



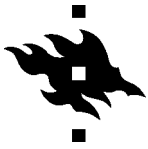
***Giardia-* ja *Cryptosporidium-* alkueläinten
esiintyminen suuressa koiratarhassa**

Annukka Sulonen

Lisensiaatin tutkielma
Helsingin yliopisto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Elintarvike- ja ympäristöhygienian laitos
Ympäristöhygienian
2009



Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Laitos - Institution – Department Elintarvike- ja ympäristöhygienian laitos	
Tekijä - Författare – Author Annukka Eveliina Sulonen			
Työn nimi - Arbetets titel – Title <i>Giardia</i> - ja <i>Cryptosporidium</i> -alkueläinten esiintyminen suuressa koiratarhassa			
Oppiaine - Läroämne – Subject Ympäristöhygienia			
Työn laji - Arbetets art – Lisensiaatin tutkimus		Aika - Datum – Month and 26.3.2009	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages 32
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p><i>Giardia</i> ja <i>Cryptosporidium</i> ovat alkueläimiä, jotka voivat elää monissa eläimissä sekä ihmisissä suolistolisena. <i>Giardia</i>- ja <i>Cryptosporidium</i>-tartunta tapahtuu ihmisillä tyypillisimmin saastuneen veden välityksellä. Tartunnan voi saada myös suoraan toisesta ihmisestä tai eläimestä sekä saastuneen ruoan välityksellä. <i>Giardia</i>- ja <i>Cryptosporidium</i>-alkueläimiä on pidetty zoonoottisena parasiittina, mutta zoonoottisuudesta ei ole olemassa varmaa ja todistettua tietoa. Risti-infektio-kokeissa on osoitettu, että osa <i>Giardia</i>-lajeista on isäntälajispesifisiä ja osa pystyy tartuttamaan useita lajeja.</p> <p><i>Giardia</i>-alkueläimen elinkierto on kaksivaiheinen: trofotsoittivaihe ja kystavaihe. Kystavaihe on infektiivinen vaihe, jossa kystat kulkeutuvat ulosteiden mukana ulos isäntälajista ja joutuvat uuteen isäntään tämän syödessä kystia. Kystistä vapautuu suolistossa trofotsoiitteja. <i>Cryptosporidium</i>-alkueläimen elinkierto on monimutkaisempi. <i>Cryptosporidium</i>-alkueläimen infektiivinen muoto on ookysta. Isäntälaji saa <i>Cryptosporidium</i>-tartunnan syömällä infektioituneen ookystan tai kontaminoituneen veden välityksellä</p> <p>Koirilla <i>Giardia</i>-tartunta on usein oireeton, mutta se voi aiheuttaa akuuttia tai kroonista ripulia ja painonmenetystä. Ripuli on tyypillisesti ohutsuoliperäistä. Koirilla ei usein esiinny kliinisiä oireita <i>Cryptosporidium</i>-tartunnasta. <i>Giardia</i>- ja <i>Cryptosporidium</i>-alkueläinten esiintymistä on maailmalla tutkittu paljon sekä kennelolosuhteissa että yksittäisillä lemmikkikoirilla. Monet tutkimukset ovat osoittaneet erityisesti <i>Giardia</i>-alkueläimen esiintyvyyden olevan paljon suurempi kennelolosuhteissa kuin yksittäisessä omistuksessa olevilla koirilla</p> <p>Tutkimuksessani selvitettiin <i>Giardia</i>- ja <i>Cryptosporidium</i>-alkueläimen esiintyvyyttä pohjois-suomalaisen kennelin koirilla. Ulostenäytteet tutkittiin Elisa-testillä sekä immunofluoresenssin avulla mikroskoopilla. Saatuja tuloksia verrattiin lisäksi koirien ikään, sukupuoleen, esiintyneeseen ripuliin ja eri ryhmiin.</p> <p>Kennelissä oli kaikkiaan tutkimushetkellä 317 koiraa. Näytteitä tutkittiin yhteensä 125 koirasta. Tutkittujen koirien iän mediaani oli 4 vuotta ja ikäjakauma 2 kk -13 vuotta. Pennuiksi luokiteltiin kaikki alle yhden vuoden ikäiset koirat ja aikuisiksi kaikki yli vuoden ikäiset koirat. Pentuja tutkituista koirista oli 16.</p> <p><i>Giardia</i>-positiivisten osuus oli 41,6 % (52 koiraa). Kaikki 16 pentua (100,0 %) olivat <i>Giardia</i>-positiivisia. Aikuisista koirista <i>Giardia</i>-positiivisia oli 34 (36,2 %).</p> <p><i>Cryptosporidium</i>-positiivisten osuus oli 5,6 % (7 koiraa). Pennuista 5 koiraa (31,2 %) oli <i>Cryptosporidium</i>-positiivisia. Aikuisista koirista <i>Cryptosporidium</i>-positiivisia koiria oli 2 (2,1 %).</p> <p>Tutkimukseni perusteella <i>Giardia</i>-tartuntaa esiintyi kennelissä paljon. Pennuilla <i>Giardia</i>-tartuntaa esiintyi enemmän kuin aikuisilla koirilla, mikä on giardiatartunnoille tyypillistä. Tartuntoja todettiin eniten koiraryhmässä, jossa aikuiset koirat olivat kosketuksissa pentuihin. Sukupuolella ei ollut vaikutusta tartuntoihin. Kennelin koirissa todettiin myös muutamia <i>Cryptosporidium</i>-tartuntoja. Suurin osa tartunnoista todettiin pennuilla.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Giardia</i> , <i>Cryptosporidium</i> , koira, zoonoosi, Elisa			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin tiedekirjasto			
Työn valvoja (professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktör och ledare – Director and Supervisor(s) Työn johtaja: Prof. Marja-Liisa Hänninen Työn ohjaaja: ELT Ruska Rimhanen-Finne			



Tiedekunta - Fakultet – Faculty Faculty of Veterinary Medicine		Laitos - Institution – Department Department of Food and Environmental Hygiene	
Tekijä - Författare – Author Annukka Eveliina Sulonen			
Työn nimi - Arbetets titel – Title <i>Giardia</i> and <i>Cryptosporidium</i> prevalence in big shelter			
Oppiaine - Läroämne – Subject Environmental hygiene			
Työn laji - Arbetets art – Licentiate Thesis		Aika - Datum – Month and 26.3.2009	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages 32
Tiivistelmä - Referat – Abstract			
<p><i>Giardia</i> and <i>Cryptosporidium</i> are protozoans which can infect animals and human as an intestinal parasites. The <i>Giardia</i> and <i>Cryptosporidium</i> infection occurs typically in humans through contaminated water. The infection can be transmitted in human-human contact or be a zoonotic. The <i>Giardia</i> and <i>Cryptosporidium</i> have been considered as zoonotic parasites. Limited crossinfection studies have shown that some of the <i>Giardia</i> species are host specific and some are able to infect several species.</p> <p>The <i>Giardia</i>'s life cycle has two phases: trophozoite stage and cyst stage. Cysts are passed in host feces and infection begins when another host ingests the cyst stage of the parasite. The <i>Cryptosporidium</i>'s life cycle is more complex. <i>Cryptosporidium</i> infection begins when host ingest the oocysts.</p> <p>In dogs <i>Giardia</i> infection is often asymptomatic, but may cause acute or chronic diarrhea and weight loss. Dogs do not often appear have clinical symptoms in <i>Cryptosporidium</i> infection. Several studies have been performed around the world on the <i>Giardia</i> and <i>Cryptosporidium</i> prevalence in shelters as well as in pet dogs. Results have shown that prevalence of <i>Giardia</i> is much higher in shelter populations than pet dogs.</p> <p>In my research I examined prevalence of <i>Giardia</i> and <i>Cryptosporidium</i> in a dog shelter located in the northern Finland. Stool samples were studied by Elisa antigen test and immunofluorescence staining using epifluorescence microscope. In addition, I compared association of giardia with age, sex, and diarrhea.</p> <p>In the shelter there were 317 dogs. The fecal samples were examined from 125 dogs. The median age of the examined dogs was 4 years and the age range was from 2 months to 13 years. Puppies were defined as under one-year-old dogs and adults > one year age. In total, there were 16 puppies.</p> <p><i>Giardia</i>-positive fecal samples were found in 41.6% of the dogs (52 dogs). All 16 puppies (100.0%) were <i>Giardia</i>-positive. In adult dogs <i>Giardia</i> prevalence was 36.2% (34 dogs).</p> <p><i>Cryptosporidium</i> prevalence was 5.6% (7 dogs). In puppies 5 dogs (31.2%) were <i>Cryptosporidium</i>-positive. In adult dogs <i>Cryptosporidium</i> prevalence was 2.1% (2 dogs).</p> <p>In my study <i>Giardia</i> prevalence was rather high in the shelter dogs. In puppies <i>Giardia</i> infection was more common than adult dogs, which is a typical characteristic of <i>Giardia</i> infections. Infections were found most in the group, where the adult dogs were in contact to the puppies. Gender had no effect on infections. <i>Cryptosporidium</i> infection was uncommon in dogs. Most of the infections were found in puppies.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Giardia</i> , <i>Cryptosporidium</i> , dog, Elisa			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikki Science Library			
Työn valvoja (professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktör och ledare – Director and Supervisor(s) Director: Professor Marja-Liisa Hänninen Supervisor: DVM, PhD Ruska Rimhanen-Finne			

1 KIRJALLISUUSKATSAUS	2
1.1 GIARDIA SPP.....	2
1.1.1 Rakenne	3
1.1.2 Elinkierto.....	3
1.1.3 Patogeneesi.....	4
1.1.4 Epidemiologia.....	5
1.2 KOIRAN GIARDIA-INFEKTIO	5
1.2.1 Oireet.....	5
1.2.2 Ennaltaehkäisy ja hoito.....	5
1.3 GIARDIA ZOONOOSINA.....	6
1.4 CRYPTOSPORIDIUM SPP.....	7
1.4.1 Rakenne	8
1.4.2 Elinkierto.....	8
1.4.3 Patogeneesi.....	9
1.4.4 Epidemiologia.....	10
1.5 KOIRAN CRYPTOSPORIDIUM-INFEKTIO	10
1.5.1 Oireet.....	10
1.5.2 Hoito ja ennaltaehkäisy	10
1.6 CRYPTOSPORIDIUM ZOONOOSINA.....	10
1.7 GIARDIA- JA CRYPTOSPORIDIUM-ALKUELÄIMEN ESIINTYMINEN KENNELÖLOSUHTEISSA.....	11
2 TUTKIMUSSELOSTUS	15
2.1 TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TARKOITUS	15
2.2 TUTKIMUSAINEISTO.....	15
2.3 TUTKIMUSMENETELMÄT.....	15
2.3.1 Näytteiden konsentroidi	15
2.3.2 Elisa-testi.....	16
2.3.3 Mikroskopointi.....	17
2.3.4 Tilastolliset menetelmät	17
2.4 TULOKSET.....	18
2.4.1 Tutkimusaineiston ominaispiirteet	18
2.4.2 Giardia- ja Cryptosporidium-tartunta.....	20
2.4.2.1 Giardia-tartunta	20
2.4.2.2 Cryptosporidium-tartunta	20
2.4.3 Tartuntamuotojen erityis.....	21
2.4.4 Ruoan suhde ripuliin sekä Giardia- ja Cryptosporidium- tartuntoihin.....	22
2.5 POHDINTA.....	23
3 KIRJALLISUUSLUETTELO	27

1 KIRJALLISUUSKATSAUS

1.1 *Giardia* spp.

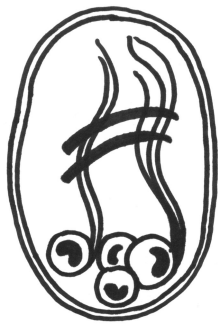
Giardia on alkueläin, joka on ensimmäisen kerran löydetty vuonna 1681 (Ortega ja Adam, 1997). *Giardia* luokitellaan pääjaksoon Sarcocystidophora, luokkaan Zoomastigophorea ja lahkoon Diplomonadida (Rimhanen-Finne, 2006). *Giardia*-lajeja on useita ja ne luokitellaan yleisimmin isäntälajinsa mukaan (Smith ym. 2007). Ainoa ihmisille tartunnan aiheuttava laji on *Giardia duodenalis*, synonyymit *Giardia lamblia* tai *Giardia intestinalis* (Smith ym. 2007). *G. duodenalis* on jaettu kuuteen erilaiseen genotyyppiin A-G (Monis ym. 2003). Nämä genotyypit on nimetty omiksi lajeiksi uusimpien tutkimusten mukaan (taulukko 1) (Thompson ym. 2008). Genotyyppejä A ja B pidetään zoonoottisina, koska niitä on löydetty monilta lajeilta (Abe ym. 2003).

Taulukko 1. *Giardia*-alkueläimen lajit ja tyyppilliset isännät (Thompson ym. 2008)

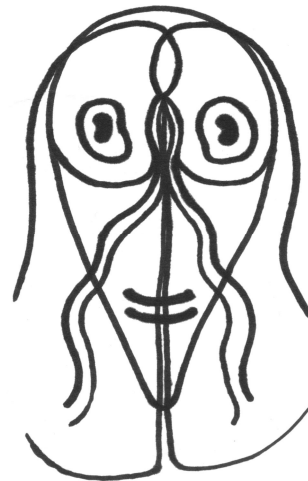
<i>G. duodenalis</i> (entinen <i>G. duodenalis</i> genotyyppi A)	Ihminen ja muut kädelliset, koira, kissa, karja, jyrsijät ja muut villit nisäkkäät
<i>G. enterica</i> (entinen <i>G. duodenalis</i> genotyyppi B)	Ihminen ja muut kädelliset, koira
<i>G. agilis</i>	Sammakkoeläimet
<i>G. muris</i>	Jyrsijät
<i>G. psittaci</i>	Linnut
<i>G. ardaea</i>	Linnut
<i>G. canis</i> (entinen <i>G. duodenalis</i> genotyyppi C)	Koira
<i>G. cati</i> (entinen <i>G. duodenalis</i> genotyyppi F)	Kissa
<i>G. bovis</i> (entinen <i>G. duodenalis</i> genotyyppi E)	Nauta ja muut sorkkaeläimet
<i>G. simondi</i> (entinen <i>G. duodenalis</i> genotyyppi G)	Rotta

1.1.1 Rakenne

Giardia-alkueläimellä on kaksi muotoa; trofotsoiitti- ja kystamuoto. Kystamuoto on *Giardia*-alkueläimen infektiivinen muoto ja säilyy hyvin ympäristössä. Kystat ovat muodoltaan pyöreitä tai ovaalin muotoisia ja kooltaan noin 11-14 x 7-10 µm (Ortega ym. 1997). Kystassa on neljä tumaa, jotka sijaitsevat kystan kapeassa päässä. Kystan leveämmässä päässä sijaitsevat imulevyjen säikeet. Kystaa ympäröi kestävä seinämä (Rimhanen-Finne, 2006). Trofotsoiitti on kyneleen mallinen ja sen pituus on 10-20 µm ja leveys 5-15 µm (Ortega ym. 1997). Ventraalisesti trofotsoiitissa on kovera imulevy, jolla se pystyy kiinnittymään suolen limakalvolle. Trofotsoiitissa on neljä paria flagelloja ja kaksi identtistä tumaa, jotka voivat kummatkin kopioitua (Ortega ym. 1997). Trofotsoiitin muoto vaihtelee hieman riippuen *Giardia* lajista (Monis ym. 2003). *Giardia* on polyploidinen ja sillä on viisi kromosomia. (Ortega ym. 1997).



Giardia- kysta



Giardia-trofotsoiitti

Kuva 1. *Giardia*-alkueläimen kysta- ja trofotsoiittimuodot

1.1.2 Elinkierto

Giardia-alkueläimen elinkierto on kaksivaiheinen: trofotsoiittivaihe ja kystavaihe. Kystavaihe on infektiivinen vaihe, jossa kystat kulkeutuvat ulosteiden mukana ulos isäntälajista ja joutuvat uuteen isäntään tämän syödessä kystia. Mahalaukussa kystistä vapautuu trofotsoiitteja mahahappojen ja sappisuolojen vaikutuksesta. Yksi kysta tuottaa kaksi trofotsoiittia. Trofotsoiitit kiinnittyvät ohutsuolen epiteeliin imulevyjensä avulla ja lisääntyvät suvuttomasti jakautumalla duodenumissa ja jejunumin alkuosassa.

Trofotsoiittien kulkiessa ohutsuolen läpi ne muuttuvat jälleen kystamuodoksi ja erittyvät ulos ulosteen mukana (Ortega ym. 1997). Aika tartunnasta oireiden alkamiseen vaihtelee 3-20 vuorokauden välillä ja prepatenttiaika eli aika tartunnasta kystien erittymiseen vaihtelee välillä 1-3 viikkoa (Rimhanen-Finne, 2006). Kystiä saattaa erittyä jaksoittain 2-30 vuorokauden välein (Björknäs ym. 1995).



Kuva 2. *Giardia*-alkueläimen elinkierto

1.1.3 Patogeneesi

*Giardia*asin patogeneesi ei ole täysin selvillä ja oireet vaihtelevat yksilöillä suuresti. Taudin oireet ovat sekä alkueläimestä että isännästä riippuvaisia. Yksi selvä mekanismi on *Giardia*-alkueläimen aiheuttama suolen epiteelin läpäisevyyden muutos. Tämä johtaa tulehdukselliseen reaktioon suolistossa sekä vaikuttaa ruoan sulamiseen ja imeytymiseen. *Giardia*-alkueläin aiheuttaa myös epiteelisolujen puolustusmekanismin heikkenemistä (Thompson, 2004).

1.1.4 Epidemiologia

Giardia-infektion voi aiheuttaa jopa vähemmän kuin kymmenen kystaa. Eräs vaikuttava tekijä, joka selittää pientä infektiomäärää on se että, yhden kystan tuottamat neljä trofotsoiittia pystyvät läpäisemään suolen seinämän ja aiheuttamaan infektion. Infektoituneet yksilöt erittävät ulosteissaan suuria määriä *Giardia*-kystiä. Tämän vuoksi *Giardia*-infektio leviää helposti (Rimhanen-Finne, 2003; Rimhanen-Finne, 2006). Sopivissa olosuhteissa mm. vedessä, jonka lämpötila on 4-10 °C, *Giardia*-kystat voivat säilyä elinkykyisinä jopa muutamia kuukausia. Kystat ovat vastustuskykyisiä klooraukselle sekä UV-säteilylle. Keittämällä *Giardia*-kystat tuhoutuvat tehokkaasti. Useimmat ihmisten *Giardia*-tartunnat välittyvät saastuneen veden kautta. Tartunnan voi saada myös suoraan toisesta ihmisestä tai eläimestä sekä saastuneen ruoan välityksellä (Ortega ym. 1997).

1.2 Koiran *Giardia*-infektio

1.2.1 Oireet

Koiralla pääasialliset oireet liittyvät ravintoaineiden heikkoon imeytymiseen. Uloste muuttuu vaaleaksi ja pahanhajuiseksi. Koiralla voi esiintyä rasvaripulia, kroonista ripulia sekä painon menetystä ilman ruokahalun heikkenemistä (Kirkpatrick, 1987). Ripuli on tyypillisesti ohutsuoliperäistä. Ripulia esiintyy sekä akuutissa että kroonisessa muodossa. Oireet voivat rajoittua itsestään, olla jaksottaisia tai jatkuvia (Thompson ym. 2008). Aikuiset eläimet ovat tyypillisesti oireettomia, varsinkin ne, joilla on ollut aiemmin tartunta (Kirkpatrick, 1987).

1.2.2 Ennaltaehkäisy ja hoito

Tärkeintä ennaltaehkäisyssä ja hoidossa on estää kystien siirtyminen eläimestä toiseen. Huolellinen hygienia (ulosteiden siivoaminen tarhoista tms.) sekä koirien häkkien desinfiointi estää *Giardia*-tartunnan leviämistä. *Giardia*-kystat eivät säily hyvin kuivissa olosuhteissa (Kirkpatrick, 1987).

Hoitona on käytetty pääsääntöisesti metronidatsolia sekä fenbendatsolia. Metronidatsolilla on kuitenkin todettu tehottomuutta ja lisäksi se on aiheuttanut

myrkytysoireita suurilla annoksilla (Zajac ym. 1998). Fenbendatsolin on todettu olevan tehokas lääkitys koiran *Giardia*-infektioon annoksella 50 mg/kg PO kolmen vuorokauden ajan (Zajac ym. 1998). Kenttätutkimuksissa on todettu että pyranteeliembonaattia (144 mg), febantelia (150 mg) ja pratsikvanteelia (50 mg) sisältävä yhdistelmävalmiste tehoaa kahden päivän kuurina (annos 1 tbl/10 kg) *Giardia*-alkueläimeen (Barr ym, 1998; Barutzki ym, 2002; Giangaspero ym, 2002). Myös yhdistelmävalmiste, jossa on febanteelia (15 mg) ja pyranteeliembonaattia (14,4 mg), on todettu tehokkaaksi lääkkeeksi kahden päivän kuurina (Schüsche ym. 2002). Albendatsoli on rekisteröity loishäätölääke lampaille, naudoille ja ihmisille. Tutkimuksessa tutkittiin albendatsolin tehoa koirien *Giardia*-tartuntaan ja sen todettiin olevan tehokas lääke annoksella 25 mg/kg PO kahdesti päivässä kahden vuorokauden ajan. Kerran päivässä annosteltuna lääke ei ollut riittävän tehokas poistamaan kaikkia kystiä. Albendatsolia ei ole kuitenkaan koiralle rekisteröitynä valmisteena (Barr ym, 1993).

Giardia-tartuntaa vastaan on myös olemassa rokote. Tutkimuksessa, jossa tutkittiin rokotteen tehoa oireettomiin *Giardia*-tartuntoihin, ei todettu rokotteella olevan tehoa *Giardia*-tartunnan hoitoon (Anderson ym. 2004). Toisessa tutkimuksessa todettiin rokotteen vähentävän eritettyjen kystien määrää koiranpennuilla selvästi. Tämän tutkimuksen mukaan rokotteista olisi hyötyä tautipaineen alentamisen kannalta koirien tartunnoissa (Olson ym. 2000).

1.3 Giardia zoonoosina

Giardiaa on pidetty zoonoottisena parasiittina, mutta zoonoottisuudesta ei ole olemassa varmaa ja todistettua tietoa. Risti-infektio-kokeet ovat osoittaneet, että osa *Giardia*-lajeista on isäntälajispesifisiä ja osa pystyy tartuttamaan useita lajeja (Thompson, 2004).

Tutkimuksissa on todettu että *Giardia*-alkueläimen genotyypit A ja B ovat ainoita, jotka ovat infektoineet ihmisiä. Näiden kahden esiintyvyys vaihtelee maasta toiseen ja tutkimuksia on toistaiseksi tehty vähän. *Giardia*-alkueläin voi tarttua suoraan isännältä isännälle tai epäsuorasti esimerkiksi kontaminoituneen veden tai ruoan välityksellä (Caccio ym. 2005). Ihmisillä tartunta tapahtuu yleensä kontaminoituneen veden tai ruoan välityksellä (Ortega ym. 1997).

Giardia duodenalis-alkueläimen genotyyppinä A ja B löytyy huomattavan yleisesti ympäristössä ulostekontaminaation seurauksena. Ne ovat yleisiä ihmisillä, karjassa, lemmikkieläimillä ja joissakin villieläimissä. Tämä viittaa zoonoottisuuden mahdollisuuteen, mutta vielä ei tiedetä onko tartunnan alkukoto ihminen vai eläin (Keulen ym. 2002).

Giardia duodenalis-alkueläimen genotyyppi A voidaan jakaa kahteen ryhmään; AI ja AII. Ryhmä AI koostuu ihmisen ja eläinten isolaateista, joita esiintyy paljon. Tästä alaryhmästä on ajateltu löytyvän mahdollisia zoonoottisia muotoja. Ryhmä AII koostuu lähinnä ihmisistä löytyneistä isolaateista. Myös genotyyppi B on jaettu kahteen alaryhmään III ja IV, näistä ryhmä IV esiintyy lähinnä ihmisillä (Thompson, 2004). Tutkimuksissa, joissa on tutkittu läheisessä kontaktissa eläviä ihmisiä ja koiria, on saatu tuloksiksi samankaltaisia isolaatteja (AI) sekä koirilta että ihmisiltä. Selviä epidemiologisia todisteita zoonoottisuudesta ei näissä tutkimuksissa ole kuitenkaan tullut ilmi (Traub ym. 2004, Inpankaew ym. 2007).

Tutkimuksessa, jossa tutkittiin *Giardia*-alkueläimen esiintymistä samassa kunnassa elävillä koirilla ja ihmisillä, ihmisiltä löydetty alkueläimet olivat kaikki A tai B – genotyyppiä. Koirilta löydetty lajit olivat C ja D – genotyyppiä. Yhdellä koiralla oli sekatarunta, jossa oli sekä B että C. Tämä voi viitata siihen, että koira oli saanut infektion ihmislähteestä (Hopkins ym. 1997).

1.4 Cryptosporidium spp.

Cryptosporidium-suku kuuluu pääjaksoon *Apicomplexa* ja luokkaan *Coccidea* (Rimhanen-Finne, 2006). *Cryptosporidium*-alkueläimen taksonomia muuttuu koko ajan kun uutta tutkimustietoa kertyy. Perinteinen *Cryptosporidium*-alkueläimen luokittelu perustuu ookystien morfologiaan, isäntälajispesifisyyteen ja ristireaktio-tutkimuksiin. Ristireaktio-tutkimuksilla sekä DNA:n perustuvilla tutkimuksilla on löydetty enemmän lajeja kuin pelkällä morfologiaan ja isäntälajispesifisyyteen perustuvalla luokituksella (Monis ym. 2003). Taulukossa 2 on lueteltu löydetty *Cryptosporidium*-lajeja ja niiden perässä pääasialliset isäntälajit sekä sulkeissa muita lajeja, joilta kyseinen laji on myös löydetty.

Taulukko 2. *Cryptosporidium*-alkueläimen lajit ja tyypillisimmät isännät (Smith ym. 2007)

<i>Cryptosporidium</i>-laji	Isäntä
<i>C. hominis</i>	Ihminen
<i>C. parvum</i>	Nauta, ihminen (sika, hiiri, hirvi)
<i>C. muris</i>	Jyrsijät (ihminen)
<i>C. suis</i>	Sika (ihminen)
<i>C. felis</i>	Kissa (ihminen, nauta)
<i>C. canis</i>	Koira (ihminen)
<i>C. meleagridis</i>	Kalkkuna, ihminen (papukaija)
<i>C. wrairi</i>	Marsu
<i>C. bovis</i>	Nauta (lammas)
<i>C. andersoni</i>	Nauta (lammas)
<i>C. baileyi</i>	Siipikarja
<i>C. galli</i>	Kana
<i>C. serpentis</i>	Lisko, käärme
<i>C. saurophilum</i>	Lisko
<i>C. scophthalmi</i>	Kala
<i>C. molnari</i>	Kala

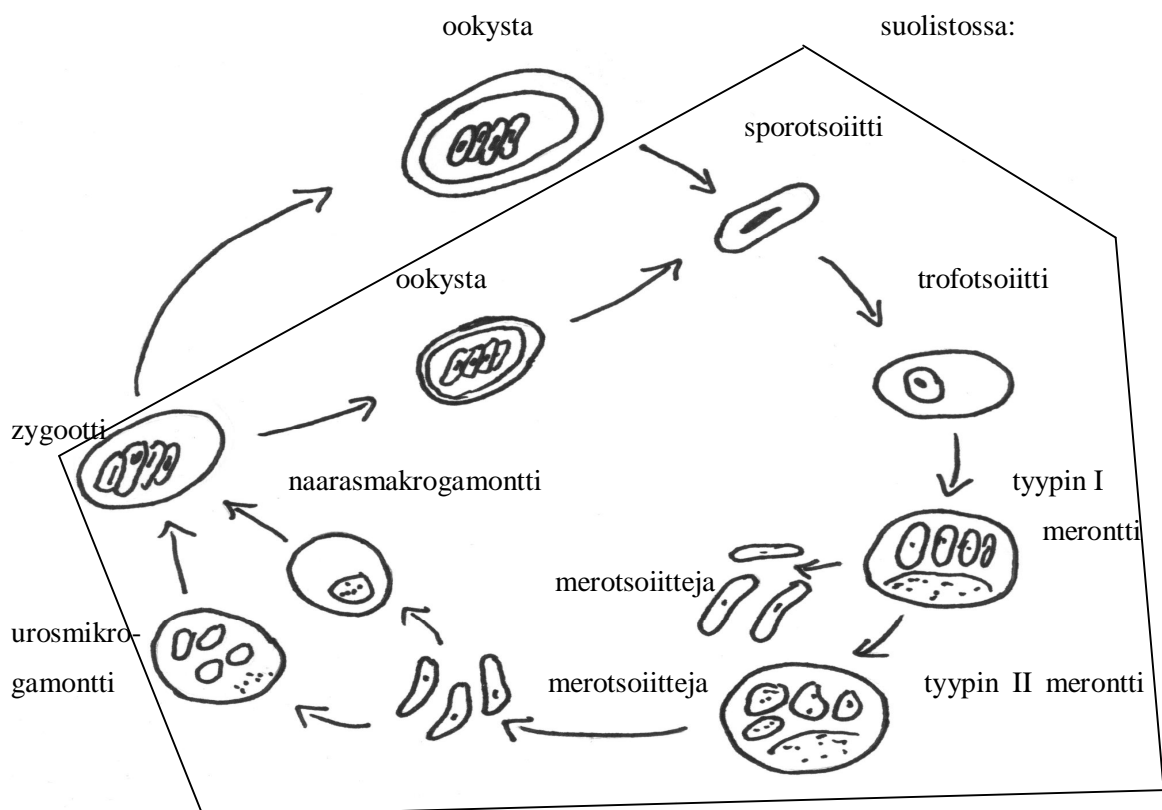
1.4.1 Rakenne

Cryptosporidium-ookysta on muodoltaan pyöreä tai ovaalinmuotoinen. Ookystassa on rinnakkain neljä sporotsoiittia, joita ympäröi ohut seinämä. *Cryptosporidium*-ookystat ovat pieniä kooltaan esimerkiksi *C. parvum* 5,0 x 4,5 µm. (Rimhanen-Finne, 2006).

1.4.2 Elinkierto

Cryptosporidium-alkueläimen elinkierto on monimutkaisempi kuin *Giardia*-alkueläimellä. *Cryptosporidium*-alkueläimen infektiivinen muoto on ookysta. Isäntälaji saa *Cryptosporidium*-tartunnan syömällä infektoituneen ookystan tai kontaminoituneen

veden välityksellä (Abe ym. 2001). Isännän syötyä ookystan, siitä vapautuu suolessa sporotsoiitteja. Sporotsoiitti infektoi isännän suoliston epiteelisoluja, joiden sisällä sporotsoiitit erikoistuvat trofotsoiiteiksi. Trofotsoiitit erilaistuvat edelleen tyyppin I tai tyyppin II meronteiksi. Tyyppin I merontit vapautuvat isäntälajin soluista ja voivat tämän jälkeen infektoida muita soluja ja tuottavat lisää merotsoiitteja. Tyyppin II meronteista tulevat merotsoiitit erilaistuvat seksuaalisen monistumisen kautta urosmikrogamonteiksi tai naarasmakrogamonteiksi. Näiden yhtyessä muodostuu kahdenlaisia ookystia, joista toiset eritetään infektiivisenä muotona isäntäeläimestä ulos ja toiset voivat aiheuttaa autoinfektion samassa isäntäeläimessä (Monis ym. 2003; Rimhanen-Finne, 2006).



Kuva 3. *Cryptosporidium*-alkueläimen elinkierto

1.4.3 Patogeneesi

Cryptosporidium-alkueläimen taudinaiheuttamiskyvystä sekä mekanismeista kulkeutua isäntäsoluun ei ole tarkkaa tietoa. Tiedetään, että *Cryptosporidium*-alkueläin muodostaa itselleen solun sisällä sellaisen ympäristön, joka suojaa sitä isäntälajin

suoliston haitallisilta tekijöiltä. Isäntäsolun puolustusmekanismit ovat vasta-aine- sekä osittain T-solu-välitteisiä (Sunnotel ym. 2006).

1.4.4 Epidemiologia

Cryptosporidium-tartunnassa infektiivinen annos on pieni; 1-10 ookystaa riittää aiheuttamaan tartunnan. *Cryptosporidiumin* ookystat ovat välittömästi tartuntakykyisiä erityyppisessä ulosteeseen. Ookystat voivat säilyä ympäristössä jopa viikkoja ja aiheuttaa näin myös veden ja ruoan saastumisen (Cacciò ym. 2005)

1.5 Koiran Cryptosporidium-infektio

1.5.1 Oireet

Ihmisillä ja monilla muilla nisäkkäillä kryptosporidioosi ilmenee akuuttina ja vakavana ripulisairautena (Abe ym. 2001). Oireet voivat vaihdella oireettomasta vakavaan sairauteen. Koirilla ei usein esiinny kliinisiä oireita tartunnasta ja ne ovat oireettomia kantajia (Giangaspero ym. 2006).

1.5.2 Hoito ja ennaltaehkäisy

Ihmisillä on tutkittu kryptosporidioosin hoitovaihtoehtona nitatsoksanidia (nitrotiatsolyyli-salisyylimidijohdannainen). Tulokset lääkkeen tehokkuudesta olivat hieman ristiriitaiset (Bailey ym. 2004). Koirille ei ole löydetty tehokasta lääkitystä kryptosporidioosin hoitoon, joten tartuntaa hoidetaan akuutissa vaiheessa lähinnä oireenmukaisesti; pitämällä yllä neste- ja elektrolyyttitasapainoa.

1.6 Cryptosporidium zoonoosina

Ihmisten kryptosporidioosin aiheuttavat pääasiassa zoonoottinen *C. parvum* ja ihmis spesifinen *C. hominis* (Alves ym. 2003). Ihmisissä esiintyvää lajia (*C. hominis*) ei ole tähän mennessä löydetty kuin ihmisiltä. Zoonoottista lajia (*C. parvum*) on sen sijaan löydetty myös lampailta, vuohilta ja monilta muilta nisäkkäiltä. Koirissa esiintyvää lajia (*C. canis*) on löydetty myös HIV-positiivisilta henkilöiltä (Abe ym. 2001). Koirilla sekä

kissoilla esiintyy pääsääntöisesti niiden omia lajeja (*C. canis* ja *C. felis*), joita ei tämänhetkisen tietämyksen mukaan pidetä kovin merkittävänä ihmisten tartuntojen lähteenä. *C. parvum*-alkueläimen on todettu esiintyvän sekä ihmisissä että naudoissa, joilla on ollut yhteyksiä toisiinsa (Cacciò ym. 2005).

1.7 Giardia- ja Cryptosporidium-alkueläimen esiintyminen kennelolosuhteissa

Giardia- ja *Cryptosporidium*-alkueläinten esiintymistä on tutkittu paljon sekä kennelolosuhteissa että yksittäisillä lemmikkikoirilla. Monet tutkimukset ovat osoittaneet erityisesti *Giardia*-alkueläimen esiintyvyyden olevan paljon suurempi kennelolosuhteissa kuin yksittäisessä omistuksessa olevilla koirilla. Osassa tutkimuksista on ollut mukana myös löytökoiria. *Giardia*-alkueläimen on osoitettu esiintyvän myös selvästi enemmän nuorilla alle vuoden ikäisillä koirilla. *Cryptosporidium*-alkueläimen kohdalla samanlaista eroavaisuutta ei ole selkeästi voitu osoittaa.

Japanissa tehdyssä tutkimuksessa tutkittiin *Giardia*-alkueläimen (*G. duodenalis*) esiintymistä 14 eri kennelissä. Erirotuiset koirat olivat iältään yhdestä kuukaudesta 14 vuoden ikäisiä. *Giardia*-alkueläimen esiintyvyys vaihteli eri kenneleissä 6,7 – 59,3 % välillä. Koirien sukupuolten välillä ei ollut eroja. Koiranpennuilla (1-9 kk:n ikäiset) esiintyvyys oli 54,5 % ja aikuisilla (yli 10 kk:n ikäiset) 30,9 %. Ulostoiden koostumuksella (kiinteä, pehmeä ja ripuli) ei ollut myöskään suurta vaikutusta *Giardia*-alkueläimen esiintymiseen; kaikkien kohdalla esiintyvyys oli suunnilleen sama. Tutkimuksessa kävi ilmi, että kennelolosuhteissa *Giardia*-alkueläimen esiintyvyys oli suuri erityisesti pentujen kohdalla. *Giardia*-alkueläintä esiintyi yhtä lailla oireettomilla kuin niillä, joilla on oireita (Itoh ym. 2005).

Italiassa tehdyssä tutkimuksessa tutkittiin *Giardia*-alkueläimen esiintymistä kennelolosuhteissa. Näytteitä kerättiin kolmesta suuresta kennelistä. Esiintyvyys yli viisivuotiailla koirilla oli 22,9 %, alle viisivuotiailla koirilla 66,7 % ja alle vuoden ikäisillä 76,2 %. Ripuloivien koirien esiintyvyys *Giardia*-alkueläimen suhteen oli 70,5 %. Tilastollisesti sukupuolella, kennelillä, rodulla tai ripulilla ei ollut merkitsevää vaikutusta (Papini ym. 2005).

Brasiliassa tehdyssä tutkimuksessa vertailtiin *Giardia*- ja *Cryptosporidium*- alkueläimen esiintymistä koirilla, jotka elävät erilaisissa olosuhteissa. Näytteitä kerättiin kenneleistä (199 kpl), lemmikkikoirilta (122 kpl) ja löytöeläinkodista (89). *Giardia*-alkueläintä (*G. duodenalis*) löydettiin 29,0 prosentilta ja *Cryptosporidium*-alkueläintä 1,4 prosentilta. Eniten giardiaa esiintyi kenneleistä otetuista näytteistä: 49,7 % (kennel), 16,8 % (löytökoirat) ja 4,1 % (lemmikit). Samoin nuorilla (alle vuoden ikäisillä koirilla) esiintyi eniten giardiaa verrattuna aikuisiin; pennuilla 46 % ja aikuisilla 22,5 %. *Cryptosporidiumia* esiintyi eniten löytökoirissa (2,3 %) sitten lemmikkikoirissa 2,1 % ja vähiten kennelissä 0,5 %. Esiintyminen eri ryhmissä ei eronnut merkitsevästi. Myöskään sukupuoliella ei ollut merkitystä tartuntoihin. Tässä tutkimuksessa todettiin nuorilla kennelissä asuvilla koirilla esiintyvä eniten *Giardia*-alkueläintä (Mundim ym. 2007).

Brasiliassa (Rio de Janeirossa) vertailtiin *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintymistä koirilla erilaisissa elinoloissa. Näytteet kerättiin koiratarhoilta (6 isoa kenneliä) ja lemmikkikoirilta. *Cryptosporidium*-alkueläintä esiintyi 2,41 % koirista. Eroavaisuutta ei löydetty lemmikkikoirien ja kennel-koirien välille. *Giardiaa* esiintyi 31,33 % kaikista näytteistä. Lemmikkikoirilla giardiaa oli 12,3 % ja kennelin koirilla 45,74 %. Tutkimuksessa ei löytynyt eroa pentujen ja täysikasvuisten koirien välillä, mutta tämä johtui siitä, että tiedot kennelin koirien iästä olivat puutteelliset. Tutkimuksessa ei löytynyt eroa *Giardia*-tartunnan ja sukupuolen välille. *Giardia*-tartunta oli yhteydessä koirilla esiintyviin muihin ruoansulatuskanavan parasiitteihin (Huber ym. 2005).

Norjassa tutkittiin *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintymistä koirilla ensimmäisen elinvuoden aikana. Näytteitä otettiin yksittäisiltä koirilta (290 kpl) 57 pentueesta, yhteisnäytteitä 43 pentueesta ja 42 emältä, joiden pennut olivat joka 1 ja/tai 2 kuukauden ikäisiä. Positiivinen *Cryptosporidium*-näyte löytyi 44,1 %:lla ja positiivinen *Giardia*-näyte 20,7 %:lla. Esiintyvyys vaihteli iän mukaan, *Cryptosporidiumin* kohdalla vaihtelu oli välillä 5,1 % ja 22,5 %, joista eniten positiivisia oli alle 6 kuukauden ikäisillä koirilla. *Giardian* vaihteluväli oli 6,0 – 11,4 %, joista eniten positiivisia oli alle 6 kuukauden ikäisillä (Hamnes ym. 2007).

Länsi-Australiassa (Perthissä) tutkittiin ruoansulatuskanavan parasiitteja eri koiraryhmissä. Ulostenäytteitä kerättiin eläinkauppojen (4 kauppa) koirista, koirien löytökodista (3 eri hoitolaa), kenneleistä (6 kenneliä), eläinlääkäriasemilla käyneiltä koirilta sekä yhdestä koirapuistosta että yhdeltä koirarannalta. Eläinkauppojen koirat olivat kaikki pentuja 6-12 viikon ikäisiä. *Giardia duodenalis* oli kaikkein yleisin parasiitti kaikissa ryhmissä. Suurin esiintyvyys oli eläinkaupoista otetuista näytteissä 37 %, löytökodin näytteissä esiintyvyys oli 29,0 % ja kenneliä näytteissä 28,6 %. Selvästi pienemmät esiintyvyydet olivat eläinlääkäriasemien potilaiden (7,8 %) sekä koirapuiston ja koirarannan näytteissä (7,4 %). Pennuilla tartuntoja esiintyi eniten. Tutkimuksessa tutkittiin myös *Cryptosporidium*-alkueläintä, mutta sitä ei löytynyt ainoastakaan näytteestä (Bugg ym. 1998).

Prahassa tutkittiin suoliston parasiittien esiintymistä koirissa. Ulostenäytteitä kerättiin koirilta kaupunkialueelta, maaseudulta ja kahdesta koirahoitolasta. Aineistoa kerättiin kolmen vuoden aikana. Suurin osa näytteistä oli yksityisten henkilöiden omistamista koirista. Näytteitä tutkittiin yhteensä 3780 kpl. Tutkimuksessa todettiin sekä *Giardia*-että *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintyvyyden kasvavan koirahoitoloiden koirissa, mitä pidempään koira on ollut hoitolassa. Tutkimuksissa oli mukana koiria, jotka ovat olleet hoidossa jo muutaman kuukauden tai pidempään sekä juuri hoitolaan tulleita koiria (Dudná ym. 2007).

Argentiinassa tehdyssä tutkimuksessa tutkittiin ruoansulatuskanavan parasiitteja koirilta. Näytteitä tutkittiin 2193. Näytteiden keräily tapahtui koirien omistajien toimesta. *Giardia*-alkueläintä (*G. duodenalis*) esiintyi 8,9 %:lla ja *Cryptosporidium*-alkueläintä esiintyi viidellä. Nuorilla koirilla (alle vuoden ikäiset) esiintyi kaiken kaikkiaan parasiitteja enemmän kuin vanhemmilla, tähän kuului mm. *Giardia*-alkueläin. Sukupuolella ei ollut merkitystä parasiittien esiintymiseen. *Cryptosporidium*-alkueläimen kohdalla löytyi vaihtelevuutta vuodenaikojen mukaan. Eniten sitä esiintyi elo- ja syyskuussa (Fontanarrosa ym. 2006).

Meksikon eteläosassa tutkittiin 100 koira talvella sekä erikseen kesällä. Näytteet otettiin kuolleiden koirien ohutsuolesta. *Giardia*-alkueläimen (*G. duodenalis*) esiintyminen kumpanakin ajankohtana oli 42–51 %. Kaikki tutkitut koirat olivat aikuisia kulkukoiria. Tutkimuksessa kävi ilmi giardian suuri esiintyvyys aikuisten koirien keskuudessa sekä se, että vuodenaikojen vaihtelulla ei ollut juuri merkitystä *Giardia*-

tartuntoihin toisin kuin muihin suolistoloiisiin vuodenaajoilla oli suurtakin merkitystä (Ponce-Macotela ym. 2005). *Giardia*-tartunnan suurta esiintyvyyttä selittää varmasti osin se että koirat olivat kaikki kulkukoiria. Tutkimuksessa ei esitelty oliko koiran sukupuolten välillä mitään eroja.

Italiassa tehdyssä tutkimuksessa tutkittiin *Giardia*-alkueläimen esiintymistä sekä koirilla että ihmisillä. Koirilla esiintyvyys oli 21,3 % ja ihmisillä 2 %. Suurempi esiintyvyys oli kennelolosuhteissa eläneiden koirien näytteissä (53 %) ja nuorilla (50 %). Myös koirilla, jolla oli ollut ruoansulatuskanavan oireita, oli suurempi esiintyvyys. Alle vuoden ikäisillä koirilla on enemmän tartuntoja kuin aikuisilla (Capelli ym. 2003).

Espanjassa tutkittiin eläinten giardioosin epidemiologiaa. Näytteitä kerättiin koirilta (912), naudoilta (592), lampailla (1165) ja vuohilta (574). Koirien ulostenäytteet kerättiin kenneleistä. Koirilla *Giardia*-alkueläintä esiintyi 12,09 %:lla. Koirien sukupuolella ei esiintynyt tilastollisesti merkittäviä eroja. Nuorilla koirilla (1-6 kk ikäisillä) koirilla giardiaa esiintyi suhteessa enemmän (21,9 %), kun aikuisilla koirilla esiintyvyys oli 10,83 % (Díaz 1996).

Italiassa tehdyssä tutkimuksessa tutkittiin *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintymistä koirilla. Näytteitä kerättiin 120 kenneleistä ja 120 yksityisten omistamilta koirilta. *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintyvyys oli 3,3 % eli kahdeksalla koiralla esiintyi kryptosporideja, näistä seitsemällä löytyi *C. parvum* ja yhdellä *C. canis*. Esiintyvyys oli korkeampi koirilla, jotka elivät kennelolosuhteissa (5 %) sekä koirilla, joilla esiintyi ripulia. Lemmikkikoirien esiintyvyys oli 1,7 %. Koirien iällä ei ollut eroavaisuutta; pennuilla (alle vuoden ikäiset) oli saman verran kuin aikuisilla (Giangaspero ym. 2006).

Japanissa tutkittiin *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintymistä 140 kulkukoiralta. Koirilla ei ollut näytteiden keräyshetkellä ripulioireita. Kryptosporidiumin esiintyvyys oli 6,4 %. (Abe ym, 2002). Japanissa tutkittiin *Cryptosporidium*-alkueläimen (*C. canis*) esiintymistä koirilla ja kissoilla. Näytteitä kerättiin löytöeläimiltä. Tutkimuksesta löytyi *Cryptosporidium*-ookystiä vain yhdeltä koiralta (esiintyvyys 0,3 %) (Satoh ym. 2006).

2 TUTKIMUSSELOSTUS

2.1 Tutkimuksen tausta ja tarkoitus

Suomessa ei ole aiemmin tutkittu *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintymistä kennelolosuhteissa. Tähän tarjoutui tilaisuus helmikuussa vuonna 2006. Tutkimuskohteeksi tuli Pohjois-Suomessa sijaitsevan matkailuyrityksen kennel, jossa oli n. 300 alaskanmalamuuttia ja siperianhuskyä. Talvella osalle koirista oli vaihdettu ruokavalio ja näille koirille tuli ripulioireita. Ruokavalio vaihdettiin 80 koiralle ja noin 20 sai oireita. Paikallinen eläinlääkäri tutki 13 koirasta näytteet suolistopatogeenien varalta. Näistä näytteistä löytyi kuudelta koiralta *Giardia*-infektio. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää giardia- ja kryptosporidiumtartuntojen laajuutta ja ominaispiirteitä kyseisessä kennelissä.

2.2 Tutkimusaineisto

Mahdollisimman monelta koiralta pyydettiin keräämään ulostenäytteet. Näytteitä keräsi kennelissä koirien hoitaja, joka lähetti näytteet kylmälaukussa linja-autolla Helsinkiin keväällä 2006. Ulostenäytteet oli kerätty muovipusseihin. Osassa näytteitä oli mukana hiekkaa ja multaa eli ne oli kerätty suoraan maasta. Näytteitä saapui useammassa erässä. Elisa-testillä saaduista negatiivisista näytteistä pyysimme kontrollinäytteet 5-7 päivän kuluttua ensimmäisestä näytteen otosta. Koska kennel oli kiinnostunut uuden ruoan, ripulin ja giardiatartunnan välisestä yhteydestä, koirista kerättiin myös ruoka- ja oiretietoja.

2.3 Tutkimusmenetelmät

2.3.1 Näytteiden konsentroidi

Ulostenäytteet konsentroidiin heti niiden saavuttua Helsinkiin. Näytteiden konsentroidimisen tarkoituksena on poistaa näytteestä mikroskopointia vaikeuttava rasva. Ulosetta sekoitettiin suunnilleen 1 gramman kokoinen pala 7 millilitraan 7 % formaliinia. Seoksesta oli tarkoitus tulla homogeeninen. Näin saatu seos suodatettiin

kuparisiivilän läpi, jolloin siivilään tarttui isoimmat ulosteen sisältämät roskat ja muut sulamattomat ainekset. Seos kaadettiin koeputkeen, johon lisättiin 3 ml etyyliasettaattia. Seos sekoitettiin huolellisesti ja sentrifugoitiin kahden minuutin ajan nopeudella 3000 kierrosta minuutissa. Sentrifugoinnin jälkeen koeputken pohjalla oli sedimentti ja tämän päällä erotettavissa kerrokset, jotka koostuivat etyyliasetaatista, kiinteän aineksen kerroksesta ja formaliinista. Käytännössä ainoastaan sedimentin pystyi selvästi erottamaan. Koeputkesta kaadettiin muut kerrokset pois ja sedimentti jätettiin. Koeputki säilöttiin sedimentteineen jääkaappiin mikroskopoimista varten. Sedimentissä sijaitsivat mahdolliset *Giardia*-kystat ja *Cryptosporidium*-ookystat.

2.3.2 Elisa-testi

Näytteet tutkittiin Elisa-menetelmällä. Elisa-testinä käytettiin ProspecT® Giardia Mikroplate Assay – kittiä sekä ProspecT® Cryptosporidium Mikroplate Assay – kittiä (Alexon-Trend, USA). Testi perustuu *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-spesifisten antigeenin kvalitatiiviseen osoittamiseen monoklonaalisen vasta-aineen avulla. Testin mukana tulevassa mikrotiitterikuoppalevyssä on valmiiksi kiinnitettynä vasta-ainetta. Jos tutkittavassa näytteessä on antigeenia, sitoutuvat nämä antigeenit kuopan pohjalla oleviin vasta-aineisiin. Tähän kiinnitetään lopuksi entsyymikonjugaatti, jonka värireaktion perusteella testin tulos voidaan lukea.

Testi suoritettiin sen mukana tulleiden ohjeiden mukaan. Koeputkiin pipetoitiin 1 ml laimennuspuskuria ja tähän lisättiin pieni määrä ulostenäytettä pumpulipuikolla. Mikrotiitterilevyn kaivoihin laitettiin sekä positiivinen että negatiivinen kontrolli, kumpaakin 200 µl. Laimennettua ulostenäytettä pipetoitiin 200 µl jokainen omaan kaivoonsa. Mikrotiitterilevyä inkuboitiin kosteassa kammiossa huoneenlämmössä (20–25 °C) tunnin ajan. Kosteaa kammio tehtiin laittamalla muovirasiaan kasteltuja paperiliinoja ja sulkemalla mikrotiitterilevy kannella tähän muovirasiaan. Inkuboinnin jälkeen kaivojen sisältö ravistettiin voimakkaasti pois. Kaikki kaivot huuhdeltiin pesupuskuriliuoksella 3 kertaa. Viimeiset pesupuskuriliuokset poistettiin vielä lopuksi kopauttelemalla levyä paperipyyhettä vasten. Tämän jälkeen lisättiin entsyymikonjugaattia 200 µl. Levyä inkuboitiin jälleen kosteassa kammiossa huoneenlämmössä puoli tuntia, jonka jälkeen kaivot pestiin pesupuskuriliuoksella 5 kertaa. Tämän jälkeen kaivoihin lisättiin 200 µl värisubstraattia. Levyä inkuboitiin huoneenlämmössä vielä 10 minuuttia, jonka jälkeen kaivoihin lisättiin 50 µl reaktion

pysäytysliuosta pysäyttämään värireaktio. Tulos luettiin silmämääräisesti ja vertaamalla ohjeiden mukana tulleisiin värikarttoihin. Negatiivisen ja positiivisen kontrollin toimiminen varmisti testin luotettavuuden. Positiiviset tulokset näkyvät riippuen tartunnan voimakkuudesta eri sävyisinä keltaisina kuoppina.



Kuva 4. Elisa-testin tulokset värireaktioina

2.3.3 Mikroskopointi

Elisa-positiivisista näytteistä laskettiin (oo)kystat immunofluoresenssin avulla mikroskoopilla (Nikon tyyppi 115, Tokyo, Japan) 200x-suurenoksella noin 10 μ l näytteestä. Näytteiden värjäyksessä käytettiin Cyst-a-Clo™ Comprehensive -kittiä (Waterborne™, Inc. USA). Kitissä on fluoreskiinileimattuja monoklonaalisia vastaaineita, jotka tunnistavat *Giardia*-kystan ja *Cryptosporidium*-ookystan seinämän antigeeneja. Värjäyksen jälkeen kystat näkyvät UV-valossa vihreinä fluoresoivina kohteina. Mahdollisia todettuja (oo)kystia verrattiin tunnetusti (oo)kystia sisältäviin kontrollinäytteisiin löydöksen varmistamiseksi.

2.3.4 Tilastolliset menetelmät

Ryhmiä välisiä riskieroja analysoitiin chi²-testillä käyttäen SPSS- 16.0 tilasto-ohjelmaa.

2.4 Tulokset

2.4.1 Tutkimusaineiston ominaispiirteet

Koko kennelissä koirien lukumäärä oli 317 (taulukko 3). Näytteitä tutkittiin yhteensä 125 (39 %) koirasta. Tutkittujen koirien iän mediaani oli 4 vuotta ja ikäjakauma 2 kk-13 vuotta. Pennuiksi luokiteltiin kaikki alle yhden vuoden ikäiset koirat ja aikuisiksi kaikki yli vuoden ikäiset koirat. Valtaosa koirista oli aikuisia ja suurin osa oli uroksia. Ikä ei ollut tiedossa 15 (12,0 %) tutkitulla koiralla. Sukupuoli ei ollut tiedossa 17 (13,6 %) koiralla. Ripulia esiintyi noin 30 % sekä tutkituista että koko kennelin koirista. Ripulitieto puuttui 24 tutkitulta koiralta. Ruokaa 1 söi noin 60 % tutkituista ja koko kennelin koirista. Ruokavaliosta ei ollut tietoa 24 (19,2 %) koiran osalta.

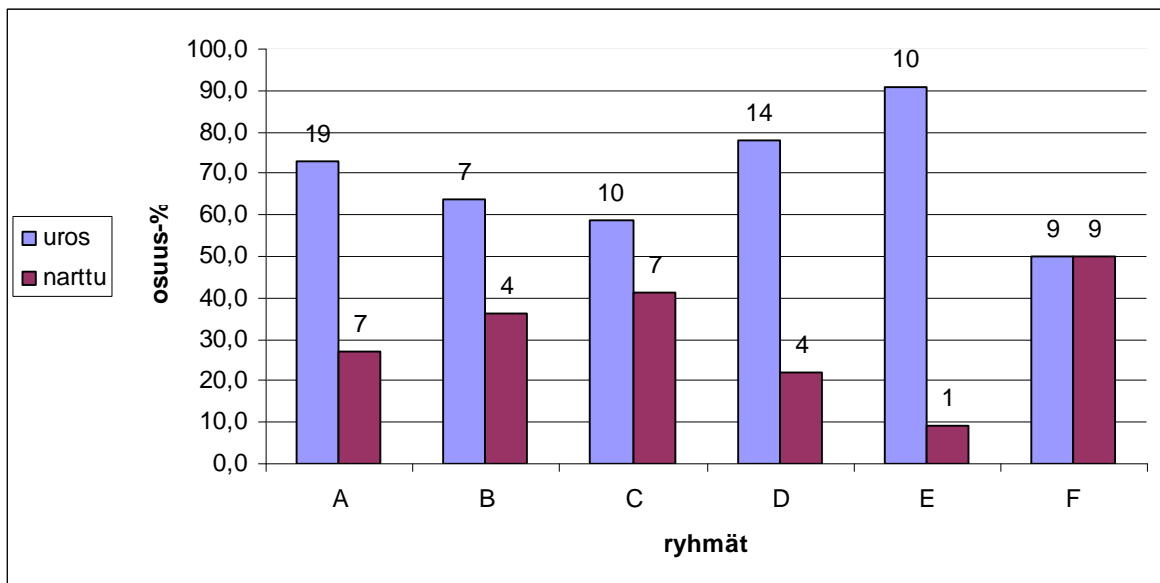
Taulukko 3. Tutkittujen ja koko kennelin koirien määrät ominaispiirteittäin

	Tutkitut koirat (n=125)	Koko kennelin koirat (n=317)
Pentu:aikuinen	16:94	18:270
Uros:narttu	73:35	154:145
Ripuli:ei-ripulia	36:65	95:197
Ruoka1:ruoka2	75:26	206:86

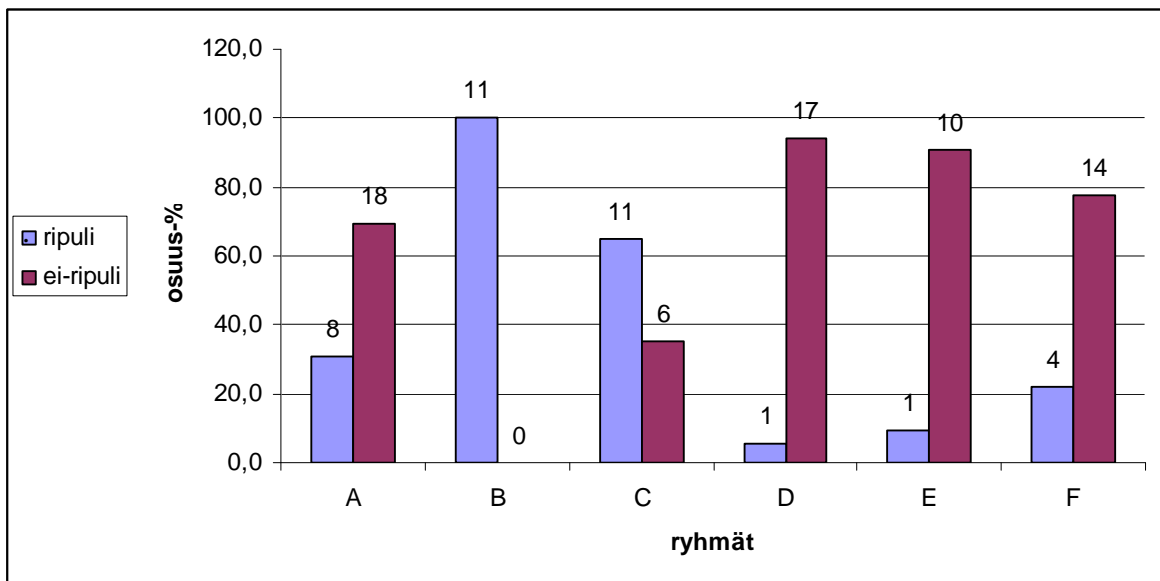
Koirat oli kennelissä jaettu eri ryhmiin. Samaan ryhmään kuuluvat koirat elivät yhteisessä tarhassa ja työskentelivät yhdessä. Tutkittavat koirat kuuluivat kuuteen ryhmään (A-G: taulukko 4). Osa koirien ryhmätiedoista oli puutteellisia, sillä 10 koiran (8,0 %) ryhmä ei ollut tiedossa. Kaksi tutkittua pentua kuului ryhmään A, muut pennut kuuluivat ryhmään G. Koirien ryhmittäinen sukupuoli- ja ripulijakauma on esitetty kuvissa 5-6. Ruokaa 1 tarjottiin ryhmille B-F ja ruokaa 2 ryhmälle A, ryhmän G ruokavaliosta ei ollut tietoa.

Taulukko 4. Koirien jakautuminen erillisiin ryhmiin kennelissä

Ryhmät	Tutkitut koirat (n=125)	Kaikki koirat (n=317)
A	26 (20,8 %)	86 (27,1 %)
B	11 (8,8 %)	46 (14,5 %)
C	17 (13,6 %)	43 (13,6 %)
D	18 (14,4 %)	52 (16,4 %)
E	11 (8,8 %)	33 (10,4 %)
F	18 (14,4 %)	32 (10,1 %)
G	14 (11,2 %)	14 (4,4 %)
Ei tietoa	10 (8,0 %)	11 (3,5 %)



Kuva 5. Urosten ja narttujen osuus eri ryhmissä



Kuva 6. Ripuli-oireiden jakautuminen eri ryhmissä

2.4.2 *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-tartunta

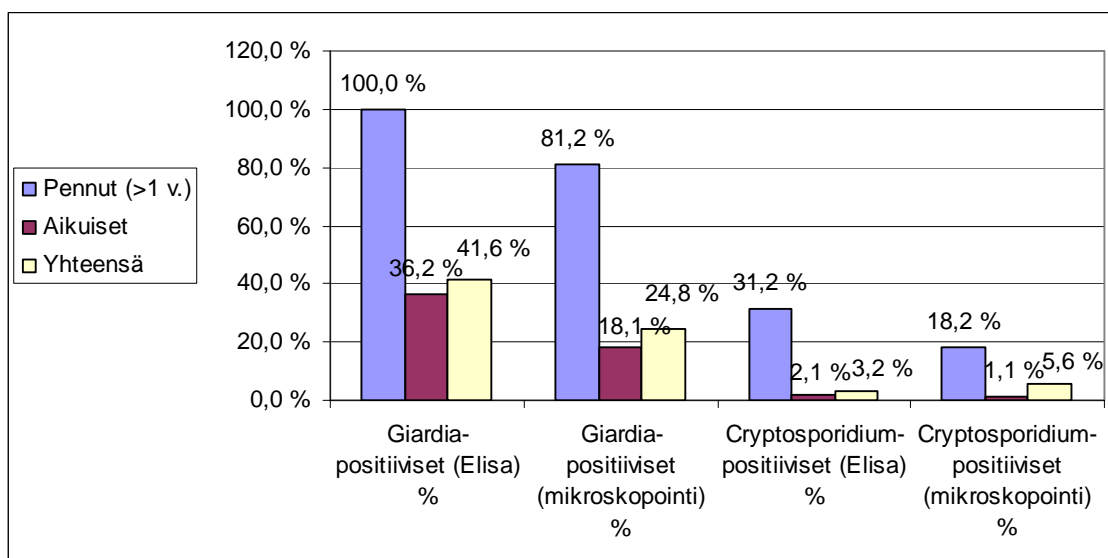
Kaikista koirista tuli aluksi 1 näyte, Elisa-testillä saaduista negatiivisista koirista pyysimme toisen näytteen. Näitä näytteitä tuli 78. Näytteiden oton välisen ajan mediaani oli 15 vuorokautta ja jakauma 6-28 vuorokautta. *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-tartunnan saaneeksi laskettiin koira, jolla oli Elisa-testissä positiivinen tulos joko näytteessä 1 tai 2. Tuloksia verrattiin koirien ikään, sukupuoleen, esiintyneeseen ripuliin ja eri ryhmiin.

2.4.2.1 *Giardia*-tartunta

Elisa-testillä tutkituista koirista *Giardia*-positiivisia oli 52 koira (41,6 %; kuva 7). Kaikki 16 pentua (100,0 %) olivat *Giardia*-positiivisia. Aikuisista koirista *Giardia*-positiivisia oli 34 (36,2 %). Kahden *Giardia*-positiivisen koiran ikätieto puuttui. Pennuilla tartunnan yleisyys oli lähes 3-kertainen verrattuna aikuisiin (RR 2.8, 95 % CI 2.1-3.6, $p < 0.001$). Nartuista *Giardia*-positiivisia oli 15 (42,9 %) ja uroksista *Giardia*-positiivisia 23 (31,5 %). Sukupuoliedot puutuivat 14 koiralta. *Giardia*-positiivisilla koirilla ripulia esiintyi lähes kaksi kertaa niin usein kuin koirilla, joilta ei todettu giardiaa (RR 1.81, 95 % CI 1.08-3.01, $p = 0.02$). Ripulitieto puuttui 16 *Giardia*-positiiviselta koiralta. *Giardia*-tartuntoja esiintyi eniten ryhmässä G (taulukko 8), joka koostui pennuista.

2.4.2.2 *Cryptosporidium*-tartunta

Elisa-testillä tutkituista koirista *Cryptosporidium*-positiivisia oli 7 koira (5,6 %; taulukko 7). Pennuista 5 koira (31,2 %) oli *Cryptosporidium*-positiivisia. Aikuisista koirista *Cryptosporidium*-positiivisia koiria oli 2 (2,1 %). Pennuilla tartunnan yleisyys oli lähes 15-kertainen verrattuna aikuisiin (RR 14.7, 95 % CI 3.1-69.3, $p < 0.001$). Aikuiset tartunnan saaneet olivat uroksia. Yhdelläkään *Cryptosporidium*-positiivisella, joista ripulitieto oli saatavilla, ei esiintynyt ripulia, mutta tieto puuttui 5 *Cryptosporidium*-tartunnan saaneelta. *Cryptosporidium*-positiiviset löytyivät ryhmästä A ja G (taulukko 5).



Kuva 7. Elisa-testin ja mikroskopoinnin tulokset ikäryhmittäin

Taulukko 5. *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-positiivisten koirien jakautuminen eri ryhmiin

Ryhmä	<i>Giardia</i> -positiivinen	<i>Cryptosporidium</i> -positiivinen
A	15 (57,7 %)	2 (7,7 %)
B	4 (36,4 %)	
C	7 (41,2 %)	
D	1 (5,6 %)	
E	2 (18,2 %)	
F	7 (38,9 %)	
G	14 (100 %)	5 (35,7 %)

2.4.3 Tartuntamuotojen erityys

Immunofluoresenssimikroskoopilla laskettiin positiivisten näytteiden sisältämät (oo)kystamäärät. Mikroskopoimalla *Giardia*-positiivisia oli 31 (24,8 %) ja *Cryptosporidium*-positiivisia 4 (3,2 %; kuva 7). Yksi *Cryptosporidium*-näyte, joka oli Elisa-testissä negatiivinen, osoittautui mikroskopiassa positiiviseksi. Koirien erittämien kystien lukumäärän mediaani oli 1/10 µl (jakauma 0-623) ja ookystien 0/10 µl (jakauma 0-53).

2.4.4 Ruoan suhde ripuliin sekä *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-tartuntoihin

Ruokaa 1 syövillä koirilla ripulia esiintyi 28 koiralla (37,3 %) ja ruokaa 2 syövillä 8 koiralla (30,8 %). Kummallakaan ruoalla ei ollut toista suurempaa yhteyttä ripulioireeseen (RR 1.21, 95% CI 0.64-2.32, p=0.55; taulukko 6).

Taulukko 6. Ruoan yhteys ripulioireisiin

	Ripuli +	Ripuli-
Ruoka1	28	47
Ruoka2	8	18

Ruokaa 1 syövillä koirilla *Giardia*-tartuntoja esiintyi 21 koiralla (28,0 %) ja ruokaa 2 syövillä 15 koiralla (57,7 %; taulukko 7). Ruokaa 2 syövillä koirilla tartuntoja vaikutti esiintyvän 2-kertaa niin usein kuin ruokaa 1 syövillä (RR 2.06, 95% CI 1.26-3.36, p=0.06). Molemmat 2 *Cryptosporidium*-positiivista koira, joista ruokatieto oli saatavilla, kuuluivat ryhmään A ja olivat syöneet ruokaa 2 (taulukko 8). Ruoan laatu ja pentukontakti olivat yhteydessä toisiinsa (taulukko 9).

Taulukko 7. Ruoan yhteys *Giardia*-tartuntoihin

	Giardia+	Giardia-
Ruoka1	21	54
Ruoka2	15	11

Taulukko 8. Ruoan yhteys *Cryptosporidium*-tartuntoihin

	Krypto+	Krypto-
Ruoka1	0	75
Ruoka2	2	24

Taulukko 9. Ruoan yhteys pentukontakteihin

	Pentukontakti+	Pentukontakti-
Ruoka1	0	75
Ruoka2	26	0

2.5 Pohdinta

Tutkimusotos vastaa hyvin sukupuolijakaumaltaan koko kenneliä. Samoin ripulin esiintyvyys ja ruokien jakauma vastaavat koko kenneliä, vaikka näytteenottajat ovat saaneet valikoida koirat, joista näytteet otettiin. Ikäjakaumaltaan otos ei vastaa koko kenneliä, koska lähes kaikki pennut tutkittiin.

Saatujen tulosten varmistamiseksi näytteet päätettiin tutkia sekä Elisa-testillä että mikroskopoimalla. Säästösyistä johtuen kuitenkin vain Elisa-testillä positiiviseksi todetut näytteet tutkittiin mikroskopoimalla. Kaikki Elisa-testillä saadut positiiviset tulokset eivät varmistuneet mikroskopoimalla. Vastaava löydös on tehty myös aiemmissa tutkimuksissa (Doing ym. 1999, Johnston ym. 2003). Positiiviseksi mikroskopointitulokseksi riitti yksi ehjä *Giardia*-kysta tai *Cryptosporidium*-ookysta. Suurimmalla osalla Elisa-positiivisista koirista todettiin mikroskopoimalla vain muutama tai ei yhtään (oo)kystaa. Osasyynä tulokseen saattaa olla joidenkin näytteiden huono kunto. Ulostetta oli joissain näytteissä hyvin vähän ja maa-ainesta jopa enemmän. Mikroskoopissa useissa näytteissä saattoi olla hajonneita (oo)kystiä, mutta ei yhtään ehjää ja tämän vuoksi tulokset jäivät negatiivisiksi. Väärät positiiviset tulokset Elisa-testillä voidaan myös selittää sillä, että kystiä ja *Giardia*-antigeenejä eritetään jaksoittain eri aikaan ulosteeseen (Addiss ym. 1991). Yhden pennun kohdalla mikroskopoimalla löytyi huomattava määrä *Cryptosporidium*-ookystiä, mutta tulos oli Elisa-testillä negatiivinen. Koska tunnistaminen mikroskoopilla ei perustunut tarkkoihin kokokriteereihin vaan (oo)kystien vertaamiseen kontrollinäytteeseen, myös virhetulkinnan mahdollisuus on olemassa. Poikkeava tulos voi johtua myös Elisa-testin käsittelyvirheestä tai sattuman vaikutuksesta. *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-tartunnan määritelmäksi katsottiin positiivinen Elisa-tulos jommassakummassa perättäisesti otetussa näytteessä.

Tutkimuksessani kennelissä esiintyi lähes puolella tutkituista koirista *Giardia*-tartunta. Verrattaessa *Giardia*-positiivisten koirien esiintyvyyttä kennelissä ja lemmikkikoirilla on huomattavissa selvä ero. Aiemmassa suomalaisessa tutkimuksessa *Giardia*-positiivisia koiria Elisa-menetelmällä tutkituista oli 9 %. Tutkittujen koirien määrä tässä tutkimuksessa oli 150 koira (Rimhanen-Finne ym. 2007). Tähän tutkimukseen verrattaessa kennel-olosuhteissa *Giardia*-tartunnan esiintyminen on selvästi yleisempää. Vastaava löydös on tehty myös muualla maailmassa, esimerkiksi Brasiliassa tehdyssä

vertailututkimuksessa lemmikkikoirilla esiintyi *Giardia*-tartuntaa 12,3 % ja kennelin koirilla 45,74 % (Huber ym. 2005).

Tutkimuksessani vain muutamalla koiralla todettiin *Cryptosporidium*-tartunta. *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintyminen on vaihdellut eri tutkimuksissa. Italiassa tehdyssä tutkimuksessa tutkittiin *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintymistä kennelolosuhteissa ja lemmikkikoirilla. *Cryptosporidium*-tartuntaa esiintyi kaikkiaan 3,3 %:lla, josta kennel-olosuhteissa esiintyvyys oli 5 % ja lemmikkikoirilla 1,7 %. Tässä ei ollut koiran iällä merkitystä (Giangaspero ym. 2006). Brasiliassa tehdyssä vertailututkimuksessa *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintyvyys oli kaikkiaan 1,4 %. Tutkimuksessa verrattiin löytökoiria, lemmikkikoiria ja kennelissä eläviä, mutta *Cryptosporidium*-alkueläimen kohdalla tilastollisesti merkitsevää eroa koiran elinolosuhteisiin ei ollut (Mundim ym. 2007). Brasiliassa on tehty myös toinen samanlainen vertailututkimus, jossa *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintyvyys oli 2,41 % ja tässäkin tutkimuksessa merkitsevää eroa ei ollut kennel-koirien ja lemmikkikoirien välillä (Huber ym. 2005). Japanissa tutkittiin kryptosporidioosia löytökoirilta ja esiintyvyys oli 0,3 % (Sato ym. 2006). Näihin tutkimuksiin verrattuna oman tutkimuksen tulokset ovat hyvin samansuuntaisia. Suomessa tehdyssä tutkimuksessa *Cryptosporidium*-esiintyvyys lemmikkikoirilla oli 9,0 % (Rimhanen-Finne ym. 2007). Tähän tutkimukseen verrattaessa lemmikkikoirilla *Cryptosporidium*-tartunnan esiintyvyys oli selvästi yleisempi.

Useissa tutkimuksissa, joissa on tutkittu sekä *Giardia*- että *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintymistä samoilla koirilla, on todettu *Giardia*-alkueläintä esiintyvän selvästi enemmän (Fontanarrosa ym. 2006; Mundim ym. 2007; Huber ym. 2005; Bugg ym. 1998). Norjassa tehdyssä tutkimuksessa on saatu toisenlaisia tuloksia. Tutkimuksessa tutkittiin *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintymistä koirilla ensimmäisen elinvuoden aikana. *Cryptosporidium*-positiivisia oli 44,1 % ja *Giardia*-positiivisia 20,7 %. (Hannes ym. 2007). Tutkimus koski kuitenkin koiria vain ensimmäisen elinvuoden aikana, joka varmasti muuttaa tuloksia erilaisiksi verrattuna tutkimuksiin, jossa on kaikenikäiset koirat mukana.

Omassa tutkimuksessani pennuilla esiintyi *Giardia*-tartuntaa selvästi enemmän kuin aikuisilla koirilla; kaikilla tutkituilla pennuilla todettiin tartunta. Valtaosa *Cryptosporidium*-tartunnan saaneista oli myös pentuja. Tutkimustulokset ovat

yhdensuuntaisia aiempiin tutkimuksiin verrattaessa. Aiemmassa suomalaisessa tutkimuksessa *Giardia*-positiivisten pentujen osuus oli 31 % ja aikuisten 3 % ja *Cryptosporidium*-positiivisia pentujen osuus oli 22,0 % ja aikuisten 5 % (Rimhanen-Finne, 2007). Tämä vastaa hyvin ikäjakaumaa omaan tutkimukseeni verrattaessa. Japanissa tehdyssä kennel-tutkimuksessa pentujen *Giardia*-tartunnan esiintyvyys oli 54,5 % ja aikuisilla 30,9 % (Itoh ym. 2005). Italiassa tehdyssä kennel-tutkimuksessa esiintyvyys alle vuoden ikäisillä oli 76,2 %, aikuisilla koirilla 22,9 % (yli viisivuotiaat) ja 66,7 % (alle viisivuotiaat) (Papini ym. 2005). Nuorilla koirilla immuniteetti ei ole vielä kehittynyt vastustamaan tartuntoja niin kuin aikuisilla. Pennut myös nuolevat ja laittavat suuhunsa erilaisia asioita toisin kuin aikuiset koirat, jolloin niiden *Giardia*-kystille altistumisen mahdollisuus kasvaa (Mundim ym. 2007). Omassa tutkimuksessani pennuilla tartuntojen esiintyvyys oli huomattavankin suuri. Tähän yksi syy on se, että tutkitut pennut olivat vain muutamasta pentueesta. Samassa pentueessa elävillä koirilla on suurin todennäköisyys saada tartunta. Muiden maiden tutkimuksissa on mukana ollut yleensä enemmän kuin yksi kenneli.

Kennelissä tartunta tapahtuu useimmiten suorana tartuntana tai fomiittien välityksellä. Kennelien hygieniaolosuhteet ovat usein huonommat kuin esimerkiksi lemmikkikoirilla kotioiloissa. Tämän vuoksi *Giardia*-kystat pääsevät helposti leviämään ulosteella saastuneen ruoan tai veden välityksellä, myös samojen hoitovälineiden käyttö altistaa tartunnan leviämiselle (Papini ym. 2005). Kennelissä on suurin mahdollisuus jatkuvaan tartunnan lähteeseen sekä stressaava elinympäristö (paljon koiria) heikentää immuniteettiä (Capellini ym. 2003).

Giardia- ja *Cryptosporidium*-tartunnan on todettu esiintyvän usein oireettomana (Rimhanen-Finne ym. 2007). Osalle koirista tartunta aiheuttaa kuitenkin ripulia. Tutkimuksessani puolella niistä *Giardia*-positiivisista koirista, joista ripulitieto oli saatavilla, esiintyi ripulia, ja lisäksi ripulia esiintyi negatiivisiksi todetuilla koirilla. *Cryptosporidium*-positiivisilla ei esiintynyt ripulia. Sukupuolella ei ollut vaikutusta *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-tartuntoihin. Samoihin tuloksiin on päästy muissakin tutkimuksissa (Itoh ym. 2005, Huber ym. 2005, Mundim ym. 2007, Papini ym. 2005).

Koirien hoitajien epäily oli, että *Giardia*-tartunnat ja ripulin oli aiheuttanut koirien ruokavalion muutos, joka tapahtui samoihin aikoihin. Tällöin 26 tutkitulle koiralle vaihdettiin ruoaksi ruoka 2, ja 8 koiraa sai ripulioireita. Tutkimusaineiston mukaan

ruokaa 2 syöville ripulia esiintyi prosentuaalisesti vähemmän kuin ruokaa 1 syöville, joten ruokavalion muutos saattoi olla ainoastaan joillakin yksilöillä syynä ripuliin. Mielenkiintoinen löydös oli todettu tilastollinen yhteys *Giardia*-tartuntojen ja ruoan 2 välillä. Todellisuudessa saatu tulos johtui todennäköisesti läheisestä pentukontaktista. Ainoastaan ryhmään A kuuluvilla koirilla oli kontakti samaan ryhmään sijoitettuihin pentuihin ja ryhmä A oli myös ainoa ryhmä, jossa tarjottiin uutta ruokaa 2. Pennuilla tartuntoja esiintyi huomattavasti enemmän kuin aikuisilla. Koska ruoan laatu ja pentukontakti olivat yhteydessä toisiinsa, toimi pentukontakti mitä ilmeisimmin sekoittavana tekijänä ruuan ja tartunnan välisessä yhteydessä. Tartuntoja esiintyi myös muissa ryhmissä kuin ryhmässä A, joten uudella ruualla tuskin oli todellista yhteyttä tartuntoihin.

Tutkimukseni perusteella *Giardia*-tartuntaa esiintyi kennelissä paljon. Pennuilla *Giardia*-tartuntaa esiintyi enemmän kuin aikuisilla koirilla, mikä on giardiatartunnoille tyypillistä. Tartuntoja todettiin eniten koiraryhmässä, jossa aikuiset koirat olivat kosketuksissa pentuihin. Kennelin koirissa todettiin myös muutamia *Cryptosporidium*-tartuntoja. Suurin osa tartunnoista todettiin pennuilla.

3 KIRJALLISUUSLUETTELO

1. Abe N, Kimata I, Iseki M. Identification of Genotypes of *Cryptosporidium parvum* Isolates from a Patient and a Dog in Japan. J. Vet. Med. Sci. 2002;64(2):165-168.
2. Abe N, Kimata I, Iseki M. Identification of Genotypes of *Giardia intestinalis* Isolates Dogs in Japan by Direct Sequencing of the PCR Amplified Glutamate Dehydrogenase Gene. J. Vet. Med. Sci. 2003;65(1):29-33.
3. Addis D.G, Mathews H.M, Stewart J.M, Wahlquist S.P, Williams R.M, Finton R.J, jne. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. J. Clin. Microbiology. 1991;29:1137-1142.
4. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal A.A, Matos O, Antunes F. Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal. Journal of Clinical Microbiology 2003;41:2744-2747.
5. Anderson K.A, Brooks A.S, Morrison A.K ect. Impact of *Giardia* vaccination on asymptomatic *Giardia* infections in dogs at a research facility. Can Vet J 2004;45:924-930.
6. Bailey J.M, Erramouspe J. Nitazoxanide treatment for giardiasis and cryptosporidiosis in children. The Annals of Pharmacotherapy 2004;38:634-40.
7. Barr S.C, Bowman D.D, Heller R.L. Efficacy of albendazole against giardiasis in dogs. Am J Vet Res 1993;54:926-928.
8. Barr S.C, Bowman D.D, Frongillo M.F ect. Efficacy of drug combination of praziquantel, pyrantel pamoate, and febantel against giardiasis in dogs. AJVR 1998;59:1134-1136

9. Barutzki D, Schimmel A, Schaper R. Efficacy of Pyrantel Embonate, Febantel and Praziquantel against *Giardia* spp. in Naturally Infected Dogs. *Giardia The Cosmopolitan Parasite*. Cabi 2002.

10. Björknäs H, Markkula H, Mäkelä. Giardiaasi varteenotettava mutta harvinainen suolistoinfektio Suomessa. *Suomen Lääkärilehti* 1995;35:3813-3814.

11. Bugg R.J, Robertson I. D, Elliot A. D, Thompson C.A. Gastrointestinal Parasites of Urban Dogs in Perth, Western Australia. *Vet. Journal* 1999;157:295-301.

12. Caccio S.M, Thompson A, McLauchlin J, Smith H.V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology* 2005: vol. 21 No.9.

13. Capelli G, Paoletti G, Iorio R, Frangipane R.A, Pietrobelli M, bianciardi P, Giangaspero A. Prevalence of *Giardia* spp. in dogs and humans in Northern and central Italy. *Parasitol Res* 2003;90:154-155.

14. Díaz V, Campos M, Lozano J, Mañas I, González J. Aspects of animal giardiasis in Granada province (southern Spain). *Vet. Parasitology* 1996;64:171-176.

15. Doing K.M, Hamm J.L, Jellison J.A, Marquis J.A, Kingsbury C. False-Positive Results Obtained with the Alexon ProSpecT *Cryptosporidium* Enzyme Immunoassay. *Journal of Clin. Microbiology* 1999;37:1582-1583.

16. Dudná S, Langrova I, Nápravník J, Jankovská I, Vadlejch J, Pekár S, Fechtner J. The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Vet. Parasitology* 2007;145:120-128.

17. Fontanarrosa M.F, Vezzani D, Basabe J, Eiras D. An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (argentiina): Age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. *Vet. Parasitology* 2006;136:283-295.

18. Giangaspero A, Iorio R, Paoletti B, Traversa D, Capelli G. Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in central Italy. *Parasitol Res* 2006;99:297-299.
19. Giangaspero A, Traldi G, Paoletti B, Traversa D, Bianciardi P. Efficacy of pyrantel embonate, febantel and praziquantel against *Giardia* species in naturally infected adult dogs. *The Veterinary Record* 2002;150:184-186.
20. Hammes I.S, Gjerde B.K, Robertson L.J. A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2007;49:22.
21. Hopkins R.M, Meloni B.P, Groth D.M, Wetherall J.D, Reynoldson J.J, Thompson R.C. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* 1997 Feb;83(1):44-51
22. Huber F, Bomfim T.C.B, Gomes R.S. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two loving situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Vet. Parasitology* 2005; 130:69-72.
23. Itoh N, Muraoka N, Saeki H, Aoki M, Itagaki T. Prevalence of *Giardia intestinalis* infection in dogs of breeding kennels in Japan. *J VetMed Sci* 2005;67:717-718.
24. Inpankaew T, Traub R, Thompson R.C, Sukthana Y. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007 Mar;38(2):247-55
25. Jacobs S.R, Forrester C.P.R, Yang J. A survey of prevalence of *Giardia* in dogs presented to Canadian veterinary practices. *Can Vet J* 2001;42:45-46.
26. Johnston S.P, Ballard M.M, Beach M.J, Causer L, Wilkins P.P. Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens. *Journal of Clin. Microbiology* 2003;41:623-626.

27. Keulen H, Macechko P.T, Wade S, Schaaf S, Wallis P.M, Erlandsen S.T. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitology* 2002;108:97-107.
28. Kirkpatrick C.E. Giardiasis. *Vet. Clinics of North America* 1987;17:1377-1387
29. Monis P.T, Adrews R.H, Mayrhofer G, Mackrill J, Ey P.L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia Intestinalis* and its relationship to host origin. *Infection, Genetics and Evolution* 2003;3:29-38.
30. Monis P.T, Thompson R.C.A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Inf, Genetics and Evolution* 2003;3:233-244.
31. Muntain M.J.S, Rosa L.A.G, Hortencio S.M, Faria E.S.M, Rodrigues R.M, Cury M.C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Vet. Parasitology* 2007; 144:356-359.
32. Olson M.E, Ceri H, Morck D.W. *Giardia* vaccination. *Parasitology Today* 2000;16:213-217.
33. Ortega Y.R, Adam R. *Giardia*: Overview and update. *Clinical Inf Diseases* 1997;25:545-50.
34. Papini R, Gorini G, Spaziani A, Cardini G. Survey on giardiosis in shelter dog populations. *Vet. Parasitology* 2005; 128:333-339.
35. Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca G.E, Martínez-Gordillo M.N. *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adult dogs from the southern of Mexico City. *Vet Parasitology* 2005;131:1-4.
36. Rimhanen-Finne Ruska. Zoonoottiset alkueläimet vesivälitteisen epidemian aiheuttajina. *Suomen Eläinlääkärilehti* 2003;109:203-205.

37. Rimhanen-Finne Ruska. *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection in environmental and faecal samples. Helsinki 2006.
38. Rimhanen-Finne R, Enemark H.L, Kolehmainen J, Toropainen P, Hänninen M.L. Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Vet Parasitology* 2007;145:345-348.
39. Satoh M, Matsubara-Nihei Y, Sasaki T, Nakai Y. Characterization of *Cryptosporidium canis* isolated in Japan. *Parasitol Res* 2006;99:746-748.
40. Schlüsche A, Grewing M, Mehlhorn H, Schimmel A, Schaper R. Efficacy of Febantel and Pyrantel Embonate (Drontal® Puppy) on *Giardia*-Infections of Dogs and Mice: a Therapeutic and Cytologic Study. *Giardia The Cosmopolitan Parasite*. Cabi 2002.
41. Smith H.V, Cacció S.M, Cook N, Nichols R.A.B, Tait A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitology* 2007;149:29-40.
42. Sunnotel O, Lowery C.J, Moore J.E, Dooley J.S.G, Xiao L, Millar B.C, Rooney P.J, Snelling W.J. *Cryptosporidium*. *Journal compilation* 2006:7-16.
43. Thompson Andrew R.C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitology* 2004;126:15-35.
44. Thompson Andrew R.C, Palmer C.S, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal* 2008;177:18-25.
45. Traub R.J, Monis P.T, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson R.C.A. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology* 2004;128:253-262.

46. Zajac A.M, LaBranche T.P, Donoghue A.R, Chu T. Efficacy of fenbendazole in the treatment of experimental Giardia infection in dogs. AJVR 1998;59:61-63.