

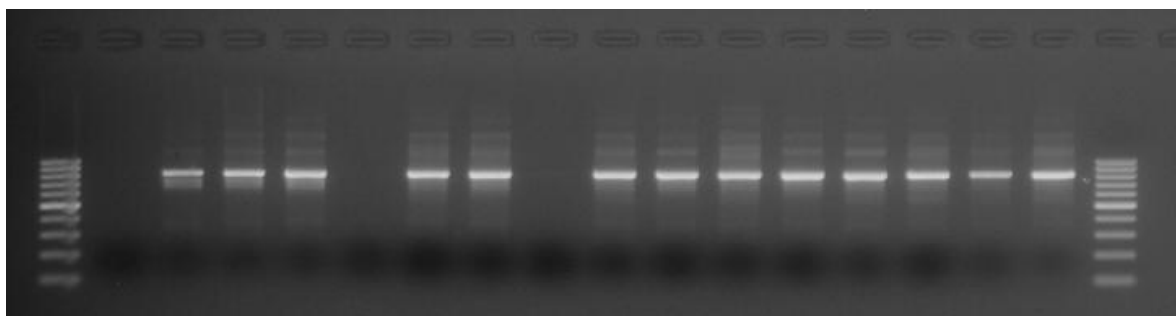
Helsingin yliopisto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto

Ympäristöhygienian oppiaine

***CRYPTOSPORIDIUM*-ALKUELÄIMEN
DIAGNOSTIIKKA JA ESIINTYMINEN
VASIKOILLA**



Kati Niiranen

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

2012

Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto	
Tekijä - Författare – Author Kati Niiranen			
Työn nimi - Arbetets titel – Title <i>Cryptosporidium</i> -alkueläimen diagnostiikka ja esiintyminen vasikoilla			
Oppiaine - Läroämne – Subject Ympäristöhygieniä			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatin tutkielma		Aika - Datum – Month and year Maaliskuu 2012	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages 51 sivua
Tiivistelmä - Referat – Abstract			
<p>Kaikki <i>Cryptosporidium</i>-sukuun kuuluvat alkueläimet ovat solunsisäisiä parasiitteja, jotka voivat infektoida yli 150 nisäkäslajin lisäksi myös lintuja, matelijoita, sammakkoeläimiä ja kaloja. Kryptosporideja esiintyy kaikkialla maailmassa. Tutkituin <i>Cryptosporidium</i>-laji on <i>Cryptosporidium parvum</i>, joka on varsinkin nuorten vasikoiden parasiitti. Muita naudoilla esiintyviä kryptosporidilajeja ovat <i>Cryptosporidium bovis</i>, <i>Cryptosporidium ryanae</i> ja <i>Cryptosporidium andersoni</i>. Kryptosporidioosiksi kutsutaan <i>Cryptosporidium</i>-alkueläimen aiheuttamaa tautia, jonka tyypillisin oire on itsestään rajoittuva lievä ripuli.</p> <p>Kryptosporidioosi diagnosoidaan etsimällä <i>Cryptosporidium</i>-alkueläimen ookystamuotoja ulostenäytteistä. Yleisimmin käytössä oleva menetelmä on joko värjättyjen tai värjäämättömien näytteiden mikroskopointi. <i>Cryptosporidium</i>-alkueläimiä voidaan tutkia suoraan ulostenäytteistä, mutta yleensä näytteet konsentroidaan ennen varsinaista diagnosointia. Konsentrintimenetelmillä pyritään kasvattamaan ulostenäytteiden ookystien määrää suhteessa näytetilavuuteen, jolloin niiden havaitseminen helpottuu. Konsentrinti tapahtuu käyttämällä apuna erilaisia sentrifugointi- ja flotaatiomenetelmiä sekä tietyn tiheyden omaavia suola- tai sokeriliuoksia. Kryptosporideille on viime vuosina kehitetty myös useita polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvia molekylaarisia tunnistusmenetelmiä.</p> <p>Tutkimuksen tarkoituksena oli verrata keskenään <i>Cryptosporidium</i>-alkueläinten diagnostiikassa käytettäviä analyysimenetelmiä sekä kartoittaa kryptosporidien esiintymistä vasikoilla. Ulostenäytteet kerättiin vasikoiden kolmivaihekasvattamosta, jossa vasikat olivat keskimäärin alle kuukauden ikäisiä. 64 näytettä sisälsivät riittävästi ulostetta, jotta ne voitiin hyväksyä tutkimukseen. Tutkimuksen kokeellisessa osassa tarkasteltiin kolmea yleisimmin käytössä olevaa kryptosporidien konsentrintimenetelmää, jotka olivat natriumkloridiflotaatio, sokeriflotaatio ja formaliini-etyyliasettaattimenetelmä. <i>Cryptosporidium</i>-ookystien havaitsemiseen konsentroiduista ulostenäytteistä käytettiin sekä Ziehl-Neelsen värjäysmenetelmää että polymeraasiketjureaktiota (PCR). Kahdeksan kryptosporidien suhteen positiivista ulostenäytettä tyypitettiin DNA-sekvensoinnin avulla, jotta saatiin tietoa Suomessa esiintyvien <i>Cryptosporidium</i>-lajien prevalensseista.</p> <p>Analysoiduista 64 ulostenäytteestä 19 (29,7 %) oli PCR-menetelmällä kryptosporidien suhteen positiivisia. DNA-sekvensointiin valituista kahdeksasta näytteestä seitsemän oli genotyyppiltään <i>C. bovis</i> ja yksi <i>C. ryanae</i>. Verratuista <i>Cryptosporidium</i>-alkueläinten diagnostiikassa käytettävistä menetelmistä Ziehl-Neelsen värjäys sopii varsinkin kliinisten näytteiden analysointiin, jotka sisältävät paljon ookystia. PCR-menetelmää kannattaa käyttää näytteille, joiden ookystamäärä on vähäinen tai joiden parasitologinen status halutaan selvittää laji- tai genotyyppitasolle asti. Tämän tutkimuksen perusteella kryptosporidien diagnostiikassa käytettävistä konsentrintimenetelmistä toimivin on natriumkloridiflotaatio, ja se voidaan ongelmitta yhdistää joko PCR-menetelmään tai Ziehl-Neelsen-värjäykseen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Cryptosporidium</i> , prevalenssi, NaCl-flotaatio, sokeriflotaatio, formaliini-etyyliasettaattimenetelmä, PCR			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin kampuskirjasto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s) Johtaja: professori Marja-Liisa Hänninen, ohjaaja: ELT Tiina Autio			

1 JOHDANTO	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	3
2.1 Yleistä <i>Cryptosporidium</i> -alkueläimistä	3
2.2 Kryptosporidien elämäntieto.....	4
2.3 Kryptosporidien patogeenesi vasikoilla	5
2.4 Naudoilla esiintyvien kryptosporidien prevalenssi	6
2.5 Kryptosporidioosi vasikoilla	9
2.6 Humaanikryptosporidioosi.....	10
2.7 Kryptosporidien diagnostiikka	12
2.8 Konsentroidintimenetelmät	13
2.8.1 Sheatherin sokeriflotaatio-menetelmä.....	14
2.8.2 Natriumkloridiflotaatio (NaCl)	15
2.8.3 Sinkkisulfaattiflotaatio (ZnSO ₄).....	16
2.8.4 Formaliini-etyyliasettaattimenetelmä.....	16
2.9 Mikroskopointi	17
2.10 Värjäysmenetelmät	18
2.10.1 Ziehl-Neelsen värjäys.....	18
2.10.2 Immunofluoresenssivärjäys.....	19
2.11 Polymeerasiketjureaktio.....	21
3 AINEISTO JA MENETELMÄT	23
3.1 Näytteiden kerääminen.....	23
3.2 Näytteiden valitseminen	27
3.3 Menetelmät	27
3.3.1 Natriumkloridiflotaatio (NaCl)	28
3.3.2 Sokeriflotaatio.....	29
3.3.3 Formaliini-etyyliasettaattimenetelmä.....	30
3.3.4 Näytteiden sively objektilasille	30
3.3.5 Ziehl-Neelsen värjäys.....	31
3.3.6 DNA-eristys	32
3.3.7 Nested PCR	33
3.3.8 DNA-sekvensointi.....	34
4 TULOKSET.....	35
5 POHDINTA	37
6 KIITOKSET	44
7 KIRJALLISUUSLUETTELO	45

1 JOHDANTO

Tutkielman tarkoituksena oli perehtyä tavallisimpiin *Cryptosporidium*-alkueläinten diagnostiikassa käytettäviin menetelmiin sekä kartoittaa vasikoilla esiintyvien kryptosporidilajien prevalenssia Suomessa ja muualla maailmassa. *Cryptosporidium*-alkueläimet ovat maailmanlaajuisesti esiintyviä suolistoparasiitteja, jotka voivat infektoida monia eri eläinlajeja (Fayer ym. 2000, Fayer 2008). Kryptosporidien aiheuttamaa tautia kutsutaan kryptosporidioosiksi. Taudin tyypillisin oire on lievä ripuli, joka paranee itsestään muutaman päivän sairastamisen jälkeen (Trotz-Williams ym. 2005, Radostits ym. 2007). Tutkituin *Cryptosporidium*-laji on *Cryptosporidium parvum*, joka infektoi pääasiassa nuoria märehitjöitä, mutta on *Cryptosporidium hominis*-alkueläimen ohella ainut kryptosporidilaji, joka voi tarttua myös ihmiseen (Xiao & Fayer 2008). Muita naudoilla esiintyviä *Cryptosporidium*-lajeja ovat *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium ryanae* ja *Cryptosporidium andersoni* (Santin ym. 2004, Fayer ym. 2006, Fayer ym. 2007).

Kryptosporidioosi diagnosoidaan etsimällä *Cryptosporidium*-alkueläimen ookystamuotoja ulostenäytteistä (Casemore 1991, Quilez ym. 1996, Coupe ym. 2005, Trotz-Williams ym. 2005, Radostits ym. 2007, Kar ym. 2011). Ookystat voidaan havaita ulostenäytteistä tutkimalla niistä suoraan tehtyjä levitteitä, erilaisilla sedimentaatio- ja flotaatiotutkimuksilla, immunologisia menetelmiä apuna käyttäen tai polymeerasiketjureaktion avulla (Trotz-Williams ym. 2005, Radostits ym. 2007, Paul ym. 2009, Kar ym. 2011). Eri analyysimenetelmien välillä on suuria eroja mm. niiden sensitiivisyydessä ja spesifisyydessä. Paul ym. (2009) tekemässä tutkimuksessa Ziehl-Neelsen värjäyksellä käsiteltyjen suoralevitteiden sensitiivisyys oli 65,4 % ja spesifisyys 95,5 %. Samaisessa tutkimuksessa Sheatherin sokeriflotaatiomenetelmän sensitiivisyydeksi saatiin puolestaan 71,1 % ja spesifisyydeksi 96,4 %. Aiempien tutkimusten perusteella ylivertainen sensitiivisyys ja spesifisyys kryptosporididiagnostiikassa saavutetaan nested PCR-menetelmää käyttämällä (Balabat ym. 1996, Trotz-Williams ym. 2005). Kryptosporidien diagnostiikassa käytettävät menetelmät eroavat toisistaan myös nopeuden, hinnan ja vaativuustason suhteen.

Cryptosporidium-alkueläimen prevalenssitutkimuksia on tehty runsaasti useissa eri maissa. Tutkimustuloksissa esiintyy suurta hajontaa. Lähimpänä Suomea tehdyt julkaistut kryptosporidien prevalenssitutkimukset löytyvät Ruotsista. Sirverlås ym. (2009) tekemässä tutkimuksessa 52 % alle kahden kuukauden ikäisistä vasikoista eritti ulosteissaan *Cryptosporidium parvum*-alkueläimen kaltaisia ookystia. Kanadassa tehdyssä tutkimuksessa kryptosporidien prevalenssiksi saatiin 64 % (Dixon ym. 2011). Unkarissa 49 % tutkituista vasikoiden ulostenäytteistä oli positiivisia kryptosporidien suhteen (Plutzer & Karanis 2007). Portugalissa 25,4 % vasikoista eritti ulosteissaan *C. parvum*-ookystia (Mendonca ym. 2007). Japanissa *Cryptosporidium*-alkueläimen prevalenssiksi alle kahden kuukauden ikäisillä vasikoilla saatiin 75 % (Karanis ym. 2010). Suomessa Autio ym. (2010) tekemässä tutkimuksessa *Cryptosporidium*-ookystien prevalenssi vasikoilla vaihteli 12 – 17 % välillä. Muita varsinaisia vasikoilla esiintyvien kryptosporidien prevalenssitutkimuksia ei Suomessa ole tehty.

Tämän tutkimuksen kokeellisessa osassa verrattiin keskenään muutamia *Cryptosporidium*-alkueläinten diagnostiikassa käytettäviä analyysimenetelmiä sekä kartoitettiin kryptosporidien esiintymistä vasikoilla Suomessa. Tutkimukseen valittiin kolme yleisimmin käytössä olevaa kryptosporidien konsentroidintimenetelmää, jotka olivat natriumkloridiflotaatio, sokeriflotaatio ja formaliini-etyyliasettaattimenetelmä. *Cryptosporidium*-ookystien havaitsemiseen konsentroiduista ulostenäytteistä käytettiin tässä tutkimuksessa sekä Ziehl-Neelsen värjäysmenetelmää että polymeerasiketjureaktiota (PCR). Konsentroidintimenetelmien, Ziehl-Neelsen värjäyksen ja PCR-menetelmän ominaisuuksia vertailtiin keskenään mm. *Cryptosporidium*-löydösten lukumäärän, menetelmän vaativuuden ja käytettävyyden suhteen. Samalla selvitettiin *Cryptosporidium*-alkueläinten esiintymistä Suomessa Pohjois-Savon alueella. Lisäksi kahdeksan kryptosporidien suhteen positiivista ulostenäytettä tyypitettiin DNA-sekvensoinnin avulla, jotta saatiin tietoa myös Suomessa vasikoilla esiintyvien *Cryptosporidium*-lajien prevalensseista.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Yleistä *Cryptosporidium*-alkueläimistä

Kaikki *Cryptosporidium*-sukuun kuuluvat alkueläimet ovat solunsisäisiä parasiitteja, jotka infektoivat selkärankaisten ruoansulatuskanavan mikrovillusten epiteelisoluja (Bowman 2003, Fayer 2008). Kryptosporideja esiintyy kaikkialla maailmassa, ja niitä tunnetaan tällä hetkellä 18 eri lajia ja yli 40 genotyyppiä, joista kaikkia ei ole vielä nimetty (Xiao & Ryan 2008). Kryptosporidit voivat infektoida yli 150 nisäkäslajin lisäksi myös lintuja, matelijoita, sammakkoeläimiä ja kaloja (Fayer ym. 2000, Fayer 2008).

Tutkituin kryptosporidilaji on *Cryptosporidium parvum*, jota aiemmin pidettiin infektiivisenä lähes kaikille nisäkäslajeille (Xiao & Fayer 2008). Uusimpia geneettisiä menetelmiä apuna käyttäen *C. parvum*-alkueläimiä ei kuitenkaan ole onnistuttu löytämään luonnossa elävistä nisäkkäistä (Feng ym. 2007). Nykytiedon valossa *C. parvum* infektoi pääasiassa vain märehitjöitä ja ihmisiä (Xiao & Fayer 2008). Aiemmin *C. parvum* jaoteltiin kahteen eri genotyyppiin, joista genotyyppiä 1 esiintyi ihmisillä ja genotyyppiä 2 naudoilla (Sulaiman ym. 1998, Widmer ym. 2000, Radostits ym. 2007). Nykyään genotyypit on eriytetty omiksi lajeikseen *Cryptosporidium hominis* (ent. *C. parvum* genotyyppi 1) ja *Cryptosporidium parvum* (ent. *C. parvum* genotyyppi 2) (Xiao & Fayer 2008). Merkittäväksi *C. parvum*-alkueläimen tekee se, että se on *C. hominis*-lajin ohella ainut *Cryptosporidium*-alkueläin, joka on infektiivinen ihmisille (Sulaiman ym. 1998, Widmer ym. 2000, Coupe ym. 2005). *C. parvum*-tartunta voi olla jopa henkeä uhkaava henkilöllä, joiden immuunipuolustus on heikentynyt, kuten on tilanne AIDS- tai syöpäpotilailla (Current ym. 1983, Casemore 1991, Balabat ym. 1996, Kuczynska & Shelton 1999, Xiao ym. 1999, Chappell & Okhuysen 2002, Radostits ym. 2007). *C. hominis* on puolestaan puhtaasti ihmispatogeeni, joten se ei pysty infektoimaan nautoja tai muita eläimiä (Radostits ym. 2007).

C. parvum-alkueläimen lisäksi muita naudoilla esiintyviä kryptosporidilajeja ovat *Cryptosporidium bovis* (ent. *Cryptosporidium parvum* genotyyppi bovine B), *Cryptosporidium ryanae* (ent. *Cryptosporidium parvum* deer-like genotyyppi) ja *Cryptosporidium andersoni*

(ent. *Cryptosporidium muris*) (Santin ym. 2004, Fayer ym. 2006, Fayer ym. 2007). Eri kryptosporidilajien esiintymiseen naudoilla vaikuttaa eläimen ikä (Santin ym. 2004, Santin ym. 2008, Fayer ym. 2006, Fayer ym. 2007, Xiao & Fayer 2008). *C. parvum* infektoi pääasiassa alle kahden kuukauden ikäisiä vasikoita, joita voidaan pitää vielä yksimahaisina. Vanhemmilla eläimillä esiintyviä lajeja ovat *C. bovis* ja *C. ryanae*, ja *C. andersoni* (Santin ym. 2004, Santin ym. 2008, Fayer ym. 2006, Fayer ym. 2007).

Cryptosporidium-ookystat ovat erittäin kestäviä (Brook ym. 2007, Radostits ym. 2007). Ookystat ovat vastustuskykyisiä suurimmalle osalle desinfiointiaineista ja voivat säilyä elinvoimaisina jopa 18 kuukautta viileässä ja kosteassa ympäristössä (Fayer ym. 2000). Ookystat säilyvät infektiivisinä useita kuukausia maaperässä tai lietteessä, mutta ovat herkkiä kuivumiselle ja yli 60 °C asteen lämpötiloille (Chappell & Okhuysen 2002, Bowman 2003). Ookystien infektiivisyys saadaan poistettua altistamalla ne ammoniakille, formaliinille, vetyperoksidille ja alle 0° tai yli 65 °C asteen lämpötiloille (Radostits ym. 2007).

2.2 Kryptosporidien elämänsykli

Kryptosporidien infektiivinen muoto on loisen elämänsyklin ookystavaihe (Brook ym. 2007). Ookystien koko vaihtelee 4 – 8 µm välillä lajista ja ookystan kehitysvaiheesta riippuen (Bowman 2003). Esimerkiksi *C. parvum* on kooltaan 5,0 x 4,5 µm ja *C. andersoni* 7,4 x 5,6 µm (Upton & Current 1985, Lindsay ym. 2000). Sairastuneet yksilöt erittävät hyvin suuria määriä infektiivisiä ookystia ulosteissaan, mikä johtaa ympäristön kontaminoitumiseen laajalta alueelta (Brook ym. 2007, Radostits ym. 2007). Kryptosporidioosia sairastavien vasikoiden on todettu erittävän jopa miljardeja ookystia 1 - 2 viikon ajanjaksona (Kuczynska & Shelton 1999). *Cryptosporidium*-ookystia löytyy oireilevien eläinten ulosteesta keskimäärin 10^5 - 10^7 kappaletta ulostegrammaa kohden (Moon & Woodmansee 1986, Higgins ym. 2001).

Loisen koko elämänsykli tapahtuu yhdessä isäntäeläimessä (Xiao & Fayer 2008). Tartunta tapahtuu, kun eläin syö infektiivisen ookystan. Ookystat sisältävät neljä sporozoiittia, jotka

vapautuvat ruoansulatuskanavassa ja tunkeutuvat ohutsuolen mikrovillusten sisään. Solujen sisällä sporozoiitit erilaistuvat trophozoiiteiksi, jotka lisääntyvät suvuttomasti muodostuen tyyppin I ja II merontteja. Tyyppin I meronttien sisältä vapautuu merozoiitteja, jotka infektoivat viereisiä isäntäsoluja ja jatkavat suvuttoman lisääntymisen ketjua. Tyyppin II meronteista vapautuu merozoiitteja, jotka erilaistuvat urospuolisiksi mikrogamonteiksi ja naaraspuolisiksi makrogamonteiksi. Hedelmöittyneistä makrogamonteista kehittyy joko paksuseinäisiä ookystia, jotka eritetään ulosteiden mukana ulos elimistöstä tai ohutseinäisiä ookystia, jotka vastaavat isännän autoinfektioista (Rimhanen-Finne 2006, Xiao & Fayer 2008).

2.3 Kryptosporidien patogeneesi vasikoilla

Cryptosporidium parvum on varsinkin nuorten vasikoiden parasiitti ja sitä esiintyy maailmanlaajuisesti (Kuczynska & Shelton 1999, Radostits ym. 2007, Silverlås ym. 2009). *C. parvum* infektoi pääasiassa alle kahden kuukauden ikäisiä vasikoita (Bowman 2003, Santin ym. 2004, Santin ym. 2008, Fayer ym. 2006, Fayer ym. 2007, Xiao & Fayer 2008). Vanhemmilla vasikoilla esiintyviä lajeja ovat lähinnä *C. bovis* ja *C. ryanae* ja aikuisilla naudoilla *C. andersoni* (Fayer ym. 2006, Fayer ym. 2007, Santin ym. 2004, Santin ym. 2008). Vanhemmat eläimet ovat immuuneja *C. parvum*-tartunnalle (Olson ym. 1997, Fayer 2008).

C. parvum infektoi ohutsuolen enterosyyttejä ja on yksi merkittävimpiä vastasyntyneiden vasikoiden ripulin aiheuttajista (Fayer ym. 2000). *C. andersoni*-ookystat lisääntyvät sen sijaan nuorkarjan ja aikuisten nautojen juoksutusmahan epiteelisoluissa, ja tartunta on yhdistetty maidontuotannon vähentymiseen, muttei muihin kliinisiin oireisiin (Lindsay ym. 2000). *C. bovis*- ja *C. ryanae*-ookystitien esiintymisellä vasikoiden ulostenäytteissä ei ole todettu olevan kliinistä merkitystä eli näiden kryptosporidilajien katsotaan olevan apatogeenisiä (Santin ym. 2004).

Kokeellisesti aiheutetut infektiot osoittavat, että kryptosporidioositartunnan saamiseksi tarvitaan vain pieni määrä infektiivisiä ookystia (Dupont ym. 1995, Radostits ym. 2007).

Tartunta tapahtuu feko-oraalista reittiä (Dupont ym. 1995, Trotz-Williams ym. 2005, Fayer 2008). Infektiolähde on sairastuneen yksilön uloste (Trotz-Williams ym. 2005, Radostits ym. 2007). Vasikat voivat saada tartunnan suoraan toisilta sairastuneilta vasikoilta tai ulosteella saastuneen, veden, rehun tai esimerkiksi kuivikkeiden kautta (Radostits ym. 2007). Myös ihminen voi toimia tartunnan levittäjänä (Radostits ym. 2007).

C. parvum kolonisoii etenkin ohutsuolen distaaliosien mikrovillusten enterosyyttejä, joissa se aiheuttaa vaurioita suoliston limakalvoon ja enterosyytteihin, villusten atrofiaa, entsyymien määrän vähenemistä ja villusten pinta-alan pienenemistä (Radostits ym. 2007, Fayer & Xiao 2008). Vaurioita saattaa esiintyä myös muissa suoliston osissa, kuten caecumissa ja koolonissa (Radostits ym. 2007). Patogeneesin tarkkaa mekanismia ei tunneta, mutta villusten tuhoutumisen uskotaan johtavan ruoansulatuksen ja imeytymisen heikkenemiseen, mikä puolestaan aiheuttaa infektion saaneille yksilöille ripulia (Radostits ym. 2007).

2.4 Naudoilla esiintyvien kryptosporidien prevalenssi

Santin ym. (2004) tutkivat *Cryptosporidium*-lajien esiintymistä vasikoilla, joiden iät vaihtelivat viidestä päivästä yhteentoista kuukauteen. Näytteitä kerättiin 15 maidontuotantotilalta seitsemän USA:n osavaltion alueelta kahden vuoden aikana. PCR:lla analysoiduista 840 ulostenäytteestä 278 kappaletta (33,01 %) oli positiivisia *Cryptosporidium*-alkueläinten suhteen. Prevalenssi alle kahden kuukauden ikäisillä vasikoilla oli 41,0 % ja 3 - 11 kk ikäisillä vasikoilla 26,2 %. Ookystien erityksessä havaittiin kaksi määrällistä huippua. 66,7 % ookystista eritettiin kahden viikon ikäisten vasikoiden ja 30,4 % kuuden kuukauden ikäisten vasikoiden toimesta. Myös muissa tutkimuksissa on havaittu, että *Cryptosporidium*-ookystia erittävät eniten ulosteissaan alle kuukauden ikäiset vasikat (Sturdee ym. 2003, Santin ym. 2008). Santin ym. (2004) aineistossa *C. parvum*-ookystia löytyi pelkästään alle kahden kuukauden ikäisten vasikoiden ulosteesta, ja 1 – 2 viikon ikäisillä vasikoilla se oli ainut ulosteista löydetty kryptosporidilaji. Vasikoiden, joiden iät vaihtelivat kolmesta viikosta kahteen kuukauteen, ulosteista todettiin myös *C. bovis*- ja *C. ryanae*-ookystia. Yli kolmen kuukauden ikäisillä vasikoilla hallitsevia

Cryptosporidium-lajeja olivat *C. bovis*, *C. ryanae* ja *C. andersoni*, eikä tässä ikäryhmässä todettu yhtään *C. parvum*-tartuntaa. Eri *Cryptosporidium*-lajien ookystien määrälliset erityshuiput jakautuivat vasikoiden ikien mukaan seuraavasti: *C. parvum*-ookystien erityshuippu oli 1 – 2 viikon, *C. bovis*-ookystien 4 – 7 kk, *C. ryanae*-ookystien 3 – 5 kk ja *C. andersoni*-ookystien 3 – 7 kk iässä. 10 - 11 kuukauden ikäisistä eläimistä vain kaksi eritti ookystia ulosteissaan ja ulosteista löydetty kryptosporidilajit olivat *C. andersoni* ja *C. ryanae*.

Fayer ym. (2006) tutkivat puolestaan kryptosporidien esiintymistä 1 - 2 vuoden ikäisillä hiehoilla. Yhteensä 571 ulostenäytettä kerättiin samoilta 14 maidontuotantotilalta kuin Santin ym. (2004) kaksi vuotta aiemmin tekemässä tutkimuksessa. Näytteistä 68 kappaletta (11,9 %) oli positiivisia *Cryptosporidium*-alkueläinten suhteen. PCR-positiivisten ulostenäytteiden lajiprevalenssit jakautuivat seuraavasti: *C. andersoni* 43 %, *C. bovis* 35 %, *C. ryanae* 15 % ja *C. parvum* 6 %. Vastaavat prosenttiosuudet suhteutettuna kaikkiin otettuihin ulostenäytteisiin eli myös PCR:n suhteen negatiivisiin olivat 5,1 %, 4,2 %, 1,8 % ja 0,7 %. *C. andersoni*- ja *C. bovis*-lajin ookystia löytyi hiehojen ulosteista koko 12 - 24 kuukauden ikäjakson puitteissa. Sitä vastoin *C. ryanae*-ookystien erityy keskittyi 12 -17 ikäkuukausien välille, ja ainoastaan neljä eläintä 571 yksilöstä eritti ulosteissaan satunnaisin väliajoin *C. parvum*-ookystia.

Fayer ym. (2007) jatkoivat tutkimustaan seuraavana vuonna tutkien samojen maidontuotantotilojen aikuisia nautoja. Ulostenäytteitä kerättiin yhteensä 541 kappaletta yli 2-vuotiailta lehmiltä. *Cryptosporidium*-positiivisia ulostenäytteitä löytyi 31 kappaletta eli *Cryptosporidium*-alkueläinten prevalenssi oli 5,7 % tässä ikäryhmässä. Positiivisista löydöksistä *C. andersoni* esiintyi 65 %, *C. bovis* 29 % ja *C. parvum* 6 % tapauksista. Yhtään *C. ryanae*-löydöstä ei tässä tutkimuksessa todettu. Samoin kuin kahdessa aiemmassa tutkimuksessa kryptosporidien kokonaisprevalenssi laski merkittävästi sitä mukaa kuin eläinten ikä kasvoi. Prevalenssi vasikoilla ennen vieroitusta oli 41 %, vieroituksen jälkeen 26 %, hiehoilla 12 % ja aikuisilla naudoilla 5,7 %.

Lähimpänä Suomea tehdyt julkaistut prevalenssitutkimukset löytyvät Ruotsista. Sirverlås ym. (2009) tekemässä tutkimuksessa analysoitiin yhteensä 1202 kappaletta nautojen ulostenäytteitä, joista 459 oli peräisin vasikoilta, 493 nuorkarjalta ja 250 aikuisilta naudoilta.

Näytteet oli kerätty 50 maidontuotantotilalta eri puolilta Ruotsia. Ookystien analysoimiseen käytettiin immunofluoresenssimenetelmää, ja ookystat jaoteltiin kahteen ryhmään kokonsa perusteella: *C. parvum*-alkueläintä muistuttavat ookystat ja *C. andersoni*-ookystat. Molekylaarisia tunnistusmenetelmiä ei kyseisessä tutkimuksessa käytetty, joten *C. parvum*-ookystia ei voitu erottaa *C. bovis*- ja *C. ryanae*-ookydista. *Cryptosporidium*-ookystia löytyi 48 tilalta, mikä kattoi 96 % tutkituista maidontuotantotiloista. 240 (52 %) alle kahden kuukauden ikäistä vasikkaa eritti *C. parvum*-alkueläimen kaltaisia ookystia ulosteissaan, ja yksi neljän viikon ikäinen vasikka oli positiivinen *C. andersoni*-alkueläimen suhteen. 4 - 12 kuukauden ikäisistä nautoista 142 (26 %) eritti *C. parvum*-alkueläintä muistuttavia ookystia ulosteissaan ja kuusi *C. andersoni*-ookystia. Aikuisista nautoista 14 (5,6 %) oli positiivisia *C. parvum*-kaltaisten ookystien suhteen. *C. andersoni*-alkueläimiä ei aikuisten nautojen ulosteissa todettu lainkaan.

Tutkimuksia on tehty USA:n ja Ruotsin lisäksi myös monissa muissa maissa. Kanadassa tehdyssä tutkimuksessa tutkittiin 45 maidontuotantotilaa, joista *Cryptosporidium*-positiivisia oli 29 kappaletta (64 %). DNA-sekvensoinnissa löydettiin kaikkia neljää nautoilla esiintyvää *Cryptosporidium*-lajia (Dixon ym. 2011). Unkarissa 79 ulostenäytettä kerättiin vieroittamattomilta vasikoilta 52 maidontuotantotilalta eri puolilta maata ja 39 (49 %) ulostenäytettä oli positiivisia kryptosporidien suhteen. Positiivisista näytteistä 22 analysoitiin PCR-menetelmää käyttäen, ja 21 vasikkaa eritti ulosteissaan *C. parvum*-ookystia ja yksi *C. ryanae*-ookystia (Plutzer & Karanis 2007). Portugalissa näytteitä kerättiin 96 tilalta ja 467 naudalta, joista 291 oli vasikoita ja 176 aikuisia eläimiä. 74 (25,4 %) vasikoista ja 8 (4,5 %) aikuisista nautoista eritti ulosteissaan *C. parvum*-ookystia (Mendonca ym. 2007). Kiinassa tehdyissä tutkimuksissa kryptosporidien keskimääräinen prevalenssi vaihteli 2,3 – 60,2 % välillä riippuen alueesta ja tutkimuksissa käytetyistä menetelmistä, ja tutkimuksissa on havaittu kaikkia neljää nautoilla esiintyvää kryptosporidilajia (Liu ym. 2009). Tšokeissä 79 tilalta otetuista yli kuuden kuukauden ikäisten nautojen 995 ulostenäytteestä 44 oli PCR-positiivisia kryptosporidien suhteen, ja positiivisista näytteistä 93,2 % oli *C. andersoni*, 4,5 % *C. bovis* ja 2,3 % *C. parvum* (Ondráčková ym. 2009). Japanissa 60/80 (75 %) alle kahden kuukauden ikäisten vasikoiden ulostenäytteistä todettiin *Cryptosporidium*-positiivisiksi. 33 näytettä tyypitettiin kryptosporidien lajitasolle asti ja

näytteistä 32 oli *C. parvum* ja yksi *C. bovis* (Karanis ym. 2010). Iranissa 15 maidontuotantotalalta otettiin 272 ulostenäytettä 1 – 20 viikon ikäisiltä vasikoilta. 51 näytteestä (18,8 %) löydettiin *Cryptosporidium*-ookystia ja positiivisten näytteiden lajijakauma oli seuraava: *C. parvum* 74,5 %, *C. andersoni* 17,7 % ja *C. bovis* 7,8 % (Keshavarz ym. 2009).

Suomessa Autio ym. (2010) tekemässä tutkimuksessa analysoitiin 3000 kappaletta vasikoiden ulostenäytteitä vuosien 2000 – 2009 välisenä aikana. Näytteitä kerättiin sekä terveiltä että kliinisesti oireilevilta vasikoilta. *Cryptosporidium*-ookystien prevalenssi vaihteli 12 – 17 % välillä Ziehl-Neelsen värjäyksen perusteella. 232 positiivista näytettä valittiin edelleen jatkotutkimuksiin PCR:lla tapahtuvaa kryptosporidien lajimäärittystä varten. Yleisimmät näytteissä esiintyvät lajit olivat *C. ryanae* ja *C. bovis*, jotka molemmat ovat apatogeenisiä. Ne olivat myös ainoita kryptosporidilajeja, joita löydettiin tutkimuksessa terveiltä yksilöiltä. Vain 25 ulostenäytteestä löydettiin *C. parvum*-ookystia, ja kyseiset näytteet oli otettu kliinisesti oireilevilta eläimiltä. *C. parvum*-alkueläimen suhteen positiivisia ulostenäytteitä löytyi yhteensä 11 tilalta eri puolilta Suomea ja, suurin osa näistä näytteistä oli otettu tutkimuksen kahden viimeisen vuoden aikana.

2.5 Kryptosporidioosi vasikoilla

Kryptosporidioosiksi kutsutaan *Cryptosporidium*-alkueläimen aiheuttamaa tautia ja sitä tavataan kaikkialla maailmassa. Kryptosporidioosia pidetään yhtenä merkittävimmistä vastasyntyneiden tuotantoeläinten ripulin aiheuttajista (Fayer ym. 2000, Radostits ym. 2007). Kryptosporidioosia esiintyy tavallisesti 1 - 4 viikon ikäisillä vasikoilla (Olson ym. 1997, Santin ym. 2004). Infektioita on todettu jopa vain viiden päivän ikäisiltä vasikoilta, mutta suurin osa sairastuneista eläimistä erittää ookystia ulosteissaan 9 ja 14 päivän välillä (Sturdee ym. 2003, Radostits ym. 2007). Tartuntaa seuraa resistenssin kehittyminen *C. parvum*-alkueläimiä vastaan ja iän myötä ookystien erittyminen ulosteisiin vähenee (Olson ym. 1997, Fayer 2008).

Riskitekijöitä, jotka altistavat vasikat infektiolle ja saavat aikaan kliinisesti oireilevan taudin kehittymisen, ei täysin tunneta (Radostits ym. 2007). Kliinisten oireiden vakavuus riippuu sairastuneen yksilön iästä ja yleisestä terveydentilasta sekä tartunnan aiheuttajan geneettisestä taustasta, tyypistä ja infektiivisestä annoksesta (Xiao & Fayer 2008). Tavallisesti kyseessä on *C. parvum*-alkueläimen lisäksi useiden muiden suolistopatogeenien, kuten rotaviruksen ja koronaviruksen, aiheuttama sekartunta (Radostits ym. 2007). Taudinkuva on sekartunnassa voimakkaampi, mutta kryptosporidioosi voi olla myös yksinään merkittävä taudinaiheuttaja (Radostits ym. 2007).

Sairastuneet vasikat ovat yleensä 5 – 15 vuorokauden ikäisiä (Radostits ym. 2007, Santin 2004). Kryptosporidioosin tyypillisin oire on lievä ripuli, joka jatkuu useita päiviä hoidosta huolimatta (Trotz-Williams ym. 2005, Radostits ym. 2007). Suurimmassa osassa tapauksista infektio paranee itsestään muutaman päivän sairastamisen jälkeen. Jos ripuli kuitenkin jatkuu, seurauksena voi olla painon menetys ja kuihtuminen (Radostits ym. 2007). Oireisiin kuuluvat myös apaattisuus, letargia, ruokahaluttomuus ja kuumeilu (Radostits ym. 2007, Sirverlås ym. 2009). Sairastuneet eläimet ovat yleensä huonokuntoisia, mutta joskus infektio voi olla myös oireeton (Silverlås ym. 2009). Kuolleisuus on alhainen, ellei taustalla ole komplisoivia tekijöitä, kuten esimerkiksi malnutritio, suolistopatogeenien sekainfektio tai puutteelliset ympäristöolosuhteet (Radostits ym. 2007).

2.6 Humaanikryptosporidioosi

Ensimmäinen humaanikryptosporidioositapaus raportoitiin vuonna 1976 (Nime ym. 1976). Vuonna 2008 ihmisten kryptosporidioositapauksia oli todettu 106 eri maassa (Fayer 2008). USA:ssa vuonna 2006 kryptosporidioosiin sairastui 6479 ihmistä, vuonna 2007 11657 ihmistä ja vuonna 2008 10500 ihmistä (Yoder ym. 2010).

Ihmisillä kryptosporidioosia esiintyy tavallisimmin immunokompetenteilla eli vastustuskyvyltään normaaleilla henkilöillä (Current ym. 1983, Radostits ym. 2007). Suurin esiintymistiheys on nuorilla lapsilla (Casemore 1991, Chappell & Okhuysen 2002, Radostits ym. 2007). Terveillä ihmisillä, joiden immuunipuolustus ei ole puutteellinen, kryptosporidit

ovat yleinen itsestään rajoittuvan ripulitaudin aiheuttaja (Current ym. 1983, D'Antonio ym. 1985, Balabat ym. 1996, Xiao ym. 1999, Chappell & Okhuysen 2002, Radostits ym. 2007). *C. parvum*-tartunta muodostaa kuitenkin todellisen uhan henkilöille, joiden immuunipuolustus on heikentynyt, kuten on tilanne AIDS- ja syöpäpotilailla (Current ym. 1983, Casemore 1991, Balabat ym. 1996, Kuczynska & Shelton 1999, Xiao ym. 1999, Chappell & Okhuysen 2002, Radostits ym. 2007).

Terveillä vapaaehtoisilla koehenkilöillä tehdyissä tutkimuksissa on osoitettu *Cryptosporidium parvum*-alkueläimen keskimääräisen infektiivisen annoksen olevan 132 ookystaa, mutta alimmillaan se voi olla jopa 30 ookystaa (Dupont ym. 1995). Tartunta voi siirtyä suoraan ihmisestä toiseen tai ihminen voi saada tartunnan sairastuneista kotieläimistä, joista suurimman riskin muodostavat vasikat (Casemore 1991, Kuczynska & Shelton 1999, Radostits ym. 2007, Dixon ym. 2011). Tärkein tartuntareitti on infektiivisillä ookystilla saastunut juomavesi (Kuczynska & Shelton 1999, Chappell & Okhuysen 2002, Higgins ym. 2001, Dixon ym. 2011). Tutkimuksissa on havaittu, että *C. parvum*-ookystat voivat säilyä elinkelpoisina vesistöissä jopa useiden kuukausien ajan (Fayer ym. 1998).

C. parvum-ookystitien zoonoottisen luonteen vuoksi humaanikryptosporidioositapauksissa merkittävä tartuntareitti on suora kontakti vasikoihin (Kuczynska & Shelton 1999, Xiao & Fayer 2008). Koska naudoilla esiintyvistä kryptosporidilajeista ainoastaan *C. parvum* voi tarttua ihmiseen, zoonoosiuhan muodostavat alle kahden kuukauden ikäiset vasikat (Santin ym. 2004, Xiao & Fayer 2008). Suurimmassa vaarassa ovat karjatilalliset, eläinlääkärit sekä kotieläinpihojen työntekijät ja asiakkaat (Pohjola ym. 1986, Dixon ym. 2011).

Pohjola ym. (1986) kuvasi tapauksen, jossa viisi eläinlääketieteen opiskelijaa sai Suomessa kryptosporidioositartunnan kokeellisesti infektoiduilta, vastasyntyneiltä vasikoilta. Vasikoiden oli todettu erittäin suuria määriä ookystia ulosteissaan, joten vasikoiden hoitamiseen osallistuneita opiskelijoita oli ohjeistettu noudattamaan hyvää hygieniataudin zoonoottisen luonteen vuoksi. Opiskelijat käyttivät suojavaatteita, kertakäyttökäsineitä ja saappaita, mutta tästä huolimatta he saivat tartunnan. Sairastuneiden opiskelijoiden oireina ilmeni lähinnä ripulia ja vatsakipuja, mutta myös ruokahaluttomuutta, oksentelua, päänsärkyä ja ilmavaivoja esiintyi. Yhden sairastuneen opiskelijan tila oli niin vakava, että

hän tarvitsi sairaalahoitoa ja suonensisäisestä nesteytystä voimakkaan ripulin aiheuttaman dehydraation korjaamiseksi.

Vastaavanlainen tapaus on raportoitu Suomessa myös vuodelta 2009, jolloin kolme maidontuotantotilalla työskentelevää henkilöä sai kryptosporidioositartunnan ripuloivilta vasikoilta. Sairastuneiden ihmisten pääasiallinen oire oli ripuli, ja yksi sairastuneista vaati sairaalahoitoa voimakkaiden vatsakipujen ja dehydraation vuoksi. Sekä sairastuneiden ihmisten että ripuloivien vasikoiden ulostenäytteistä löytyneiden *C. parvum*-alkueläinten DNA-sekvenssit olivat identtiset, joten kyseisen humaanikryptosporidioositapauksen lähteeksi varmistui zoonoottinen tartunta vasikoista (Autio ym. 2010).

Ihmisillä kryptosporidioosin pääasiallisena oireena on ripuli, joka voi johtaa nopeaan painonmenetykseen ja kuivumiseen, jolloin sairastuneet yksilöt tarvitsevat suonensisäisestä nestehoitoa (Radostits ym. 2007). Muita oireita ovat vatsakipu, pahoinvointi, oksentelu, anoreksia, kuumeilu ja painonmenetykset (Casemore 1991). Oireet kestävät 3 – 12 päivää ja menevät yleensä itsestään ohi (Radostits ym. 2007). Ihmisille, joiden immuunipuolustus on heikentynyt, sairaus voi kuitenkin olla jopa henkeä uhkaava, koska siihen ei ole olemassa tehokasta hoitoa (Casemore 1991, Kuczynska & Shelton 1999, Chappell & Okhuysen 2002).

2.7 Kryptosporidien diagnostiikka

Kryptosporidioosi diagnosoidaan etsimällä *Cryptosporidium*-alkueläimen ookystamuotoja ulostenäytteistä (Casemore 1991, Quilez ym. 1996, Coupe ym. 2005, Trotz-Williams ym. 2005, Radostits ym. 2007, Kar ym. 2011). Ookystat voidaan havaita ulostenäytteistä tutkimalla suoraan niistä tehtyjä levitteitä, erilaisilla sedimentaatio- ja flotaatiotutkimuksilla, immunologisia menetelmiä apuna käyttäen tai polymeerasiketjureaktion avulla (Trotz-Williams ym. 2005, Radostits ym. 2007, Paul ym. 2009, Kar ym. 2011).

Ulostenäytteistä tehtävät levitteet ovat tavallisimpia käytössä olevia kryptosporidien tutkimusmenetelmiä (Kuczynska & Shelton 1999, Trotz-Williams ym. 2005). Vaikka levitteiden tekeminen on nopeaa, niitä voidaan käyttää vain vetisille ulosteille, jotka sisältävät vähän kiinteitä aineita (Kuczynska & Shelton 1999). *Cryptosporidium*-ookystien

havaitseminen ulostenäytteistä on hankalaa, koska ne ovat värittömiä, läpikuultavia ja hyvin pieniä (Bowman 2003, Radostits ym. 2007). Objektilasille tehtyä levitettä voidaan tarkastella värjäämättömänä tai värjättyinä (Trotz-Williams ym. 2005).

Kryptosporidien tutkimiseksi on olemassa useita konsentroitimenetelmiä, jotka helpottavat ookystien havaitsemista ulostenäytteistä (Trotz-Williams ym. 2005, Kar ym. 2011). Konsentroidinnin avulla ulosteessa olevien ookystien tiheyttä pyritään kasvattamaan mahdollisimman suureksi ja saamaan näytteessä oleva debriksen määrä mahdollisimman alhaiseksi. Konsentroidinnin jälkeen tehdään lopullinen diagnoosi eri tunnistusmenetelmiä käyttäen.

Kryptosporideille on viime vuosina kehitetty useita polymeerasiketjureaktioon (PCR) perustuvia molekylaarisia tunnistusmenetelmiä (Higgins ym. 2001, Chappell & Okhuysen 2002, Brook ym. 2007). Korkea hinta rajoittaa kuitenkin niiden käyttöä laaja-alaisissa tutkimuksissa (Kvac ym. 2003, Brook ym. 2007). PCR:lla ei kannata tutkia suuria näytemääriä, joiden parasitologista statusta ei ennestään tiedetä (Kvac ym. 2003). PCR:a käytetään lähinnä kryptosporidien lajitason tunnistamiseen (Higgins ym. 2001, Brook ym. 2007).

2.8 Konsentroitimenetelmät

Cryptosporidium-alkueläimiä voidaan tutkia suoraan ulostenäytteistä, mutta yleensä näytteet konsentroidaan ennen varsinaista diagnosointia. Konsentroidinti tapahtuu käyttämällä apuna erilaisia sentrifugointi- ja flotaatiomenetelmiä sekä tietyn tiheyden omaavia suola- tai sokeriliuoksia (Radostits ym. 2007, Kar ym. 2011). Konsentroitimenetelmillä pyritään kasvattamaan ulostenäytteiden ookystien määrää suhteessa näytetilavuuteen, jolloin niiden havaitseminen helpottuu. Konsentroidinti on erityisen tärkeää silloin, kun eläin erittää ulosteessaan vain vähän ookystia, jolloin diagnostisten menetelmien herkkyyks ei välttämättä riitä havaitsemaan parasiitteja (Trotz-Williams ym. 2005, Kar ym. 2011).

Konsentroidinnilla pyritään myös vähentämään ulostenäytteessä olevan debriksen määrää. Näytteeseen jäävä debris vaikeuttaa ookystien erottamista ja siten tulosten tulkintaa

(MacPherson & McQueen 1993, Kvac ym. 2003). *Cryptosporidium*-ookystat ovat helpoimmin havaittavissa vetisistä ulosteista, sillä kiinteämmät ulosteet sisältävät enemmän debristä myös konsentroidin jälkeen (Weber ym. 1991). Joidenkin konsentroidintimenetelmien ongelmana on se, että *Cryptosporidium*-ookystien muoto ja kyky heijastaa valoa saattavat muuttua erilaisten käsittelyissä käytettävien kemikaalien johdosta (Kvac ym. 2003).

2.8.1 Sheatherin sokeriflotaatio-menetelmä

Kryptosporidien tutkimiseksi on kehitetty monia erilaisia sokeriflotaatioon perustuvia menetelmiä, joista Sheatherin menetelmä ja sen modifikaatiot ovat kenties kaikista tunnetuimpia ja eniten käytettyjä. Sheatherin sokeriflotaatio-menetelmässä valmistetaan ominaispainon 1,27 g/ml omaava sokeriliuos, jonka avulla näytteiden sisältämät ookystat saadaan erotettua sentrifugoimalla muusta ulostemassasta (Sheather 1923, Kuczynska & Shelton 1999, Kvac ym. 2003, Paul ym. 2009, Kar ym. 2011). Joissakin lähteissä Sheatherin menetelmä on mainittu parhaaksi kryptosporidien konsentroidintimenetelmäksi, kun näytteitä on tarkoitus tarkastella värjäämättöminä (Kvac ym. 2003). Se on nopea ja halpa, ja sitä on helppo käyttää ulostenäytteiden rutiininomaiseen tutkimiseen (MacPherson & McQueen 1993, Kvac ym. 2003).

Sheatherin sokeriflotaatio-menetelmässä käytettävän liuoksen valmistaminen on hyvin vaativaa ja sitä on hankala käsitellä suuren viskositeetin takia (Weber ym. 1991, MacPherson & McQueen 1993). Sheatherin liuoksen käyttäminen ookystien konsentroidinnissa estää näytteiden värjäämisen mikroskopoinnin yhteydessä (Weber ym. 1991). Menetelmään pystyttäisiin yhdistämään erilaisia konsentroidin jälkeen tapahtuvia huuhteluvaiheita, joilla värjäämisen estävää sokeriliuosta saataisiin poistettua, mutta tällaiset käsittelyt johtavat ookystien määrän vähenemiseen (Weber ym. 1991). Näytteitä ei voi analysoida suurissa erissä, sillä tulokset on luettava viimeistään 15 minuutin kuluessa näytteiden valmistuksesta, koska muuten niiden sisältämät ookystat hajoavat (MacPherson & McQueen 1993). Sheatherin menetelmällä konsentroidut näytteet sisältävät myös jonkin verran tulosten

tulkintaa vaikeuttavaa debristä (MacPherson & McQueen 1993, Kuczynska & Shelton 1999, Kar ym. 2011).

Eräissä tutkimuksissa, jossa selvitettiin konsentroitimenetelmien välisiä eroja lisäämällä tunnettu määrä *Cryptosporidium*-ookystia vakioituihin ulostenäytteisiin, Sheatherin menetelmällä näytteistä saatiin eristettyä määrällisesti eniten ookystia, tulosten välillä oli vähiten variaatiota ja menetelmä oli ainut tutkittavista flotaatio-sedimentaatiokäsittelyistä, jolla havaittiin kaikki positiiviset näytteet (Kvac ym. 2003). Paul ym. (2009) tekemässä tutkimuksessa Sheatherin sokeriflotaatiolla saavutettiin 71,13 % sensitiivisyys ja 96,37 % spesifisyys nautojen kryptosporididiagnostiikassa. Samaisessa tutkimuksessa sensitiivisyys ja spesifisyys nousivat 82,6 % ja 98,76 %, kun Sheatherin menetelmään yhdistettiin PSB-puskuripesun jälkeen Ziehl-Neelsen värjäys.

2.8.2 Natriumkloridiflotaatio (NaCl)

Sokeriliuosten ohella kryptosporidien konsentroinnissa voidaan käyttää myös erilaisia suolaliuoksia, joista tavallisin on natriumkloridiliuos. NaCl-flotaatiossa ookystat saadaan erottumaan sentrifugoinnin yhteydessä muusta ulostemassasta käyttämällä kyllästettyä suolaliuosta, jonka tiheys on 1,18 g/ml (Kuczynska & Shelton 1999, Kvac ym. 2003, Silverlås ym. 2009, Kar ym. 2011). Natriumkloridiflotaatio on halpa, nopea ja soveltuu erinomaisesti rutiinidiagnostiikkaan (Kuczynska & Shelton 1999). NaCl-menetelmällä käsitellyt näytteet sisältävät vain vähän debristä, eikä käsittely estä näytteiden värjäämistä (Kuczynska & Shelton 1999, Kar ym. 2011).

NaCl-menetelmän käyttäminen ulostenäytteiden konsentroinnissa on hyvin tehokasta. Kahden eri tutkimuksen mukaan NaCl-flotaatiolla saatiin eristettyä prosentuaalisesti eniten ookystia yksittäistä ulostenäytettä kohden (Kuczynska & Shelton 1999, Kar ym. 2011). Paul ym. (2009) tekemässä tutkimuksessa NaCl-flotaation sensitiivisyys oli 75 % ja spesifisyys 95,5 %, kun menetelmään yhdistettiin Ziehl-Neelsen värjäys.

Suolaliuoksia käytettäessä liuoksessa olevat ookystat menettävät ajan kuluessa muotonsa ja niiden havaitseminen vaikeutuu (Kvac ym. 2003). Ookystien erottamista vaikeuttaa myös

suolaliuosten kiteytyminen, mikä lyhentää näytteiden analysointiin käytettävää aikaa, koska se tekee ookystien tunnistamisen mahdolliseksi (Kvac ym. 2003). Erityisenä NaCl-flotaation hankaluutena on se, että tietyssä menetelmän vaiheessa on odotettava tarpeeksi kauan, jotta ookystat ehtivät nousta liuoksen pintakerrokseen. Tämä puolestaan edesauttaa ookystien hajoamista ja suolaliuoksen kiteytymistä (Kvac ym. 2003).

2.8.3 Sinkkisulfaattiflotaatio (ZnSO₄)

Sinkkisulfaattiflotaatiossa 703 g sinkkisulfaattia (ZnSO₄) sekoitetaan litraan vettä, jolloin saadaan ominaispainon 1,3 g/ml omaava flotaatioliuos (Kuczynska & Shelton 1999, Kvac ym. 2003). Sinkkisulfaattiflotaatio on nopea ja halpa tutkimusmenetelmä (Kvac ym. 2003).

Eräässä tutkimuksessa sinkkisulfaattiflotaatiolla käsitellyt ulostenäytteet sisälsivät eniten tulosten tulkintaa häiritsevää debristä (Kuczynska & Shelton 1999). Sinkkisulfaattiflotaatiomenetelmän käytössä on havaittu vastaavanlaisia ongelmia kuin muiden suolaliuosten kohdalla. ZnSO₄-liuos kiteytyy objektilasille noin 5 minuutissa laboratoriolämpötiloissa (Kvac ym. 2003). Tämä lyhentää mikroskopointiin käytettävää aikaa, koska kiteytymisen jälkeen lasien tutkiminen on mahdotonta. Lisäksi suolaliuokset vaurioittavat *Cryptosporidium*-ookystien seinämiä, jonka seurauksena ookystien tunnusomainen muoto muuttuu ja niiden tunnistaminen vaikeutuu (Kvac ym. 2003).

Kvac ym. (2003) tekemässä tutkimuksessa, jossa selvitettiin konsentrintimenetelmien välisiä eroja lisäämällä tunnettu määrä *Cryptosporidium*-ookystia vakioituihin ulostenäytteisiin, sinkkisulfaattiflotaatiolla näytteistä saatiin eristettyä vain keskinkertainen määrä ookystia ja tulosten välillä oli huomattavaa vaihtelua. Vastaavia tuloksia on saatu myös aikaisemmissa tutkimuksissa (Weber ym. 1992, Bukhari & Smith 1995).

2.8.4 Formaliini-etyyliasetatimenetelmä

Formaliini-etyyliasettaattimenetelmässä ulostenäytteisiin lisätään formaliinia ja etyyliasettaattia, joiden ansiosta näyteputkeen muodostuu neljä kerrosta erilaisten sekoitus- ja sentrifugointikäsitteilyjen jälkeen (Young ym. 1979, Weber ym. 1991, Kuczynska & Shelton 1999). Kryptosporidit jäävät pohjimmaiseen sedimenttikerrokseen.

Näytteiden konsentroidi formaliini-etyyliasettaattimenetelmällä ei häiritse objektilasien värjäämistä kuten Sheatherin menetelmä (Weber ym. 1991, MacPherson & McQueen 1993). Yleensä formaliini-etyyliasettaattikonsentroidi yhdistetäänkin johonkin värjäysmenetelmään, jolloin saavutetaan molempien tekniikoiden edut. Vetiset ulostenäytteet, joiden sisältämää ookystamäärää konsentroidaan formaliini-etyyliasettaattimenetelmällä, sisältävät vain vähän objektilasien lukemista vaikeuttavaa debristä (Weber ym. 1991). Debrisen määrä kuitenkin lisääntyy sitä mukaa, mitä kiinteämpiä analysoitavat ulosteet ovat (Weber ym. 1991). Formaliini-etyyliasettaattisedimentaatiolla käsitellyt kiinteät ulostenäytteet voivat sisältää jopa huomattavia määriä debristä (Weber ym. 1991, Kuczynska & Shelton 1999).

Konsentroidinnin aikana ookystien määrä saattaa pienentyä, sillä niitä voi jäädä muihin kerroksiin kuin pohjan sedimenttiin, kuten sideharsoon, jonka läpi formaliini-ulosteseos suodatetaan tai kahden ensimmäisen sentrifugointivaiheen supernatanttiin (Weber ym. 1991). Konsentroidi vähentää kuitenkin debrisen määrää ja helpottaa siten ookystien havaitsemista verrattuna suoraan mikroskopointiin (Weber ym. 1991, MacPherson & McQueen 1993, Kvac ym. 2003). Konsentroitujen näytteiden mikroskopoinnissa saadaan loppujen lopuksi parempia tuloksia ja ookystia havaitaan enemmän kuin konsentroidimattomien, vaikka käsittelyn yhteydessä ookystien todellinen määrä vähenisikin (Weber ym. 1991).

2.9 Mikroskopointi

Ookystien tunnistamiseen on perinteisesti käytetty mikroskopointia (Bowman 2003, Brook ym. 2007). Se on edelleen yleisimmin käytössä oleva menetelmä kryptosporidien tutkimiseksi ulostenäytteistä (MacPherson & McQueen 1993, Kvac ym. 2003, Bowman

2003, Brook ym. 2007). Objektilasille sivelty näyte yleensä värjätään ennen mikroskopointia, mutta näytteitä voidaan tarkastella myös värjäämättöminä (Trotz-Williams ym. 2005). Värjäys on mahdollista suorittaa joko konsentroiduille tai käsittelemättömille ulostenäytteille. Värjäyksen onnistuminen riippuu siitä, ovatko ookystat säilyneet ehjinä erilaisten käsittelyjen yhteydessä, sillä vain ehjät ookystat värjäytyvät. Lisäksi vain kokenut henkilö pystyy erottamaan ookystat muista virheellisesti värjäytyneistä kappaleista (Casemore 1991, Weber ym. 1991, Bowman 2003, Brook ym. 2007). Mikroskopointi on myös varsin aikaavievää (MacPherson & McQueen 1993, Kvac ym. 2003, Brook ym. 2007). Mikroskopointia helpottamaan on kehitetty erityisesti *Cryptosporidium*-ookystille suunnattuja värjäysmenetelmiä, joista kaksi yleisimmin käytössä olevaa menetelmää ovat Ziehl-Neelsen värjäys ja immunofluoresenssivärjäys (Weber ym. 1991, Trotz-Williams ym. 2005).

2.10 Värjäysmenetelmät

2.10.1 Ziehl-Neelsen värjäys

Ziehl-Neelsen (ZN) värjäyksessä käytettäviä reagensseja ovat karbolifuksiini, happo-alkoholiliuos ja metyleenisininen tai malakiittivihreä. Karbolifuksiini värjää ookystat punaisiksi, jonka jälkeen ylimääräinen väri huuhdellaan pois hapon ja alkoholin sekoituksella. Lopuksi suoritetaan vastavärjäys joko siniseksi tai vihreäksi, jolloin ookystat erottuvat paremmin taustasta (Casemore ym. 1985, Casemore 1991, Kvac ym. 2003). Värjätyissä näytteissä ookystat näkyvät punaisina, pyöreinä kappaleina vihreää tai sinistä taustaa vasten (Casemore 1991, Paul ym. 2009).

Ziehl-Neelsenin menetelmä on halpa, ja siinä on vähemmän eri vaiheita kuin useissa muissa värjäysmenetelmissä (MacPherson & McQueen 1993, Brook ym. 2007). Menetelmä soveltuu erinomaisesti rutiinidiagnostiikkaan ja näytteitä voidaan käsitellä suurissa erissä (MacPherson & McQueen 1993). Ziehl-Neelsen värjäyksellä erotetaan hyvin *Cryptosporidium*-ookystien morfologinen rakenne, jolloin niiden tunnistaminen on

helpompaa (MacPherson & McQueen 1993, Kar ym. 2011). Lisäksi jokainen värjätty objektilasi säilyy pysyvänä tallenteena (MacPherson & McQueen 1993, Brook ym. 2007).

Brook ym. (2007) mukaan ZN-värjäys on hyvin sensitiivinen ja spesifinen menetelmä kryptosporidien tutkimiseen. Paul ym. (2009) tekemässä tutkimuksessa Ziehl-Neelsen värjäyksellä käsiteltyjen suoralevitteiden sensitiivisyys oli 65,4 % ja spesifisyys 95,5 %. Quilez ym. (1996) tulokset osoittivat, että Ziehl-Neelsen menetelmä hyvin spesifinen ja riittävän sensitiivinen kryptosporididiagnostiikkaan, kun ulostenäytteet sisältävät paljon ookystia. Käytettäessä ulostenäytteiden suoravärjäystä ilman edeltävää ookystien konsentroitua menetelmän havaitsemiskynnys on noin 10^6 ookystaa yhtä ulostegrammaa kohden (Anusz ym. 1990). Kvac ym. (2003) tekemässä tutkimuksessa havaittiin puolestaan kaikki positiiviset objektilasit, kun tarkasteltiin vakioituja ulostenäytteitä, jotka sisälsivät 10^5 ja 10^6 ookystaa grammassa ulostetta.

Ziehl-Neelsen värjäys ei sovellu näytteille, joissa on vain vähän ookystia, sillä vähäiset ookystat saattavat jäädä huomaamatta objektilaseja mikroskopoidessa (MacPherson & McQueen 1993, Quilez ym. 1996). Menetelmällä saadaan luotettavampia tuloksia, jos ookystia on havaittava useampia kuin yksi, jotta näyte mielletään positiiviseksi. ZN-menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys paranevat huomattavasti, jos kaikki alle kaksi ookystaa muistuttavaa kappaletta sisältävät näytteet tulkitaan negatiivisiksi (Brook ym. 2007). Ziehl-Neelsen menetelmä saattaa värjätä ookystien lisäksi myös useita muita partikkeleita kuten hiivoja ja homeita sekä sieni- ja bakteeri-itiöitä, mutta kokenut henkilö pystyy helposti erottamaan nämä kappaleet toisistaan kokonsa perusteella (Casemore 1991). Quilez ym. (1996) ja Kar ym. (2011) eivät myöskään kokeneet tätä ongelmaksi, koska koon lisäksi Ziehl-Neelsen värjäyksellä ookystien morfologinen sisärakenne näkyy hyvin, jolloin ne ovat helposti erotettavissa muista kappaleista.

2.10.2 Immunofluoresenssivärjäys

Immunofluoresenssimenetelmää varten on kehitetty monia valmiita kaupallisia kittejä, kuten esimerkiksi Meriflour® *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Diagnostics Cincinnati, Ohio).

Immunofluoresenssimenetelmässä vasta-aineeseen liitetään fluoresoiva merkkiaine ja seoksen annetaan reagoida tutkittavan näytteen kanssa. Näytteen lähettämää fluoresenssivaloa tarkastellaan erityisellä fluoresenssimikroskoopilla. Ookystat näkyvät mikroskoopissa pyöreinä, 4 - 6 µm halkaisijaltaan olevina kappaleina, jotka lähettävät omenanvihreää fluoresenssivaloa (Rusnak ym. 1989, Weber ym. 1991, Quilez ym. 1996).

Immunofluoresenssivärjäys on hyvin sensitiivinen ja spesifinen menetelmä *Cryptosporidium*-ookystien tutkimiseksi (Rusnak ym. 1989, Weber ym. 1991). Se soveltuu myös vähäisten ookystamäärien havaitsemiseen (Quilez ym. 1996). Weber ym. (1991) suorittamassa tutkimuksessa immunofluoresenssimenetelmä osoittautui parhaaksi kryptosporidien värjäysmenetelmäksi ja sillä saatiin parempia tuloksia kuin Ziehl-Neelsen värjäyksellä. Myös Quilez ym. (1991) mukaan immunofluoresenssin käyttäminen on sensitiivisempi menetelmä kryptosporidien havaitsemiseksi ulostenäytteistä kuin ZN-värjäys.

Menetelmä on kokonaisuudessaan hieman hitaampi kuin monet perinteiset värjäysmenetelmät, mutta fluoresenssin ansiosta positiivisten näytteiden tutkiminen mikroskoopilla on hyvin nopeaa (Rusnak ym. 1989, Quilez ym. 1996). Negatiivisten näytteiden mikroskopointiin kuluu sen sijaan saman verran aikaa käytettiin sitten immunofluoresenssia tai perinteisiä värjäysmenetelmiä (Rusnak ym. 1989). Toisaalta taas debriksen lähettämä keltainen taust fluoresenssivalo saattaa häiritä ookystien omenanvihreän fluoresenssin havaitsemista (Weber ym. 1991, MacPherson & McQueen 1993).

Immunofluoresenssimenetelmän kustannukset ovat huomattavasti suurempia kuin perinteisten värjäysmenetelmien (Rusnak ym. 1989, MacPherson & McQueen 1993, Quilez ym. 1996, Brook ym. 2007). Esimerkiksi Ziehl-Neelsen värjäykseen verrattuna immunofluoresenssimenetelmän käyttäminen on kolme kertaa kalliimpaa (Rusnak ym. 1989). Hintaa nostavat kalliimmat reagenssit sekä etenkin menetelmän vaatima fluoresenssimikroskooppi (Quilez ym. 1996). Immunofluoresenssivärjäyksessä objektilaseja ei voida säilyttää pysyvänä tallenteena toisin kuin ZN-värjäystä käytettäessä (Brook ym. 2007).

2.11 Polymeraasiketjureaktio

C. parvum-alkueläimen DNA:ta onnistuttiin monistamaan ensimmäisen kerran vuonna 1991 (Laxer ym. 1991). Kryptosporideille on viime vuosina kehitetty useita polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvia molekylaarisia tunnistusmenetelmiä (Chappell & Okhuysen 2002, Brook ym. 2007). Kallis hinta rajoittaa kuitenkin näiden menetelmien käyttöä laaja-alaisessa tutkimuksessa (Kvac ym. 2003, Trotz-Williams ym. 2005, Paul ym. 2005, Brook ym. 2007). Menetelmän käyttäminen on myös hyvin aikaavievää (Trotz-Williams ym. 2005, Paul ym. 2005). PCR:lla ei kannata tutkia suuria näytemääriä, joiden parasitologista statusta ei ennestään tiedetä (Kvac ym. 2003). PCR-menetelmää käytetään lähinnä tutkimustarkoituksessa (Trotz-Williams ym. 2005). PCR:lla näytteitä voidaan tutkia suurissa erissä (Brook ym. 2007). Menetelmän etuja on myös se, että tulosten tulkinta on helppoa ja diagnostiikka voidaan edelleen viedä laji- ja genotyypitasolle asti (Brook ym. 2007).

Ennen PCR-tutkimusta ulostenäytteistä täytyy eristää *Cryptosporidium*-DNA:ta. DNA:n eristäminen voidaan suorittaa joko käsittelemättömistä tai konsentroiduista ulostenäytteistä. Eristäminen tapahtuu valmiilla kiteillä, jotka on suunniteltu DNA:n eristämiseen ulostenäytteistä (Brook ym. 2007). Ongelmia DNA-eristykseen ja PCR-tutkimukseen aiheuttavat kuitenkin DNA:n monistumista estävät inhibiittorit. PCR-inhibiittoreina voivat toimia monet orgaaniset ja epäorgaaniset aineet kuten esimerkiksi ulostenäytteiden sisältämät sappisuolat. Inhibiittorit reagoivat joko suoraan DNA:n kanssa estäen sen monistumisen tai häiritsevät PCR-reaktiossa keskeisten DNA-polymeraasientsyymien toimintaa.

Ulostenäytteiden tutkimisessa *Cryptosporidium*-alkueläinten varalta käytetään PCR-menetelmistä varsinkin nested PCR-tekniikkaa (Balabat ym. 1996, Trotz-Williams ym. 2005, Brook ym. 2007). Nested PCR:ssa DNA:n kopioimiseen käytetään kahta paria PCR-alukkeita tavallisesti polymeraasiketjureaktiossa käytettävän yhden parin sijaan. Ensimmäisten eli uloimmaisten alukkeiden käyttö saa aikaan tavallisen DNA-juosteiden monistumisen. Nested PCR:ssa suoritetaan tämän jälkeen vielä toinen PCR-ajo, jolloin

käytetään alukkeita, jotka sitoutuvat ensimmäisten alukkeiden monistaman alueen sisäpuolelle (Balabat ym. 1996). Toisen alukeparin käyttö lisää menetelmän tarkkuutta, sillä toiset, sisemmät alukkeet sitoutuvat jo monistuneen, alkuperäistä DNA-ketjua lyhyemmän kopion sisään. Toisessa vaiheessa käytetään siis templaattina ensimmäisen vaiheen tuotetta. Kryptosporideille kehitettyjä monistettavia geenialueita on useita, kuten SSU rRNA-geeni, *Cryptosporidium* oocyst wall protein-geeni (COWP), lämpöshokkiproteiini 70-geeni (HSP-70) ja β -tubuliinigeeni. Yksi tutkituimmista alueista on 18S rRNA-geeni, jota käytetään yleisesti *Cryptosporidium*-suvun alkueläinten havaitsemiseen ja molekyyli-tason karakterisointiin (Xiao ym. 1999, Higgins ym. 2001, Santin ym. 2004, Coupe ym. 2005, Fayer ym. 2006).

Nested PCR:n etuja ovat sen erinomainen sensitiivisyys ja spesifisyys (Balabat ym. 1996, Trotz-Williams ym. 2005). Nested-menetelmällä monistuu vain harvoin väärää DNA:ta, sillä on hyvin epätodennäköistä, että DNA:sta, jota varten alukkeita ei ole suunniteltu, löytyisi sitoutumispaikka molemmille erityyppisille alukkeille. Nested PCR-menetelmällä pystytään esimerkiksi erottamaan *C. parvum* muista ihmisen tavallisimmista suolistoparasiiteista kuten *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis* ja *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* (Balabat ym. 1996). Coupe ym. (2005) tutkimuksessa *C. parvum*-alkueläimen DNA erotettiin edellä mainittujen *G. lamblia*- ja *E. intestinalis*-taudinaiheuttajien lisäksi myös *Toxoplasma gondii*-, *Trichophyton rubrum*- ja *E. coli*-parasiittien DNA:sta. Lisäksi menetelmän avulla on mahdollista havaita eri *Cryptosporidium*-lajeja ja genotyyppisiä (Sulaiman ym. 1999, Xiao ym. 1999). Vasikoilla esiintyvien eri *Cryptosporidium*-lajien erottaminen toisistaan on tärkeää, sillä vain *C. parvum* on merkittävä uhka ihmisille ja vasikoille (Santin & Zarlenga 2009).

Nested PCR-menetelmän käyttö mahdollistaa hyvin pienten ookystamäärien havaitsemisen ulostenäytteistä. Nested PCR pystyy havaitsemaan pitoisuuksia, joissa on 500 ookystaa yhtä ulostegrammaa kohti (Balabat ym. 1996). Menetelmällä on saatu monistettua DNA:ta jopa yhdestä *Cryptosporidium*-ookystasta (Sulaiman ym. 1999, Xiao ym. 1999, Coupe ym. 2005). Sitä vastoin perinteisillä tutkimusmenetelmillä, kuten esimerkiksi formaliini-etyyliasetaatikonsentrintimenetelmällä yhdistettynä immunofluoresenssivärijäykseen, positiivisten näytteiden havaitsemiskynnys on 5000 -

10000 ookystaa grammassa vetistä ulostetta ja 10000 - 50000 ookystaa grammassa kiinteää ulostetta (Weber ym. 1991). Näin ollen PCR:n avulla havaitaan myös infektiot, joissa kryptosporidien määrä tartunnan saaneessa yksilössä on niin pieni, ettei klinisiä oireita havaita. Esimerkiksi ihmisten *C. parvum*-tartunnoissa keskimääräinen infektiivinen annos terveillä vapaaehtoisilla yksilöillä on todettu olevan vain 132 ookystaa (Dupont ym. 1995). Nested PCR soveltuu oireettomien infektioiden havaitsemiseen, hoitovasteen arviointiin sekä ookystien etsimiseen monista ympäristön materiaaleista (Balabat ym. 1996).

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Näytteiden kerääminen

Ulostenäytteet kerättiin yhden päivän aikana kesäkuussa 2007 vasikoiden kolmivaihekasvattamosta, joka on aiemmin tehnyt yhteistyötä Elintarviketurvallisuusviraston (Evira) Kuopion tutkimusyksikön kanssa. Kasvattamo toimii kertatäyttöperiaatteella eli kasvattamo täytetään ja vastaavasti tyhjennetään eläimistä yhdellä kertaa. Kasvattamoon tulevat vasikat kerätään lähitiloilta saman päivän aikana ja eläimet kasvavat yhtenä ryhmänä, kunnes ne ovat tarpeeksi vanhoja siirtymään loppukasvatukseen muille tiloille. Tällöinkin kasvattamo tyhjennetään kerralla eläimistä, jonka jälkeen tilat pestään huolellisesti ennen seuraavan vasikkaerän saapumista.

Tutkimukseen otettiin kasvattamoon viimeisimpänä saapunut eläinerä, jossa vasikat olivat keskimäärin alle kuukauden ikäisiä. Vasikoiden iät vaihtelivat 13 – 91 vuorokauden välillä (keskiarvo 26 vrk). Vasikat tulivat 53 eri tilalta, jotka sijoituivat 11 kunnan alueelle Pohjois-Savoon. Vasikoiden iät ja kotikunnat on esitetty taulukossa 1. Kuvassa 1. on nähtävissä Pohjois-Savon kuntakartta.

Ulostenäytteet kerättiin kaikilta kasvattamossa sillä hetkellä olleilta vasikoilta. Näytteet otettiin suoraan peräsuolesta kumihanskan avulla, ja niitä saatiin kaiken kaikkiaan 72

kappaletta. Näytteet kuljettiin Eviraan kylmälaukussa, ja ne säilytettiin jääkaapissa 4 °C lämpötilassa käsittelyn aloittamiseen saakka.

Taulukko 1. Tutkimukseen osallistuneiden vasikoiden kotikunnat, syntymäajat sekä iät näytteenottohetkellä.

Näytteen nro	Vasikan syntymäpäivä	Vasikan ikä (vrk) näytteenottohetkellä	Lähtötilan postinumero	Kunta
1	05.05.	30	73100	Lapinlahti
2	29.04.	36	73320	Nilsia
3	10.05.	25	71800	Siilinjärvi
4	14.05.	21	73100	Lapinlahti
5	05.05.	30	71920	Lapinlahti
6	06.05.	29	73100	Lapinlahti
7	04.05.	31	73300	Nilsia
8	20.05.	15	73230	Varpaisjärvi *
9	20.05.	15	73200	Varpaisjärvi *
10	09.05.	26	73239	Varpaisjärvi *
11	19.05.	16	71730	Maaninka
12	01.05.	34	71910	Lapinlahti
13	08.05.	27	73200	Varpaisjärvi *
14	03.05.	32	73100	Lapinlahti
15	09.05.	26	73250	Varpaisjärvi *
16	08.05.	27	73200	Varpaisjärvi *
17	13.05.	22	73230	Varpaisjärvi *
18	11.05.	24	71950	Nilsia
19	14.05.	21	71800	Siilinjärvi
20	01.05.	34	73100	Lapinlahti
21	04.05.	31	71910	Lapinlahti
22	13.05.	22	73200	Varpaisjärvi *
23	07.05.	28	71910	Lapinlahti
24	10.05.	25	73320	Nilsia
25	08.05.	27	71800	Siilinjärvi
26	13.05.	22	73770	Juankoski
27	04.05.	31	73810	Nilsia
28	18.05.	17	73770	Juankoski
29	12.05.	23	71910	Lapinlahti
30	13.05.	22	73830	Nilsia
31	14.05.	21	71960	Varpaisjärvi *
32	17.05.	18	73770	Juankoski
33	22.05.	13	73830	Nilsia
34	05.03.	91	73620	Kaavi
35	08.05.	27	71800	Siilinjärvi
36	11.05.	24	73830	Nilsia
37	12.05.	23	73250	Varpaisjärvi *
38	**			
39	20.05.	15	73470	Juankoski
40	09.05.	26	79160	Leppävirta

41	16.05.	19	73810	Nilsia
42	16.05.	19	79150	Leppavirta
43	20.05.	15	79140	Leppavirta
44	18.05.	17	73810	Nilsia
45	03.05.	32	74470	Varpaisjärvi *
46	08.05.	27	70870	Kuopio
47	12.05.	23	71170	Tuusniemi
48	09.05.	26	79160	Leppavirta
49	17.05.	18	71310	Kuopio
50	18.05.	17	73460	Juankoski
51	20.05.	15	73460	Juankoski
52	04.05.	31	73250	Varpaisjärvi *
53	15.05.	20	73460	Juankoski
54	08.05.	27	73900	Rautavaara
55	04.05.	31	73360	Nilsia
56	14.05.	21	73810	Nilsia
57	16.05.	19	71160	Kuopio
58	26.04.	39	73990	Rautavaara
59	08.05.	27	70870	Kuopio
60	18.05.	17	71330	Kuopio
61	09.05.	26	73470	Juankoski
62	07.05.	28	74420	Sonkajärvi
63	27.04.	38	73900	Rautavaara
64	08.05.	27	74470	Varpaisjärvi *
65	17.05.	18	71150	Kuopio
66	29.04.	36	74300	Sonkajärvi
67	04.05.	31	73900	Rautavaara
68	17.05.	18	71310	Kuopio
69	11.05.	24	71800	Siilinjärvi
70	05.05.	30	71170	Tuusniemi
71	14.05.	21	73460	Juankoski
72	11.05.	24	71330	Kuopio
73	28.04.	37	73810	Nilsia

* Varpaisjärvi liitettiin osaksi Lapinlahden kuntaa vuonna 2011.

** Numeroa 38 vastaavaa ulostenäytettä ei tutkimuksessa ollut.



Kuva 1. Pohjois-Savon kuntakartta. Punaisella on ympyröity kunnat, joiden alueella olevilta tiloilta tuli vasikoita kolmivaihekasvattamoon. Punaiset numerot kertovat, moneltako tilalta kuntaa kohden vasikoita kerättiin kasvattamoon.

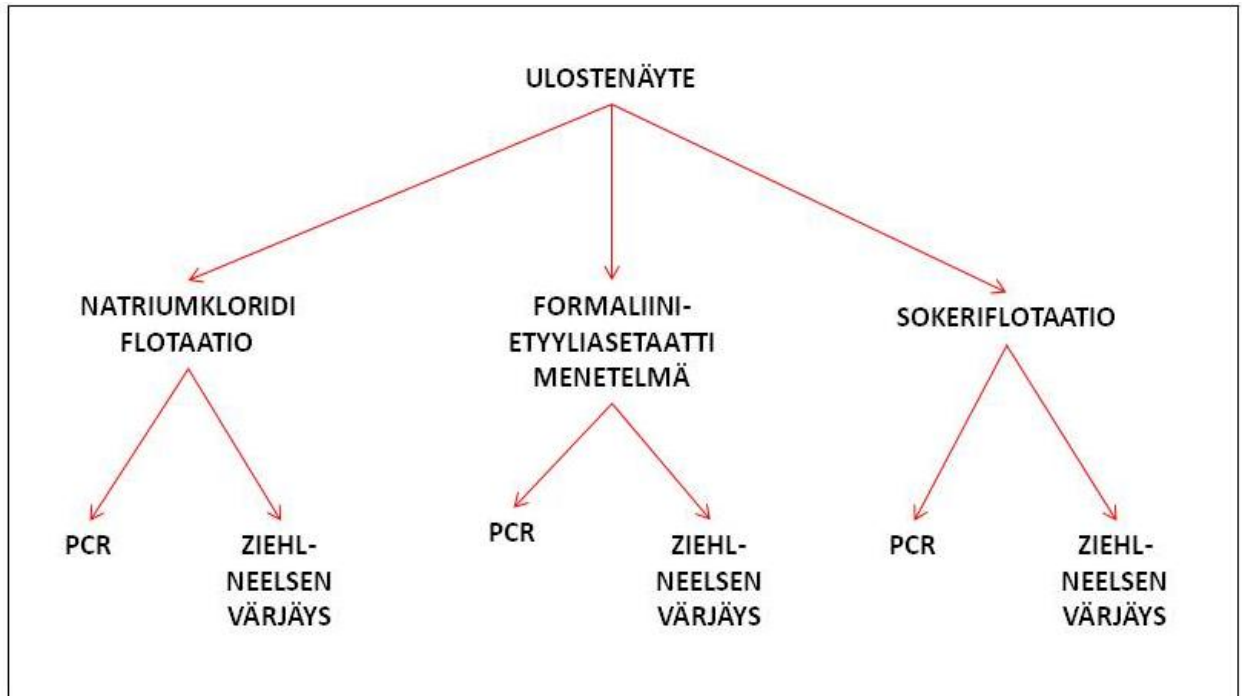
3.2 Näytteiden valitseminen

Kaikki 72 ulostenäytettä punnittiin ja aluksi jatkoon valittiin näytteet, jotka painoivat 20 grammaa tai sen yli. Koska näytemäärä jäi näillä kriteereillä vähäiseksi, tutkimukseen päätettiin ottaa mukaan kaikki näytteet, jotka sisälsivät ulostetta yli 9 grammaa. Tällöin analysoitavia ulostenäytteitä saatiin yhteensä 64 kappaletta. Näytteitä, jotka painoivat alle 9 grammaa, ei voitu hyväksyä tutkimukseen, koska ulostemäärä ei olisi riittänyt kaikkien konsentroidintimenetelmien suorittamiseen. Tästä syystä kahdeksaa ulostenäytettä ei analysoitu lainkaan. Punnituksen yhteydessä näytteistä arvioitiin myös ulosteen koostumus ja se sisälsivätkö ne verta.

3.3 Menetelmät

Tutkimukseen valittiin kolme tavallisimmin käytössä olevaa kryptosporidien konsentroidintimenetelmää, joiden ominaisuuksia vertailtiin keskenään. Menetelmät olivat formaliini-etyyliasettaattimenetelmä, sokeriflotaatio ja natriumkloridiflotaatio. Ookystien havaitsemiseksi konsentroiduista ulostenäytteistä käytettiin sekä nested PCR-menetelmää että Ziehl-Neelsenin menetelmällä värjättyjen näytteiden mikroskopointia.

Jokainen tutkimukseen valittu ulostenäyte jaettiin kolmeen osaan ja käsiteltiin kaikkia kolmea eri konsentroidintimenetelmää käyttämällä. Tämän jälkeen kaikki konsentroidut ulostenäytteet tutkittiin sekä PCR:lla että Ziehl-Neelsenin värjäysmenetelmällä *Cryptosporidium*-ookystien havaitsemiseksi. Kuva 2. havainnollistaa tilannetta.



Kuva 2. Kaavio ulostenäytteiden käsittelystä.

3.3.1 Natriumkloridiflotaatio (NaCl)

Näytteet käsiteltiin aiemmin kuvatun mukaisesti (Sirverlås ym. 2009). Koeputkeen, johon oli punnittu noin 1 g ulostetta, lisättiin 4 ml tislattua vettä ja näyte suspensoitiin. Tämän jälkeen koeputken lisättiin 4 ml kyllästettyä NaCl-liuosta. Näyte sekoitettiin ensin käsin ravistelemalla, sitten sitä vorteksoitiin 20 sekunnin ajan, jonka jälkeen sitä taas ravisteltiin käsin ja lopuksi vorteksoitiin 10 s. Sekoittelun jälkeen ulostenäytettä sentrifugoitiin huoneenlämmössä 1 minuutin ajan 1600 g:n voimalla. Sentrifugoinnin aikana kryptosporidit nousevat nesteen pinnalle, koska ne ovat kevyempiä kuin kyllästetty NaCl.

Sentrifugoinnin jälkeen koeputken pinnalta aspiroitiin 7 - 8 ml nestettä 50 ml putkeen. Aspiroitaessa varottiin pohjalle muodostuneen sakan sekoittumista muuhun nesteeseen. 50 ml putkiin lisättiin tislattua vettä 50 ml merkkiin asti, jonka jälkeen putkia sentrifugoitiin 10 min 1600 g. Ylimääräinen neste poistettiin putkista imun avulla siten, että jäljelle jäi 5 ml

nestettä sekä sentrifugoidessa pohjalle muodostunut sakka. Näytteitä vorteksoitiin, kunnes sakka oli sekoittunut nesteeseen. Tämän jälkeen putkiin lisättiin taas tislattua vettä 50 ml merkkiin asti ja 10 min sentrifugointi toistettiin. Ylimääräinen neste imettiin jälleen sentrifugoinnin jälkeen pois siten, että putken pohjalle jätettiin 5 ml nestettä. Pohjalle muodostunut sakka sekoitettiin nesteeseen varovasti edestakaisin pipetoimalla ja koko nestemäärä siirrettiin uuteen 10 ml koeputkeen. 50 ml putkea pestiin pienillä määrillä tislattua vettä ja pesuvesi siirrettiin pipetoimalla 10 ml koeputkeen.

Pesuja jatkettiin, kunnes koeputkessa olevan nesteen lopullinen tilavuus oli 10 ml. Pesuilla varmistettiin, ettei 50 ml putken pohjalle jäänyt *Cryptosporidium*-ookystia. 10 ml koeputkia sentrifugoitettiin 10 min 1600 g, jonka jälkeen ylimääräistä nestettä imettiin pois, kunnes putken pohjalle jäi 1,5 ml nestettä ja sakka. Neste ja sakka vorteksoitiin sekaisin ja koeputket suljettiin korkeilla. Näytteet säilytettiin jääkaapissa 4 °C lämpötilassa jatkotutkimuksiin asti.

3.3.2 Sokeriflotaatio

Koeputkeen, johon oli punnittu 2 g ulostetta, pipetoitiin 2 ml PBS-liuosta (pH 7,2) ja massa suspensoitiin hyvin vorteksoimalla. Liuos suodatettiin suppilon ja harson avulla sentrifugiputkeen huuhtelemalla koeputkea PBS-liuksella. Koeputkea huuhdeltiin, kunnes sentrifugiputken tilavuus oli 7 ml. Harsosta puristettiin kaikki neste sentrifugiputkeen puulastaa apuna käyttäen. Näytettä sentrifugoitettiin 5 min 800 g, jonka jälkeen ylimääräinen neste imettiin pois siten, että putken pohjalle jätettiin vain sakka.

Sakka suspensoitiin pienellä määrällä PBS-liuosta ja suspensio lisättiin varovasti pipetoiden uuteen koeputkeen, jossa oli valmiina 7 ml sakkaroosiliuosta, jonka tiheys oli 1,18 g/ml. Pipetoitaessa pidettiin huoli siitä, etteivät kerrokset päässeet sekoittumaan. Näytettä sentrifugoitettiin 5 min 800 g, jonka aikana putkiin muodostui kolme erillistä kerrosta. Ylin kerros ja välikerros, jossa ookystat sijaitsevat, siirrettiin pipetoimalla uuteen koeputkeen. Putkeen lisättiin 4 ml PBS-liuosta ja näyte suspensoitiin vorteksoimalla, jonka jälkeen näytettä sentrifugoitettiin 5 min 800 g. Ylimääräinen PBS-liuos imettiin jälleen pois. Putken

pohjalle jääneeseen sakkaan lisättiin 1 ml tislattua vettä ja putkien suut peitettiin parafilmillä ja säilytettiin jääkaapissa 4 °C lämpötilassa jatkotutkimuksiin asti.

3.3.3 Formaliini-etyyliasettaattimenetelmä

2 g ulostetta ja 7 ml 10 % formaliinia sekoitettiin koeputkessa, ja näytteiden annettiin fiksoitua vähintään 30 min. Tämän jälkeen formaliini-ulosteseos sekoitettiin ja suodatettiin sideharson läpi eetteriä kestäväan koeputkeen (Pyrex). Sideharsosta puristettiin kaikki neste puulastan avulla koeputkeen. Koeputkiin lisättiin 3 ml etyyliasettaattia. Koeputket suljettiin parafilmillä etyyliasettaatin kaasuuntumisen estämiseksi ja putkia sekoitettiin vorteksoimalla 30 sekunnin ajan. Tämän jälkeen näytteitä sentrifugoitiin 10 min 1850 rpm.

Sentrifugoinnin jälkeen putkessa erottui 4 kerrosta: pohjalla sedimentti, jossa ovat myös kryptosporidit, sitten formaliini, ulostekerros ja pinnalla etyyliasettaatti. Ulostekokkare irrotettiin pumpulipuikolla koeputken reunoista ja ylimääräinen neste kaadettiin pois. Putken reunat puhdistettiin huolellisesti puhtaalla pumpulipuikolla, ettei etyyliasettaattia jäänyt koeputkeen. Koeputkeen lisättiin 3-5 tippaa 0,9 % NaCl sedimentin tilavuudesta riippuen. Näyte ja NaCl-liuos sekoitettiin kertakäyttöisellä viljelysilvällä, ja putki viljelysilvällä suljettiin parafilmillä ja siirrettiin jääkaappiin 4 °C lämpötilaan odottamaan jatkotutkimuksia.

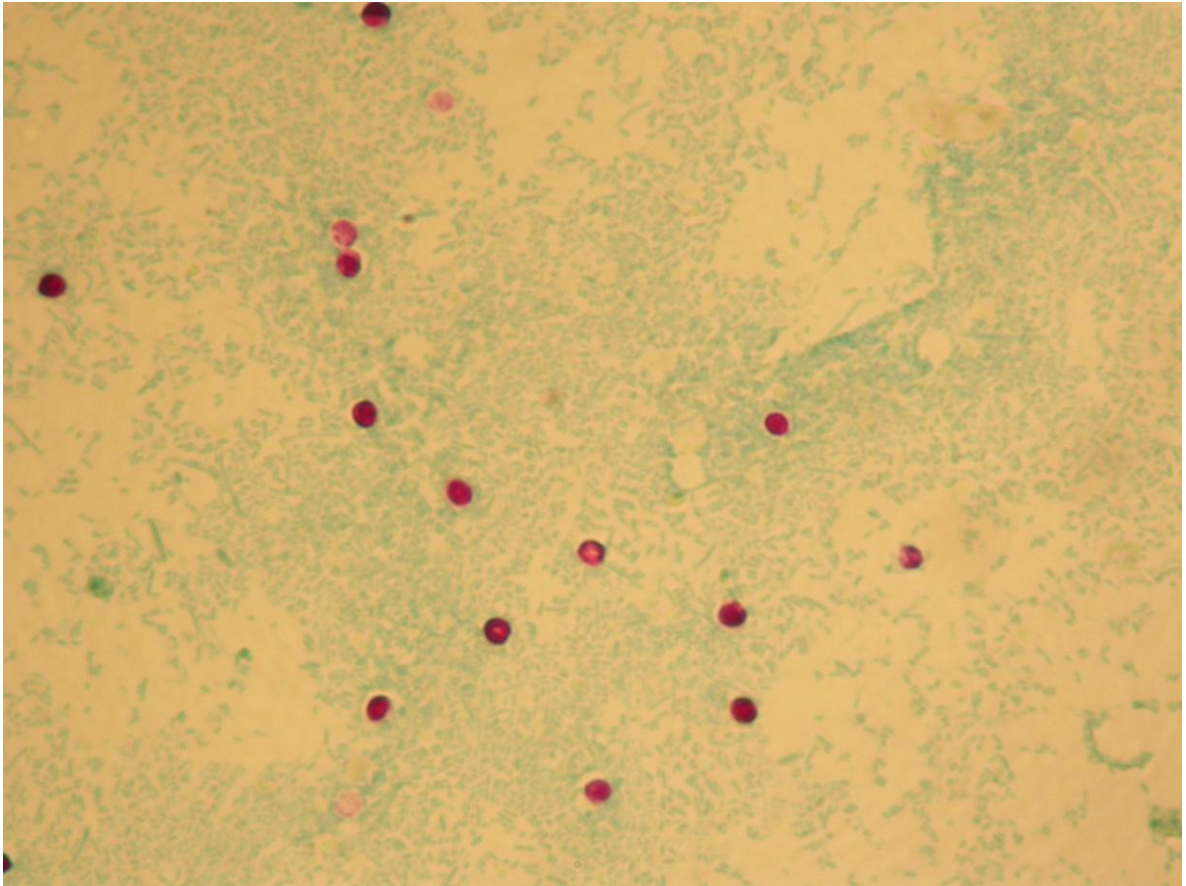
3.3.4 Näytteiden sively objektilasille

Konsentroidin jälkeen näytteitä tutkittiin mikroskoopilla kryptosporidien havaitsemiseksi. Tätä varten kaikista konsentroiduista näytteistä tehtiin sively objektilasille. Objektilasit numeroitiin näytteiden mukaisesti, ja jokaiseen lasiin piirrettiin timanttikynän avulla noin 1 cm halkaisijaltaan oleva ympyrä. Kertakäyttöinen viljelysilvällä kastettiin näytteeseen ja näyteliuosta siveltiin objektilasin ympyrään. Jos näyte oli hyvin tummaa tai paksua, näytettä levitettiin myös ympyrän ulkopuolelle, jotta näyte kerros olisi ohuempi ja mikroskopointi

helpompaa. Tämän jälkeen objektilasit siirrettiin tarjottimelle kuivumaan ja odottamaan värjäystä.

3.3.5 Ziehl-Neelsen värjäys

Kaikki eri menetelmillä konsentroidut ulostenäytteet värjättiin Ziehl-Neelsen menetelmää käyttämällä. Ensin objektilasille levitettyjä näytteitä fiksoitiin 10 minuutin ajan metanolissa, jonka jälkeen niiden annettiin kuivua. Tämän jälkeen objektilaseja värjättiin 20 minuutin ajan kryptosporidien sisään tunkeutuvalla, punaisella Basic-fuksiinivärillä. Värjäyksen jälkeen objektilaseja huuhdeltiin 4 minuutin ajan juoksevalla vesijohtovedellä, minkä jälkeen kaikki ylimääräinen väri huuhdeltiin pois 6 minuutin 7 % rikkihappokäsittelyllä ja näytteitä huuhdeltiin taas 2 minuutin ajan juoksevalla vedellä. Tämän jälkeen suoritettiin objektilasin taustan vastavärjäys pitämällä näytteitä 3 minuutin ajan metyleenisiniliuoksessa. Metyleenisini ei pääse kryptosporidien kuoren sisään. Lopuksi objektilaseja huuhdeltiin juoksevalla vedellä 4 minuutin ajan, lasien annettiin kuivua ja objektilasit peitettiin Entellan New-liimalla ja peitinlasilla. Käsittelyn jälkeen ookystat näkyvät punaisina, pyöreinä kappaleina vihreää tai sinistä taustaa vasten, kuten kuvassa 3. voidaan todeta.



Kuva 3. Ziehl-Neelsen menetelmällä värjättyjä *Cryptosporidium*-ookystia. Ookystat näkyvät punaisina, pyöreinä kappaleina vihertävää taustaa vasten. Valomikroskooppi, 400x suurennos. Kuva Paula Syrjälä, Evira Kuopion tutkimusyksikkö.

3.3.6 DNA-eristys

DNA-eristys tehtiin kaikille konsentroiduille näytteille. Ennen varsinaista DNA-eristystä ookystia pehmennettiin Dynabeads keraamisten kuulien avulla ja ylimääräisellä proteinaasi K-käsittelyllä. Ookystien suhteen konsentroitua ulostenäytettä sisältävään eppendorffputkeen lisättiin 1,5 ml steriiliä Milli-Q-vettä ja putkia sentrifugoitiin 1000 g:n voimalla 3 minuuttia. Sentrifugoinnin jälkeen ylimääräinen H₂O pipetoitiin pois siten, että näytettä jäi jäljelle 400 µl tai vähemmän, jotta se sopi BSE-putkiin. Valmiista BSE-putkista poistettiin 400 µl

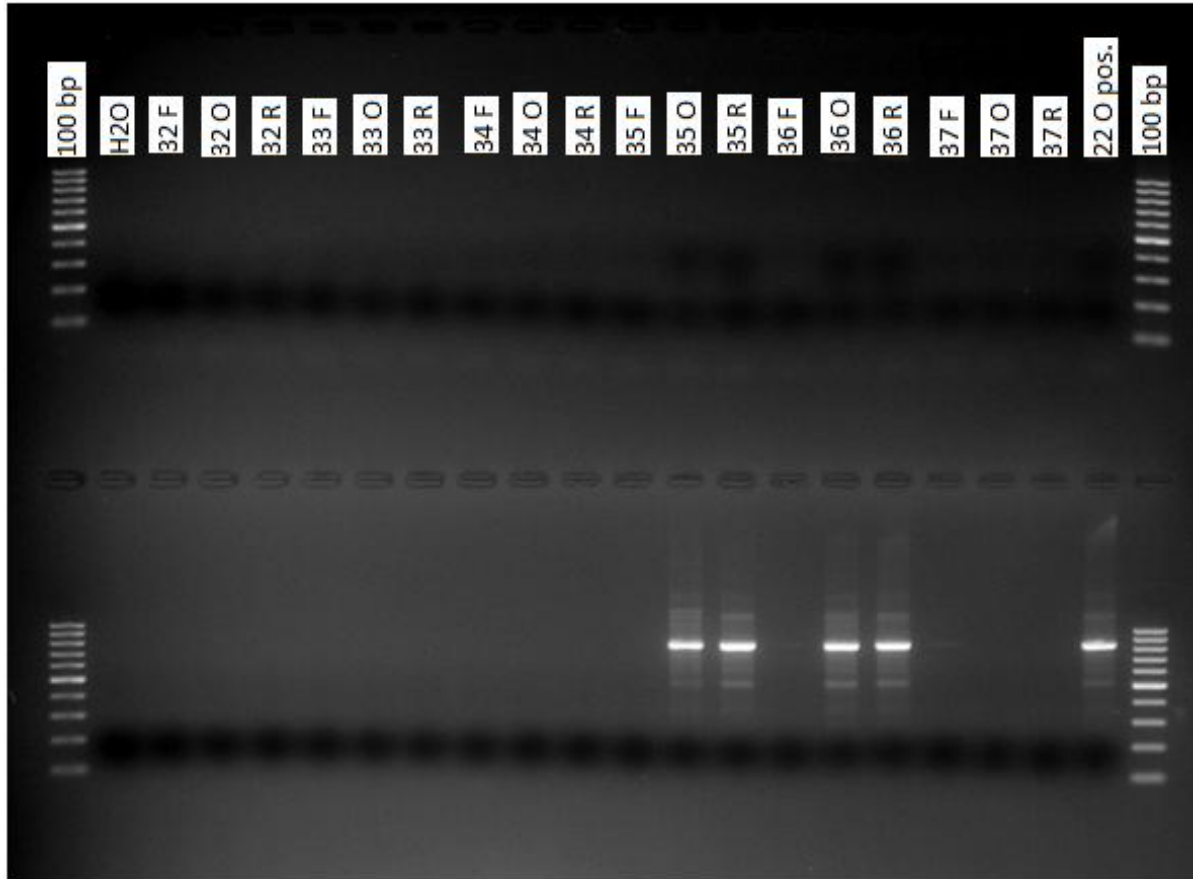
nestettä ja tilalle lisättiin jokainen näyte kokonaisuudessaan. BSE-putkia sekoitettiin ravistelemalla Magna Lyser-laitteessa 25 s 6000 rpm. Ravisteltua näytettä otettiin 200 µl erilliseen eppendorffputkeen ja päälle lisättiin 400 µl BSE-puskuri A:ta sekä 40 µl BSE-kitin proteinaasi K:ta. Näytteet vorteksoitiin ja inkuboitiin Grant lämpöhauteessa 50 °C lämpötilassa yön yli.

Seuraavana päivänä varsinaisessa DNA:n eristämässä käytettiin valmista kittiä (QiAmp DNA Minikit, Qiagen Inc.), joka on suunniteltu nimenomaan DNA:n eristämiseen ulostenäytteistä. DNA-eritys suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaan. Eristettyjä näytteitä säilytettiin jääkaapissa 4 °C lämpötilassa jatkotutkimuksiin asti.

3.3.7 Nested PCR

Polymeraasiketjureaktio (PCR) suoritettiin nested-protokollan mukaan ja monistettavana oli kryptosporidien 18S rRNA-geeni. DNA:n monistus tapahtui 48 µl kokonaistilavuudessa, joka koostui 2 µl näytettä, 5 µl 10 x PCR-puskuria, 8 µl 50 mM MgCl₂-liuosta, 1 µl 10 mM dNTP:a, 0,5 µl BSA (100x kantaliuos), 1,25 U entsyymiä, 31,25 µl H₂O ja 1 µl molempia alukkeita (10 pmol/µl). PCR-ohjelma muodostui 95 °C 15 min alkudenaturaatiosta ja 35 monistussyklistä, joista kukin sisälsi seuraavat vaiheet: 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, sekä 72 °C 7 min loppuelongaatiosta ja tuotteen jäädyttämisestä 4 °C lämpötilaan. Toinen PCR-kierros toistettiin muuten täsmälleen samoin kuin ensimmäinen, mutta templaattina käytettiin ensimmäisen PCR-ajon tuotetta ja reaktiossa käytettiin eri alukkeita sekä MgCl₂ määrä pienennettiin 4 µl:aan ja veden määrä vastaavasti nostettiin 35,25 µl:aan.

Toisen PCR-ajon jälkeen tuotteet eroteltiin 1,5 % agarosigeelielektroforeesilla (50 min 140 V), jossa merkkiaineena käytettiin etidiumbromidia ja puskurina TAE-puskuria. Elektroforeesin jälkeen geeli kuvattiin UV-valossa. Kuvassa 4. on esimerkki UV-valossa kuvatusta geelistä.



Kuva 4. Agarosigeelielektroforeesilla erotellut PCR-tuotteet UV-valossa kuvattuna. 100bp = molekyylipainomarkkeri, H₂O = negatiivinen kontrolli (vesi), 32 F – 37 R = näyttenumerot; joista F = formaliini-etyyliasetatimenetelmä, O = sokeriflotaatio ja R = NaCl-flotaatio, 22 O pos. = positiivinen kontrolli. Kuvassa esitetystä erästä PCR-positiivisia näytteitä olivat 35 O, 35 R sekä 36 O ja 36 R.

3.3.8 DNA-sekvensointi

DNA-sekvensointia varten valittiin kahdeksan PCR-positiivista näytettä, jotka oli konsentroitua sokeriflotaatiota käyttämällä (3 O, 10 O, 28 O, 29 O, 35 O, 36 O, 40 O ja 53 O). Ennen DNA-sekvensointia näytteille tehtiin uusi PCR-ajo, jossa ensimmäisen

monistusvaiheen tuotetta pipetoitiin kolmeen eri putkeen ennen toista PCR-ajoa, jotta monistettua tuotetta olisi riittävästi analysoimista varten.

Toisen PCR-ajon jälkeen kolminkertainen lopputuote eroteltiin agarosiigeelielektroforeesilla aiemmin kuvatun mukaisesti, mutta geeliä ajettiin pidempään (1 h 30 min), jotta vyöhykkeet erottuivat varmasti toisistaan. Ajon jälkeen oikeat vyöhykkeet leikattiin irti geelistä ja siirrettiin analyysivaalla punnittuihin eppendorffputkiin. Tämän jälkeen PCR-tuote puhdistettiin valmiilla kitillä valmistajan ohjeen mukaan (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega). Puhdistuksen jälkeen näytteet pakastettiin (-20 °C) ja lähetettiin analysoitavaksi A.I. Virtanen-instituuttiin (Neulaniementie 2, 70210 Kuopio). Vastauksena A.I. Virtanen-instituutista tuli kunkin analysoidun DNA:n sekvenssijärjestys, joita verrattiin toisiinsa ja olemassa oleviin, tunnettuihin sekvensseihin.

4 TULOKSET

Tutkituista 64 ulostenäytteestä 19 todettiin nested PCR:lla positiiviseksi kryptosporidien suhteen. Tässä tutkimuksessa *Cryptosporidium*-alkueläinten prevalenssiksi saatiin siis 29,7 %. NaCl-flotaatiolla konsentroiduista näytteistä 19 oli PCR-positiivisia ja mikroskopoimalla Ziehl-Neelsen värjäyksen jälkeen positiivisia näytteitä löydettiin 21 kappaletta. Sokeriflotaatiolla konsentroiduista näytteistä positiivisia oli mikroskopoitaessa 27 ja PCR:n perusteella 19 kappaletta. Formaliini-etyyliasettaattimenetelmällä konsentroiduista näytteistä yksikään ei antanut PCR:lla positiivista tulosta. Mikroskopoitaessa formaliini-etyyliasettaattimenetelmällä konsentroituja näytteitä 24 ulostenäytettä todettiin positiiviseksi. Kaikki positiiviset mikroskopointi- ja PCR-tulokset on esitetty taulukossa 2. Yhdeksän vasikan, joiden ulosteesta löydettiin *Cryptosporidium*-ookystia, ulosteen koostumus oli ripulia ja yhden vasikan ripuliulosteen seassa oli myös verta. Muiden positiivisen tuloksen antaneiden vasikoiden uloste oli normaalia. DNA-sekvensointiin valituista kahdeksasta näytteestä seitsemän oli genotyypiltään *C. bovis* ja yksi *C. ryanae*. Tyypitystulokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 2. Kryptosporidien suhteen positiiviset ulostenäytteet. ZN = Ziehl-Neelsen värjäys, PCR = polymeraasiketjureaktio, N = normaali / kiinteä ulosteen koostumus, + = vähän ookystia, ++ = keskimäärin ookystia, +++ = runsaasti ookystia, x = PCR-positiivinen näyte.

Näyte nro	Ulosteen koostumus	NaCl-flotaatio		Sokeriflotaatio		Formaliini-etyyli-asetattimenetelmä	
		ZN	PCR	ZN	PCR	ZN	PCR
1	N	+	x	+	x	+	
3	ripuli	+	x	+	x	+	
5	verinen ripuli		x		x		
6	N	+	x	+	x	+	
7	N	+		+		+	
9	ripuli	++	x	++	x	++	
10	ripuli	+++	x	+++	x	+++	
12	N	+		+		+	
13	N			+		+	
19	N	+		+		+	
21	ripuli	+		+		+	
22	N	+	x	+	x	+	
24	N	+		+		+	
28	N		x		x		
29	N	+++	x	+++	x	+++	
34	N	+		+		+	
35	N	+	x	+	x	+	
36	N	+++	x	+++	x	+++	
40	ripuli	+	x	+	x	+++	
41	ripuli	+	x	+	x	+	
48	N	+	x	+	x	+	
50	N			+		+	
53	N	+	x	+	x	+	
56	N			+			
63	N		x	+	x		
64	N	+		+		+	
70	N	+++	x	+++	x	+++	
71	ripuli		x	+	x	+	
72	N		x	+	x		
positiivisia kpl (%)		21 (32,8 %)	19 (29,7 %)	27 (42,8 %)	19 (29,7 %)	24 (37,5 %)	0 kpl 0 %

Taulukko 3. Kryptosporidien lajiprevalenssi. Taulukossa on esitetty DNA-sekvensointiin valitut ulostenäytteet, niiden tyyppitulokset sekä vasikoiden iät.

Näyte	<i>Cryptosporidium</i> -laji	Vasikan ikä (vrk)
3 O	<i>C. bovis</i>	25
10 O	<i>C. bovis</i>	26
28 O	<i>C. bovis</i>	17
29 O	<i>C. bovis</i>	23
35 O	<i>C. ryanae</i>	27
36 O	<i>C. bovis</i>	24
40 O	<i>C. bovis</i>	26
53 O	<i>C. bovis</i>	20

5 POHDINTA

Tässä tutkimuksessa otetuista 64 vasikan ulostenäytteestä 19:sta löytyi PCR-menetelmän perusteella *Cryptosporidium*-ookystia eli *Cryptosporidium*-alkueläimen prevalenssiksi saatiin 29,7 %. Ulostenäytteet kerättiin yhdestä vasikoiden kolmivaihekasvattamosta, mutta tulokset kuvaavat tilannetta vasikoiden lähtötiloilla eli 53 lypsykarjatilalla 11 kunnan alueella Pohjois-Savossa. Koska näytteet otettiin heti vasikoiden kasvattamoon saapumisen jälkeen, uusia tartuntoja ei ollut ehtinyt vielä syntyä. 19 kryptosporidien suhteen positiivista vasikkaa olivat lähtöisin 15 eri tilalta eli 28,3 %:lla lähtötiloista esiintyi *Cryptosporidium*-alkueläimiä. Sitä vastoin Autio ym. (2010) tekemässä tutkimuksessa kryptosporidien prevalenssi vaihteli Suomessa 12 – 17 % välillä Ziehl-Neelsen värjäyksen perusteella. Kyseisessä tutkimuksessa otanta oli huomattavasti suurempi. Vasikoiden ulostenäytteitä analysoitiin yhteensä 3000 kappaletta vuosien 2000 - 2009 välillä, joten

voidaan olettaa, että kyseisen tutkimuksen tulokset kuvaavat todenmukaisemmin Suomessa vallitsevaa tilannetta.

Myös muualla maailmassa tehdyissä prevalenssitutkimusten tuloksissa on suuria eroja. Yhdysvalloissa Santin ym. (2004) tutkimuksessa *Cryptosporidium*-alkueläinten prevalenssi alle kahden kuukauden ikäisillä vasikoilla oli 41,0 %. Ruotsissa Sirverlås ym. (2009) saivat saman ikäisten vasikoiden prevalenssiksi 52 %, ja *Cryptosporidium*-ookystia löytyi 96 % tutkituista maidontuotantotiloista. Kanadassa 45 maidontuotantotilasta 29 (64 %) oli *Cryptosporidium*-positiivisia (Dixon ym. 2011). Unkarissa vieroittamattomien vasikoiden *Cryptosporidium*-prevalenssiksi saatiin 49 % (Plutzer & Karanis 2007). Portugalissa 25,4 % tutkituista vasikoista eritti ulosteissaan *Cryptosporidium*-ookystia (Mendonca ym. 2007). Japanissa puolestaan 75 % alle kahden kuukauden ikäisten vasikoiden ulostenäytteistä todettiin *Cryptosporidium*-positiivisiksi (Karanis ym. 2010).

DNA-sekvensoinnin perusteella tässä tutkimuksessa Pohjois-Savon alueelta löydettiin *Cryptosporidium*-lajeista *C. bovis* ja *C. ryanae*. Vastaavia tuloksia on saatu myös Autio ym. (2010) tekemässä tutkimuksessa, jonka perusteella yleisimmät Suomessa esiintyvät kryptosporidilajit ovat *C. ryanae* ja *C. bovis*. Kyseisessä tutkimuksessa 3000 tutkitusta ulostenäytteestä vain 25 (0,8 %) sisälsi *C. parvum*-ookystia. *C. bovis* ja *C. ryanae* ovat apatogeenisiä eli eivät aiheuta vasikoille ripulia, joten tässä tutkimuksessa yhdeksän ripuloivan ja *Cryptosporidium*-alkueläinten suhteen positiivisen vasikan taudinaiheuttajana on ollut jokin muu tekijä kuin kryptosporidioosi, kuten esimerkiksi rota- tai koronavirustartunta. Apatogeenisten *Cryptosporidium*-lajien esiintymisen puolesta puhuu myös se, että muiden kryptosporidipositiivisten vasikoiden uloste oli normaalia. Myös Autio ym. (2010) tutkimuksessa *C. bovis* ja *C. ryanae* olivat ainoita terveiltä yksilöiltä löydettyjä kryptosporidilajeja.

Hajonta kryptosporidien tutkimuskohtaisissa prevalensseissa selittyy mm. niiden kriteerien eroilla, joiden perusteella eläimet on tutkimuksiin valittu. Merkittävin seikka, mikä vaikuttaa kryptosporidien esiintymiseen ulostenäytteissä, on se, ovatko näytteet otettu oireettomilta vai oireilevilta eläimiltä. Koska kryptosporidioosin katsotaan olevan merkittävä ripulin aiheuttaja vastasyntyneillä vasikoilla, ja ripuloivien eläinten on todettu erittävän suuria määriä ookystia ulosteissaan, sairastuneilla yksilöillä *Cryptosporidium*-alkueläinten

prevalenssi on huomattavasti korkeampi kuin terveillä eläimillä (Moon & Woodmansee 1986, Kuczynska & Shelton 1999, Fayer ym. 2000, Higgins ym. 2001, Brook ym. 2007, Radostits ym. 2007). Esimerkiksi Karanis ym. (2010) tutkimuksen korkeat prevalenssitulokset Japanissa selittyvät sillä, että tutkitut ulostenäytteet oli kerätty nimenomaan oireilevilta, ripuloivilta vasikoilta, joten tulokset kuvaavat ainoastaan *Cryptosporidium parvum*-alkueläimen prevalenssia sairastuneilla yksilöillä. Lisäksi myös eläinten ikä vaikuttaa ulosteissa esiintyvien *Cryptosporidium*-ookystien määrään. Eniten ookystia ulosteissaan erittävät alle kahden kuukauden ikäiset vasikat (Sturdee ym. 2003, Santin ym. 2004, Santin ym. 2008). Jos ulostenäytteitä on kerätty myös vanhemmilta vasikoilta tai jopa aikuisilta naudoilta, saadut prevalenssitulokset ovat selvästi pienempiä (Santin ym. 2004, Fayer ym. 2006, Fayer ym. 2007).

Prevalenssitulosten väliset poikkeamat selittyvät myös osittain tutkimuksissa kryptosporidien tunnistamiseksi käytettyjen menetelmien eroilla. Myös tässä tutkimuksessa havaittiin merkittäviä eroja perinteisen Ziehl-Neelsen värjäysmenetelmän ja PCR-menetelmän antamien tulosten välillä. NaCl-flotaatiolla konsentroiduista ulostenäytteistä 19 oli PCR-positiivisia ja mikroskopoimalla Ziehl-Neelsen värjäyksen jälkeen positiivisia näytteitä löydettiin 21 kappaletta. Sokeriflotaatiolla konsentroiduista näytteistä positiivisia oli mikroskopoitaessa 27 ja PCR:n perusteella 19 kappaletta. Formaliini-etyyliasettaattimenetelmällä konsentroiduista ulostenäytteistä näytteistä 24 todettiin mikroskopoinnin perusteella positiivisiksi, mutta tällä menetelmällä konsentroiduista näytteistä yksikään ei antanut PCR:lla positiivista tulosta. Näin ollen voidaan olettaa, että formaliini-etyyliasettaatti menetelmässä käytettävät reagenssit sisältävät inhibiittoreita tai muuta aineita, jotka häiritsevät polymeraasiketjureaktiota. Jotta formaliini-etyyliasettaattimenetelmällä konsentroituja näytteitä pystyttäisiin analysoimaan PCR:n avulla, näytteille on ensin suoritettava useita pesuja, jotta inhiboivat tekijät saadaan poistettua ennen DNA:n monistamista.

Polymeraasiketjureaktiota pidetään kryptosporidien diagnostiikassa referenssimenetelmänä sen detektioherkkyyden ja tulosten luottavuuden vuoksi (Balabat ym.1996, Trotz-Williams ym. 2005). Nested PCR pystyy havaitsemaan pitoisuuksia, joissa on 500 ookystaa yhtä ulostegrammaa kohti (Balabat ym. 1996). Menetelmällä on saatu monistettua DNA:ta jopa

yhdestä *Cryptosporidium*-ookystasta (Sulaiman ym. 1999, Xiao ym. 1999, Coupe ym. 2005). PCR:lla saadaan siis tarkempia ja luotettavampia tuloksia kuin perinteisillä tutkimusmenetelmillä, koska varsinkin mikroskopoitaessa vähäiset ookystamäärät saattavat jäädä huomaamatta tai vaihtoehtoisesti virhepositiivisten määrä kasvaa, jos myös muut kappaleet kuin ookystat värjäytyvät. Tässä tutkimuksessa PCR:lla saatuja tuloksia voidaan siis pitää luotettavampana ja lähempänä kryptosporidien todellista määrää kuin tuloksia, jotka saatu mikroskopoimalla ulostenäytteitä Ziehl-Neelsen värjäyksen jälkeen. Huomion arvoista on se, että sekä NaCl- että sokeriflotaatiolla konsentroiduista näytteistä saatiin PCR-menetelmällä sama tulos. Molemmat konsentroidintimenetelmät soveltuvat siis erinomaisesti käyttäväksi yhdessä PCR-diagnostiikan kanssa.

Ziehl-Neelsen värjäysmenetelmän detektiokynnys *Cryptosporidium*-ookystien suhteen on paljon PCR-menetelmää korkeampi. Käytettäessä ulostenäytteiden suoravärjäystä ilman edeltävää ookystien konsentroidintia menetelmän havaitsemiskynnys on noin 10^6 ookystaa yhtä ulostegrammaa kohden (Anusz ym. 1990). Lisäksi ZN-värjäys ei sovellu näytteille, joissa on vain vähän *Cryptosporidium*-ookystia, sillä vähäiset ookystat saattavat jäädä huomaamatta objektilaseja mikroskopoitaessa (MacPherson & McQueen 1993, Quilez ym. 1996). Ulostenäytteiden konsentroidiminen ennen mikroskopointia parantaa kuitenkin Ziehl-Neelsen värjäysmenetelmän tarkkuutta. ZN-värjäyksen ongelmana on myös se, että *Cryptosporidium*-ookystien lisäksi useat muut partikkelit, kuten hiivat ja homeet saattavat värjäytyä (Casemore 1991). Tässä tutkimuksessa värjäytyjä objektilaseja mikroskopoitaessa positiivisiksi merkittiin kaikki lasit, joista löytyi yksikin *Cryptosporidium*-ookysta. Tämä on todennäköisesti kasvattanut virhepositiivisten määrää. Nested PCR-menetelmään verrattuna Ziehl-Neelsen värjäyksellä saatiin kaksi virhepositiivista, kun värjäys yhdistettiin NaCl-flotaatioon, viisi virhepositiivista formaliini-etyyliasettaattimenetelmän kanssa ja kahdeksan virhepositiivista, kun ulostenäytteet konsentroidtiin sokeriflotaatiolla ennen värjäystä ja mikroskopointia. Tulokset olisivat mahdollisesti olleet hieman luotettavampia, jos kaikki objektilasit, joissa havaittiin alle kaksi ookystaa muistuttavaa kappaletta, olisi tulkittu negatiivisiksi, kuten aiemmissa tutkimuksissa on esitetty (Casemore 1991, MacPherson & McQueen 1993, Brook ym. 2007).

Analysoituista kryptosporidien konsentroidintimenetelmistä NaCl-flotaatio oli helpoin suorittaa. Siinä oli vähemmän työvaiheita, eivätkä ne olleet niin vaativia kuin muissa tutkituissa menetelmissä. Myös käytettävät reagenssit ja välineet olivat yksinkertaisia. Käytetyt reagenssit olivat joko helposti saatavilla tai helppoja valmistaa, eivätkä ne olleet näytteiden käsittelijälle haitallisia, kuten esimerkiksi formaliini-etyyliasettaattimenetelmän 10 % formaliini ja etyyliasettaatti. Kuten aikaisemmissa tutkimuksissa on esitetty, NaCl-flotaatio oli nopea ja soveltui erittäin hyvin rutiinidiagnostiikkaan (Kuczynska & Shelton 1999). NaCl-flotaatiolla konsentroidut näytteet sisälsivät vähiten debristä, joten näytteiden mikroskopointi oli sen suhteen helppoa ja nopeaa. Tähän tulokseen olivat tulleet myös Kuczynska & Shelton (1999). Kirjallisuudessa on mainittu, että suolaliuoksia käytettäessä ookystat menettävät ajan kuluessa muotonsa ja saattavat hajota (Kvac ym. 2003). Ongelmana on myös kuvattu suolaliuosten kiteytymistä (Kvac ym. 2003). Tässä tutkimuksessa ei edellä kuvattuja ongelmia havaittu, vaikka ulostenäytteiden konsentroidin ja värjättyjen näytteiden mikroskopoinnin välillä saattoi kulua useita päiviä. Mikroskopoidessa NaCl-flotaatiolla konsentroiduja näytteitä päästiin myös lähimmäksi PCR:lla saatuja tuloksia, joten menetelmää voidaan pitää tässä suhteessa luotettavimpana. Myös Kuczynska & Shelton ym. (1999) tutkimuksessa NaCl-flotaation tulokset olivat luotettavimpia, ja tulosten välillä oli vähiten vaihtelua verrattuna sokeriflotaatioon ja formaliini-etyyliasettaattimenetelmään. NaCl-flotaatio oli tutkituista konsentroidintimenetelmistä paras ja luotettavin.

Formaliini-etyyliasettaattimenetelmä oli kaikista työläin ja hitain käytetyistä konsentroidintimenetelmistä. Osa käytetyistä reagensseista, kuten 10 % formaliini ja etyyliasettaatti, ovat haitallisia, joten näytteiden käsittely täytyi suorittaa vetokaapissa. Formaliini on syöpää aiheuttava aine ja se ärsyttää voimakkaasti silmiä, ihoa ja hengitysteitä. Myös etyyliasettaatti ärsyttää silmiä ja hengitysteitä, ja sille altistumisesta voi seurata keskushermostovaikutuksia. Formaliini-etyyliasettaattimenetelmällä konsentroidut näytteet sisälsivät vain vähän tai jonkin verran mikroskopointia hankaloittavaa debristä, kuten myös kirjallisuudessa on mainittu (Weber ym. 1991, Kuczynska & Shelton 1999). Formaliini-etyyliasettaattimenetelmällä *Cryptosporidium*-ookystat saatiin parhaiten esiin mikroskopointia varten. Tällä menetelmällä konsentroiduja ulostenäytteitä mikroskopoidessa havaittiin kuitenkin epäselväksi jääneestä syystä enemmän

virhepositiivisia kuin NaCl-flotaatiolla käsitellyillä näytteillä, kun tuloksia verrattiin PCR-menetelmään. Menetelmä ei myöskään sovellu yhdistettäväksi PCR:n kanssa reagenssien sisältämien DNA:n monistumista estävien inhibiittorien vuoksi. Kaikesta huolimatta formaliini-etyyliasettaattimenetelmällä konsentroitujen näytteiden mikroskopointi oli kaikista helpointa, ookystat erottuivat parhaiten ja olivat helpoimmin tunnistettavissa. Tästä syystä formaliini-etyyliasettaattimenetelmä sijoittui tässä tutkimuksessa käytetyistä konsentroitimenetelmistä paremmuusjärjestyksessä sijalle kaksi.

Sokeriflotaatio oli tutkituista konsentroitimenetelmistä toiseksi hitain ja työläin. Reagensseihin ei kuulunut haitallisia aineita, mutta menetelmässä vaaditun tiheyden 1,18 g/ml omaavan sakkaroosiliuoksen valmistaminen oli hankalaa. Sokeriflotaatio oli kuitenkin kokonaisuudessaan helpompi suorittaa kuin formaliini-etyyliasettaattimenetelmä. Sokeriflotaatiolla konsentroidut näytteet sisälsivät keskinkertaisesti tai paljon tulosten tulkintaa vaikeuttavaa debristä. Tämä on mainittu myös kirjallisuudessa useissa Sheatherin sokeriflotaatiota käsittelevissä artikkeleissa (MacPherson & McQueen 1993, Kuczynska & Shelton 1999). Sokeriflotaatiolla käsitellyt näytteet sisälsivät tässä tutkimuksessa huomattavasti enemmän debristä kuin näytteet, jotka oli konsentroidu NaCl- tai formaliini-etyyliasettaattimenetelmää käyttämällä. Tämä voi selittää myös suhteellisen suuren virhepositiivisten määrän, joka saatiin sokeriflotaatiolla konsentroituja ulostenäytteitä mikroskopoidessa. Mitä enemmän näyte sisältää debristä, sitä todennäköisempää on, että Ziehl-Neelsen menetelmällä värjäytyy myös muita kappaleita kuin *Cryptosporidium*-ookystia (Casemore 1991, Brook ym. 2007). Menetelmän keskinkertaisen työläyden, suuren debrismäärän ja useiden virhepositiivisten näytteiden perusteella sokeriflotaatiomenetelmä soveltuu tutkituista konsentroitimenetelmistä kaikista heikoiten kryptosporidien diagnosointiin ulostenäytteistä.

Kryptosporideille soveltuvista värjäysmenetelmistä perehdyttiin tässä tutkimuksessa vain Ziehl-Neelsen värjäykseen. Menetelmä oli hyvin helppo ja nopea suorittaa, ja siinä oli vain muutama vaihe. Näytteitä oli helppo käsitellä suurissa erissä. Ziehl-Neelsen värjäyksellä käsiteltyjen näytteiden mikroskopointi oli suhteellisen yksinkertaista, sillä punaisiksi värjäytyneet ookystat oli helppo erottaa sinisestä taustasta. Lisäksi suurimmassa osassa tapauksista *Cryptosporidium*-ookystien morfologinen rakenne oli erotettavissa, joten niiden

tunnistaminen oli vaivatonta. Jokainen värjätty objektilasi oli myös mahdollista säilyttää pysyvänä tallenteena. Kaikki edellä mainitut seikat on todettu myös aikaisemmissa tutkimuksissa (MacPherson & McQueen 1993, Brook ym. 2007, Kar ym. 2011).

Polymeraasiketjureaktio oli tutkimuksessa käytetyistä menetelmistä kaikista vaativin ja työläin. PCR:n toteuttamiseen tarvitaan hyvin kalliita laitteita ja reagensseja. Monissa aiemmissa tutkimuksissa on mainittu, että kallis hinta rajoittaa PCR:n käyttöä rutiinidiagnostiikassa ja laaja-alaisessa tutkimuksessa (Kvac ym. 2003, Trotz-Williams ym. 2005, Paul ym. 2005, Brook ym. 2007). Kvac ym. (2003) mukaan PCR:lla ei kannata tutkia suuria näytemääriä, joiden parasitologista statusta ei ennestään tiedetä. PCR-menetelmän käyttäminen on myös hyvin aikaavievää (Trotz-Williams ym. 2005, Paul ym. 2005). Tässä tutkimuksessa yhden näyte-erän käsittelyyn PCR-menetelmällä kului keskimäärin neljä työpäivää. Näytteiden analysointi oli siis hyvin hidasta verrattuna perinteisiin konsentroitimenetelmiin, värjäykseen ja mikroskopointiin, joissa tulokset saatiin jo saman päivän aikana. PCR:lla näytteitä voidaan kuitenkin tutkia isoissa erissä (Brook ym. 2007). Menetelmän etuja on myös se, että tulosten tulkinta on helppoa, menetelmä on hyvin sensitiivinen ja spesifinen, ja diagnostiikka voidaan viedä edelleen kryptosporidien laji- ja genotyypitasolle asti (Xiao ym. 1999, Sulaiman ym. 1999, Higgins ym. 2001, Santin ym. 2004, Coupe ym. 2005, Fayer ym. 2006, Brook ym. 2007). Vasikoilla esiintyvien eri *Cryptosporidium*-lajien erottaminen toisistaan on tärkeää, sillä vain *C. parvum* on merkittävä uhka ihmisille ja vasikoille (Santin & Zarlenga 2009).

Verratuista *Cryptosporidium*-alkueläimen diagnostiikassa käytettävistä ookystien havaitsemismenetelmistä perinteinen Ziehl-Neelsen värjäys sopii kliinisten näytteiden analysointiin, sillä oletuksena on, että ripuloivien vasikoiden ulostenäytteistä löytyy runsaasti *Cryptosporidium*-ookystia. Tällöin ZN-värjäyksen detektiokyky riittää diagnoosin tekemiseen. Samaan lopputulokseen ovat päätyneet myös Quilez ym. (1996), joiden tulokset osoittavat, että Ziehl-Neelsen menetelmä hyvin spesifinen ja riittävän sensitiivinen kryptosporididiagnostiikkaan, kun ulostenäytteet sisältävät paljon ookystia. Sen sijaan PCR-menetelmän käyttäminen on välttämätöntä ulostenäytteille, joiden ookystamäärä on vähäinen tai joiden parasitologinen status halutaan selvittää laji- tai genotyypitasolle asti. Ziehl-Neelsen menetelmän diagnostinen herkkyys ei riitä, jos ulostenäytteet sisältävät vain

vähän ookystia, eikä *Cryptosporidium*-lajeja voida luotettavasti erottaa toisistaan pelkän mikroskopoinnissa havaittavan morfologian perusteella. Esimerkiksi *C. parvum*-, *C. bovis*- ja *C. ryanae*-ookystien erottaminen toisistaan on mahdollista vain PCR:n avulla. PCR-menetelmä soveltuu varsinkin tutkimustarkoitukseen, kuten aiemmissa tutkimuksissa on mainittu (Trotz-Williams ym. 2005, Brook ym. 2007).

6 KIITOKSET

Haluan kiittää työn johtajaa professori Marja-Liisa Hännistä sekä työn ohjaajaa ELT Tiina Autiota kärsivällisestä ja pitkäjänteisestä ohjauksesta.

Kiitokset myös Eviran Kuopion tutkimusyksikön henkilökunnalle, erityisesti Seija Haataselle ja Tatu Soiniselle, jotka opastivat ja neuvoivat näytteiden käsittelyssä sekä auttoivat loppumattomalta tuntuvassa mikroskopointiurakassa.

Perhettäni, ystäviäni ja opiskelutovereitani haluan kiittää tuesta, kannustuksesta ja iloisista hetkistä opiskelu-urallani ja sen ulkopuolella.

7 KIRJALLISUUSLUETTELO

Autio T, Syrjälä P, Pohjanvirta T, Karhukorpi J, Pelkonen S. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in calves and a case of human cryptosporidiosis associated with calves in Finland. 26th World Buiatrcis Congress, Santiago, Chile, 2010.

Anusz KZ, Mason PH, Riggs MW, Perryman LE. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1990, 28:2770-2774.

Balabat AB, Jordan GW, Tang YJ, Silva J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. J Clin Microbiol 1996, 34:1769-72.

Bowman DD. Protozoans. Teoksessa: Georgis' Parasitology for Veterinarians. 8. p. Saunders, St. Louis 2003: 98-100.

Brook EJ, Christley RM, French NP, Hart CA. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces: comparison of three methods. Lett Appl Microbiol 2007, 46:26-31.

Bukhari Z, Smith HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. J Clin Microbiol 1995, 33:2592-2595.

Casemore DP. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. J Clin Pathol 1991, 44:445-451.

Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J Clin Pathol 1985, 38:1337-1341.

Chappell CL, Okhuysen PC. Cryptosporidiosis. Curr Opin Infect Dis 2002, 15:523-527.

Coklin T, Uehlinger FD, Farber JM, Barkema HW, O'Handley RM, Dixon BR. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. Vet Parasitol 2009, 160:323-326.

Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 2005, 43:1017-1023.

Current WL, Reese NC, Ernst JV, Bailey WS, Heyman MB, Weinstein WM. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. New Engl J Med 1983, 308:1252-1257.

D'Antonio RG, Winn RE, Taylor JP, Gustafson TL, Current WL, Rhodes MM, Gary GW, Zajac RA. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. Ann Intern Med 1985, 103:886-888.

Dixon B, Parrington L, Cook A, Pintar K, Pollari F, Kelton D, Farber J. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. Vet Parasitol 2011, 175:20-26.

Dupont H, Chappel C, Sterling C, Okhuysen P, Rose J, Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. New Engl J Med 1995, 308:1252-1257.

Fayer R, Graczyk TK, Lewis EJ, Trout JM, Farley CA. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginia*) in the Chesapeake Bay. Appl Environ Microb 1998, 64: 1070-1074.

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int J Parasitol 2000, 30:1305-1322.

Fayer R, Santin M, Trout JM, Greiner E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2 year-old dairy cattle in the eastern USA. Vet Parasitol 2006, 135: 105-112.

Fayer R, Santin M, Trout JM. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. Vet Parasitol 2007, 145:260-266.

Fayer R, Xiao L. (toim.) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2. p. CRC Press, Boca Raton 2008.

Feng Y, Alderisio KA, Yang W, Blancero LA, Kuhne WG, Nadareski CA, Reid M, Xiao L. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from New York watershed. *Appl Environ Microb* 2007, 73: 6475-6483.

Higgins JA, Fayer R, Trout JM, Xiao L, Lal AA, Kerby S, Jenkins MC. Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. *J Microbiol Meth* 2001, 47:323-337.

Kar S, Gawlowska S, Dauschies A, Bangoura B. Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet Parasitol* 2011, 177:366-370.

Karanis P, Eiji T, Palomino L, Boonrod K, Plutzer J, Ongerth J, Igarashi I. First description of *Cryptosporidium bovis* in Japan and diagnosis and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic pre-weaned calves in Hokkaido. *Vet Parasitol* 2010, 169:387-390.

Keshavarz A, Haghighi A, Athari A, Kazemi B, Abadi A, Mojarad EN. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. *Vet Parasitol* 2009, 160:316-318.

Kuczynska E, Shelton DR. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures and soils. *Appl Environ Microb* 1999, 65: 2820-2826.

Kvac M, Kvetonova D, Puzova G, Ditrich O. Comparison of selected diagnostic methods for identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* in routine examination of faeces. *J Vet Med B* 2003, 50:405-411.

Laxer MA, Timblin BK, Patel RJ. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1991, 45:688-694.

Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol* 2000, 47:91-95.

Liu A, Wang R, Li Y, Zhang L, Shu J, Zhang W, Feng Y, Xiao L, Ling H. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Heilongjiang province, China. *Parasitol Res* 2009,105:797-802.

MacPherson DW, McQueen R. Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *J Clin Microbiol* 1993, 31:198-202.

Mendonca C, Almeida A, Castro A, de Lurdes Delgado M, Soares S, da Costa JM, Canada N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet Parasitol* 2007, 147:47-50.

Moon HW, Woodmansee DB. Cryptosporidiosis. *J Am Vet Med Assoc* 1986, 189:643-646.

Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 1976, 70:592-598.

Olson ME, Guselle NJ, O'Handley RM, Swift ML, McAllister TA, Jelinski MD, Morck DW. *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. *Can Vet J* 1997, 38:703-706.

Ondráčková Z, Kvác M, Sak B, Kvetonová D, Rost M. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South Bohemia, the Czech republic. *Vet Parasitol* 2009, 165:141-144.

Paul S, Chandra D, Tewari AK, Banerjee PS, Ray DD, Boral R, Rao JR. Comparative evaluation and economic assessment of coprological diagnostic methods and PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in bovines. *Vet Parasitol* 2009, 164:291-295.

Plutzer J, Karanis P. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Vet Parasitol* 2007, 146:357-362.

Quilez J, Sánchez-Acedo C, Clavel A, del Cacho E, López-Bernad F. Comparison of an acid-fast stain and monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. *Vet parasitol* 1996, 67:75-81.

Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Diseases associated with protozoa. Teoksessa: Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10. p. Saunders, Edinburgh 2007: 1512-1515.

Rimhanen-Finne R. *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection in environmental and faecal samples [väitöskirja]. Helsingin yliopisto, Helsinki 2006.

Rusnak J, Hadfield TL, Rhodes MM, Gaines JK. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1989, 27:1135-1136.

Santin M, Trout JM, Fayer R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. Vet parasitol 2008, 155:15-23.

Santin M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. Vet parasitol 2004, 122:103-117.

Santin M, Zarlenga DS. A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish *Cryptosporidium* species of veterinary and public health concern in cattle. Vet parasitol 2009, 166:32-37.

Sheather AL. The detection of intestinal protozoan and mange parasites by a flotation technique. J Comp Pathol 1923, 36:266-275.

Silverlås C, Emanuelson U, Verdier de K, Björkman C. Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. Prev Vet Med 2009, 90: 242-253.

Sturdee AP, Bodley-Tickell AT, Archer A, Chalmers RM. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. Vet Parasitol 2003, 116: 97-113.

Sulaiman IM, Xiao L, Lal AA. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. Appl Environ Microbiol 1999, 65:4431-4435.

Sulaiman IM, Xiao LH, Yang CF, Escalante L, Moore A, Beard CB, Arrowood MJ, Lal AA. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. Emerg Infect Dis 1998, 4: 681-685.

Trotz-Williams LA, Martin SW, Martin D, Duffield T, Leslie KE, Nydam DV, Jamieson F, Peregrine AS. Multiattribute evaluation of two simple tests for detection of *Cryptosporidium parvum* in calf faeces. Vet Parasitol 2005, 134:15-23.

Upton SJ, Current WL. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. J parasitol 1985, 71:625-629.

Weber R, Bryan RT, Bishop HS, Wahlquist SP, Sullivan JJ, Juranek DD. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. J Clin Microbiol 1991, 29:1323-1327.

Weber R, Bryan RT, Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. J Clin Microbiol 1992, 30:2869-2873.

Widmer G, Akiyoshi D, Buckholt MA, Feng X, Rich SM, Deary KM, Bowman CA, Xu P, Wang Y, Wang X, Buck GA, Tripodi S. Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. Mol Biochem Parasit 2000, 108: 187-197.

Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl Environ Microbiol 1999, 65:1578-1583.

Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. Int J Parasitol 2008, 38: 1239-1255.

Xiao L, Ryan UM. Molecular epidemiology. Teoksessa: Fayer R, Xiao L (toim.) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2. p. CRC Press, Boca Raton 2008: 119-163.

Yoder JS, Herral C, Beach MJ. Cryptosporidiosis surveillance – USA, 2006 – 2008. MMRV Surveillance Summaries 2010, 59:1-14.

Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol* 1979, 10:852-853.