Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Wiederkäuer

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Thomas Wittek, Diplomate ECBHM)

Methodenvergleich zum Nachweis von Kryptosporidien in Kälberkot

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Katharina Freudenthaler

Wien, im September 2020

Erstbetreuer:	Univ.-Prof. Dr.med.vet. Thomas Wittek, Diplomate ECBHM
	Mitbetreuende Assistentin:
	Dr.med.vet. Katharina Lichtmannsperger
Zweitbetreuer:	Univ.-Prof. Dr.med.vet. Anja Joachim, Diplomate EVPC
	Mitbetreuende Assistentin:
	Dr.med.vet. Barbara Hinney, Diplomate EVPC

Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. med. vet. Peter Schmidt, Dipl. ECVP

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Kryptosporidien 1

1.1.1 Lebenszyklus 1

1.1.2 Pathogenese und Klinik 2

1.1.3 Übertragungswege 2

1.1.4 Zoonotische Bedeutung 3

1.1.5 Kryptosporidien beim Kalb 4

1.2 Diagnostikmöglichkeiten 5

1.2.1 Mikroskopische Nachweismethoden 5

1.2.2 Immunologische Nachweismethoden 6

1.2.3 Molekularbiologische Nachweismethoden 6

2 Material und Methode 8

2.1 Tiere und Probennahme 8

2.2 Untersuchungsmethoden 8

2.2.1 Mikroskopischer Nachweis 8

2.2.2 Schnelltests 9

2.2.3 PCR 10

2.2.4 DNA - Sequenzierung 13

2.3 Statistische Berechnungen 13

3 Ergebnisse 15

3.1 Mikroskopie 15

3.2 Schnelltests 16

3.3 PCR 16
3.4 Speziesdifferenzierung 17
3.5 Validitätskriterien des Schnelltests 19
3.6 Übereinstimmung der Nachweismethoden 20
4 Diskussion 22
4.1 Nachgewiesene Spezies 22
4.2 Schnelltest 22
4.3 Übereinstimmung der Nachweismethoden 23
4.4 Limitationen 24
4.5 Conclusio 25
5 Zusammenfassung 26
6 Summary 28
7 Abkürzungsverzeichnis 30
8 Literaturübersicht 31
9 Abbildungs-/Tabellenverzeichnis 36
9.1 Abbildungsverzeichnis 36
9.2 Tabellenverzeichnis 36

Diese Diplomarbeit fand im Rahmen einer größeren Studie statt. Ergebnisse dieser Studie wurden bereits publiziert:

Lichtmannsperger K, Hinney B, Joachim A, Wittek T. 2019. Molecular characterization of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* from calves with diarrhoea in Austria and evaluation of point-of-care tests. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 66: 101333. DOI 10.1016/j.cimid.2019.101333.

Eine weitere Publikation wurde bereits von Parasitology Research akzeptiert und wird demnächst veröffentlicht werden. Lichtmannsperger K, Harl J, Freudenthaler K, Hinney B, Wittek T, Joachim A. 2020. *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium ryanae* and *Cryptosporidium bovis* in samples from calves in Austria. Parasitology Research.

Ziele

Ziele dieser Arbeit waren, verschiedene Nachweismethoden für Kryptosporidien in Kälberkot zu validieren und die Übereinstimmung dieser zu überprüfen. Außerdem sollten Kryptosporidienspezies in an Durchfall erkrankten Kälbern differenziert werden.

Hypothesen

Es wurde hypothetisiert, dass die eingesetzten Schnelltests Kryptosporidien hoch sensitiv und spezifisch nachweisen und dass es eine hohe Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Nachweismethoden gibt. Weiters wurde hypothetisiert, dass neben *Cryptosporidium* (*C.*) *parvum* auch andere Kryptosporidien-Spezies in an Durchfall erkrankten Kälbern vorkommen.

1 EINLEITUNG

1.1 KRYPTOSPORIDIEN

Kryptosporidien (Ordnung *Cryptosporidia*, Klasse *Coccidea*, Stamm *Alveolata*) gehören zu den Protozoen und kommen weltweit vor. Sie spielen als Krankheitserreger sowohl bei Tieren (Reptilien, Fische, Vögel und Säugetiere) als auch beim Menschen eine Rolle und infizieren vorwiegend den Gastrointestinaltrakt, selten auch andere Organe (Cho und Yoon 2014, Eckert 2008, Lefay et al. 2000). Es sind mindestens 38 verschiedene Spezies bekannt (Feng et al. 2018, Ryan et al. 2014).

1.1.1 Lebenszyklus

Infektiöse Oozysten kommen ubiquitär vor und werden oral aufgenommen. Im Gastrointestinaltrakt des Wirtes werden Sporozoiten frei, welche mithilfe spezifischer Liganden an Rezeptoren der Enterozyten binden und in die Zelle aufgenommen werden. Dort entwickeln sie sich in einer parasitophoren Vakuole, die intrazellulär aber extracytoplasmatisch liegt, weiter. Es entstehen Meronten vom Typ I, welche jeweils acht Merozoiten bilden, diese befallen wiederum neue Wirtszellen. Die Merozoiten leiten entweder eine weitere Generation von Meronten I ein oder beginnen die Entwicklung von Meronten II, welche jeweils vier Merozoiten ausbilden. Aus diesen Merozoiten entwickeln sich Geschlechtszellen (Gamonten). Durch die Befruchtung der weiblichen Gamonten (Makrogameten) durch männliche (Mikrogameten) entstehen neue Oozysten, welche noch im Darmlumen sporulieren und somit sofort infektiös sind. Es werden zwei verschiedene Typen von Oozysten gebildet: Etwa 80 % dickwandige Oozysten, welche mit dem Kot ausgeschieden werden, somit den Lebenszyklus aufrecht erhalten und für Neuinfektionen sorgen, und ca. 20 % dünnwandige, die bereits im Darmlumen rupturieren und so für eine endogene Autoinfektion verantwortlich sind (Cho und Yoon 2014, Dirksen und Baumgartner 2006, Eckert 2008, Thomson et al. 2017).

1.1.2 Pathogenese und Klinik

Die Infektion mit Kryptosporidien führt zu einer katarrhalischen Enteritis mit Zerstörung und Fusion der Zotten sowie Hyperplasie von Kryptenzellen. Es kommt zur Infiltration der *Lamina propria* mit Entzündungszellen und zu Epithelzellverlust mit fokalen Nekrosen. Der Abbau der absorptiven Enterozyten und die Hyperplasie der Cl^--sekretierenden Kryptenzellen führen zu Malabsorption und Hypersekretion, was wiederum osmotische Diarrhoe bedingt. Begleitinfektionen mit anderen Durchfallerregern können zur Pathogenese beitragen (Clark und Sears 1996, Dirksen und Baumgartner 2006).

Die klinische Ausprägung der Kryptosporidiose ist von verschiedenen Faktoren beeinflusst und kann stark variieren. So können einerseits subklinische Infektionen auftreten und auch bei klinisch gesunden Kälbern Oozysten im Kot nachgewiesen werden (Eckert 2008, Trotz-Williams et al. 2005). Andererseits können vor allem hohe Infektionsdosen und das gleichzeitige Vorkommen anderer Enteropathogene zu sehr schweren Krankheitsverläufen und Todesfällen führen. Häufig wird bei der Kryptosporidiose des Kalbes Diarrhoe mit flüssigem, oft hellgelbem Kot beobachtet. Weiters kommt es zu Inappetenz, Exsikkose, Fieber, Apathie und Gewichtsverlust (Dirksen und Baumgartner 2006, Eckert 2008).

1.1.3 Übertragungswege

Die in der Umwelt vorkommenden Oozysten, welche mit dem Kot ausgeschieden und oral aufgenommen werden, stellen die Infektionsquelle dar. Es handelt sich um eine fäkal-orale Ansteckung. Für die Verbreitung der infektiösen Oozysten können verschiedene Wege festgemacht werden, unter anderem Personenverkehr, direkter Kontakt von Tier zu Tier bzw. Tier zu Mensch, aber auch kontaminiertes Futter bzw. Wasser (Fayer 2010, Thomson et al. 2017). Oozysten werden nach einer Präpatenzzeit von drei bis sechs Tagen ausgeschieden, wobei die Ausscheidung mehrere Wochen andauern kann (Dirksen und Baumgartner 2006, Eckert 2008).

Die infektiösen Oozysten sind sehr widerstandsfähig gegenüber äußeren Einflüssen (Fayer et al. 1996). Die Überlebenszeit in der Umwelt liegt bei genügend Feuchtigkeit und Temperaturen

von 15 °C bis 20 °C bei 3-4 Monaten. Bei Temperaturen um 5 °C werden Zeiten von sechs Monaten bis zu einem Jahr beschrieben. Somit stellt die kontaminierte Umwelt die wichtigste Infektionsquelle für die Wirtstiere dar. Austrocknung oder Temperaturen von < -20 °C oder > 65 °C sind für Kryptosporidienoozysten letal (Dirksen und Baumgartner 2006, Eckert 2008). Viele chemische Desinfektionsmittel sind nicht wirksam gegen Kryptosporidienoozysten, Chemikalien auf Kresol-Basis oder Sauerstoffabspalter zeigen Wirksamkeit (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. http://www.desinfektion-dvg.de/index.php?id=2150; Zugriff 05.04.2020).

1.1.4 Zoonotische Bedeutung

Knapp 20 Kryptosporidenspezies wurden beim Menschen bereits nachgewiesen, am häufigsten sind *C. hominis* und *C. parvum* für humane Kryptosporidiose verantwortlich (Razakandrainibe et al. 2018, Ryan et al. 2014). Beide Spezies kommen bei Kälbern vor, womit diese eine potentielle Infektionsquelle für den Menschen darstellen (Razakandrainibe et al. 2018).

Die Ansteckung erfolgt vor allem über kontaminiertes Trinkwasser, kontaminierte Lebensmittel, aber auch durch direkten Kontakt zu infizierten Personen oder Tieren (Ryan et al. 2014). Die Symptomatik beinhaltet Durchfall, Übelkeit, Erbrechen, abdominale Schmerzen und Fieber. Vor allem bei Patienten mit einem geschwächten Immunsystem kann es zu sehr schweren Krankheitsverläufen kommen (Cacciò und Chalmers 2016, Eckert 2008). Als Beispiel für einen großen Ausbruch über kontaminiertes Trinkwasser gilt der Ausbruch in Milwaukee 1993, dabei litten Schätzungen zufolge mehr als 400 000 Menschen an wässrigem Durchfall (Kenzie et al. 1994).

Bei Untersuchungen zum Auftreten von Kryptosporidien im Humanbereich in Österreich wurden Oozysten in Trinkwasserreservoirs und in Stuhlproben von an HIV erkrankten Personen nachgewiesen (Hassl et al. 2001).

1.1.5 Kryptosporidien beim Kalb

1.1.5.1 Spezies und Altersverteilung

Bei Kälbern kommen gewöhnlich vier Kryptosporidienspezies vor: *C. parvum*, *C. bovis* (früher bekannt als *Cryptosporidium* genotype bovine B), *C. ryanae* (früher *Cryptosporidium* deer-like genotype) und *C. andersoni* (früher *Cryptosporidium muris*). Am häufigsten ist *C. parvum* ursächlich für die Kryptosporidiose beim Kalb (Cho und Yoon 2014, Taha et al. 2017).

Vor allem Milchkälber sind für Kryptosporidien empfänglich, weltweit werden Prävalenzraten von 24,5-52,0 % beschrieben, wobei die Prävalenz innerhalb einer Herde bis zu 100 % betragen kann (Delafosse et al. 2015, Holzhausen et al. 2019, Joachim et al. 2003, Silverlås et al. 2009, Trotz-Williams et al. 2005). Die höchste Prävalenz ist in der zweiten Lebenswoche feststellbar (Avendaño et al. 2018, Cai et al. 2017, Joachim et al. 2003, La Fuente et al. 1999, Santín et al. 2004).

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der vorkommenden Kryptosporidienspezies und dem Alter der betroffenen Tiere. *C. parvum* kommt hauptsächlich bei Milchkälbern vor dem Absetzen vor, selten bei älteren Tieren. *C. ryanae, C. andersoni* und *C. bovis* werden hingegen vorwiegend bei abgesetzten Kälbern nachgewiesen (Fayer et al. 2006, Santín et al. 2004).

1.1.5.2 Subtypen

Eine definierte Nomenklatur wird für die Subtypisierung der Kryptosporidienspezies verwendet. Dabei wird durch römische Ziffern die Zugehörigkeit zur Spezies ausgedrückt (I für *C. hominis,* II für *C. parvum*, III für *C. meleagridis* etc.) und mit kleinen Buchstaben (a,b,c, etc.) die Subtypenfamilie bezeichnet. Weiters wird die Anzahl der Wiederholungen des Tri-Nukleotids TCA (ausgedrückt durch großen Buchstaben A), des Tri-Nukleotids TCG (ausgedrückt durch großen Buchstaben G) und des Tri-Nukleotids TCT (ausgedrückt durch großen Buchstaben T) bzw. der Sequenz ACATCA für Subtypen der Familie IIa (ausgedrückt durch großen Buchstaben R) angegeben (Feng et al. 2018, Ryan et al. 2014). Die bei Kälbern am häufigsten nachgewiesene Subtypenfamilie der Spezies *C. parvum* ist die Familie IIa (Avendaño et al. 2018, Broglia et al. 2008, Díaz et al. 2018, Feng et al. 2018, Quilez et al. 2008).

1.2 DIAGNOSTIKMÖGLICHKEITEN

1.2.1 Mikroskopische Nachweismethoden

Um die Oozysten im Kot zu konzentrieren, gibt es verschiedene Methoden, meist werden Zentrifugation, Flotationsverfahren oder Ridley‘s-formol-ether-Methode angewandt (Khurana und Chaudhary 2018).

Der angefertigte Ausstrich wird durch Phasenkontrastmikroskopie oder Lichtmikroskopie visualisiert, beim Letzteren kommen verschiedene Färbetechniken zum Einsatz. Die Oozysten stellen sich unter dem Lichtmikroskop als 4–6 µm große, runde Gebilde dar, je nach eingesetzter Färbung in unterschiedlicher Erscheinungsform (Casemore et al. 1985, Dirksen und Baumgartner 2006).

1.2.1.1 Färbetechniken

Erstmals wurden Romankowsky-Färbungen wie die Giesma- oder Jennerfärbung für die Identifikation von Kryptosporidienoozysten verwendet. Dabei stellen sich diese blau bis azur dar, es sind vier bis sechs rote oder violette eosinophile Granula zu erkennen. Henriksen und Pohlenz beschrieben 1981 die Ziehl-Neelsen Färbung (ZN) zur Detektion von Kryptosporidien, welche später von Casemore et al. 1984 modifiziert wurde. Diese modifizierte Variante hat sich als Nachweismethode bewährt, Oozysten sind als rote Gebilde auf einem hellgrünen Hintergrund zu erkennen. Bei der Safranin-Methylenblau-Färbung werden die Oozysten hingegen orange angefärbt (Khurana und Chaudhary 2018).

Weiters können Kryptosporidien mittels Auramin-Phenol-Färbung mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden, dabei werden höhere Sensitivitäten als mit der modifizierten ZN-Färbung erreicht (Casemore et al. 1985, Khurana und Chaudhary 2018).

Die Elektronenmiskroskopie kann zum Nachweis von Oozysten eingesetzt werden, aufgrund des hohen Aufwandes und der Kosten findet diese Methode in der Routinediagnostik allerdings keine Anwendung (Casemore et al. 1985, Khurana und Chaudhary 2018).

1.2.2 Immunologische Nachweismethoden

1.2.2.1 Detektion von Antigenen

Für die Detektion von Antigenen werden entweder Fluoreszenz-markierte Antikörper oder Enzym-markierte Antikörper eingesetzt. Letztere finden Anwendung in Form von Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) oder Immunochromatographischen Tests (IC), welche als Testkits kommerziell erhältlich sind (Khurana und Chaudhary 2018).

Diese kommerziellen Schnelltests erreichen Sensitivitäten von 75 %-100 % und Spezifitäten von 94,6 %-100 % (Cho et al. 2012, Klein et al. 2009, Papini et al. 2018).

Der in dieser Studie eingesetzte Testkit (FASTest® Crypto Strip, Megacor, Österreich) funktioniert nach folgendem Prinzip:

„Der verwendete Schnelltest basiert auf einem immunochromatographischen „Sandwich-Prinzip“. Die im Probenmaterial Kot enthaltenen Oberflächenantigene der Kryptosporidien-Oozysten sowie aller vegetativen *C. parvum*-Formen reagieren im Bereich des Konjugatkissens mit mobilen, an rote Latexpartikel gebubundnen Antikörpern. Diese Ag-Ak-Komplexe durchfließen die Membran („lateral flow“, LF) und werden unter Ausbildung einer mehr oder weniger intensiv gefärbten roten TESTline (TL) an membranfixierte, monoklonale Anti-*Cryptosporidium*-Antikörper (mAbs) gebunden. Diese mAbs gewährleisten ein hohes Maß an Spezifität zum alleinigen Nachweis von *C. parvum*. (…) Die Intensität der TL bzw. deren Breite hängt von der Konzentration der Kryptosporidienantigene in der eingebrachten Probenmenge ab. Der FASTest® Crypto Strip ist nicht auf das Vorhandensein intakter Kryptosporidien-Oozysten bzw. vegetativer Kryptosporidien-Formen angewiesen!“ (Gebrauchsinformation FASTest® Crypto Strip, Megacor, Österreich; Stand 06/2015)

1.2.3 Molekularbiologische Nachweismethoden

Verschiedene molekularbiologische Verfahren wie PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (PCR-RFLP), multiplex-allele-specific PCR (MAS-PCR) oder quantitative real-time PCR (rtPCR) kommen zum Einsatz, um Kryptosporidien nachzuweisen (Khurana und Chaudhary 2018). Voraussetzung ist die aus dem

Probenmaterial extrahierte DNA, welche dann in unterschiedlichen Methoden der Identifikation der Kryptosporidien dient (Ryan et al. 2014).

Zur Genotypisierung der Kryptosporidienspezies werden üblicherweise small subunit (SSU) rRNA Gene mittels PCR vervielfältigt. Anschließend werden die PCR-Produkte entweder geschnitten (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) und mittels Gelelektrophorese ausgewertet oder per DNA-Sequenzierung analysiert (Ryan et al. 2014).

Eine gängige Methode zur Subtypisierung von *C. parvum* ist die DNA-Sequenz Analyse des 60kDA Glykoproteins (gp60) (Ryan et al. 2014). Die Sequenzen werden in international zugänglichen DNA-Sequenzdatenbanken (z. B.: GenBank) veröffentlicht.

2 MATERIAL UND METHODE

2.1 TIERE UND PROBENNAHME

Die Kotproben wurden im Zeitraum von November 2017 bis Juli 2018 gesammelt. Dabei waren 18 veterinärmedizinische Praxen beteiligt, es wurden insgesamt 70 verschiedene Betriebe in Salzburg (n=26), Niederösterreich (24) Steiermark (7), Burgenland (6), Tirol (4) und Oberösterreich (3) besucht.

Als Probenmaterial wurde Kot von an Durchfall erkrankten Kälbern direkt aus dem Rektum entnommen, dabei wurden an jedem besuchten Betrieb alle Tiere, die jünger als 180 Tage alt waren und an Durchfall erkrankt waren, inkludiert. Die beprobten Kälber waren zwischen einem und 164 Tagen alt. Insgesamt wurden Proben von 177 Kälbern gewonnen, wovon 108 weiblich und 69 männlich waren. Beteiligte Rassen waren Fleckvieh (n=141), Holstein Frisian (8), Braunvieh (1) sowie Kreuzungen verschiedener Rassen (27).

Die Kotproben wurden per Kurierdienst (Medlog) innerhalb von 24 Stunden in einer Styroporbox mit Kühlakkus an die Klinik für Wiederkäuer der Veterinärmedizinischen Universität Wien gebracht und für weitere Untersuchungen bei -80 °C tiefgefroren.

2.2 UNTERSUCHUNGSMETHODEN

2.2.1 Mikroskopischer Nachweis

Die mikroskopische Untersuchung aller 177 Kotproben fand bereits vorab im Zuge einer größeren Studie statt (Lichtmannsperger et al. 2019). Alle 177 Kotproben wurden vor dem Tieffrieren per Phasenkontrastmikroskopie untersucht.

2.2.1.1 Durchführung

Die Kotproben wurden mittels Sodium Acetate Formalin (SAF)–Methode behandelt, um die Oozysten zu konzentrieren. Dazu wurde 1 g homogenisierter Kot mit 10 ml der SAF-Lösung

verdünnt, gefiltert und zentrifugiert (2 min, 500 x g) und der Überstand verworfen. Weiters wurden 8 ml einer 0,9 %-igen Natriumchloridlösung und 3 ml Diethylether beigemengt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dem verbliebenen Pellet wurde 1 ml Phosphat-gepufferte Lösung (pH-Wert 7,2) beigefügt, mittels Vortexmischer vermengt und so für die mikroskopische Untersuchung verwendet. Für die Zählung der Kryptosporidienoozysten wurde ein Phasenkontrastmikroskop (PCM) (Nikon Labophot-2, Nikon Instruments Inc., Japan) verwendet. Die Auszählung der Oozysten erfolgte unter 200-facher Vergrößerung mittels Hämozytometer (C-Chip, NanoEnTek Inc., USA) (Lichtmannsperger et al. 2019).

Die Zahl der Kryptosporidienoozysten wurde in Oozysten pro Gramm Kot (opg) angegeben. Die Einteilung der Proben erfolgte in drei Kategorien: negativ (0 opg), geringer Ausscheidung (≤10000 opg) und hoher Ausscheidung (>10000 opg).

2.2.2 Schnelltests

Ein kommerziell erhältlicher Schnelltest (FASTest® Crypto Strip, Megacor, Österreich) zum Nachweis von *C. parvum* wurde angewandt.

Es fanden zwei Schnelltestdurchgänge statt, wobei der erste unter Feldbedingungen (Feld) von sieben verschiedenen Tierärzten/Tierärztinnen durchgeführt wurde. Der zweite Durchgang erfolgte durch eine Person (KF) als Reevaluierung unter Laborbedingungen (Labor) an der Klinik für Wiederkäuer der Veterinärmedizinischen Universität Wien.

Beim ersten Durchgang wurden Schnelltests von allen 177 Kotproben angefertigt, bei der Reevaluierung wurden Schnelltests von 130 zufällig (Zufallsstichprobe) ausgewählten Proben wiederholt.

2.2.2.1 Durchführung

Beim Feldtest kamen ausschließlich frische Kotproben zum Einsatz, für die Reevaluierung wurden die in der Zwischenzeit bei -80 °C tiefgefrorenen Proben für mindestens zwölf Stunden bei Zimmertemperatur aufgetaut.

Sowohl beim Feld- als auch beim Labordurchgang ist nach Angaben des Herstellers vorgegangen worden. Dafür wurde die Kotprobe vorab mittels Spatel homogenisiert, anschließend wurde der Kot (bei breiig-festem Kot eine gestrichenes Löffelchen, bei breiig-wässrigem Kot 2-3 gestrichene Löffelchen) der Pufferlösung beigemengt und durch Schwenken vermischt. Nach einminütiger Wartezeit wurde der Teststreifen senkrecht und in Pfeilrichtung in das Probenröhrchen gestellt und abgewartet, bis die Proben-Puffer-Mischung die Kontrolllinie erreicht hat. Danach wurde der Teststreifen entnommen, auf eine waagrechte Unterfläche gelegt und das Ergebnis nach fünf Minuten abgelesen.

2.2.3 PCR

Für die PCR kam der in der Zwischenzeit bei -80 °C tiefgefrorene Kot zum Einsatz, der im Vorhinein bei Zimmertemperatur mindestens 12 Stunden lang aufgetaut wurde. Von allen Proben, die in der PCM-Untersuchung negativ waren (n=79), wurde eine 18S-PCR durchgeführt (KF). Jene Proben, die in der PCM-Untersuchung positiv waren, wurden vorerst mit der gp60-PCR gescreent. Ergab diese ein negatives Ergebnis, so wurde von der Probe weiters eine 18S-PCR durchgeführt.

2.2.3.1 Durchführung

Die Extraktion der DNA aus dem Kot erfolgte mithilfe eines kommerziellen Kits (NucleoSpin® Soil, MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Deutschland), es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen:

Eine Spatelspitze der Kotprobe wurde mit 700 µl Puffer SL1 fünf Minuten lang bei 2850 rpm (rounds per minute) mittels Vortexgerät (Digital Disruptor Genie, Scientific Industries Inc., USA) gemischt und anschließend für zwei Minuten bei 11388*g zentrifugiert (Centrifuge MiniSpin®, Eppendorf Austria GmbH, Österreich). Weiters wurden 150 µl des Puffers SL3 beigemengt, fünf Sekunden lang per Vortexmischer (IKA® MS 3 basic, AL-Labortechnik e.U., Österreich) vermengt, für fünf Minuten auf Eis inkubiert und eine Minute bei 11388*g zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe gefiltert, indem 700 µl des Überstandes in ein NucleoSpin® Inhibitor Removal Column überführt wurden und es für eine Minute bei 11388*g zentrifugiert wurde. Der Filter und der Überstand wurden verworfen, 250 µl des Puffers SB

hinzugefügt und für fünf Sekunden mittels Vortexmischer vermengt. Zum Binden der DNA wurde die Probe in ein NucleoSpin® Soil Column überführt und für eine Minute bei 11388*g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde die Probe in vier Schritten gewaschen. Bei Schritt eins wurden 500 µl des Puffers SB hinzugefügt, 30 Sekunden lang bei 11388*g zentrifugiert und der Überstand verworfen. In Schritt zwei wurden 550 µl des Puffers SW1 beigemengt, ebenfalls 30 Sekunden bei 11388*g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Bei Schritt drei und vier wurden jeweils 700 µl des Puffers SW2 hinzugefügt, zwei Sekunden per Vortexmischer vermengt und 30 Sekunden bei 11388*g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Trocknung der Membran wurde die Probe zwei Minuten lang bei 11388*g zentrifugiert. Zum Eluieren der DNA wurden 100 µl SE Puffer beigemengt, eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert und für 30 Sekunden bei 11388*g abzentrifugiert.

Die extrahierte DNA wurde mittels nested-PCR vervielfältigt, dafür wurden zwei PCR Protokolle etabliert, welche einerseits zum spezifischen Nachweis von *C. parvum* (gp60 Lokus) und andererseits zum Nachweis von *Cryptosporidium* spp. (18S rDNA) geeignet sind.

Beide Protokolle wurden mithilfe des Thermocyclers (Mastercycler®proS, Eppendorf AG, Deutschland) realisiert.

Das Thermocycler-Programm der gp60-PCR beinhaltete die initiale Denaturierung bei 94 °C für 2 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 95 °C für 50 Sekunden, 56 °C (nest 1) bzw. 60 °C (nest 2) für 50 Sekunden und 65 °C für 1 Minute und die final extension bei 65 °C für 5 Minuten. Der Mastermix setzte sich aus 9,675 µl H2O, 5 µl PCR Puffer (5xGreen GoTaq® Reaction Buffer, Promega USA), 3 µl $MgCl_2$ (25mM), 0,2 µl dNTP´s (25mM), 0,125 µl TaqPolymerase (GoTaq® G2 DNA Polymerase, Promega, USA) und 1 µl des jeweiligen Primers zusammen. Dem wurde 1 µl der Probe (bei nest 1) bzw. 1 µl des nest 1-Produktes (bei nest 2) hinzugefügt. verwendeten Primer sind Tab. 1 zu entnehmen.

Das 18S-PCR-Protokoll wurde wie folgt umgesetzt: Die initiale Denaturierung lief bei 94 °C für 2 Minuten, gefolgt von 20 Zyklen (nest 1) bzw. 35 Zyklen (nest 2) bei 94 °C für 30 Sekunden, 56 °C für 1 Minute, 72 °C für 1 Minute und die final extension bei 72 °C für 5 Minuten. Der Mastermix beinhaltete 14,375 µl H2O, 5 µl PCR Puffer (5xGreen GoTaq® Reaction Buffer, Promega USA), 2 µl $MgCl_2$ (25mM), 0,5 µl dNTP´s (25mM), 0,125 µl

TaqPolymerase (GoTaq® G2 DNA Polymerase, Promega, USA) und 1 µl des jeweiligen Primers. Dem wurde 1 µl der Probe (bei nest 1) bzw. 1 µl des nest 1-Produktes (bei nest 2) beigefügt. Die verwendeten Primer sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 1, Eingesetzte Primer für das gp60 PCR-Protokoll zum Nachweis von *C. parvum* modifiziert nach Peng et al. 2001

gp60-PCR	
Nest 1:	
forward	5`-ATTGTTCCGCTGTATTC-3`
reverse	5`- GC AGAGGAACCAGCATC-3`
Nest 2:	
forward	5`-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3`
reverse	5`-GAG ATATATCTI'GGTGCG-3`

Tab. 2, Eingesetzte Primer für das 18S PCR-Protokoll zum Nachweis von *Cryptosporidium* spp.

18S-PCR	
Nest 1:	
forward	5`-ACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATC-3`
reverse	5`TCTCATAAGGTGCTGAAGGAGT-3`
Nest 2:	
forward	5`-CAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGG-3`
reverse	5`-TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGGAAC-3`

Die vervielfältigte DNA wurde auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen und per Elektrophorese ausgewertet.

Es wurden auf jedes Gel 15 µl der Leiter (Zusammensetzung: 9 µl Wasser, 3 µl loading dye, 3 µl der 100bp Leiter), 5 µl der Positivkontrolle, 5 µl des Leerwertes je der ersten und zweiten

PCR und 5 µl der PCR-Produkte in die Slots eingebracht. Das Gel lag für 45 Minuten bei 120 Volt in der Gelelektrophoresekammer (Horizon 11.14, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), bei nicht klar sichtbarer Bande wurde das Gel weitere 15 Minuten in die Kammer gelegt.

2.2.4 DNA - Sequenzierung

Jene Kotproben, die entweder in der 18S-PCR oder in der gp60-PCR positiv waren, wurden weiters zur Sequenzierung an ein externes Labor geschickt, um die genaue Kryptosporidien-Spezies zu verifizieren.

2.2.4.1 Durchführung

Es wurden jeweils 20 µl des PCR-Produktes und 5 µl des entsprechenden Primers auf eine Spiegelplatte aufgetragen und zur Sequenzierung (LGC Genomics GmbH, Berlin, Deutschland) geschickt. Die Sequenzen wurden durch den Kooperationspartner (Josef Harl, Institut für Pathologie, Vetmed Wien) mittels ChromasLite® (ChromasLite® 2.1.1, Technelysium, Australien) beurteilt und bearbeitet und in der DNA-Sequenzdatenbank GenBank (National Center for Biotechnology Information) hochgeladen.

2.3 STATISTISCHE BERECHNUNGEN

Für den eingesetzten Schnelltest wurden folgende Kriterien berechnet: Sensitivität, Spezifität, Positiver und Negativer Prädiktiver Wert, prozentuale Übereinstimmung sowie Cohen's Kappa. Als Grundlage für die Berechnungen galten die Ergebnisse der PCM (Referenzmethode).

Die Berechnungen erfolgten mithilfe von Microsoft Excel.

Sensitivität:	Anzahl der richtig als positiv erkannten / alle positiven
Spezifität:	Anzahl der richtig als negativ erkannten / alle negativen
Positiver Prädiktiver Wert:	Anzahl der richtig positiven / (Anzahl der richtig positiven + Anzahl der falsch positiven)

Negativer Prädiktiver Wert: Anzahl der richtig negativen / (Anzahl der richtig negativen + Anzahl der falsch negativen)

Prozentuale Übereinstimmung: (Anzahl der richtig positiven + Anzahl der richtig negativen) / Anzahl aller Proben

Cohen‘s Kappa: $p_0 - p_e / 1 - p_e$

wobei p_0 = relative Übereinstimmung und p_e = Wahrscheinlichkeit zufälliger Übereinstimmung

Richtwerte:

0	agreement is equal to that expected by chance
≤ 0,2	poor agreement
0,21−0,4	fair agreement
0,41−0,6	moderate agreement
0,61−0,8	good agreement
> 0,8	very good agreement
1	complete agreement beyond chance

(Altman 1999, Thrusfield 2007)

Um das Vorkommen der Kryptosporidien zwischen unterschiedlichen Altersgruppen (ein bis zwei Wochen; über zwei Wochen alt) zu beschreiben, wurde ein Chi^2 Test durchgeführt. Die Normalverteilung der Ausscheidungsraten (opg) wurde mit der Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests geprüft. Normal verteilte Variablen wurden weiter mit einem t-Test analysiert, nicht normal verteilte Variablen mit dem Mann-Whitney U Test. Alle Ergebnissse mit einem *p*-Wert $p<0,05$ wurden als statistisch signifikant interpretiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 MIKROSKOPIE

In der Phasenkontrastmikroskopie wurden in 98 Proben (55,4 %) Oozysten nachgewiesen; 79 Proben (44,6 %) ergaben ein negatives Ergebnis.

Die Kategorisierung in Ausscheidungsraten ergab sich wie folgt: Kategorie eins (negativ) 79 Proben, Kategorie zwei (gering-Ausscheider) 29 Proben und Kategorie drei (hoch-Ausscheider) 69 Proben.

In Altersgruppen eingeteilt zeigt sich, dass jüngere Kälber (ein bis zwei Wochen alt) signifikant höhere (p=0,00) Ausscheidungsraten aufweisen als ältere Kälber (älter als zwei Wochen), siehe Abb. 1.

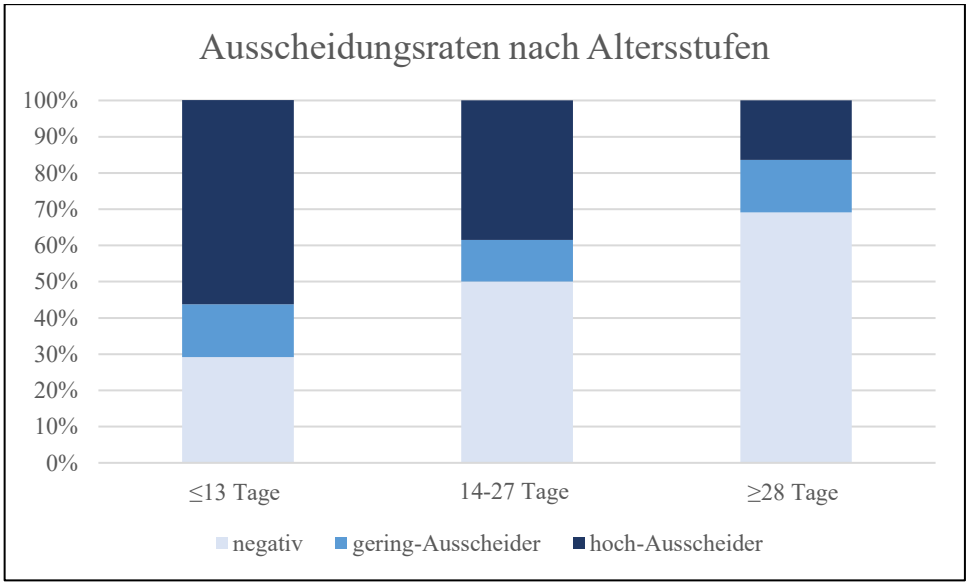

Abb. 1, Oozysten-Ausscheidung kategorisiert in drei Altersgruppen: ≤13 Tage (n=96), 14–27 Tage (n=26) und ≥28 Tage (n=55). Ergebnisse eingeteilt in: negativ (keine Oozysten in der Phasenkontrastmikroskopie nachweisbar), geringe Ausscheidung (≤10000 opg) und hohe Ausscheidung (>10000 opg).

3.2 SCHNELLTESTS

In der Feldstudie (n=177) wurden 83 Proben (46,9 %) positiv und 94 (53,1 %) negativ getestet. Bei der zweiten Durchführung der Schnelltests (n=130) waren 69 Kotproben (53,0 %) positiv und 61 (47,0 %) negativ.

Von den 130 Proben, die sowohl im Feld- als auch im Labordurchgang getestet wurden, wiesen 124 (95,4 %) in beiden Durchgängen das selbe Ergebnis auf, 6 Kotproben (4,6 %) zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Daraus berechnet sich ein Cohen‘s Kappa von 0,91 für die Übereinstimmung der beiden Schnelltestdurchgänge.

3.3 PCR

Von allen Mikroskopie-positiven Proben (n=98) wurde eine gp60–PCR durchgeführt. Dabei zeigten 67 (68,4 %) ein positives und 31 (31,6 %) ein negatives Ergebnis.

Von diesen 31 gp60-negativen Proben wurde eine 18S-PCR durchgeführt, welche bei 11 Proben (35,5 %) positiv und bei 20 Proben (64,5 %) negativ ausfiel.

Mikroskopie-negative Proben (n=79) wurden mit der 18S-PCR gescreent. Die PCR ergab in 15 Proben (19,0 %) ein positives und in 64 Proben (81,0 %) ein negatives Ergebnis.

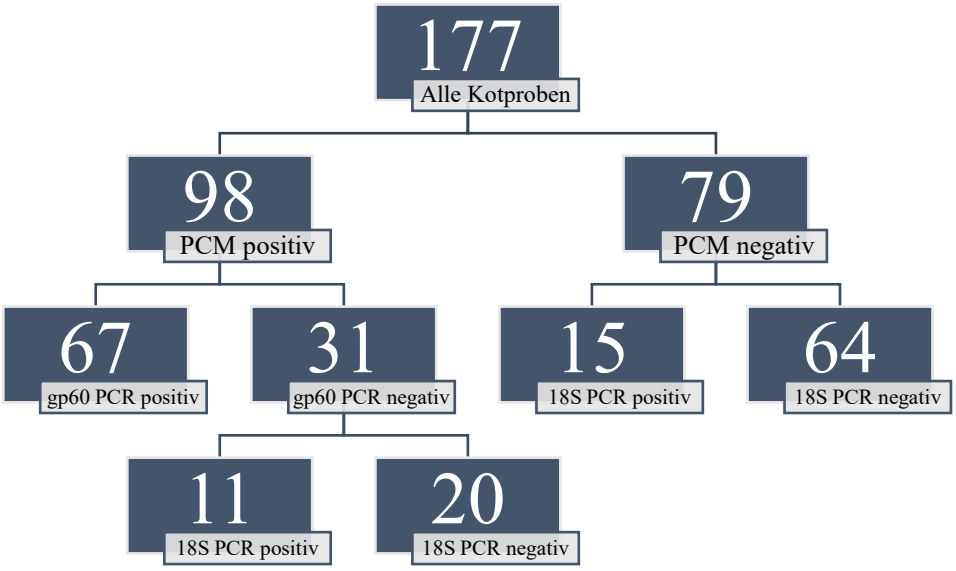

Abb. 2, Einteilung der Ergebnisse der PCM, gp60-PCR und 18S-PCR aller 177 Kotproben

Jene Proben, die in der PCM positiv waren, jedoch sowohl in der gp60-PCR als auch in der18S-PCR ein negatives Ergebnis zeigten (n=20), wurden erneut mit der 18S-PCR gescreent. Auch beim zweiten Durchlauf wiesen alle 20 Proben ein negatives Ergebnis auf.

3.4 SPEZIESDIFFERENZIERUNG

Insgesamt wurden 93 DNA-Produkte zur Sequenzierung geschickt und dabei 73 (79,3 %) als *C. parvum*, acht (8,7 %) als *C. bovis* und elf (12 %) als *C. ryanae* detektiert. Eine Probe konnte nicht erfolgreich sequenziert werden.

Bei der Subtypisierung der als *C. parvum* detektierten Proben wurden vier Subtypen festgestellt, alle der Familie IIa zugehörig. Der am häufigsten gefundene Subtyp war IIaA15G2R1 (n=52), gefolgt von IIaA14G1R1 (n=5), IIaA21G2R1 (n=4) und IIaA19G2R1 (n=4).

Die Sequenzen der Kryptosporidienspezies dieser Studie sind in der GenBank (National Center for Biotechnology Information) mit der accession number MT611069–MT611099 (für 18S-Sequenzen) und MT637080- MT637083 (für gp60-Sequenzen) abrufbar (nach erfolgreicher Publikation; Status: accepted).

In Altersgruppen eingeteilt zeigt sich, dass ein Zusammenhang der vorkommenden Kryptosporidienspezies und des Alters der Kälber besteht, siehe Abb. 3.

C. parvum wurde vor allem bei jungen Tieren detektiert, das älteste Kalb war 127 Tage alt. 84 % der *C. parvum*-positiven Kälber waren ≤ 14 Tage bzw. 92 % waren ≤ 28 Tage alt.
C. ryanae konnte bei 11 Tieren nachgewiesen werden, davon waren 91 % >14 Tage bzw. 64 % > 28 Tage alt.
C. bovis wurde in 8 Kotproben bestätigt, wovon 89 % ≥ 28 Tage bzw. 63 % ≥ 60 Tage alt waren.

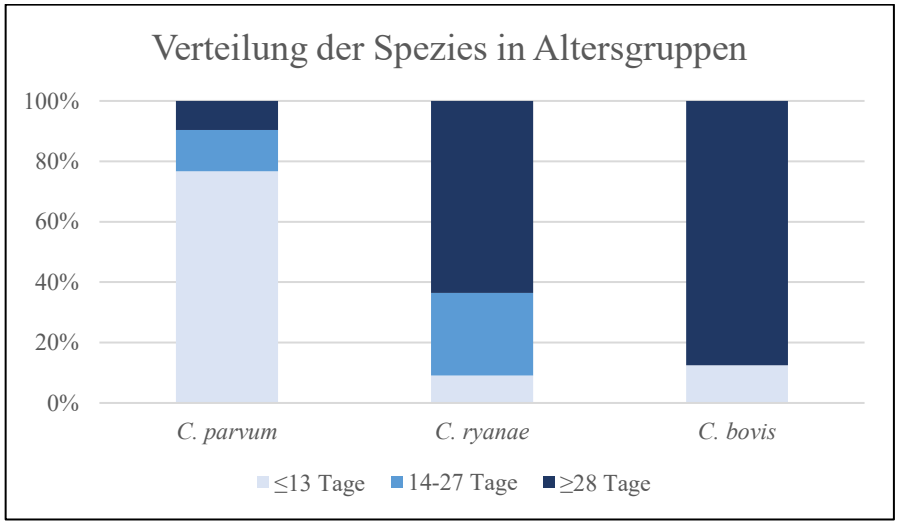

Abb. 3, Verteilung der nachgewiesenen Krpytosporidienspezies *C. parvum* (n=73), *C. ryanae* (n=11) und *C. bovis* (n=8), eingeteilt in 3 Altersgruppen (≤13 Tage; 14–27 Tage; ≥28 Tage)

Abb. 4 visualisiert die Ausscheidungsraten nach Spezies. Es zeigt sich, dass *C. parvum* die höchste Ausscheidungsrate aufweist mit einem Mittelwert von 1677814 opg und einem Median von 411500 opg. Für *C.ryane* berechnet sich ein Mittelwert von 11250 opg und ein Median von 10000 opg, *C. bovis* weist einen Mittelwert von 13333 opg und einen Median von 10000 opg auf. Diese Berechnungen erfolgten durch die Auswertung von PCM-positiven Proben.

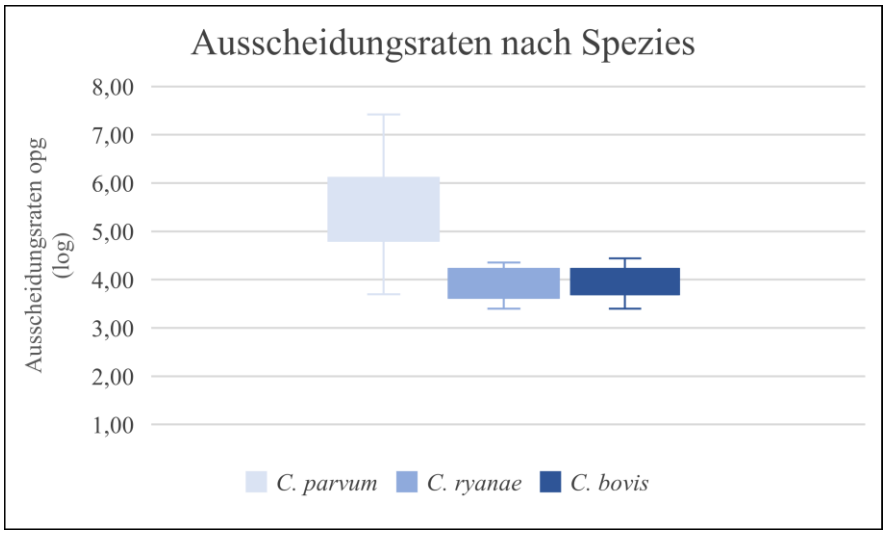

Abb. 4, Ausscheidungsraten (Logarithmus der ausgeschiedenen Oozysten pro Gramm Kot) von Kryptosporidienoozysten, kategorisiert in *C. parvum* (n=70), *C. ryanae* (n=4), *C. bovis* (n=3), wobei lediglich PCM-positive Proben berücksichtigt wurden

3.5 Validitätskriterien des Schnelltests

Die Berechnungen der Validitätskriterien für den kommerziellen Schnelltest ergeben folgende Ergebnisse:

Die Sensitivität berechnet sich mit 77,6 % für den ersten Durchgang (Feld) und 82,9 % für den zweiten Durchgang (Labor), die Spezifität beträgt 91,1 % (Feld) bzw. 88,9 % (Labor).

Es ergibt sich ein Negativer Prädiktiver Wert von 76,6 % (Feld) bzw. 78,7 % (Labor) und ein Positiver Prädiktiver Wert von 91,6 % (Feld) bzw. 91,3 % (Labor).

Die prozentuale Übereinstimmung zur Referenzmethode (PCM) liegt bei 83,6 % (Feld) bzw. 85,4 % (Labor), der Cohen‘s Kappa bei 0,67 (Feld) und 0,71 (Labor).

Tab. 3, Validitätskriterien des eingesetzten Schnelltests, jeweils für den ersten Durchgang (Feld) und den zweiten Durchgang (Labor). SE=Sensitivität, SP=Spezifität, NPW=negativer prädiktiver Wert, PPW=positiver prädiktiver Wert, κ=Cohen's Kappa, Übereinstimmung=prozentuale Übereinstimmung zur Referenzmethode (PCM)

	SE (%)	SP (%)	NPW (%)	PPW (%)	κ	Übereinstimmung (%)
Feld	77,6	91,1	76,6	91,6	0,67	83,6
Labor	82,9	88,9	78,7	91,3	0,71	85,4

3.6 Übereinstimmung der Nachweismethoden

Abb. 5 zeigt die Übereinstimmung der drei verschiedenen Nachweismethoden, wobei ausschließlich jene Proben berücksichtigt wurden, welche in der Mikroskopie ein positives Ergebnis zeigten und mit der gp60-PCR gescreent wurden. Für den Schnelltest wurde der Feldversuch herangezogen. Es ist feststellbar, dass 66 (67,35 %) von 98 Proben in allen drei Nachweismethoden das selbe Ergebnis aufweisen.

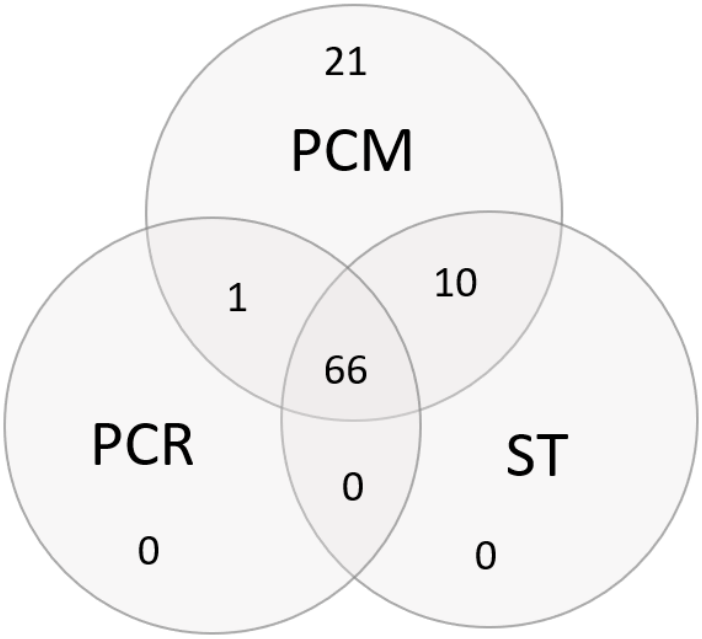

Abb. 5, Übereinstimmung der verschiedenen Nachweismethoden, wobei alle Proben berücksichtig wurden, die in der Mikroskopie positiv waren; PCM (Phasenkontrastmikroskopie), PCR (gp60 PCR), ST (Schnelltest, Felddurchgang)

Tab. 4 stellt eine Übersicht über alle durchgeführten Proben der verschiedenen Nachweismethoden dar. Dabei sind die Anzahl aller positiven, negativen und nicht durchgeführten Proben der verschiedenen Methoden angegeben, kategorisiert nach Kryptosporidienspezies.

Tab. 4, Anzahl der positiven (pos.), negativen (neg.) und nicht durchgeführten (n.d.) Proben aller Nachweismethoden, aufgeteilt in Kryptosporidienspezies *C. parvum* (n=73), *C. ryanae* (n=11), *C. bovis* (n=8)

Spezies	**PCM**			**PCR gp60**			**PCR 18S**			**ST (Feld)**			**ST (Labor)**		
	pos.	neg.	n.d.	pos.	neg.	n.d.	pos.	neg.	n.d.	pos.	neg.	n.d.	pos.	neg.	n.d.
C. parvum	70	3	0	67	3	3	14	1	58	69	4	0	57	2	14
C. ryanae	4	7	0	0	4	7	11	0	0	3	8	0	2	5	4
C. bovis	3	5	0	0	3	5	8	0	0	1	7	0	0	7	1

Tab. 5 zeigt die Übereinstimmung der drei Nachweismethoden anhand der Berechnung des Cohen`s Kappas.

Tab. 5, Übereinstimmung der verschiedenen Nachweismethoden anhand der Berechnung des Cohen‘s Kappas. PCM = Phasenkontrastmikroskopie, ST = Schnelltest (Feldversuch), PCR (18S-Lokus), Anzahl n = Anzahl der für die Berechnung verwendeten Proben

Zu vergleichende Methoden	Berechneter Cohen‘s Kappa	Anzahl n
PCM + 18S-PCR	0,24	117
PCM + ST (Feld)	0,67	177
18S-PCR + ST (Feld)	0,35	117

4 DISKUSSION

4.1 NACHGEWIESENE SPEZIES

In dieser Studie wurden drei verschiedene Kryptosporidienspezies (*C. parvum*, *C. bovis* und *C. ryanae*) nachgewiesen, wobei *C. parvum* die dominierende Spezies war.

Es lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und der vorkommenden Spezies beobachten, *C. parvum* (n=73) wurde hauptsächlich bei jungen Kälbern nachgewiesen, *C. ryanae* (n=11) und *C. bovis* (n=8) hingegen bei älteren Tieren. Auch in vorangegangenen Studien zeigte sich dieser Zusammenhang. *C. parvum* ist vor allem bei Milchkälbern und selten bei älteren Tieren zu finden. *C. bovis, C. ryanae* und *C. andersoni* sind hingegen für Infektionen bei abgesetzten Kälbern verantwortlich (Fayer et al. 2006, La Fuente et al. 1999, Santín et al. 2004).

In den Ausscheidungsraten war ein Unterschied zwischen den Kryptosporidienspezies feststellbar. Die höchsten Raten ergaben sich bei *C. parvum*, gefolgt von *C. bovis* und *C. ryanae*. Da die Anzahl der Proben für *C. bovis* (n=8) und *C. ryanae* (n=11) gering war, wurden die Ergebnisse lediglich deskriptiv ausgewertet.

Bei der Subtypisierung von *C. parvum* wurden vier verschiedene Subtypen detektiert: IIaA15G2R1 (n=52), IIaA14G1R (n=5), IIaA21G2R1 (n=4), und IIaA19G2R1 (n=4). Der weltweit am häufigsten bei Kälbern vorkommende Subtyp von *C. parvum* IIaA15G2R1 wurde auch in dieser Studie als dominierender Subtyp identifiziert (Feng et al. 2018, Holzhausen et al. 2019).

4.2 SCHNELLTEST

Für den eingesetzten Schnelltest wurde eine Sensitivität von 77,6 % (erster Durchgang) bzw. 82,9 % (zweiter Durchgang) und eine Spezifität von 91,1 % bzw. 88,9 % ermittelt. Ähnliche Ergebnisse mit Sensitivitäten von 75 %-100 % und Spezifitäten von 94,6 %-100 % sind auch

in vorangegangenen Studien für denselben oder vergleichbare Schnelltests zu finden (Cho et al. 2012, Klein et al. 2009, Papini et al. 2018). Aufgrund der einfachen Handhabung, der Schnelligkeit und der geringen Kosten sind derartige kommerziell erhältliche Schnelltests als praxistauglich zu bewerten. Die in dieser Studie errechneten Validitätskriterien (SE 77,6 % bzw. 82,9 %, SP 91,1 % bzw. 88,9 %, NPW 76,6 % bzw. 78,7 %, PPW 91,6 % bzw. 91,3 %, Cohen‘s Kappa 0,67 bzw. 0,71, prozentuale Übereinstimmung 83,6 % bzw. 85,4 %) sind als hoch anzusehen. Aus klinischer Sicht ist die PCM die relevanteste Methode, da inaktive Oozysten nachgewiesen werden, weshalb diese als Referenzmethode für die Berechnungen Verwendung fand.

Der Hersteller des eingesetzten Schnelltests gibt an, dass der Test hoch spezifisch *C. parvum* nachweist. In dieser Studie ergab der Test jedoch bei drei Proben, welche als *C. ryanae* identifiziert wurden, und bei einer Probe, welche *C. bovis* positiv war, ein positives Ergebnis. Dies kann einerseits auf eine Kreuzreaktion der bei den Schnelltests eingesetzten *C. parvum*-Antikörper auf *C. bovis*- und *C. ryanae*-Antigene zurückzuführen sein. Eine solche Kreuzreaktion wurde bereits beschrieben und kann auch in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden (Ayinmode und Fagbemi 2011). Andererseits kann auch das gemeinsame Vorkommen von *C. parvum* und *C. bovis* bzw. *C. ryanae* in diesen Proben nicht ausgeschlossen werden. Zu geringe Konzentrationen von *C. parvum*-Oozysten oder überlagerte DNA-Sequenzen können als Erklärung für ein negatives *C. parvum*-Ergebnis beim Mikroskopie- bzw. PCR-Nachweisverfahren herangezogen werden.

4.3 Übereinstimmung der Nachweismethoden

In 21 Kotproben wurden Oozysten in der Phasenkontrastmikroskopie nachgewiesen, sowohl die 18S-PCR als auch die gp60-PCR zeigten jedoch ein negatives Ergebnis. Auch die Wiederholungsuntersuchungen mittels 18S-PCR waren negativ. Gründe für ein falsch negatives PCR-Ergebnis können PCR-Inhibitoren im Kälberkot oder nicht ausreichende Qualität der eingesetzten PCR-Produkte sein (Taha et al. 2017, Thornton und Passen 2004). Ein falsch positives Ergebnis in der mikroskopischen Untersuchung kann hingegen durch die

Erfassung morphologisch ähnlicher Strukturen wie zum Beispiel Hefesporen zustande kommen (Taha et al. 2017).

In 15 Proben sind in der Phasenkontrastmikroskopie keine Oozysten nachgewiesen worden, die 18S-PCR lieferte allerdings ein positives Ergebnis. Bei sieben Kotproben, welche PCM negativ waren, zeigte der Schnelltest im Feldversuch ein positives Ergebnis. Falsch negative PCM-Ergebnisse ergeben sich unter anderem durch zu geringe Oozystenkonzentrationen in den Proben oder nicht mehr intakte Oozysten. Diese können mittels PCM nicht erfasst werden, jedoch durch die PCR oder den Schnelltest, da hier lediglich DNA bzw. Antigene für ein positives Ergebnis erforderlich sind. Dadurch kann die PCR als sensitivere Methode gegenüber der PCM angesehen werden (Jiang et al. 2005, Morgan et al. 1998, Uppal et al. 2014).

Die Übereinstimmung der Methoden in dieser Studie ist als mäßig gut anzusehen. Die berechneten Cohen‘s Kappa liegen bei 0,24 für PCM und 18S-PCR, bei 0,67 für PCM und Schnelltest und bei 0,35 für 18S-PCR und Schnelltest.

4.4 LIMITATIONEN

Die Beurteilung der Übereinstimmung der unterschiedlichen Nachweismethoden ist in dieser Studie limitiert, da nicht alle 177 Kotproben mit allen Nachweismethoden gleichermaßen gescreent wurden. Die gp60-PCR wurde lediglich von Proben durchgeführt, welche in der Phasenkontrasmikroskopie positiv waren und die 18S-PCR wurde nicht von gp60-PCR-positiven Proben durchgeführt. Aufgrund dessen ist auch die Aussagekraft über die gefundenen Kryptosporidienspezies beschränkt, das Auftreten von mehr als einer Spezies in einer Kotprobe kann nicht ausgeschlossen werden.

4.5 CONCLUSIO

Trotz der genannten Limitationen und Schwächen dieser Studie, konnte gezeigt werden, dass die drei verschiedenen Nachweismethoden eine mäßig (PCM und 18S-PCR, Schnelltest und 18S-PCR) bis gute (PCM und Schnelltest) Übereinstimmung aufweisen. Sowohl die Hypothese, dass der eingesetzte Schnelltest Kryptosporidien mit einer hohen Sensitivität und hohen Spezifität nachweißt, als auch die Hypothese, dass neben *C. parvum* noch weitere Kryptosporidienspezies in jungen Kälbern mit Durchfall vorkommen, wurden bestätigt.

Wie in vorangegangenen Arbeiten zeigte sich auch in dieser Studie, dass die PCR als sensitivere Methode gegenüber der Mikroskopie anzusehen ist. Die Spezies- und Subtypenbestimmung ist lediglich mithilfe der PCR und anschließender Sequenzierung möglich (Jiang et al. 2005, Morgan et al. 1998, Uppal et al. 2014).

Obwohl bereits Publikationen zum Vergleich von Nachweismethoden für Kryptosporidien und zum Vorkommen verschiedener Kryptosporidienspezies- und subtypen veröffentlicht wurden, wären Folgestudien bedeutsam, da Kryptosporidien als Zoonoseerreger für den Menschen von Bedeutung sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziele dieser Arbeit waren, Nachweismethoden für Kryptosporidien in Kälberkot zu validieren und die Übereinstimmung dieser zu überprüfen, sowie Kryptosporidienspezies in an Durchfall erkrankten Kälbern zu identifizieren.

Kotproben wurden direkt aus dem Rektum von an Durchfall erkrankten Kälbern gezogen.

Es kamen drei Testsysteme zum Einsatz (Phasenkontrastmikroskopie, Schnelltest, PCR), als Referenzmethode galt die Mikroskopie.

Zwei Durchgänge mit einem kommerziell erhältlichem Schnelltest zum Nachweis von *Cryptosporidium parvum* wurden durchgeführt und zwei PCR-Protokolle etabliert, einerseits zum spezifischen Nachweis von *Cryptosporidium parvum* (gp60 Lokus) und andererseits zum Nachweis von *Cryptosporidium* spp. (18S rDNA). Die PCR-Produkte der positiven Proben wurden sequenziert.

In der Phasenkontrastmikroskopie wurden in 55,4 % der Proben Oozysten nachgewiesen,

mithilfe des Schnelltests wurden im ersten Durchgang (n=177) 46,9 % und im zweiten Durchgang (n=130) 53,0 % positiv getestet.

Die Validitätskriterien für den eingesetzten Schnelltest ergaben eine Sensitivität von 77,6 % (erster Durchgang) bzw. 82,9 % (zweiter Durchgang), eine Spezifität von 91,1 % bzw. 88,9 %, einen negativen prädiktiven Wert von 76,6 % bzw. 78,7 %, einen positiven prädiktiven Wert von 91,6 % bzw. 91,3 %, eine prozentuale Übereinstimmung zur Referenzmethode von 83,6 % bzw. 85,4 % und einen Cohen‘s Kappa von 0,67 bzw. 0,71.

Von allen Mikroskopie-positiven Proben (n=98) wurde eine gp60–PCR durchgeführt. Dabei zeigten 68,4 % ein positives Ergebnis, die 31 negativen Proben wurden weiters mittels 18S-PCR gescreent, welche in 32,3 % ein positives Ergebnis lieferte.

Von den Mikrospie-negativen Proben (n=79) wurde eine 18S-PCR durchgeführt, diese ergab bei 19,0 % ein positives Ergebnis.

Insgesamt wurden 93 DNA–Produkte sequenziert und davon 79,3 % als *Cryptosporidium parvum*, 8,7 % als *Cryptosporidium bovis* und 12 % als *Cryptosporidium ryanae* bestätigt. Bei der Subtypisierung von *Cryptosporidum parvum* wurden vier Subtypen (IIaA15G2R1, IIaA14G1R, IIaA21G2R1, IIaA19G2R1) detektiert.

Berechnungen zur Übereinstimmung der Methoden ergaben einen Cohen‘s Kappa von 0,24 für Phasenkontrastmikroskopie und 18S-PCR, 0,67 für Phasenkontrastmikroskopie und Schnelltest und 0,35 für 18S-PCR und Schnelltest.

Es konnten hohe Validitätskriterien für den kommerziellen Schnelltest festgestellt werden.

Außerdem wurde bestätigt, dass neben *Crpytosporidium parvum* auch *Cryptosporidium bovis* und *Crytposporidium ryanae* bei jungen Kälbern mit Durchfall vorkommen, es besteht allerdings ein Zusammenhang zwischen der vorkommenden Spezies und dem Alter der Tiere.

Die Übereinstimmung der verschiedenen Nachweismethoden ist als mäßig gut zu bewerten, die PCR kann als sensitivere Methode gegenüber der Phasenkontrastmikroskopie angesehen werden.

6 SUMMARY

The aim of this study was to compare and evaluate different detection methods for *Cryptosporidium* in faecal samples of calves and to further characterize the *Cryptosporidia* on a species level.

Faecal specimens were collected per rectum of diarrhoic calves. Three detection methods were implemented: Phase contrast microscopy, a commercial immunochromatographic point of care test and PCR. Microscopy was used as the reference method, the point of care test was carried out twice (in the field and following freezing-thrawing in the lab). Two different protocols for PCR were performed, for the detection of *Cryptosporidium* spp. (18S locus) and for the detection of *Cryptosporidium parvum* (gp60 locus). PCR-products of positive samples were analysed by DNA-sequencing.

Upon examination with phase contrast microscopy 55.4 % of the samples were positive for *Cryptosporidium* oocysts. In the field the point of care test showed positive results in 46.9 % (n=177) of the analyzed samples. In the laboratory the test yielded positive results in 53.0 % (n=130).

Calculation of validity criteria showed a sensitivity of 77.6 % (field study) and 82.9 % (lab), a specifity of 91.1 % and 88.9 %, respectively, a negative predictive value of 76.6 % and 78.7 %, a positive predictive value of 91.6 % and 91.3 %, respectively. Percentage of agreement between point of care test and phase contrast microscopy was 83.6 % and 85.4 % and Cohen‘s Kappa coefficient yielded 0.67 and 0.71, respectively.

Samples tested positive using phase contrast microscopy were screened with gp60-PCR (n=98), where 68.4 % showed a positive result. Thirty-one specimens were further screened with 18S-PCR, where 32.3 % were positive. Samples tested negative with phase contrast microscopy were screened with 18S-PCR (n=79), where 19.0 % were tested positive.

DNA-products (n=93) were sent to another laboratory for DNA-sequencing. 79.3 % were identified as *Cryptosporidium parvum*, 8.7 % as *Cryptosporidiumm bovis* and 12.0 % as *Cryptosporidium ryanae*. Subtyping of *Cryptosporidium parvum* showed four different subtypes (IIaA15G2R1, IIaA14G1R, IIaA21G2R1, IIaA19G2R1).

The agreement between different detection methods was calculated with Cohen‘s Kappa coefficient and yielded 0.24 for phase contrast microscopy and 18S-PCR, 0.67 for phase contrast microscopy and point of care test and 0.35 for 18S-PCR and point of care test.

Validation of the point of care test showed good results. With PCR it was confirmed that besides *Cryptosporidium parvum* also *Cryptosporidium ryanae* and *Cryptosporidium bovis* can be found in diarrhoic calves.

Agreement between different detection methods showed rather poor results, PCR can be stated to be more sensitive than phase contrast microscopy.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NPW	negativer prädiktiver Wert
opg	Oozysten pro Gramm
PCM	Phasenkontrastmikroskopie
PPW	positiver prädiktiver Wert
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rpm	rounds per minute
SAF	sodium acetat formalin
SE	Sensitivität
SP	Spezifität
ST	Schnelltest
ZN	Ziehl-Neelson

8 LITERATURÜBERSICHT

Altman DG. 1999. Practical statistics for medical research. Boca Raton, Fla: Chapman & Hall/CRC, 611.

Avendaño C, Ramo A, Vergara-Castiblanco C, Sánchez-Acedo C, Quílez J. 2018. Genetic uniqueness of *Cryptosporidium parvum* from dairy calves in Colombia. Parasitology Research, 117 (5): 1317–1323. DOI 10.1007/s00436-018-5818-6.

Ayinmode AB, Fagbemi BO. 2011. Cross-reactivity of some *Cryptosporidium* species with *Cryptosporidium parvum* coproantigen in a commercial ELISA kit. Nigerian Veterinary Journal, 32 (1): 1–4. DOI 10.4314/nvj.v32i1.69004.

Broglia A, Reckinger S, Cacció SM, Nöckler K. 2008. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. Veterinary Parasitology, 154 (1): 8–13. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.02.029.

Cacciò SM, Chalmers RM. 2016. Human cryptosporidiosis in Europe. Clinical Microbiology and Infection, 22 (6): 471–480. DOI 10.1016/j.cmi.2016.04.021.

Cai M, Guo Y, Pan B, Li N, Wang X, Tang C, Feng Y, XIAO L. 2017. Longitudinal monitoring of *Cryptosporidium* species in pre-weaned dairy calves on five farms in Shanghai, China. Veterinary Parasitology, 241: 14–19. DOI 10.1016/j.vetpar.2017.05.005.

Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. Journal of Clinical Pathology, 38 (12): 1337. DOI 10.1136/jcp.38.12.1337.

Cho Y-I, Sun D, Cooper V, Dewell G, Schwartz K, Yoon K-J. 2012. Evaluation of a commercial rapid test kit for detecting bovine enteric pathogens in feces. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 24 (3): 559–562. DOI 10.1177/1040638712440997.

Cho Y-I, Yoon K-J. 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. Journal of veterinary science, 15 (PMID: 24378583 Version:1). DOI 10.4142/jvs.2014.15.1.1.

Clark DP, Sears CL. 1996. The pathogenesis of cryptosporidiosis. Parasitology Today, 12 (6): 221–225. DOI 10.1016/0169-4758(96)10018-1.

Delafosse A, Chartier C, Dupuy MC, Dumoulin M, Pors I, Paraud C. 2015. *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in western France. Preventive Veterinary Medicine, 118 (4): 406–412. DOI 10.1016/j.prevetmed.2015.01.005.

Díaz P, Varcasia A, Pipia AP, Tamponi C, Sanna G, Prieto A, Ruiu A, Spissu P, Díez-Baños P, Morrondo P, Scala A. 2018. Molecular characterisation and risk factor analysis of *Cryptosporidium spp*. in calves from Italy. Parasitology Research, 117 (10): 3081–3090. DOI 10.1007/s00436-018-6000-x.

Dirksen G, Baumgartner W, Hrsg. 2006. Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. Fünfte. Aufl., unveränd. Nachdr. der Vierte. Aufl. Stuttgart: Parey, 1325.

Eckert J. 2008. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 112 Tabellen. Zweite., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Enke, 632.

Fayer R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Experimental Parasitology, 124 (1): 90–97. DOI 10.1016/j.exppara.2009.03.005.

Fayer R, Graczyk TK, Cranfield MR, Trout JM. 1996. Gaseous disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Applied and Environmental Microbiology, 62 (10): 3908.

Fayer R, Santín M, Trout JM, Greiner E. 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1–2-year-old dairy cattle in the eastern United States. Veterinary Parasitology, 135 (2): 105–112. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.08.003.

Feng Y, Ryan UM, XIAO L. 2018. Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. Trends in Parasitology, 34 (11): 997–1011. DOI 10.1016/j.pt.2018.07.009.

Hassl A, Benyr G, Sommer R. 2001. Occurrence of *Cryptosporidium sp*. oocysts in fecal and water samples in Austria. Acta Tropica, 80 (2): 145–149. DOI 10.1016/S0001-706X(01)00169-3.

Holzhausen I, Lendner M, Göhring F, Steinhöfel I, Daugschies A. 2019. Distribution of *Cryptosporidium parvum* gp60 subtypes in calf herds of Saxony, Germany. Parasitology Research, 118 (5): 1549–1558. DOI 10.1007/s00436-019-06266-1.

Jiang J, Alderisio KA, XIAO L. 2005. Distribution of *Cryptosporidium* Genotypes in Storm Event Water Samples from Three Watersheds in New York. Applied and Environmental Microbiology, 71 (8): 4446. DOI 10.1128/AEM.71.8.4446-4454.2005.

Joachim A, Krull T, Schwarzkopf J, Daugschies A. 2003. Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. Veterinary Parasitology, 112 (4): 277–288. DOI 10.1016/S0304-4017(03)00006-2.

Kenzie et al. 1994. A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted through the Public Water Supply.

Khurana S, Chaudhary P. 2018. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. Tropical parasitology, 8 (1): 2–7. DOI 10.4103/tp.TP_34_17.

Klein D, Kern A, Lapan G, Benetka V, Möstl K, Hassl A, Baumgartner W. 2009. Evaluation of rapid assays for the detection of bovine coronavirus, rotavirus A and *Cryptosporidium parvum* in faecal samples of calves. The Veterinary Journal, 182 (3): 484–486. DOI 10.1016/j.tvjl.2008.07.016.

La Fuente R de, Luzón M, Ruiz-Santa-Quiteria JA, García A, Cid D, Orden JA, García S, Sanz R, Gómez-Bautista M. 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enterophatogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. Veterinary Parasitology, 80 (3): 179–185. DOI 10.1016/S0304-4017(98)00218-0.

Lefay D, Naciri M, Poirier P, Chermette R. 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. Veterinary Parasitology, 89 (1): 1–9. DOI 10.1016/S0304-4017(99)00230-7.

Lichtmannsperger K, Hinney B, Joachim A, Wittek T. 2019. Molecular characterization of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* from calves with diarrhoea in Austria and evaluation of point-of-care tests. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 66: 101333. DOI 10.1016/j.cimid.2019.101333.

Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RCA. 1998. Comparison of PCR and Microscopy for Detection of *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens: Clinical Trial. Journal of Clinical Microbiology, 36 (4): 995. DOI 10.1128/JCM.36.4.995-998.1998.

Papini R, Bonelli F, Montagnani M, Sgorbini M. 2018. Evaluation of three commercial rapid kits to detect *Cryptosporidium parvum* in diarrhoeic calf stool. Italian Journal of Animal Science, 17 (4): 1059–1064. DOI 10.1080/1828051X.2018.1452055.

Peng MM, Matos O, Gatei W, Das P, Stantic-Pavlinic M, Bern C, Sulaiman I. M., Glaberman S., Lal A. A., XIAO L. 2001. A Comparison of *Cryptosporidium* Subgenotypes from Several Geographic Regions.

Quilez J, Torres E, Chalmers RM, Robinson G, Del Cacho E, Sanchez-Acedo C. 2008. *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. Parasitology, 135 (14): 1613–1620. DOI 10.1017/S0031182008005088.

Razakandrainibe R, Diawara EHI, Costa D, Le Goff L, Lemeteil D, Ballet JJ, Gargala G, Favennec L. 2018. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic calves in France. PLOS Neglected Tropical Diseases, 12 (3): e0006355. DOI 10.1371/journal.pntd.0006355.

Ryan Una, Fayer R, XIAO L. 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. Parasitology, 141 (13): 1667–1685. DOI 10.1017/S0031182014001085.

Santín M, Trout JM, XIAO L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. Veterinary Parasitology, 122 (2): 103–117. DOI 10.1016/j.vetpar.2004.03.020.

Silverlås C, Emanuelson U, Verdier K de, Björkman C. 2009. Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. Preventive Veterinary Medicine, 90 (3): 242–253. DOI 10.1016/j.prevetmed.2009.04.006.

Taha S, Elmalik K, Bangoura B, Lendner M, Mossaad E, Daugschies A. 2017. Molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* isolated from diarrheic calves in the Sudan. Parasitology Research, 116 (11): 2971–2979. DOI 10.1007/s00436-017-5606-8.

Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, Katzer F, Mabbott NA, Morrison LJ, Innes EA. 2017. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. Veterinary research, 48 (1): 42. DOI 10.1186/s13567-017-0447-0.

Thornton CG, Passen S. 2004. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. Journal of Microbiological Methods, 59 (1): 43–52. DOI 10.1016/j.mimet.2004.06.001.

Thrusfield MV. 2007. Veterinary epidemiology. Dritte. ed., reissued in paperback with updates. Oxford: Blackwell Science, 610.

Trotz-Williams LA, Jarvie BD, Martin SW, Leslie KE, Peregrine AS. 2005. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne, 46 (4): 349–351. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15943123.

Uppal B, Singh O, Chadha S, Jha AK, Choochote W. 2014. A Comparison of Nested PCR Assay with Conventional Techniques for Diagnosis of Intestinal Cryptosporidiosis in AIDS Cases from Northern India. Journal of Parasitology Research, 2014: 706105. DOI 10.1155/2014/706105.

9 ABBILDUNGS-/TABELLENVERZEICHNIS

9.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1, Oozysten-Ausscheidung kategorisiert in drei Altersgruppen 15
Abb. 2, Einteilung der Ergebnisse der PCM, gp60-PCR und 18S-PCR 17
Abb. 4, Ausscheidungsraten von Kryptosporidienoozysten, kategorisiert in C. parvum, C. ryanae, C. bovis 19
Abb. 5, Übereinstimmung der verschiednen Nachweismethoden 20

9.2 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1, eingesetzte Primer für das gp60 PCR-Protokoll zum Nachweis von C. parvum 12
Tab. 2, eingesetzte Primer für das 18S PCR-Protokoll zum Nachweis von Cryptosporidium spp. 12
Tab. 3, Validitätskriterien des eingesetzten Schnelltests 20
Tab. 4, Anzahl der Proben aller Nachweismethoden, aufgeteilt in Kryptosporidienspezies ... 21
Tab. 5, Übereinstimmung der verschiedenen Nachweismethoden 21

Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die mich während meines Studiums und bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben, bedanken.

Mein Dank gebührt meinen betreuenden Professoren/Professorinnen und Assistentinnen, allen voran Dr.med.vet. Katharina Lichtmannsperger und Univ.-Prof. Dr.med.vet. Thomas Wittek, Diplomate ECBHM.

Für die immerwährende Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanke ich mich vor allem bei meiner Familie, sowie auch bei meinen Freunden und Mitbewohnern.