelje in bi pri negativnih teletih z drisko lahko šlo tudi za drugega povzročitelja.
8. Glede na rezultate naše raziskave smo ugotovili, da je zdravljenje s halofuginonom vplivalo na manjšo pojavnost drisk in izločanja oocist *C. parvum* z iztrebki, zato bi bilo priporočljivo, da bi se rejci s težavami večkrat odločali za preventivno zdravljenje s tem pripravkom, kar bi zanje pomenilo boljše zdravstveno stanje telet, boljše proizvodne rezultate in manjše finančne izgube. Menimo, da bi skupaj z učinkovitimi biovarnostnimi ukrepi to lahko privedlo do manjše prevalence obolenj in bolj ugodnih proizvodnih rezultatov.

7 ZAHVALA

Zahvaljujema se mentorici doc. dr. Jožici Ježek, dr. vet. med. in somentorju izr. prof. dr. Jožetu Stariču, dr. vet. med. za vso pomoč, čas, napotke, potrpežljivost, koristne nasvete in prijetno sodelovanje pri izdelavi naloge.

Hvala doc. dr. Aleksandri Vergles Rataj, dr. vet. med. za pomoč in koristne usmeritve pri parazitološkem delu naloge in mikroskopiranju.

Hvala tudi Roku Marzelu, dr. vet. med. in vsem ostalim veterinarjem in veterinarskim organizacijam, ki so nama pomagali pri zbiranju podatkov in vzorcev na terenu.

Hvala upravnikom in zaposlenim vseh osmih rej, ki so nama omogočili izvedbo te Prešernove naloge in priskočili na pomoč na terenu.

Hvala tudi Bernardi Oblak, kem. teh. in asist. mag. Mariji Nemec, dr. vet. med. za pomoč pri biokemijskih preiskavah krvnih vzorcev v laboratoriju in pripravo evidenc pobranih vzorcev.

Zahvaljujema se tudi najinim sošolcem in sošolkam ter študentom 6. letnika na strokovni praksi v študijskem letu 2017/18, ki so nama pomagali pri zbiranju podatkov in nama prihranili čas in olajšali vzorčenje.

Hvala podjetju MedVet, TPR d.o.o., ki je sponzoriralo izvedbo naloge.

Zahvaljujema se podjetju Tehnooptika Smolnikar d. o. o. za prijaznost in posojlo mikroskopa in mrežice.

Hvala tudi mag. Giti Grecs Smole, dr. vet. med. za pomoč pri navajanju in pregledu literature.

Posebno pa se zahvaljujeva še najinim družinam, bližnjim in prijateljem za razumevanje, potrpežljivost, motivacijo, dobro voljo in nesebično podporo v času izdelave naloge.

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste na kakršenkoli način pomagali pri nastanku te naloge.

8 LITERATURA

Alsmark C, Nolskog P, Lindqvist Angervall A, et al. Two outbreaks of cryptosporidiosis associated with cattle spring pasture events. Vet Parasitol Reg Stud Reports 2018; 14: 71–4.

Andrews AH. Calf health. In: Andrews AH, ed. The health of dairy cattle. Oxford: Blackwell Science 2000: 1–14.

Andrews, AH. Colostrum – not just for 24 hours. Cattle Pract 2004; 12(2): 121–24.

Brand A, Noordhuizen JPTM, Schukken YH. Herd health and production management in dairy practice. Wageningen: Wageningen Pers, 1996; 84–94.

Braun JP, Tainturier D, Laugier C, Benard P, Thouvenot JP, Rico AG. Early variations of gamma-glutamyl transferase in newborn calves – a test of colostrum intake. J Dairy Sci 1982; 65: 2178–81.

Cho Y, Yoon K. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. J Vet Sci 2014; 15(1): 1–17.

Connor EE, Wall HE, Bravo MD, et al. Reducing gut effects from *Cryptosporidium parvum* infection in dairy calves through prophylactic glucagon-like peptide 2 therapy or feeding of an artificial sweetener. J Dairy Sci 2017; 100: 1–15.

Hall GA, Reynolds DJ, Parsons KR, Bland AP, Morgan JH. Pathology of calves with diarrhoea in southern Britain. Res Vet Sci 1988; 45(2): 240–50.

Harp AJ, Goff PJ. Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. J Dairy Sci 1998; 81: 289–94.

Heller MC, Chigerwe M. Diagnosis and treatment of infectious enteritis in neonatal and juvenile ruminants. *Vet Clin North Food Am Food Anim Pract* 2017; 34(1): 101–17.

Jarvie BD, Trotz-Williams LA, McKnight DR, et al. Effect of halofuginone lactate on the occurrence of *Cryptosporidium parvum* and growth of neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2005; 88: 1801–6.

Kiang MK, Scheftel MJ, Leano TF, et al. Recurrent outbreaks of cryptosporidiosis associated with calves among students at an educational farm programme, Minnesota, 2003. *Epidemiol Infect* 2006; 134(4): 878–86.

Kinross P, Beser J, Troell K, et al. *Cryptosporidium parvum* infections in a cohort of veterinary students in Sweden. *Epidemiol Infect* 2015; 143(13): 2748–56.

Meganck V, Hoflack G, Opsomer G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. *Acta Vet Scand* 2014; 56(1): 75.

Moore AD, Atwill ER, Kirk HJ et al. Prophylactic use of decoquinat for infections with *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223(6): 839–45.

Niine T, Dorbek-Kolin E, Lassen B, Orro T. *Cryptosporidium* outbreak in calves on a large dairy farm: Effect on treatment and the association with the inflammatory response and short-term weight gain. *Res Vet Sci* 2018; 117: 200–8.

Pancieria RJ, Thomassen RW, Garner FM. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Path* 1971; 8: 479–84.

Reynolds DJ, Morgan JH, Chanter N et al. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Vet Rec* 1986; 119: 34–9.

Snodgrass DR, Terzolo HR, Sherwood D, Campbell I, Menzies JD, Synge BA. Aetiology of diarrhoea in young calves. Vet Rec 1986; 119(2): 31–4.

Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, et al. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. Vet Res 2017; 48:42.

Tizard IR. Veterinary immunology 7th ed. Philadelphia: Saunders 2004: 110–234.

Tyler JW, Hancock DD, Wiksie SE, Holler SL, Gay JM, Gay CC. Use of serum protein concentration to predict mortality in mixed-source dairy replacement heifers. J Vet Intern Med 1998; 12: 79–83.

Tyler JW, Parish SM, Besser TE, Van Metre DC, Barrington GM, Middleton JR. Detection of low serum immunoglobulin concentrations in clinically ill calves. J Vet Intern Med 1999; 13: 40–3.

White DG. Colostral supplementation in ruminants. Compend Contin Educ Pract Vet 1993; 15: 335–42.

Xiao L, Feng Y. Zoonotic cryptosporidiosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2008; 52(3): 309–23.

9 PRILOGE

9.1 PRILOGA 1 – OBRAZCI ZA IZPOLNJEVANJE – 1. DEL RAZISKAVE

Prešernova naloga

FARMA:

DATUM:

Nastanitev telet:

Boksi	Starost telet v boku	Širina x dolžina	Število telet v boku	Nastilj	Čistoča	Na voljo imajo:	Mleko dobijo	Napajanje/količina (L):	Napajanje:	Čistoča posod za napajanje:
				0-ni nastila 1-slama 2-žagovina 3-drugo	1-slaba 2- zadovoljiva 3-dobra	1-vodo 2-seno 3-štarter	1- dvakrat/dan 2-trikrat/dan 3-odstavljeni	1-mleko matere 2-mešano mleko krav 3-mleko zdravljenih krav 4-mlečni nadomestek	1-vedro s cucijem 2-odprto vedro 3-korito 4-avtomat	1-dobra 2-zadovoljiva 3-slaba
Posamični										
Skupinski										
Skupinski										
Skupinski										

Število poginov telet v zadnjem mesecu: _____ Starost ob poginu: _____ Povprečno % poginov na leto: _____

Hlev je: zračen neprezračen (zatohel) preprih Svetloba v hlevu: zelo svetel zmerno svetel temen

Kdaj po rojstvu dobijo kolostrum _____ (ure), količina _____ L, količina kolostruma v prvih 24 urah _____ L, Kdaj po rojstvu tele ločijo od krave _____

Starost ob odstavitvi: _____ Kriteriji za odstavev: starost telesna teža drugo: _____

Način odstavitve: postopno zmanjšujejo količino mleka / naenkrat

Temperatura mleka za napajanje _____ (°C), Kako jo preverjajo? z roko / s termometrom / ne preverjajo

[illegible]

Tabela prvi del (2.-8.-dan) – VSAKO 3. ROJENO TELE JE KONTROLNO IN SE NE TRETIRA

[illegible]





CRYPTOSPORIDIOSIS IN SLOVENIA

Starič J.¹, Jernejčič B.¹, Modrijan K.¹, Vergles Rataj A.¹, Ježek J.¹

¹Veterinary faculty, University of Ljubljana

Corresponding author: joze.staric@vf.uni-lj.si

Introduction

Cryptosporidium parvum is distributed worldwide and can infect several hosts, including humans. The first report on bovine cryptosporidiosis was published in 1971, but *C. parvum*, the main pathogen in cattle, is still a major concern among farmers and veterinarians. The reasons for this are that during its complex life cycle, which includes also autoinfection within the intestines, it challenges the immune response of a neonatal calf. It requires special methods for identification in faeces; it infects a large absorptive area of the predominantly small intestines, causing a malabsorption syndrome resulting in diarrhoea, which can severely affect health and productivity of calves. *Cryptosporidium* species are difficult to distinguish between pathogenic and non-pathogenic. Oocysts of the parasite are very stable in the environment of calves, remaining infective for prolonged time, requiring very small infective dose for establishing the disease. There are no licensed vaccines to prevent it. Halofuginone is the only registered medicine for the prevention and treatment of cryptosporidiosis in calves, and was shown to be beneficial both in experimental and natural conditions. The best control over the disease, which is very hard to eradicate from a cattle herd is currently achieved by strict hygiene, adequate provision of colostrum, preventive treatment, strict observation of calves and rapid recognition of cases, followed by isolation of clinically affected calves.

Methods

In the study, 2 to 21 days old calves, from 8 big dairy cattle herds (ranging from 160 to 400 dairy cows) located in Slovenia, were sampled in order to establish if cryptosporidiosis is present and clinical features in neonatal calves. Fecal samples were screened for the presence of oocysts using cow side test FASTest® D4T bovine (Megacor, Austria) and laboratory test modified Ziehl–Neelsen stain (ZN stain).

Results

Cryptosporidiosis was present on all 8 tested farms. In 4 farms farm managers were not aware that they have cryptosporidiosis. The prevalence of *C. parvum* varied according to the age of animals and farm. *C. parvum* starts to appear in faeces of 3 days old calves. *C. parvum* was found both in diarrheic and non-diarrheic calves. Differences concerning the diarrhoea were observed also depending coinfection with other pathogens. There were some discrepancies in results between rapid test and modified ZN staining, which are discussed.

Conclusions

Strict control of cryptosporidiosis is necessary to prevent neonatal diarrhea in calves as well as because of its zoonotic potential. Based on results we think that cryptosporidiosis is underestimated as cause of neonatal diarrhea in Slovenia and that more problems with the disease will emerge in the future.

References

1. Meganck V, Hoflack G, Piepers S, Opsomer G. Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds. *Prev Vet Med* 2015; 118(1): 64-70.
2. Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, Katzer F, Mabbott NA, Morrison LJ, Innes EA. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res* 2017; 48(1): 42.
3. Heller MC, Chigerwe M. Diagnosis and Treatment of Infectious Enteritis in Neonatal and Juvenile Ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2018; 34(1): 101-117.



Ugotavljanje povzročiteljev drisk pri teletih in vpliv zdravljenja na izločanje oocist *Cryptosporidium parvum*

Jože Starič¹, Barbara Jernejčič¹, Katarina Modrijan¹, Aleksandra Vergles Rataj², Rok Marzel³, Jožica Ježek¹

¹ Veterinarska fakulteta, Klinika za reprodukcijo in velike živali, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ VOA, Breznikova cesta 89, Ihan, 1230 Domžale, Slovenija

*joze.staric@vf.uni-lj.si

Pogosti povzročitelji drisk pri teletih so Corona in Rotavirusi, *E. coli*, vse bolj pomemben in razširjen povzročitelj pa je protozoj *Cryptosporidium parvum*. Na osmih različnih farmah po Sloveniji, smo testirali teleta stara 2 do 21 dni na prisotnost teh štirih povzročiteljev, z večjim poudarkom na odkrivanju oocist *Cryptosporidium parvum*. Glede na največje število okuženih telet s *Cryptosporidium parvum* na eni od farm, smo raziskavo nadaljevali na tej farmi. Izvedli smo preventivno zdravljenje telet s Halagonom in determinacijo oocist kriptosporidijev s klasičnim in hitrim testom. *Cryptosporidium parvum* se je v blatu pojavil pri tri dni starih teletih, tako pri tistih z drisko, kot pri tistih brez le-te. Razlike v pojavljanju drisk so bile odvisne tudi od infekcije z drugimi patogeni in od drugih dejavnikov. Po izvedbi obeh testov za dokaz kriptosporidioze smo primerjali rezultate ter ugotovili neskladja med rezultati hitrih testov in rezultati metode modifikiranega ZN barvanja. Dajanje Halagona je zmanjšalo število izločenih oocist pri teletih, saj so bila na hitri test pozitivna le 4 teleta od 20 zdravljenih. V kontrolni skupini je bilo 9 od 10-ih telet pozitivnih na *Cryptosporidium parvum*. V povprečju je driska pri zdravljenih teletih trajala manj časa kot pri kontrolnih, kar kaže, da je dajanje zdravila ugodno za preventivo kriptosporidioze.

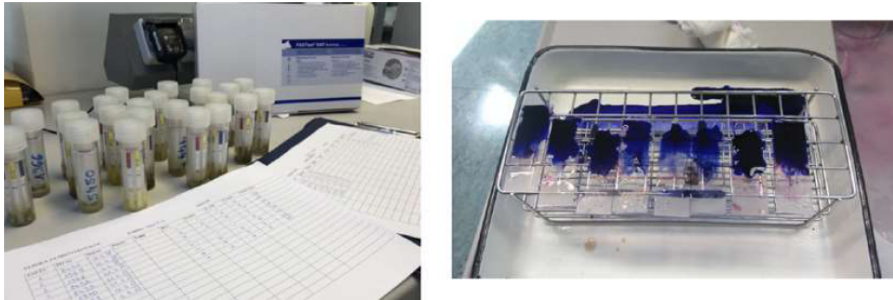
Ključne besede: kriptosporidioza; govedo; preventiva; oociste

Uvod

Driske so v govedoreji, predvsem pri teletih, zelo nezaželena a žal tudi zelo pogosta nadloga. Teleta z drisko so zaradi še nestabilnega imunskega sistema bolj podvržena infekcijam z virusi, bakterijami in paraziti. Najpogostejši povzročitelji drisk pri teletih so Rotavirusi, Coronavirusi, *E. coli* in v zadnjem času vedno več tudi z enoceličnim parazitom *Cryptosporidium parvum*. *C. parvum* sodi v poddeblo *Apicomplexa*, je razširjen po celem svetu in lahko okuži vrsto različnih gostiteljev, vključno s človekom. Prvo poročilo o goveji kriptosporidiozi je bilo objavljeno leta 1971, vendar pa kot eden glavnih povzročiteljev drisk pri teletih še vedno povzroča zaskrbljenost med kmeti in veterinarji. Razlog za skrb je predvsem v njegovem kompleksnem razvojnem krogu, ki omogoča avtoinfekcijo črevesja in negativnem vplivu na imunski sistem novorojenih telet. Dokazovanje okužbe zahteva posebne postopke za identifikacijo povzročitelja v blatu. Povzročča vnetje tankega črevesja, in posledično malabsorpcijski sindrom, ki se izraža z drisko. Zdravstveno stanje in normalen razvoj novorojenih telet sta prizadeta. Oociste zajedavca so v okolju zelo odporne, zato dolgo časa vztrajajo v okolju, razen tega je za okužbo potreben zelo majhen infektivni odmerek oocist. Cepivo za kriptosporidiozo ne obstaja. Edino registrirano zdravilo oz. zdravilna učinkovina za preprečevanje in zdravljenje kriptosporidioze pri teletih je kokcidostatik halofuginon, za katerega številne raziskave ugotavljajo, da blagodejno vpliva v eksperimentalnih kot tudi v naravnih razmerah. Za obvladovanje bolezni se priporoča dobra higiena hlevov in napajanja telet, zadostna količina kolostruma v najkrajšem možnem času po rojstvu, preventivno zdravljenje in spremljanje zdravstvenega stanja telet.

V raziskavi smo se ukvarjali s pojavljanjem drisk pri teletih v povezavi z infekcijami z Rotavirusi, Coronavirusi, *E. coli* ter s poudarkom na infekciji s *C. parvum*. Testirali smo tudi učinkovitost preparata Halagon za preventivo kriptosporidioze.

V prvem delu raziskave smo se osredotočili na 8 večjih rej goveda za prirejo mleka v Sloveniji, in sicer s 160 do 400 molznicami, kjer smo pregledali 36 telet, starih od 2 do 21 dni (3 do 11 telet iz vsake farme), z namenom ugotavljanja povzročiteljev nekaterih pogostejših infekcijskih dni pri teletih. Opravili smo klinične preglede telet in odvzeli vzorce blata za izvedbo hitrega testa FASTest® D4T bovine (Megacore, Austria) za določitev prisotnosti štirih različnih pogostih povzročiteljev drisk: *Coronavirus*, *Rotavirus*, *E. Coli* - K99 (F5) in *C. parvum*. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca. Dodatno smo pripravili razmaze blata na predmetnih stekelcih za barvanje z modificirano Ziehl – Neelsen metodo, za ugotavljanje in štetje oocist *C. parvum*.



Na podlagi rezultatov iz prvega dela raziskave, smo se zaradi težav povezanih z driskami in prekuženostjo reje s *C. parvum* ter velikega števila telitev odločili za preventivno zdravljenje telet v tej reji. V raziskavo smo vključili 30 telet, ki so se rodila brez zapletov in bila prvi dan ustrezno oskrbljena s kolostrumom ter zdrava pri pregledu 2 dan. Teleta smo zbrali v obdobju dveh mesecev, in sicer na dva rojena testna smo pustili enega nezdravljenega kontrolnega. Testno skupino (20 telet) smo zdravili z edino registrirano učinkovino za preprečevanje in zdravljenje kriptosporidioze pri teletih, halofuginonom. Zdravljenje je potekalo od drugega do osmega dneva starosti (7 zaporednih dni, enkrat na dan). Drugi dan je bil opravljen klinični pregled in odvzem krvi teletom vključenim v raziskavo. Vzorce krvi smo odvzeli iz *v. jugularis* za biokemijske preiskave. V krvnih vzorcih smo določali celokupne serumske beljakovine in encim GGT, kot pokazatelja uspešnosti prenosa pasivne imunosti. Preiskave krvnega seruma smo izvedli na biokemijskem analizatorju Daytona (Randox, Velika Britanija) po navodilih proizvajalca. Deveti dan smo odvzeli vzorce blata za hitri test in klasično ZN metodo. Štirinajsti do 16. dan starosti pa smo opravili drugi odvzem blata. Postopki z vzorci blata so bili enaki kot pri prvem delu raziskave. Razmazne blata, pobarvane z modificirano ZN metodo smo pregledali pod mikroskopom in prešteli oociste kriptosporidijev. Pri tem smo si pomagali s posebno mrežico vstavljeno v okular mikroskopa s površino $10000\mu\text{m}^2$ oz. $0,01\text{mm}^2$ ($100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$). To mrežico smo uporabili kot 1 vidno polje in prešteli vse oociste, ki so bile znotraj mrežice. Enako smo ponovili petkrat oz. prešteli pet vidnih polj/ površin mrežice, izračunali aritmetično sredino števila preštetih oocyst na petih vidnih poljih.

Kriptosporidioza je bila prisotna v vseh osmih rejah krav molznic. V štirih rejah niso bili seznanjeni z dejstvom, da je pri njih prisotna kriptosporidioza. Prevalenca *C. parvum* je variirala glede na starost telet in rejo. Oociste *C. parvum* so se začele pojavljati v blatu pri tri dni starih teletih, in so bile prisotne tako v blatu telet z drisko, kot pri teletih, ki driske niso imela. Razlike v pojavljanju driske pa so bile odvisne tudi od infekcije telet z drugimi povzročitelji drisk (Rotavirus, Coronavirus, *E.coli*). Po izvedbi obeh testov za dokaz kriptosporidijev smo primerjali rezultate in pojavila so se neskladja med rezultati hitrega testa in metodo modificiranega ZN barvanja. Rezultati obeh testov, v obeh delih raziskave so bili skladni v 75 odstotkih primerov, v preostalih 25-ih pa so bili rezultati hitrih testov drugačni kot rezultati pri klasični metodi določanja kriptosporidijev z modificirano ZN metodo.

Vsa teleta vključena v drugi del raziskave, razen enega so bila primerno oskrbljena s kolostrumom, saj so rezultati celokupnih serumskih beljakovin in GGT presegali minimalne vrednosti, ki kažejo na zadosten prenos kolostralne imunosti. V drugem delu raziskave, kjer smo se osredotočili na zdravljenje, smo pregledali vzorce blata, ki so bili odvzeti 9. dan, naslednji dan po končanem zdravljenju s Halagonom. Hitri testi na povzročitelje drisk so bili pri devetih teletih (30 % telet) pozitivni na Rotavirus, pri štirih teletih (13,3 % telet) na Coronavirus, pri vseh negativni na *E. coli* - K99 (F5), pri trinajstih teletih (43,3 % telet) pa so bili pozitivni na *C. parvum*. Devet telet, ki so imela pozitiven rezultat na kriptosporidiozo je bilo iz kontrolne skupine, ostali štirje pa iz testne oz. zdravljene skupine.

Drisko smo 9. dan ugotovili pri 21 teletih (70 % vseh telet), in sicer pri 9 od 10 teletih iz kontrolne skupine in 12 od 20 telet iz testne skupine. V obdobju med 14. in 16. dnevom starosti, pa je drisko imelo 22 telet (73,3 % vseh telet), 8 telet iz kontrolne skupine in 14 telet iz testne skupine. V povprečju je driska pri zdravljenih teletih trajala 2,8 dni, pri kontrolni pa 4,9 dni.

Pri pregledu razmazov blata 9. dan smo pri 6-ih od 10-ih telet iz kontrolne skupine ugotovili večje število oocist *C. parvum* v vidnem polju (v povprečju 0,33 oocist/ 0,01mm²) kot pa pri teletih iz zdravljene (testne) skupine, kjer so bili vsi rezultati razen enega negativni, kar v povprečju znaša 0,015 oocist/ 0,01mm².

Rota in coronavirus sta se v približno enaki prevalenci pojavljala tako v kontrolni kot v testni oz. zdravljeni skupini.

Razlika v prsnem obsegu telet od 2. do 35. dne je pri kontrolni skupini v povprečju znašala 6,8 cm, pri teletih zdravljene skupine pa 6,6 cm.

Razprava

Ugotavljamo, da je *C. parvum* prisoten v vseh testiranih rejah goveda v raziskavi. Zelo verjetno bi dobili podobne rezultate tudi pri testiranju večjega števila rej, ker se v Sloveniji ne izvajajo biovarnostni ukrepi za preprečevanje vnosa *C. parvum* v rejo. Tudi drugod po svetu ugotavljajo zelo visoko prevalenco okuženosti rej goveda s protozom *C. parvum*.

Glede na dobljene rezultate sklepamo, da je bilo zdravljenje s Halagonom uspešno. Kot prvo je zdravljenje izrazito zmanjšalo število izločenih oocist pri teletih, saj so bila na hitrem testu pozitivna le štiri teleta v testni skupini 20 telet, v kontrolni skupini pa je bilo pozitivnih kar 9 telet od 10-ih. Temu je ustrezalo tudi manjše število oocist na mm² razmaza. Pri teletih v zdravljeni skupini, je bil tudi manjši pojav drisk. Naši rezultati so primerljivi z rezultati nekaterih študij, ki tudi ugotavljajo učinkovitost halofuginona pri preprečevanju kriptosporidioze.

Kriptosporidioza, ki je tudi zoonoza, zahteva v prihodnosti večjo pozornost, saj zaradi svojih lastnosti, predvsem odpornosti in obstojnosti oocist v okolju ter majhnega infektivnega odmerka oocist, ki lahko povzroči bolezen, predstavlja resno grožnjo za zdravje telet in tudi ljudi.

Zahvala

Avtorji se zahvaljujemo podjetju TPR d.o.o. (Med Vet) za sodelovanje pri raziskavi.

Reference

1. Meganck V, Hoflack G, Piepers S, Opsomer G. Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds. *Prev Vet Med* 2015; 118(1): 64-70.
2. Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, Katzer F, Mabbott NA, Morrison LJ, Innes EA. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res* 2017; 48(1): 42.
3. Heller MC, Chigerwe M. Diagnosis and Treatment of Infectious Enteritis in Neonatal and Juvenile Ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2018; 34(1): 101-117.

Infectious causes of diarrhea in calves and the influence of treatment on the secretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts

Common agents of diarrhea in calves are Corona and Rota viruses, *E. coli*, increasingly more important and widely spread protozoan *Cryptosporidium parvum*. On eight different Slovenian dairy farms we tested newborn calves on presence of these four pathogens, with large emphasis on detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Considering the largest number of calves infected with *Cryptosporidium parvum* on one farm, our research continued on that farm. Calves there were treated and later the number of oocysts of *Cryptosporidium* with classical and quick tests was determined. Oocysts appeared in feces of three days old calves, both diarrheic and in those without. Differences in occurrence of diarrhea depended upon the infection of calves with other pathogens and other factors. After the realisation of both tests, results were compared and some disagreement appeared between the results of quick tests and results of modified ZN coloring. After treatment with Halagon, number of excreted oocysts was reduced according to the quick tests there were only 4 positive among 20 treated calves, while in control group 9 out of 10 calves were positive on *Cryptosporidium parvum*. Diarrhea in treated calves lasted fewer days on average as in control group, which indicates that preventive treatment with Halagon was beneficial.

Key words: Cryptosporidiosis; cattle; diarrhea; prevention; oocysts