

Cryptosporidium parvum:
Alatyypit Suomessa
ja pikatestin toimivuus
vasikkaripulidiagnostiikassa

Henriikka Rautapää

Maisterintutkielma

Helsingin yliopisto

Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos

Mikrobiologia

Toukokuu 2018

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution– Department Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author Henriikka Rautapää			
Työn nimi / Arbetets titel – Title <i>Cryptosporidium parvum</i> : Alatyypit Suomessa ja pikatestin toimivuus vasikkaripulidiagnostiikassa			
Oppiaine /Läroämne – Subject Mikrobiologia			
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterintutkielma	Aika/Datum – Month and year Toukokuu 2018	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 66	
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p><i>Cryptosporidium parvum</i> on itiöeläimiin kuuluva parasiitti, joka aiheuttaa kryptosporidioosiksi kutsutun suolistoinfektion. <i>C. parvum</i> infektoi pääasiassa nuoria vasikoita ja voi siirtyä zoonoottisesti myös ihmiseen. <i>C. parvum</i> aiheuttaa rajun vesiripulin, joka on yleensä itsestään rajoittuva. Kryptosporidioosi voi olla henkeä uhkaava pienillä lapsilla ja immuunipuutteisilla potilailla sekä heikkokuntoisilla vasikoilla.</p> <p><i>C. parvum</i> leviää pääasiassa uloste-suu -reittiä ookystien avulla. Se lisääntyy solunsisäisesti yleensä ohutsuolen enterosyyteissä ja elinkierto tapahtuu yhdessä isännässä. Ookystat ovat erittäin kestäviä ja voivat aiheuttaa talousvesiin tai elintarvikkeisiin päästessään laajojakin epidemioita.</p> <p>Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää Suomessa vuosina 2012-2017 vasikoilla esiintyneet <i>C. parvum</i> -alatyypit sekä niiden maantieteellinen ja ajallinen jakautuminen. Lisäksi tutkimuksessa selvitettiin kymmenen ihmisiä infektoineen <i>C. parvum</i> -isolaatin alatyypin ja verrattiin tuloksia vasikoilta löydettyihin alatyyppeihin. Tutkimuksessa testattiin myös vasikkaripulidiagnostiikkaan tarkoitettu pikatesti Fassisi BoDia, joka löytää ripulinäytteestä neljä yleisintä nuoria vasikoita infektoivaa patogeeniä: rotaviruksen, koronaviruksen, <i>C. parvum</i> -alkueliön ja <i>E. coli</i> K99/F5-tyypin. Pikatesti tunnistaa myös mahdollisen sekainfektion. Testi on immunokromatografinen ja <i>C. parvum</i> -löydösten diagnostinen menetelmä perustuu spesifisen proteiinin tunnistaviin monoklonaalisiin vasta-aineisiin.</p> <p>Tutkimuksen alatyypin määrityksen näyttemateriaali koostui yhteensä 100 vasikoiden ulostenäytteestä ja kymmenestä ihmisnäytteestä. Fassisi BoDia -pikatestin testaamiseen käytettiin 67 vasikoiden ripulinäytettä. Alatyypitys tehtiin monistamalla gp60-glykoproteiinia koodaavaa geeniä nested-PCR -menetelmällä ja analysoimalla geenin sekvenssitulos. Työ tehtiin Eviran eläintautibakteriologian ja -patologian Kuopion yksikössä.</p> <p>Vasikoilla oli eniten maailmallakin yleisintä alatyypin IIAA15G2R1, sen osuus oli lisääntynyt runsaasti Suomessa verrattuna aiempiin alatyypitystuloksiin. Alatyypin IIAA15G2R1 oli sijoittunut läntiseen Suomeen, etenkin Pohjanmaan alueelle. Ihmisnäytteistä löytyi ainoastaan IIAA18G1R1-alatyypin, jota ei tässä tutkimuksessa löytynyt vasikkanäytteistä. Fassisi BoDia -pikatestillle saatiin <i>C. parvum</i> -testin osalta tulokseksi 91,7 % herkkyudeksi ja 83,9 % tarkkuudeksi.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Cryptosporidium parvum</i> , kryptosporidioosi, alatyypin, gp60, Fassisi BoDia, vasikkaripuli			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin tiedekirjasto, Helsingin yliopisto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaajat: erikoistutkija Tiina Autio, prof. Sinikka Pelkonen ja prof. Per Saris			



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos/Institution – Department Department of Food and Environmental Sciences	
Tekijä/Författare – Author Henriikka Rautapää			
Työn nimi / Arbetets titel – Title <i>Cryptosporidium parvum</i> : Subtypes in Finland and functionality of rapid test in diagnostic of calf diarrhea.			
Oppiaine / Läroämne – Subject Microbiology			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's thesis		Aika/Datum – Month and year May 2018	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 66
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p><i>Cryptosporidium parvum</i> is a coccidian parasite. It causes an intestinal infection, named cryptosporidiosis. <i>C. parvum</i> infects mainly young calves and can be transmitted zoonotically to humans. <i>C. parvum</i> causes watery diarrhea, which is usually self-limiting. Cryptosporidiosis can be life-threatening to small children, immunocompromised patients and weak calves.</p> <p><i>C. parvum</i> spreads mainly by the fecal-oral route by oocysts. It multiplies intracellularly, usually in the enterocytes of the small intestine. The life cycle is spent in a single host. Oocysts are extremely resilient and can cause large epidemics when household water or food gets exposed.</p> <p>Aim of this study was to research subtypes of protozoan <i>C. parvum</i> that occurred in calves in Finland 2012-2017, and research their divergence geographically and temporally. Additionally subtypes of 10 <i>C. parvum</i> -isolates from humans were studied and results were compared to subtypes found in calves. Fassisi BoDia, a rapid test designed to identify the four most common pathogens that infect young calves (rotavirus, coronavirus, <i>C. parvum</i> and <i>E. coli</i> K99/F5-type) was tested. The rapid test also detects possible mixed infections. Test is immunocromatographic and the diagnostic method to find <i>C. parvum</i>'s specific protein is based on monoclonal antibodies.</p> <p>Sample collection for determination of subtypes consists of 100 fecal samples from calves and 10 human fecal samples. Fassisi BoDia rapid test was tested with 67 fecal samples from calves. Subtyping was made by multiplying the protein gp60 coding gene with nested-PCR and by analyzing sequences of the gene. Research was made in Evira research unit of veterinary bacteriology and pathology in Kuopio.</p> <p>Subtype IIA15G2R1 was the most common in calves. Distribution of this subtype had increased in Finland after subtype results from earlier years. Subtype IIA15G2R1 was mainly found in western Finland, especially around Pohjanmaa. Subtype IIA18G1R1 was the only one found in human samples, the same subtype was not found from calf samples in this study. Sensitivity of the Fassisi BoDia rapid test for <i>C. parvum</i> was 91,7 % and specificity was 83,9 % reliability.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Cryptosporidium parvum</i> , cryptosporidiosis, subtype, gp60, Fassisi BoDia, calf diarrhea			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Campus library of Viikki, University of Helsinki			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Tutors: Tiina Autio, Sinikka Pelkonen and Per Saris			

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	6
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	7
2.1 <i>Cryptosporidium parvum</i>	7
2.1.1 Yleistä.....	7
2.1.2 Elinkierto.....	10
2.2 Esiintyvyys	12
2.2.1. Esiintyvyys ihmisillä.....	12
2.2.2 Esiintyvyys vasikoilla Suomessa.....	15
2.3 Kryptosporidioosi	17
2.3.1 Kryptosporidioosi vasikoilla.....	17
2.3.2 Hoito vasikoilla.....	18
2.3.3 Kryptosporidioosi ihmisillä.....	20
2.3.4 Hoito ihmisillä.....	22
2.4 Diagnostiikka	23
2.4.1 Mikroskopointi.....	23
2.4.2 PCR-menetelmät ja nukleiinihappo-osoitus.....	24
2.4.3 Alatyypin erotus.....	26
2.4.4. Immunomääritykset.....	27
2.4.5 Fassisi BoDia -pikatesti.....	27
2.5 Nautakarjan kasvatus Suomessa	28
3 TUTKIMUKSEN TAVOITE	29
4 AINEISTOT JA MENETELMÄT	30
4.1 Aineisto <i>Cryptosporidium parvum</i> -alatyypitystä varten	30
4.1.1 Näytteiden keräys.....	30
4.1.2 Näytteille aiemmin tehty käsittely ja lajimääritys.....	32
4.1.2.1 Näytteiden konsentroidi, mikroskopointi ja DNA:n eristäminen.....	32
4.1.2.2 <i>Cryptosporidium</i> -nested PCR ja RFLP.....	33
4.2 Aineisto Fassisi BoDia -pikatestiin	34
4.3 Menetelmät	35

4.3.1 DNA:n monistaminen gp60-geenin sekvensointia varten.....	35
4.3.2 DNA:n eristys ja puhdistus agarosigeeliltä, sekä pitoisuuden mittaus.....	37
4.3.3 Gp-60-geenin sekvensointi ja alatyypitys.....	38
4.3.4 Fassisi BoDia -pikatesti.....	38
5 TULOKSET	40
5.1 <i>Cryptosporidium parvum</i> -alatyypit.....	40
5.2 Fassisi BoDia –pikatesti.....	42
6 TULOSTEN TULKINTAA	43
6.1 <i>Cryptosporidium parvum</i> -alatyypit.....	43
6.1.1 Tulosten luotettavuus.....	43
6.1.2 Alatyypit Suomessa.....	44
6.1.3 Alatyypit maailmalla.....	47
6.2 Fassisi BoDia –pikatesti.....	48
7 POHDINTAA	50
8 KIITOKSET	53
LÄHTEET	54

1 JOHDANTO

Cryptosporidium parvum on itiöeliöihin kuuluva alkueliö, joka aiheuttaa ripulitauteja etenkin nuorilla vasikoilla ja voi infektoida zoonoottisesti myös ihmisiä. Immuunipuutteisilla potilailla ja pienillä lapsilla tauti voi olla erittäin vakava, jopa henkeä uhkaava. Nuorilla vasikoilla *C. parvum* on yleisimpiä ripulitaudin aiheuttajia ja johtaa merkittävään haittaan nautakarjatiljoilla. Lisäksi sairastavuus lisää kustannuksia niin nautakarjataloudessa kuin ihmisten terveydenhoitokuluissa. Viime vuosina (2016–2017) *C. parvum* -lajin aiheuttamat tautitapaukset ja positiiviset näytelöydökset ovat lisääntyneet runsaasti sekä vasikoilla että ihmisillä Suomessa. Vuoden 2018 THL:n tartuntatautitilastojen mukaan ihmisten *Cryptosporidium*-infektiot ovat yli kahdeksankertaistuneet parissa viime vuodessa (2015–2017). Vasikoilla *Cryptosporidium*-löydökset ovat kaksinkertaistuneet vuosien 2015 ja 2017 välillä (Eviran tilastot 2018).

C. parvum voi levitä sairastuneista vasikoista ihmisiin ja ympäristöön, sekä aiheuttaa suoria ja välillisiä tartuntoja tai jopa epidemioita. *C. parvum* voi aiheuttaa myös laajoja vesi- ja elintarvikevälitteisiä epidemioita Suomessa ja maailmalla (Caccio & Putignani 2014; Rimhanen-Finne 2013). Tartuntojen jäljityksessä ja ripulioireisten yksilöiden sairauden syyn selvittelyssä tehokas diagnostiikka on kulmakivi niin eläinten kuin ihmistenkin tautitapauksissa. Vasikkaripuleissa diagnostiikka perustuu alkueliön osoittamiseen eläimen ulosteesta värjäyksen ja mikroskopian avulla, sekä todetun alkueliön lajin tarkempaan nimeämiseen 18S rRNA -geeniin perustuvalla PCR-RFLP -menetelmällä (PCR-tuotteen katkokirjoanalyysi) tai sekvensoinnilla. Diagnostiikka on hidasta ja työlästä, ja usein infektio on ohi ennen lopullista lajimäärittystä. Tarve nopeammalle analytiikalle on kasvanut lisääntyneiden infektiotapausten myötä. Tässä tutkimuksessa evaluoitiin Fassisi BoDia - pikatesti, joka on tarkoitettu vasikkaripulin nopeaan diagnostiikkaan. Pikatesti testattiin *C. parvum* -infektion ja mahdollisen sekainfektion osalta.

Cryptosporidium-lajeja on erittäin vaikeaa erottaa toisistaan ilman molekyylibiologisia menetelmiä (Uzal ym. 2016). *Cryptosporidium*-lajeille voidaan tehdä lajimäärittäksen lisäksi alatyypitys soluseinän glykoproteiinia koodaavan gp60-geenin sekvensoinnilla ja erottelulla (Sulaiman ym. 2005). Ihmisten ja vasikoiden *C. parvum* -infektiot

voivat levitä montaa eri reittiä ja vaihdella maantieteellisesti ja kausittain, joten on tärkeää saada tietoa tartuntareiteistä selvittämällä infektioita ja epidemioita aiheuttavien *C. parvum* -alkueliöiden alatyyppejä ja vertaamalla niiden esiintyvyyttä (Caccio & Putignani 2014). Suomessa *C. parvum* -lajin alatyypitystä on tehty ainoastaan Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Kuopion eläintautibakteriologian ja -patologian tutkimusyksikössä (Eviran tilastot 2018). Viimeisimmät vasikoiden alatyypitykset on tehty vuonna 2012. Ihmisten tautitapausten yhteydessä *C. parvum* lajimääriä on tehty Eviran toimesta myös vuonna 2016. Tässä tutkimuksessa määritettiin vasikkaripulia aiheuttavia *C. parvum*-alatyyppejä naudakarjatiloilta eri puolilta Suomea vuosilta 2012–2017, ja alatyyppeiden esiintyvyyttä verrattiin sekä aikaisempiin tuloksiin Suomesta että kirjallisuudessa esiintyviin alatyyppeiden jakautumiseen maailmalla. Lisäksi määritettiin yksittäisen ihmisillä ripulia aiheuttaneen kryptosporidioosiepidemian näytteistä alatyyppejä ja verrattiin tuloksia vasikoilla esiintyneisiin alatyyppeihin tartuntareitin selvitystä varten.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 *Cryptosporidium parvum*

2.1.1 Yleistä

Cryptosporidium parvum on itiöeläimiin (Coccidia) kuuluva solunsisäinen parasiitti, joka kuuluu Apicomplexa-pääjaksoon, Conoidasida-luokkaan, Coccodiasina-alaluokkaan, Eucoccidiorida-lahkoon, Eimeriina-alalahkoon, Cryptosporidiidae-heimoon ja *Cryptosporidium*-sukuun (Siikamäki ym. 2010; Sun 1988). Genotyypin Bovine 2 *C. parvum* esiintyy satunnaisesti uusimmassa kirjallisuudessa myös nimellä *Cryptosporidium pestis*, mutta nimitys ei saanut ICZN:n (International Code for Zoological Nomenclature) hyväksyntää, eikä näin ollen ole vakiintunut viralliseen käyttöön (Bauerfeind ym. 2016; Ryan & Xiao 2014). Uudet molekulaariset tutkimukset muuttavat jatkuvasti *Cryptosporidium*-lajien nimeämistä ja sijoittumista fylogeneettisesti (Peek ym. 2018; Leitch & He 2011). *C. parvum* genotyyppi 1 (Human genotype) infektoi pääasiassa ihmisiä ja genotyyppi 2 (Bovine genotype)

infektoi sekä ihmisiä että nautoja (O'Connor ym. 2004). *C. parvum* genotyyppi 1 on nykyään erotettu omaksi lajikseen ja on nimeltään *Cryptosporidium hominis* (Morgan-Ryan ym. 2002).

Ihmisten ja nautojen lisäksi *Cryptosporidium* infektoi monia nisäkäslajeja, muun muassa apinoita, lampaita, hevosia, sikoja, koiria, kissoja ja jyrsojia, sekä lintuja, kaloja ja matelijoita (Mehlhorn 2008). *Cryptosporidium* esiintyy maailmanlaajuisesti ja sitä on löydetty yli 150 eläinlajilta (Bauerfeind ym. 2016; Schmidt & Roberts 2005). *Cryptosporidium*-lajeja on tunnistettu 25 erilaista ja yli 40 erilaista genotyyppiä (Ryan & Xiao 2014). Uusimmassa kirjallisuudessa lajimääräksi mainitaan jo 30 eri *Cryptosporidium*-lajia, mutta nimeäminen ja tarkka lajien molekyylibiologinen erottaminen on osittain kesken (Peek ym. 2018). *Cryptosporidium*-lajit eroavat toisistaan metaboliareiteiltään ja proteiinirakenteiltaan. *C. parvum* ja *C. hominis* -lajeilta puuttuu muun muassa mitokondriorakenteita ja proteiineja, joita on muilla *Cryptosporidium*-lajeilla ja itiöeliöillä (Ryan & Xiao 2014; Xu ym. 2004). Nykyään *Cryptosporidium*-alkueliöt nähdäänkin liittyvän läheisesti gregariinien alaluokkaan solurakenteiden, elinkierron ja molekyylibiologisten ominaisuuksiensa perusteella.

Yleisimmät ihmisellä infektioita aiheuttavat *Cryptosporidium*-lajit ovat *C. hominis* ja *C. parvum*, jotka ovat geneettisesti hyvin lähellä toisiaan (Ryan & Xiao 2014; Xu ym. 2004). *C. hominis* infektoi pääasiassa vain ihmisiä ja *C. parvum* on nautaeläinten patogeeni, joka infektoi pääasiassa nuoria vasikoita (Bauerfeind ym. 2016; Gerba 2015). Muita ihmisiä infektoivia lajeja ovat *C. felis* (pääisäntänä kissa), *C. meleagridis* (pääisäntänä kalkkuna), *C. canis* (koira), *C. baileyi* (linnut) ja *C. muris* (jyrsojat), mutta näitä diagnosoidaan harvoin (DPDx 2017; Krauss ym. 2003). Nautaeläimiä infektoivat *C. parvum* -lajin lisäksi *C. bovis*, *C. ryanae* ja *C. andersoni* (Uzal ym. 2016; Robertson ym. 2014; Santin ym. 2008). *C. bovis*, *C. andersoni* ja *C. ryanae* kuitenkin kolonisoivat vanhempia vasikoita tai aikuisia nautoja, eivätkä yleensä aiheuta ripulitautia. Kyseiset lajit eivät myöskään yleensä tartu eläimistä ihmisiin. *Cryptosporidium* on todettu ihmiselle patogeeniseksi ensimmäisen kerran vuonna 1976, jolloin se löydettiin aikuisen immuunisupressiopotilaan ja ripulitautia sairastavan lapsen ulosteesta (Gerba 2015; Shikani & Weiss 2014). Eläimiltä *C. parvum* on löydetty ja identifioitu jo vuonna 1907 (Jay ym. 2005; Schmidt & Roberts 2005). *C. parvum* -alkueliön isäntänä voi toimia ihmisen ja nautaeläinten lisäksi hirvi, hevonen, lammas, vuohi tai sika (Peek ym. 2018; Taylor ym. 2007).

C. parvum ja *C. hominis* tarttuvat ihmisiin ookystina pääasiassa kontaminoituneen veden tai saastuneiden elintarvikkeiden välityksellä, suoraan ihmisestä

toiseen tai zoonoottisesti infektioituneen eläimen ulosteesta tai ulosteen saastuttamasta vedestä, ja aiheuttavat kryptosporidioosiksi kutsutun taudin (Bauerfeind ym. 2016; DPDx 2017; Autio ym. 2012; Sun 1988). *Cryptosporidium* infektoi useammin pieniä lapsia kuin aikuisia (Caccio & Putignani 2014). Vesivälitteisiä kryptosporidioosi-epidemioita on raportoitu useita ympäri maailmaa (Caccio & Putignani 2014). Tunnetuin tautitapaus on Yhdysvaltain Milwaukeesta keväällä 1993, jolloin yli 400 000 ihmistä sai kryptosporidioosin saastuneesta juomavedestä (Siikamäki ym. 2010; MacKenzie ym. 1994). Vesivälitteisiä tartuntoja on levinnyt myös kylpylöistä, julkisista uimaloista ja vesipuistoista (Jay ym. 2005; Schmidt & Roberts 2005). *Cryptosporidium*-ookystat leviävät myös kontaminoituneen ruuan välityksellä tai hengitettynä aerosolien mukana (Bauerfeind ym. 2016). Ookystat pysyvät infektiivisinä jopa useita kuukausia viileässä ja kosteassa ympäristössä, ja ovat resistenttejä useille yleisille desinfektioaineille, muun muassa kloorille (Bauerfeind ym. 2016; Jay ym. 2005; Krauss ym. 2003). Ookystien kestävyys ja laaja reservuaari eläinkunnassa aiheuttaa niiden leviämisen helposti pintavesistöihin ja edelleen vesilaitoksiin (O'Connor ym. 2004). Lisäksi ookystien pieni koko estää niiden jäämisen kiinni yleisesti vedenpuhdistuksessa käytettyihin suodatusmenetelmiin. *Cryptosporidium* aiheuttaakin haasteita talousvesijärjestelmille ja talousveden laadun ylläpitämiseen ja valvomiseen (Medema ym. 2006). Riskiryhmille, kuten immuunipuutteisille potilaille, WHO (World Health Organization) suositteleeikin vesijohtoveden keittämistä ennen veden käyttöä.

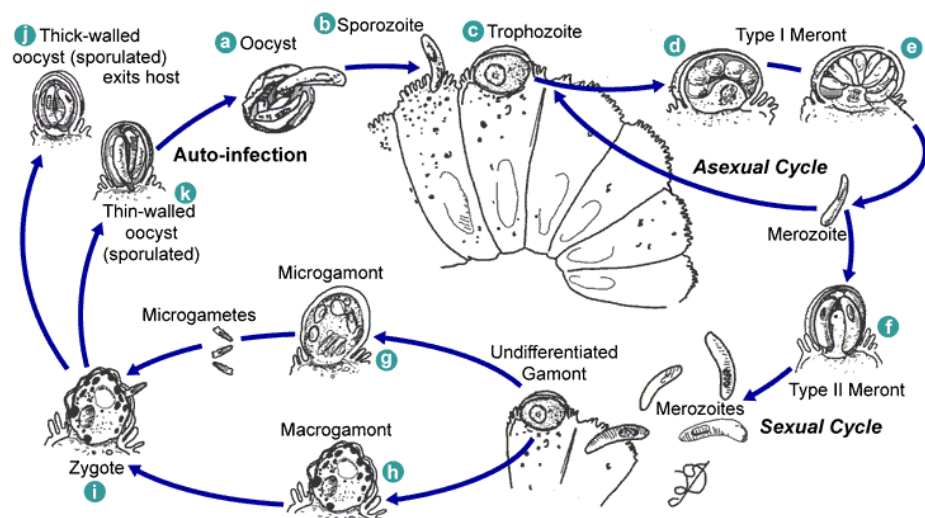
Nuorilla ja vastasyntyneillä vasikoilla *C. parvum* on yleinen ripulin aiheuttaja ja lisää siten merkittävästi nautakarjan hoitokustannuksia ja vasikkakuolleisuutta (Peek ym. 2018). *C. parvum* aiheuttaa suurimman osan alle kahden kuukauden ikäisten vasikoiden kryptosporidiooseista (Robertson ym. 2014). Vasikoilla *Cryptosporidium* leviää ookystien välityksellä uloste–suu -reittiä, yleensä juomaveden, rehun, likaisten juoma- ja ruokinta-astioiden tai elinympäristön kautta (Utriainen 2010). Kryptosporidioosia todetaan vasikoilla maailmanlaajuisesti, esiintyvyys vaihtelee 0–100 % välillä eri tutkimusten mukaan (Robertson ym. 2014; Santin ym. 2008; Trotz-Williams ym. 2005). Tartunnan aiheuttavien ookystien infektiivinen annos on pieni, vain satoja ookystia, ja toisaalta infektioitunut vasikka voi erittää ympäristöönsä jopa yli $3,8 \times 10^{10}$ ookystaa ulosteessaan, jolloin tarttuvuus vasikoiden parissa on erittäin suuri (Peek ym. 2018; Nydam ym. 2001; DuPont ym. 1995).

2.1.2 Elinkierto

C. parvum -alkueliön elinkierto tapahtuu yhdessä isännässä (Jay ym. 2005; Sun 1988). Leviäminen isännästä toiseen tapahtuu kestävien ookystien kautta, pääasiassa uloste–suu -reitillä. Paksuseinäiset ookystat ovat erittäin kestäviä ja selviävät ympäristön kuivuudesta, kuumuudesta tai desinfioinnista (mm. kloori-, jodi-, natriumhydroksidi- ja aldehydipohjaiset desinfektioaineet) huolimatta (Scott ym. 2004). Infektiivinen annos on pieni, jopa alle 10 ookystaa voi aiheuttaa taudin ihmisellä (Mattila & Järvinen 2011; Okhuysen ym. 1999). Nieltynä *Cryptosporidium*-ookystat hajoavat ohutsuolessa sappisuolojen, lämpötilan ja vatsalaukun matalan pH:n vaikutuksesta ja vapauttavat neljä sporotsoiittia, jotka infektoivat ruuansulatuskanavan limakalvon epiteelisoluja, enterosyyttejä (Gerba 2015; Leitch & He 2011; Taylor ym. 2007). Yleensä *Cryptosporidium* jakautuu ohutsuolen sykkyräsuolen soluissa, mutta se voi levitä myös paksusuolen kooloniin tai umpisuoleen (Uzal ym. 2016). Sisäänhengitettyinä ookystat voivat infektoida hengitysteiden kudoksia sporotsoiittien tunkeutuessa epiteelisolukkaan.

Solunsisäisesti parasiitit lisääntyvät ensin aseksuaalisesti ja myöhemmin seksuaalisesti muodostaen kahdenlaisia ookystia, paksuseinäisiä ulosteeseen erittyviä ja ohutseinäisiä autoinfektioon osallistuvia ookystia (Kuva 1) (Uzal ym. 2016; Taylor ym. 2007; Krauss ym. 2003). Ensin sporotsoiitti kehittyy ohutsuolen epiteelisolujen mikrovilluksissa trofotsoiitiksi ja edelleen skitsontiksi. Skitsontti jakaantuu aseksuaalisesti muodostaen kuusi tai yleisimmin kahdeksan ensimmäisen polven (tyyppi I) merotsoiittia. Merotsoiitit vapautuvat solusta ja infektoivat viereisiä epiteelisoluja, jossa ne muodostavat joko uuden sukupolven tyyppi I:n merotsoiitteja tai jakautuvat neljäksi toisen polven (tyyppi II) merotsoiitiksi (Gerba 2015; Scott ym. 2004). Nämä toisen polven merotsoiitit infektoivat edelleen uusia epiteelisoluja ja kehittyvät suvullisiksi gametosyyteiksi. Gametosyyteistä kehittyy edelleen naaraspuolisia makrogamontteja tai urospuolisia mikrogamontteja. (Uzal ym. 2016; O'Hara & Chen 2011). Gametosyytit jakautuvat muodostaen liikkumattomia makrogameetteja tai liikkuvia mikrogameetteja, jotka yhdistyvät diploidiksi tsykootiksi ja tuottavat suvullisia ookystia (Caccio & Putignani 2014). Ookystien sisällä on neljä haploidia sporotsoiittia ja ne muodostuvat kuroutumalla tsykootista, tapahtuma muistuttaa itiömuodostumista (O'Hara & Chen 2011). Ookystien seinämä on monimutkainen kompleksi, joka rakentuu sisemmästä ja

ulommasta soluseinästä, jotka puolestaan koostuvat proteiinien, lipidien ja hiilihydraattien muodostamasta matriksista. Paksuseinäiset ookystat erittyvät ulosteeseen ja kykenevät infektoimaan uusia yksilöitä. Ohutseinäiset ookystat jäävät suolistoon ja ne kykenevät infektoimaan saman yksilön uudestaan (autoinfektio) (Leitch & He 2011).



Kuva 1. *Cryptosporidium*-alkueliön elinkierto (DPDx 2017).

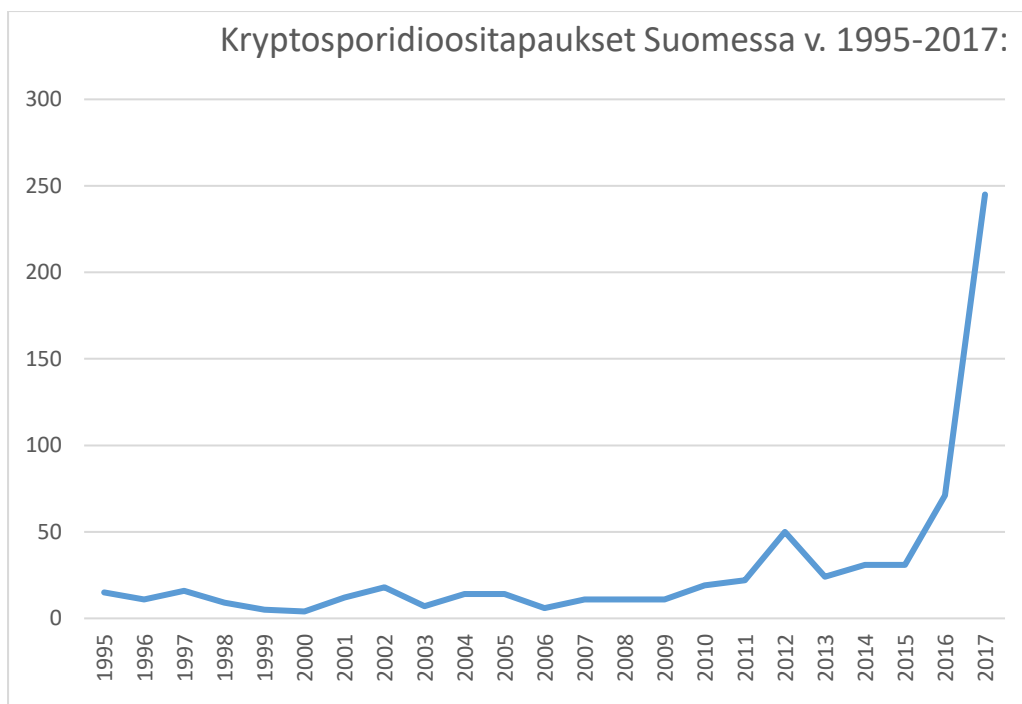
Suurin osa *Cryptosporidiumin* kehitysvaiheista tapahtuu solunsisäisessä, sytoplasman ulkopuolisessa rakkulassa epiteelisolun apikaalipuolella (Uzal ym. 2016; Ryan & Xiao 2014). Ookystista vapautuneet sporotsoiitit tunkeutuvat sekä suolen pinnan limakerroksen että enterosyyttien solukalvon läpi (Leitch & He 2011). Sporotsoiitin pintaproteiinit tunnistavat kohdesolujen solukalvon rakenneproteiineja reseptorivälitteisesti, jolloin reseptoriin kiinnittynyt sporotsoiitti nielaistaan lopulta solun sisään isäntäsolun toimesta. Sporotsoiitti kehittää ympärilleen monikalvoisen rakkulan, jossa se aloittaa kehittymisen ja jakautumisen. Parasiitti saa myös ravintonsa isäntäsoluun kiinnittyneen rakkulan läpi ja monelta *Cryptosporidium*-lajilta puuttuukin merkittävä osa metaboliareiteistä ja metaboliaan liittyvistä entsyymeistä (Xu ym. 2004). Rakkulaan kehittyvä ravinnon hankkimisesta vastaava soluorganelli, joka on yhteydessä isäntäsolun solulimaan ja jonka läheisyydessä suurin osa kehitysvaiheista tapahtuu (Leitch & He 2011). Sporotsoiitista kehittynyt trofotsoiitti kehittyä edelleen solun sisällä merontiksi, josta vapautuu solun ulkopuolelle merotsoiitteja. Merotsoiitit kykenevät liikkumaan ja tunkeutumaan uusien enterosyyttien sisään, muodostaen taas uuden solunsisäisen rakkulan. Mekanismit solurakenteiden tunnistamisessa, soluun tunkeutumisessa ja rakkulan muodostamisessa ovat samanlaisia kuin sporotsoiiteilla. Rakkula kehittyä joko

uudeksi merontiksi tai gamontiksi, jotka erilaistuvat mikro- tai makrogamonteiksi. Infektoidessaan epiteelisoluja *Cryptosporidium* aiheuttaa eriasteista mikrovillusten atrofiaa ja villusten solurakenteen muutoksia, sekä kryptojen hyperplasiaa (Uzal ym. 2016; Chalmers & Davies 2010). Villusatrofia, solujen apoptoosi ja kehittymättömät enterosyytit aiheuttavat imeytymishäiriöitä ohutsuolessa. Tulehdusvälittäjäaineet, erityisesti prostaglandiini, lisäävät limakalvon erityystä ja epiteelisolujen läpäisevyyttä makromolekyyleille, mikä on syynä ripulin kehittymiseen (Uzal ym. 2016).

2.2 Esiintyvyys

2.2.1. Esiintyvyys ihmisillä

Länsimaissa ihmisten kryptosporidioositartunnat ovat pääasiassa lähtöisin ulkomaanmatkoilta, eläinkontakteista (maatilat, karjanhoito) tai suoraan ihmiseltä toiselle (päiväkodit, hoitolaitokset) (Caccio & Putignani 2014; Krauss ym. 2003). Esiintyvyydessä on suuria vaihteluita alueittain ja eri tutkimusten mukaan. Vesi- ja elintarvikevälitteisiä epidemioita esiintyy myös enenevässä määrin (Rimhanen-Finne 2013). Suomessa *Cryptosporidium*-alkueliön aiheuttamat todetut tautitapaukset ovat viimeisen vuoden aikana lisääntyneet merkittävästi Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) ylläpitämän tartuntatautirekisterin tilastotietokannan mukaan (2018) (Kuva 2). Suomen zoonosikeskuksen ohjausryhmän ja strategiatyöryhmän (2013) mukaan voidaan arvioida, että rekisteriin kertyy tietoa vain noin 10 % todellisista tapauksista, jolloin tartuntatautirekisterin tapausmäärät ovat merkittävästi alhaisempia kuin väestön todelliset tapausmäärät. Rekisteriin kerätään lääkäreiden ja klinisten laboratorioden ilmoitusten perusteella tietoja tartuntatautitapauksista, mutta kaikkia tautitapauksia ei kuitenkaan ilmoiteta, eivätkä kaikki sairastuneet hakeudu hoitoon. Lisäksi kaikista hoitoon hakeutuneista ei oteta klinisiä näytteitä, eikä kaikista näytteistä onnistuta eristämään taudinaiheuttajaa (Autio ym. 2012).



Kuva 2. Kryptosporidioositautitapaukset Suomessa vuosina 1995–2017 (THL, Tartuntatautirekisteri 2018).

Diagnostiikan kehittyminen ei yksin selitä positiivisten löydösten runsasta lisääntymistä. Vaikka viime vuosina nukleiinihappo-osoitus (F-ParaNhO) on noussut diagnostisena menetelmänä värjäysten ja antigeenitestien rinnalle, moni sairaanhoitopiiri käyttää edelleen mikroskopointia ensisijaisena diagnostisena menetelmänä tai nukleiinihappo-osoituksen rinnalla (Savolainen L, sähköpostiviesti 2.3.2018; Savolainen R, sähköpostiviesti 19.2.2018; Kerttula A-M, sähköpostiviesti 12.2.2018, Saha K, sähköpostiviesti 12.2.2018). Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin alueella, Etelä- ja Pohjois-Pohjanmaan sekä Vaasan sairaanhoitopiirien alueella *Cryptosporidium*-löydökset ovat lisääntyneet runsaasti (THL 2018), mutta diagnostiikka tai epidemiat eivät yksin selitä kasvua (Savolainen L, sähköpostiviesti 2.3.2018). Todennäköisesti taustalla ovat parantunut tiedotus hoitavien ja diagnostiikkaa tekevien yksiköiden välillä, sekä lisääntyneet *Cryptosporidium*-infektiot nautatiloilla (Saha K, sähköpostiviesti 12.2.2018).

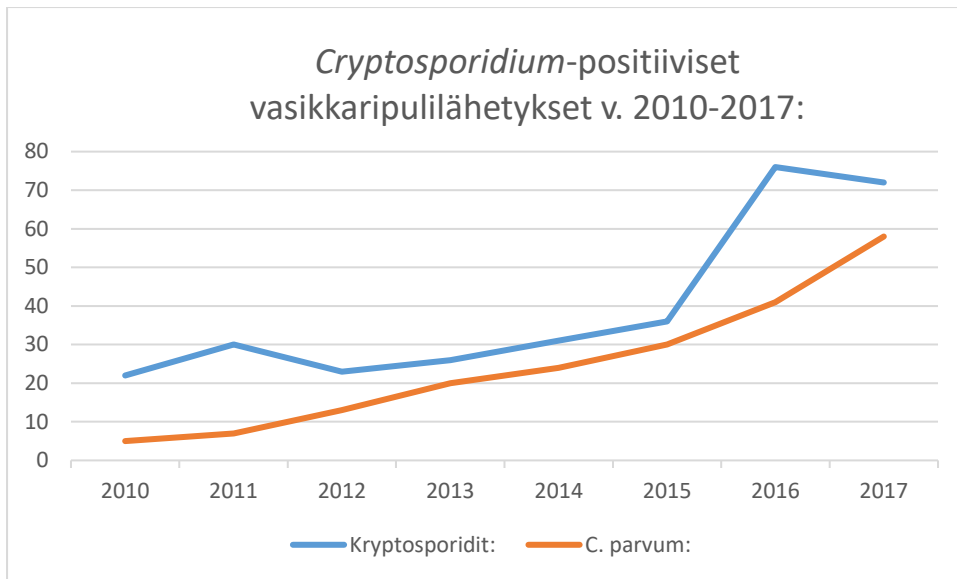
Suomessa on todettu muutamia *Cryptosporidium*-alkueliön aiheuttamia epidemioita. Vuonna 2008 Helsingissä todettiin *C. parvum* -lajin aiheuttama elintarvikevälitteinen kryptosporidioosiepidemia, jossa sairastui 72 henkilöä (Rimhanen-Finne

2013; Pönkä ym. 2009). Vuonna 2012 sekä Kirkkonummella että Tampereella todettiin myös elintarvikeperäiset epidemiat, joiden aiheuttajana oli *C. parvum* (Räsänen 2012). Sairastuneita oli yhteensä 150. Lisäksi vuonna 2012 oli kolme muuta epidemiaa Helsingissä ja Espoossa, joissa aiheuttajaksi todettiin *C. parvum* (Åberg ym. 2015; Jaakola ym. 2013). Kaikkiaan sairastuneita oli yhteensä yli 250, tartuntalähteenä oli todennäköisesti salaatti. Vuonna 2016 Pietarsaaren, Ilmajoen ja Kurikan alueella oli epidemia, jossa useita henkilöitä oli sairastunut *C. parvum* -lajin aiheuttamaan vesiripuliin (Evira 2016a). Syyskesällä 2017 Pietarsaaren alueella oli toinen suurehko kryptosporidioosi-epidemia, mikä selittää osittain Vaasan sairaanhoitopiirin kasvaneet näyte- ja löydösmäärät (Lumio 2018).

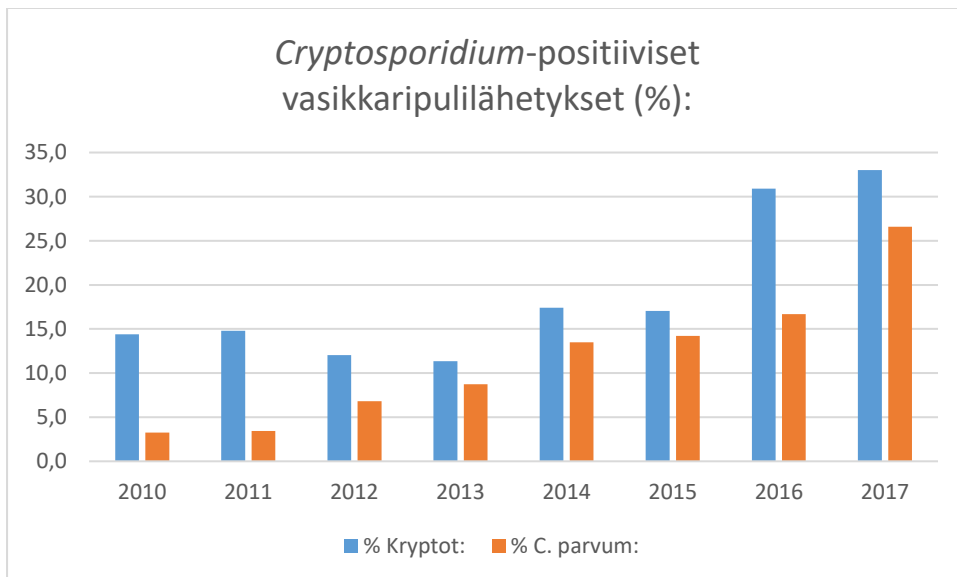
Kehittyvissä maissa kryptosporidioosin tarkkaa esiintyvyyttä ei tiedetä, esiintyvyyden arvioidaan vaihtelevan 3–20 % välillä (Medema ym 2006; Current & Garcia 1991). Etiopiassa *Cryptosporidium*-lajien esiintyvyys oli vuosina 2007–2008 7,6 % (Adamu ym. 2010). Tutkimuksessa tutkittujen henkilöiden ikäjakauma oli 1–45 vuotta. Pelkästään HIV/AIDS-potilailla (human immunodeficiency virus/ acquired immune deficiency syndrome) *Cryptosporidium*-alkueliön yleinen esiintyvyys vaihtelee 26,9–43,6 %, joista *C. parvum*-lajin osuus on suhteellisen suuri. (Adamu ym. 2014; Krauss ym. 2003). Tulokset vaihtelevat kuitenkin sekä tutkimusten välillä että alueittain. Etiopiassa vuonna 2014 tehdyn tutkimuksen mukaan HIV/AIDS-potilailla *Cryptosporidium*-alkueliön esiintyvyys oli 26,9 %, ja *C. parvum* -lajin 17,7 % (Adamu ym. 2014). Vuonna 2017 julkaistussa tutkimuksessa *C. parvum* -lajin esiintyvyys oli vain 3,1 % (Eshetu ym. 2017). Aliravituilla lapsilla, etenkin kehittyvissä maissa, kryptosporidioosi on yleinen ja usein vakava, esiintyvyys vaihtelee 4,9–19,5 % (Hunter & Nichols 2002; Sallon ym. 1988). Länsimaissa *Cryptosporidium*-lajien esiintyvyyttä on tutkittu pääasiassa HIV/AIDS-potilailta ja kantajuus on Euroopassa noin 6,6 % ja Yhdysvalloissa noin 3,8 % HIV-positiivisista tutkituista yksilöistä (Hunter & Nichols 2002). Esiintyvyys vaihtelee kuitenkin suuresti eri tutkimuksissa, Euroopassa on *Cryptosporidium*-kantajuudeksi todettu jopa 15,6 % AIDS-potilaista (Lopez-Velez ym. 1995). *C. parvum* on maailmanlaajuisesti yhä yksi merkittävistä kuolinsyytekijöistä AIDS-potilailla (Schmidt & Roberts 2005). *Cryptosporidium*-lajien kantajuus immunokompetenteilla yksilöillä vaihtelee alle prosentista jopa kymmeneen prosenttiin, tulokset vaihtelevat sekä tutkimusten että eri maiden välillä suuresti (Caccio & Putignani 2014).

2.2.2 Esiintyvyys vasikoilla Suomessa

Cryptosporidium-alkueliön merkitys vasikkaripulin aiheuttaja on kasvanut voimakkaasti Suomessa viime vuosina Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran laboratoriodiagnostiikan tulosten mukaan (Eviran tilastot 2018). Vasikkaripulinäytteistä värjäyspositiivisia *Cryptosporidium*-lajeja ja varmistettuja *C. parvum* -alkueliöitä on Eviran Eläintaudit Suomessa 2016 -julkaisun (2017) sekä Eviran tilastojen mukaan löydetty enenevässä määrin (Kuva 3; Kuva 4). Yhteensä *C. parvum* -alkueliötä on vuonna 2016 todettu kaikkiaan 57:ltä eri tilalta Suomessa (Evira 2017) ja vuonna 2017 65:ltä eri tilalta (Kuva 3). Vasikkaripulinäytelähetysten lisäksi *C. parvum* -löydöksiä on tehty patologis-anatomisissa sairauden syyn selvityksissä sekä muista tutkittavaksi tulleista näytteistä. Diagnostiikan muuttuminen ei selitä löydösten kasvua, koska menetelmänä konsentroitujen ja värjättyjen näytteiden mikroskopointi on edelleen ainoa diagnostinen seulontatapa (Evira 2012).



Kuva 3. *Cryptosporidium*-positiiviset vasikkaripulinäytelähetykset Suomessa vuosina 2010–2017 (Evira 2017). Sininen viiva kuvaa värjäyspositiivisia *Cryptosporidium*-lajeja, oranssi viiva PCR-RFLP-menetelmällä varmistettuja *C. parvum* -tapauksia.



Kuva 4. *Cryptosporidium*-löydökset (%) alle 6 kk:n ikäisten vasikoiden vasikkaripulilähetyksissä vuosina 2010–2016 (Evira 2017). Sininen pylväs kuvaa värjäyspositiivisia *Cryptosporidium*-lajeja, oranssi pylväs PCR-RFLP-menetelmällä varmistettuja *C. parvum* -tapauksia.

2.3 Kryptosporidioosi

2.3.1 Kryptosporidioosi vasikoilla

Nuorilla vasikoilla *C. parvum* on yleinen ripulitaudin aiheuttaja (Robertson ym. 2014; Silverlås ym. 2013). Alle kuukauden ikäisillä vasikoilla *C. parvum* on yleisimmin todettu kryptosporidioosin aiheuttaja, ja alle kolmen viikon ikäisillä vasikoilla ainoa löydetty *Cryptosporidium*-laji (Peek ym. 2018). Usein *C. parvum* aiheuttaa sekainfektion yhdessä muiden enteropatogeenien kanssa (Krauss ym. 2003). Sekainfektiossa yleensä *C. parvum* esiintyy yhdessä rota- ja/tai koronaviruksen kanssa, harvemmin *Salmonella*- tai *Escherichia coli* -bakteerien kanssa (Taylor 2004). Yleensä sairastuneet vasikat ovat 1–2 viikon ikäisiä (4–20 vrk), yleinen sairastuvuusikä noin 11 vuorokautta (Uzal ym. 2016; Scott ym. 2004). Ajallisesti *C. parvum* -alkueliön aiheuttama ripulitauti ajoittuu samaan aikaan rotavirusinfektion kanssa ja on kliinisesti vaikea erottaa virusinfektioista. Koska *C. parvum* -alkueliön ookystien erityös ulosteeseen alkaa vasta joitakin päiviä infektion alkamisesta, sekainfektioissa *Cryptosporidium* voi usein jäädä diagnosoimatta ulostenäytteiden jäädessä näytteenottohetkellä negatiivisiksi (Peek ym. 2018). Infektio leviää ookystien välittämänä vasikoiden keskuudessa nopeasti, kuitenkin kaikki vasikat eivät sairastu ripuliin (Scott ym. 2004). *C. parvum* aiheuttaa vesiripulin, usein limaisen ja joskus verisen. Vasikoilla taudin itämisaika on 2–5 vuorokautta, infektio kestää 2–14 vuorokautta (yleensä 7 vuorokautta) aiheuttaen kuivumista, ruokahaluttomuutta ja depressiota. Ookystien erityös alkaa 2–6 vuorokautta infektion alusta ja kestää päivästä jopa kahteen viikkoon (Robertson ym. 2014; Fayer ym. 1998). Erittyvien ookystien määrä vaihtelee $1,5 \times 10^6$ – 4×10^7 ookystaa grammassa ulostetta (Nydam ym. 2001; Fayer ym. 1998). Ookystien erittyminen vaihtelee vasikan iän ja infektion itämisaikan mukaan, sekä taudin oireiden ja niiden vakavuuden mukaan. Ruuan imeytymishäiriöt ovat tavallisia ja johtuvat ohutsuolen tuhoutuneista enterosyyteistä ja villusatrofiasta, imeytymishäiriöt puolestaan johtavat vasikan kasvun hidastumiseen (Uzal ym. 2016). Infektio on usein itsestään rajoittuva ja hoidettuna kuolleisuus on vähäistä (Scott ym. 2004). Sekainfektio on yleensä vakavampi oireiltaan, infektion ollessa laajemmalla alueella suolistossa. Eri patogeenit infektoivat eri osia ohut- ja paksusuolesta muodostaen epiteelisolukkoon leesioita ja soluvaurioita, joiden vakavuus vaihtelee patogeenien ja niiden yhteisvaikutuksen mukaan (Uzal ym. 2016; Scott ym. 2004). Infektion aiheuttama

immuunivaste on pääasiassa soluvälitteinen, ja pohjautuu CD4 T-lymfosyyttien (ns. auttaja-T-lymfosyyttien) ja niiden erittämien gamma-interferonien toimintaan (Uzal ym. 2016; Fayer ym. 1998). Myös CD8 T-lymfosyyttien (ns. tappaja-T-lymfosyyttien) määrät, sekä interleukiini 12 -pitoisuudet nousevat infektion aikana. Vasta-ainevälitteisellä immuunipuolustuksella on todennäköisesti myös osuutta immuunivasteen synnyssä, mutta ei yhtä merkittävää kuin soluvälitteisellä (Hunter & Nichols 2002). Immuunipuutteisilla yksilöillä infektio on vaikeampi ja pitkäkestoisempi. Ripuli saattaa kestää immuunipuutteisilla vasikoilla jopa kuukausia, minkä katsotaan johtuvan ohutseinäisten ookystien autoinfektiokierteestä (Uzal ym. 2016; Scott ym. 2004). *C. parvum* voi infektoida vasikoilla myös haima- ja sappitiehyitä, maksan sekä hengitysteitä.

Vastasyntyneillä ja nuorilla vasikoilla ripuli on merkittävä vasikkakuolleisuuden aiheuttaja. Hoitamattomana nestehukka ja elimistön asidoosi voivat olla fataaleja (Scott ym. 2004). Ripuli ja suolistoinfektiot vaurioittavat suolta ja avaavat tien suoliston bakteereille verenkiertoon ja ympäröiviin kudoksiin (Tenhunen 2011). Ripulin sekundääri-infektioina voivat olla yleisimmin *Escherichia coli* -bakteerin aiheuttama sepsis tai meningiitti. Koska tartunnan saaneet vasikat erittävät ookystia suuria määriä jopa viikkoja, ja infektion aiheuttava ookystamäärä on hyvin pieni, kryptosporidioosin sairastuvuus on suuri (Peek ym. 2018; Fayer ym. 1998).

2.3.2 Hoito vasikoilla

Vasikoiden kryptosporidioosien hoidossa uusien tartuntojen ennaltaehkäisy on merkittävässä asemassa (Peek ym. 2018). Karjasuojien puhdistus ja desinfektio, sekä sairaiden eläinten eristys ovat välttämättömiä toimenpiteitä taudin leviämisen ehkäisemiseksi. Rakenteiden ja ruokinta-astioiden huolellinen mekaaninen pesu kuumalla vedellä ja pesuaineella, sekä pestyjen pintojen kuivatus ovat suositeltavia ennen desinfiointiaineiden käyttöä (Tirkkonen 2018). Kryptosporideihin tehoavat fenoli-kloorikresolipohjaiset desinfiointiaineet, sekä fenolin glutaraldehydin ja kvarternäärysten ammoniumyhdisteiden yhdistelmä (Tirkkonen 2018; Taylor ym. 2007). Desinfiointiaineet ovat eläimille myrkyllisiä, joten tilojen puhdistus ja desinfiointi vaatii eläinten siirtämisen pois tilojen läheisyydestä. Ennaltaehkäisynä

infektioiden leviämiseen tehokkaimmat keinot ovat hyvästä hygieniasta huolehtimisen lisäksi vasikoiden mahdollisuus saada riittävästi vasta-aineita sisältävää ternimaitoa ensimmäisen 24 elintunnin aikana (Uzal ym. 2016; Scott ym. 2004). Vasikoiden tulisi saada ensimmäinen ternimaitoannos neljän tunnin sisällä syntymästä, jolloin vasta-aineet imeytyvät parhaiten suolistosta (Utriainen 2010c). Vasikoiden immuunipuolustuksella on merkittävä vaikutus kryptosporidioosiin sairastumisessa, tehokas luonnollinen ja soluvälitteinen immuunivaste suojaa infektioilta (Uzal ym. 2016). Vasikoiden jakaminen eri ikäryhmiin ja ryhmäkoon pitäminen riittävän pienenä auttaa infektioiden ennaltaehkäisyssä (Huuskonen ym. 2014). Vasikoiden stressin välttäminen, elinolojen kehittäminen, tilojen järjestely sekä kuivituksen ja ruokinnan tarkistus parantaa niiden immuunipuolustuksen tehoa ja vähentää vasikkaripulien esiintyvyyttä merkittävästi (Koikkalainen ym. 2015; Huuskonen ym. 2014). Rokotteita on kehitetty *C. parvum* -infektioita vastaan, mutta tulokset niiden tehosta ovat edelleen vajaita tai ristiriitaisia (Peek ym. 2018).

Ensisijainen hoito sairastuneelle vasikalle on riittävä nesteytys suun kautta (Peek ym. 2018). Elektrolyyttejä ja glukoosia sisältävät nesteytysliuokset ovat suositeltuja, jolloin nestehukan aiheuttama elektrolyyttivaje ja imeytymishäiriöiden aiheuttama energian tarve saadaan korjattua (Utriainen 2010b; Scott ym. 2004). Lisäksi maito- tai juomarehun juottoa jatketaan normaalisti ja vasikan tilaa seurataan. Vaikeasti sairaille ja huonokuntoisille vasikoille i.v. nesteytys ja lääkitys ovat tarpeen. Suomessa Eläinten Terveystieteiden (ETU) Nautatautiryhmä ohjeistaa huonokuntoisten ripulivasikoiden hoidossa ensisijaisena parenteraalisena nesteytyshoitona isotonista bikarbonaattia (1,4 % NaHCO_3) tai fysiologista suolaliuosta (0,9 % NaCl) painokilojen mukaan annettuna (Utriainen 2010). Nesteytyksellä korjataan dehydraatiota, elektroniepätasapainoa sekä asidoosia. Sairaana vasikan dehydraation asteen ja mahdollisen asidoosin arvioiminen on oleellista oikeaa nestehoitoa valitessa. Asidoosia voidaan hoitaa myös hypertonisella natriumbikarbonaattiliuoksella (5 tai 7,5 %), tällöin muu nesteytys on erityisen tärkeää (Utriainen 2010). Suonensisäisiä glukoosipitoisia nesteitä tulisi antaa ainoastaan hypotermisille vastasyntyneille vasikoille tai sepsistapauksissa. Nesteytyksen lisäksi yleisoireiselle vasikalle annetaan kipulääkettä (meloksikaamia tai fluniksiinia). Tarvittaessa aloitetaan antibioottilääkitys, ensisijaisesti trimetopriimi-sulfadiatsiini (sulfonamidi) -yhdistelmä. Antibioottihoito tulisi aloittaa ainoastaan vasikoilla, joilla on ripulin lisäksi myös systeemisiä oireita. Myös ripulitaudin aiheuttaja tulisi selvittää ennen mikrobilääkityksen aloitusta. Toisaalta antibioottihoito voi olla tarpeellinen myös

virusten tai parasiittien aiheuttamissa ripuli-infektioissa sekundääristen bakteeri-infektioiden ehkäisemiseksi (Lähteinen 2012).

Spesifistä toimivaa antiparasiittilääkitystä ei kryptosporidioosin hoitoon ole, eikä vasta-aineiden antamisesta ole tuloksellista tutkimusnäyttöä (Utriainen 2010c; Taylor 2004). Spiramysiini-antibiootti voi olla mahdollinen hoitolääke, mutta tutkittua näyttöä sen tehosta ei ole (Shikani & Weiss 2014; Taylor ym. 2007). Paromomysiini ja atsitromysiini ovat mahdollisia antimikrobilääkkeitä käytettäväksi akuuttiin *C. parvum* -infektioon, mutta lääkkeiden tehosta ei ole näyttöä ja kustannukset asettavat usein rajoituksia niiden käytölle (Dowling 2013; Apley & Coetzee 2013). Eläinlääkärin harkinnan mukaan on mahdollista käyttää vasikoilla halofuginoni-laktaattia sisältävää reseptivalmistettä muun hoidon tukena (Tirkkonen 2018; Taylor ym. 2007). Halofuginoni-laktaatti vähentää erittyvien ookystien määrää, jolloin sitä voidaan käyttää myös tartuntojen ehkäisyssä. Lääkkeen ei kuitenkaan ole osoitettu vaikuttavan ripulin kestoon tai vaikeuteen sairastuneilla vasikoilla (Peek ym. 2018). Lisäksi tulokset lääkkeen vaikutuksesta ookystien eritykseen ja vasikoiden kuolleisuuteen ovat ristiriitaisia. Halofuginoni-laktaatin turvallisuusmarginaali on pieni, liian suuri lääkeannos voi aiheuttaa myrkytystapauksia ja jopa eläimen menehtymisen (Tirkkonen 2018). Suomessa lääkettä ei saa antaa heikossa kunnossa oleville vasikoille tai jos ripuli on kestänyt yli 24 tuntia.

2.3.3 Kryptosporidioosi ihmisillä

Ihmisillä taudin itämisaika vaihtelee 2–14 vuorokauden välillä, yleensä oireet ilmenevät 7 vuorokauden kuluttua infektiosta (Bauerfeind ym. 2016; Gerba 2015; Mattila & Järvinen 2011; Jay ym. 2005). Jopa 1–28 vuorokauden vaihteluväli itämisajassa on mahdollinen. Kryptosporidioosi aiheuttaa rajua vesiripulia, harvemmin pahoinvointia, vatsakipua ja lievää kuumeilua (Mattila & Järvinen 2011; Siikamäki ym. 2010). *Cryptosporidium*-infektio voi olla myös oireeton (Caccio & Putignani 2014). Ookystien eritykseseen kestää noin 7 vuorokautta (vaihteluväli 1–15 vuorokautta) oireiden loppumisesta (Shikani & Weiss 2014; Chalmers & Davies 2010; Chappell ym. 1996). Ookystia eritetään noin $5,5 \times 10^4$ – $3,8 \times 10^9$, eritysmäärät ovat yleensä riippuvaisia tautioireiden vakavuudesta. Immunokompetenteilla henkilöillä tauti on yleensä itsestään rajoittuva, oireet kestävät muutamista päivistä kolmeen

viikkoon (Ryan & Xiao 2014). Immuunipuutteisilla potilailla kryptosporidioosi voi olla henkeä uhkaava ja taudin kesto on yleensä pidempi, jopa kuukausia (Jay ym. 2005; Schmidt & Roberts 2005; Krauss 2003). Immuunipuutteisilla tauti on usein rajumpi, koleraa muistuttava, ja nesteen menetys on jopa 20–25 litraa vuorokaudessa. Kryptosporidioosi aiheuttaa tällöin vaikeaa nestehukkaa, imeytymishäiriöitä, painonlaskua ja kuihtumista (Krauss ym. 2003). Vaikeasti immuunipuutteiselle, kuten AIDS-potilaalle, *C. parvum* voi aiheuttaa myös hengitystie-, sappitie- tai haimatieinfektion (Siikamäki ym. 2010). Kehittyvissä maissa akuutit *Cryptosporidium*-infektiot ovat yksi yleisimpiä lasten ripulitaudin aiheuttajia ja viidenneksi yleisin pienten lasten ripulitauteihin liittyvistä kuolinsyistä alle viisivuotiailla lapsilla (Khalil ym. 2018). Vuonna 2016 *Cryptosporidium*-infektioiden arvioidaan aiheuttaneen maailmanlaajuisesti yli 57 000 kuolemaa, joista yli 48 000 oli pientä lasta. Imeväisten ja pienten lasten *Cryptosporidium*-infektiot aiheuttavat lisäksi kasvuhäiriöitä, ravintoaineiden imeytymishäiriöitä, systemaattisia immuunipuolustuksen häiriöitä, aliravitsemusta ja kognitiivisia kehityshäiriöitä myös myöhemmällä iällä (Borad & Ward 2010; Kirkpatrick ym. 2006).

Ihmisen immuunipuolustusvasteen *Cryptosporidium*-infektiossa on todettu olevan voimakkaasti yhteydessä CD4 T-lymfosyytteihin, jolloin kaikki Th-lymfosyytteihin (T helper, eli auttaja-lymfosyytteihin) yhdistetyt immuunipuutesairaudet altistavat vakavalle suolistoinfektiolle ja infektion leviämislle suoliston ulkopuolelle (Uzal ym. 2016; Hunter & Nichols 2002). Th-lymfosyyttien toimintaan liittyviä immuunipuutosairauksia ovat HIV-infektion (human immunodeficiency virus) ja AIDS:n (acquired immune deficiency syndrome) lisäksi lasten akuutti lymfaattinen leukemia (ALL), lasten SCID-oireyhtymä (severe combined immunodeficiency syndrome), hyperimmunoglobuliini M -syndrooma (CD40-ligandin puutos), elinsiirrot sekä erilaiset syöpätaudit. Gamma-interferonien on todettu olevan myös olennaisessa roolissa immuunipuolustuksessa *Cryptosporidium*-infektiota vastaan, jolloin gamma-interferonien puutoksilla ja niihin liittyvillä sairauksilla on osoitettu yhteyttä infektion vaikeuteen (Pollok ym. 2002; Mead & You 1998). CD8 T-lymfosyyttien (Tk-solujen) rooli on vielä osittain epäselvä, samoin NK-solujen (natural killer -solujen) ja muiden luonnollisen immuunivasteen tekijöiden (Hunter & Nichols 2002). Luonnollinen immuunivaste on kuitenkin tärkeässä osassa primääri-infektion yhteydessä, mutta gamma-interferonien ja muiden sytokiinien merkitys on silloinkin olennainen (Leitch & He 2011; Borad & Ward 2010). Vasta-ainevälitteisen, eli B-lymfosyyttivälitteisen immuunivasteen ei oleteta olevan

yhtä merkittävässä asemassa infektion torjunnassa kuin T-lymfosyyttivälitteisen (Shikani & Weiss 2014).

2.3.4 Hoito ihmisillä

Vesiripulien ensimmäisenä hoitoperiaatteena on nestetasapainon korjaus ja ylläpito, jolloin hoito riippuu nestetasapainohäiriön tasosta (Vesikari 2003). Nestetasapainosta huolehtiminen on erityisen tärkeää pienillä lapsilla. Ravitsemustilasta huolehtiminen on oleellista heti nestetasapainon korjauksen jälkeen, ripuli ei vaikuta syömiseen. Vaikeassa dehydraatiossa hoitona on nesteytys laskimoon, lievässä ja kohtalaisessa dehydraatiossa riittää oraalinen nesteytys. Oraaliseen nesteytykseen suositellaan elektrolyyttitasoa korjaavaa nesteliuosta, joka sisältää natriumkloridia, kaliumkloridia, natriumsitraattia ja glukoosia. Laktoosia tulisi välttää ripulin aiheuttaman laktaasi-entsyymin menetyksen vuoksi (Shikani & Weiss 2014).

Perusterveillä aikuisilla ja lapsilla voidaan käyttää parasiittilääkkeenä nitatsoksanidia (Siikamäki ym. 2010). Annostus on aikuisille ja yli 12-vuotiaille lapsille 500 mg x 2, 1–2 -vuotiaille lapsille 100 mg x 2, 4–11 -vuotiaille 200 mg x 2 kolmen vuorokauden ajan. Nitatsoksanidia voidaan käyttää myös AIDS-potilaan kryptosporidioosin hoitoon etenkin pidempänä kuurina, mutta sen teho on epäselvä (Schmidt & Roberts 2005). Immuunipuutteisille potilaille voidaan käyttää myös paromomysiiniä yksin sekä atsitromysiinin kanssa, paromomysiinin tehosta on tosin saatu ristiriitaisia tuloksia (Shikani & Weiss 2014; Siikamäki ym. 2010). Spiramysiini on yksi mahdollinen hoitolääke kryptosporidioosin hoidossa, mutta tehosta ei ole juurikaan tutkimusnäyttöä (Peltola 1997). Muut makrolidit, kuten atsitromysiini, roksitromysiini ja klaritromysiini ovat olleet satunnaisesti käytössä kryptosporidioosin hoidossa, mutta niidenkin kohdalla tutkimusnäyttö on vajaata tai ristiriitaista (Shikani & Weiss 2014). AIDS/HIV-potilaiden hoidon kulmakivi on HIV-infektion yhdistelmä lääkehoito (HAART tai ART), jolla pyritään ylläpitämään ja palauttamaan normaalit CD4 T-lymfosyyttitasot (Eskola ym. 2016; Shikani & Weiss 2014).

2.4 Diagnostiikka

2.4.1 Mikroskopointi

Cryptosporidium-lajien diagnostiikka perustuu perinteisesti alkueliön ookystien osoittamiseen ulosteesta mikroskopoimalla konsentroidu ja värjätty näyte (Uzal ym. 2016; Ryan & Xiao 2014; Scott ym. 2004). Konsentroidiin ja värjäykseen on tarjolla eri menetelmiä, joista osa on kaupallisia. Yleisimmät konsentroidiin käytetyt menetelmät ovat formaliini-etyyliasetiikkonsentroidi, tai flotaatio-konsentroidi käyttäen hypertonista natriumkloridia (Hartmeyer ym. 2017; Schmidt & Roberts 2005; Scott ym. 2004). Formaliini-etyyliasetiikkonsentroidi perustuu etyyliasetiikkiin liukenevan, mikroskopointia häiritsevän rasvaliukoksen ulostemateriaalin poistamiseen näytteestä (Jokiranta ym. 2003). Konsentroidu vesiliukoinen näytemateriaali sisältää alkueliön ookystia noin 5–10 kertaa alkuperäistä näytettä enemmän. Flotaatio-konsentroidi perustuu kyllästetyn NaCl-liuoksen ja deionisoidun veden kerrostumiseen koeputkessa, jolloin ookystat saadaan eroteltua ulostemateriaalista (Weber ym. 1992).

Värjästekniikoista yleisimmät ovat modifioitu Ziehl-Neelsen happovärjäys (ns. kryptovärjäys) ja Giemsa-värjäys (Schmidt & Roberts 2005). Suomessa tavallisin diagnostiikassa käytetty menetelmä on modifioitu Ziehl-Neelsenin värjäys (Siikamäki ym. 2002). Mikroskopoitaessa etsitään ulostenäytteestä *C. parvum* -alkueliön erittämiä pyöreitä tai hieman soikeita ookystia, jotka ovat kooltaan n. 4,6–5,4 µm x 3,8–4,7 µm (DCDx 2016; Taylor ym. 2007; Jay ym. 2005). Ookystan sisällä on neljä sukkulamaista sporotsoiittia, jotka voidaan joskus nähdä mikroskoopissa (Schmidt & Roberts 2005). Histologisissa ohutsuolen värjätyissä kudoksenäytteissä voidaan nähdä sekä epiteelisolujen mikrovillusten atrofiaa että eri kehitysvaiheissa olevia *Cryptosporidium* -alkueliön muodostamia rakkuloita epiteelisolujen pinnassa (Uzal ym. 2016; Leitch & He 2011).

Värjättyjen ulostenäytteiden mikroskopointi on hidasta ja työlästä, diagnostisena menetelmänä sen herkkyys ja tarkkuus ovat huonoja (Uzal ym. 2016). Mikroskopointi vaatii osaamista ja kokemusta, eikä morfologian ja värjäytyvyyden perusteella eri *Cryptosporidium*-lajeja voida erottaa toisistaan. (Peek ym. 2018; Scott ym. 2004; Verweij ym. 2004).

2.4.2 PCR-menetelmät ja nukleiinihappo-osoitus

PCR (polymerase chain reaction, polymeraasiketjureaktio) on yleisesti käytetty diagnostinen menetelmä, joka on erittäin tarkka ja herkkä menetelmä myös sellaisille mikro-organismeille, joiden kasvatus on vaikeaa tai mahdotonta (Sachse 2003). *Cryptosporidium*-lajien erottamiseen käytetään monistuskohteena yleisesti 18S rRNA-geeniä tai hypervariaabelia soluseinän glykoproteiinia koodaavaa gp60-geeniä (Ryan & Xiao 2014). Diagnostiikassa ja lajien nimeämisessä ribosomaalinen RNA-geeni (rRNA tai rDNA) on hyvä kohde PCR-monistukselle, koska ribosomaalinen DNA jakautuu monipuolisesti sekä konservatiivisiin, muuttumattomiin jaksoihin että suurta vaihtelua sisältäviin jaksoihin. Ribosomi jakautuu kahteen osaan, pieneen ja suureen alayksikköön. Aitotumallisilla, kuten alkueliöillä, pieni alayksikkö (SSU, Small SubUnit) on kooltaan 40 S (Svedberg unit) ja koostuu 18S RNA:sta ja noin 30 ribosomaalisesta proteiinista (Madigan ym. 2015). 18S rRNA -geeni on noin 2300 emäsparin pituinen ja PCR-monistuksessa eri alukkeilla voidaan kopioida eri osia geenistä. PCR:ssa käytettävät denaturaatio-, kiinnittymis- ja pidentymislämpötilat valitaan templaatin ja alukkeiden C+G-pitoisuuksien ja käytettävän polymeraasi-entsyymin mukaan (Sachse 2003). Nested-PCR -menetelmässä monistus tehdään kahdesti, yleensä eri alukkeilla, jolloin ensimmäisen PCR-monistuksen reaktiotuote toimii templaattina toiselle monistukselle (Nolte & Wittwer 2016). Näin lisätään huomattavasti menetelmän herkkyyttä ja tarkkuutta. Nested-PCR voidaan yhdistää myös automatisoituun Real-Time PCR-menetelmään. PCR-menetelmien kohteena ovat yleensä *Cryptosporidium*-alkueliön 18S rRNA -geeni, 70 kDa:n kokoisen ”heat shock”-proteiinin geeni, ookystan soluseinän proteiinin geeni (COWP, *Cryptosporidium* oocyst wall protein), erilaisten syntetaasi-entsyymien geenit, adhesiiviproteiinien geenit, ribonukleotidi-reduktaasin geenin, sekä muutamien muiden yksittäisten proteiinien geenit (Verweij ym. 2016; O’Connor ym. 2004).

Cryptosporidium-lajien erottamisessa toisistaan käytetään yleisesti (nested) PCR-tuotteen katkokirjoanalyysia (PCR-RFLP) tai sekvensointia (Nichols ym. 2014; O’Connor ym. 2003). Katkokirjoanalyysissa PCR-tuote on yleisimmin 18S rRNA-geenin monistustuote ja käytetyt restriktioentsyymit ovat MboII, Sspl ja VspI (Xiao 2009; Feng ym. 2007). PCR-tuotteen katkokirjoanalyysi on mahdollista tehdä myös muille geneille (muun muassa β -tubuliinille, ”heat shock” -proteiinille, ribosomaaliselle DNA:lle ja

adhesiiviproteiinille), näille käytetään eri restriktioentsyymejä kohdegeenien mukaan valiten (O'Connor ym. 2004). Lajimäärityksen taso kuitenkin vaihtelee eri kohdegeenien mukaan. Katkokirjoanalyysiin on yleensä yhdistetty agarosigeelielektroforeesi, jolla entsyymaattisesti katkaistut PCR-tuotteet erotellaan juosteiden koon perusteella (Westermeier 2005). Mikroskopointi ja PCR-tuotteen katkokirjoanalyysi ovat kuitenkin hitaita ja työläitä analysointimenetelmiä, viime vuosina niiden rinnalle on kehitetty useita Real-Time PCR -menetelmiä, jotka ovat nopeita ja herkkiä (Hartmeyer ym. 2017; Yang ym. 2013; Verweij ym. 2004).

Suomessa parasitologiassa mikroskopian rinnalle on diagnostiseksi menetelmäksi viime vuosina noussut alkueliöiden nukleinihappo-osoitus (tutkimusnimike F-ParaNhO) (Kerttula & Lavikainen 2017). Pääasiallisesti käytetty menetelmä on qPCR (quantitative polymerase chain reaction) eli Real-Time PCR, jolloin DNAn monistumista voidaan seurata reaaliaikaisena tietokoneelta. Real-Time PCR on saatavissa kaupallisena eri valmistajien multiplex-kittinä tai singleplex-menetelmänä. Multiplex-PCR -menetelmässä kohteena on useita eri DNA-jaksoja samassa analyysissä (Nolte & Wittwer 2016). Menetelmien ongelmana on alkueliöiden geneettinen erilaisuus, ja toisaalta Apicomplexa-pääjakson 18S rRNA -geenin hyvin konservatiiviset alueet, jolloin vaikeudet liittyvät lähinnä sopivien alukkeiden löytämiseen *Cryptosporidium*-lajien erottelunsa (Verweij ym. 2016; Nichols ym. 2014). Käyttökelpoisena menetelmänä on kehitetty uusia multiplex-PCR -menetelmiä, joissa käytetään useille parasiiteille omia alukkeita samaan aikaan (Kerttula & Lavikainen 2017). Ristireaktiota eri lajien välillä ei kaikissa tutkimuksissa ole ilmennyt, mutta ne ovat mahdollisia (Hartmeyer ym. 2017; Yang ym. 2013). Menetelmien kehitys on Suomessa vielä alussa, ja vain muutama parasitologian laboratorio tarjoaa nukleinihappo-osoitusta parasiitti-infektioiden diagnostiikkaan. Nukleinihappo-osoitusta on kehitetty vasta viime vuosina, joten menetelmien toimivuudesta ei vielä voida sanoa paljoa.

Hedfield ym. (2015) raportoivat kokogenomisekvenssoinnin mahdollisuuksista tutkimuksissa *C. hominis* ja *C. parvum* -lajien aiheuttamissa infektioidissa, mutta menetelmän ongelmina ovat DNA:n riittävä eristäminen ookystista ja näytteiden kontaminoituminen muulla nukleinihapolla. Menetelmä antaa kuitenkin paljon uutta tietoa, jota voidaan käyttää diagnostiikan, lääkehoidon ja tyyppityksen kehittämisessä, sekä virulenssitekijöiden tutkimuksessa.

2.4.3 Alatyypien erotus

C. parvum -lajin alatyypien erottamiseen käytetään yleisesti soluseinän 60 kDa:n glykoproteiinia (gp60) koodaavan geenin toistojaksojen erottelua (Nichols ym. 2014; Xiao 2009; Sulaiman ym. 2005). Gp60-geeni koodaa 60 kDa:n kokoista esiproteiinia, joka pilkotaan proteolyttisesti kahdeksi solun pinnan glykoproteiiniksi gp15:ksi ja gp40:ksi (Strong ym. 2000). Gp15 ja gp40 kohdentuvat *Cryptosporidium*-alkueliön sporotsoiitti- ja mertsoiittimuotojen soluseinän rakenneosaksi. Geenissä on sekä hypervariaabeli osa (3' päässä) että mikrosatelliitti-sekvenssi, jossa on trinukleotidin toistojakso (5' päässä). Gp60-geenin sekvenssissä toistuvat seriini-aminohappoa koodaava trinukleotidi TCA, TCG tai TCT. Trinukleotidien määrä toistojaksossa määrää alatyypin nimen loppuosan. Sekvenssin hypervariaabeliosa puolestaan määrittää alatyypiperheen, jotka *C. parvum* -lajilla ovat tyyppiä Iia-, Iib-, Iic-, Iid-, jne. ja *C. hominis* -lajilla Ia-, Ib-, Id-, jne. Alatyypin nimi muodostuu siis alatyypiperheestä (II), trinukleotidi TCA:n toistojaksojen määrästä (A), trinukleotidi TCG:n toistojaksojen määrästä (G) ja trinukleotidi TCT:n toistojaksojen määrästä (T). Lisäksi joillain *C. parvum* -lajin alatyypiperhe Iia:n alatyypeillä on kaksi kopiota välittömästi toistojaksoa seuraavasta sekvenssistä ACATCA, jolloin alatyypin nimi nimeytyy R2:ksi. Useimmilla Iia-perheen alatyypeillä on vain yksi toistojaksoa seuraava ACATCA-sekvenssi, joillain alatyypin nimi nimeytyy R1:ksi. Esimerkkinä alatyypin nimestä on IiaA15G2R1, joka on *C. parvum*, alatyypiperhe Iia, toistojaksossa trinukleotidi TCA esiintyy 15 kertaa, trinukleotidi TCG kaksi kertaa ja toistojaksoa seuraa yksi ACATCA-sekvenssi. *C. parvum* alatyypiperheillä Iia, Iic, Iid, Iie, Iih, Iim ja Iio yleisimmät trinukleotidit toistojaksossa ovat TCA ja TCG, alatyypiperheillä Iib, Iif, Iig, Iii, Iik, Iil ja Iin yleisin toistojaksossa on TCA (Nichols ym. 2014).

2.4.4. Immunomääritykset

C. parvum -infektioiden diagnostiikkaan on tarjolla myös useita kaupallisia immunologisia testikittejä, jotka perustuvat suoriin immunofluoresenssimäärityksiin tai entsyymi-immunomäärityksiin (IFA, EIA, ELISA) (O'Connor ym. 2004). Testien luotettavuus ilmoitetaan yleensä testin herkkyytensä ja tarkkuutena (Altman & Bland 1994) Immunologiset menetelmät perustuvat yleensä antigeeninä toimivien *C. parvum* -ookystien soluseinän proteiinien tunnistukseen spesifisillä vasta-aineilla (Darwish 2006). Testien diagnostinen herkkyys vaihtelee eri tutkimuksissa, yleensä herkkyys vaihtelee välillä 91–100 % ja spesifisyys 97–100 % (Garcia & Shimizu 1997). Entsyymi-immunomääritysten herkkyys voi vaihdella jopa 66,3–100 % välillä (O'Connor ym. 2004). Immunologisten testien ongelmana ovat usein eri lajien vasta-aineiden ristireaktiot (Yang ym. 2013). Immunologisia testejä sekä analyttisesti että diagnostisesti herkempänä ja tarkempaan määrityksenä mainitaan myös DNA-hybridisaatioon perustuva fluoresenssimääritys (Bandyopadhyay ym. 2007). Menetelmä erottaa toisistaan *C. hominis* ja *C. parvum* -lajit sekä uloste- että ympäristönäytteistä perustuen ML-2:een (mikrosatelliittilokus 2) sitoutuvien leimattujen alukkeiden hybridisaatioon, joka on mitattavissa virtausytometrillä (Luminex 100).

2.4.5 Fassisi BoDia -pikatesti

Fassisi BoDia-pikatesti on tarkoitettu vasikoiden ripulitautien In vitro -antigeenidiagnostiikkaan. Valmistajan (Fassisi 2017) mukaan testi tunnistaa neljä yleisintä vasikoiden ripulin aiheuttajaa; rotaviruksen, koronaviruksen, *Escherichia coli* K99 -tyypin ja *Cryptosporidium parvum* -alkueliön. Testi perustuu immunokromatografiaan ja tunnistaa yksittäisen taudinaiheuttajan lisäksi myös sekainfektion. *C. parvum* -lajin aiheuttamassa infektiossa testin diagnostinen menetelmä perustuu monoklonaalisiin vasta-aineisiin, jotka tunnistavat 62 kDa:n kokoisen spesifisen proteiinin (ell Constanze Dallman, Fassisi, sähköpostiviesti 5.12.2017). Proteiinin alkuperä on epäselvä, mutta todennäköisesti kyseessä

on oookystan soluseinän rakenneproteiini. Testille on luvattu valmistajan esitteessä *C. parvum* -alkueliön kohdalla herkkyudeksi 99,99 % ja tarkkuudeksi 95,85 % (Fassisi BoDia 2017).

2.5 Nautakarjan kasvatus Suomessa

Suomessa pidetään elintarviketuotannossa nautakarjaa sekä maidontuotannossa lypsykarjatiljoilla että lihan tuotannossa lihanautakasvattamoissa ja emolehmätiljoilla, sekä näiden sekamuodoissa (Eläinten hyvinvointikeskus EHK 2018). Lypsykarja poikii noin kerran vuodessa ja syntyneet vasikat erotetaan emosta usein välittömästi syntymän jälkeen. Lehmävasikat voidaan kasvattaa samassa navetassa joko yksittäis- tai ryhmäkarsinassa, sonnivasikat siirretään 2–4 viikon ikäisenä terni(vasikka)kasvattamoihin. Ternikasvattamoista vasikat siirretään kuukauden kuluttua välikasvattamoihin ja noin puolivuotiaina edelleen loppukasvattamoihin. Rotulihakarjan vasikat kasvatetaan pääasiassa emolehmätiljoilla, joista useimmat ovat Suomessa kylmäpihattoja. Emolehmätiljoilla vasikat saavat kasvaa emonsa kanssa.

Navettarakenteilla ja ympäristön olosuhteilla voidaan vaikuttaa suuresti vasikoiden terveyteen ja mahdollistetaan fyysisesti ja psyykkisesti stressittömät elinolot (Aho 2002). Lypsylehmätiljoilla vasikat tulisi sijoittaa syntymän jälkeen yksittäiskarsinaan noin kahden viikon ikään asti ja sen jälkeen siirtää ryhmäkarsinaan saman ikäisten vasikoiden kanssa (Eläinten Terveysthuolto 2011). Vasikoiden siirrossa voidaan välissä käyttää myös parikarsinaa (Huuskonen ym. 2014). Tärkeää vasikoiden stressin välttämisen ja tautien leviämisen kannalta on olla sekoittamatta eri-ikäisiä vasikkaryhmiä keskenään. Juomaveden, maitorehun ja muun rehun laatuun ja puhtauteen, sekä ruokinta-astioiden puhtauteen tulee kiinnittää huomiota. Lisäksi karsinan hyvä kuivitus, vedottomuus ja sijainti ovat merkittäviä tekijöitä vasikan terveyden kannalta. Sekä välikasvattamot että lihanautakasvattamoiden vasikkaosastot tulisi täyttää ja tyhjentää kerralla, jolloin tilat voidaan pestä ja desinfioida kunnolla (Aho 2002). Kryptosporidioosin ennaltaehkäisyssä ja sairastapauksien leviämisen estämisessä on tärkeää puhdistaa tilat pesemällä ne lämpimällä vedellä ja saippualla, sekä kuivattaa tilat kunnolla ennen uusien vasikoiden saapumista, asianmukainen desinfiointi suoritetaan tarpeen mukaan pesun jälkeen (Peek ym. 2018). Ripulitautien ehkäisyssä tärkeintä

vastasyntyinen vasikoiden hoidossa on riittävä hyvälaatuisen ternimaidon saanti (Utriainen 2010c). Emolehmätiloilla vasikka saa yleensä riittävästi ternimaitoa eläessään ensimmäiset elinviikkonsa emonsa kanssa, mutta lypsylehmätiloilla emostaan erotettujen vasikoiden ternimaidonsaanti on varmistettava (Utriainen 2010c; Riihikoski 1982). Lisäksi vieroitus ja ravinnon muutos maidon ja kiinteän rehun välillä vaikuttaa vasikan ruuansulatuselimistön mikrobiotan koostumukseen, mikä puolestaan vaikuttaa vasikan ruuansulatuskanavan mahdolliseen infektoitumiseen (Meale ym. 2017; Meale ym. 2016).

3 TUTKIMUKSEN TAVOITE

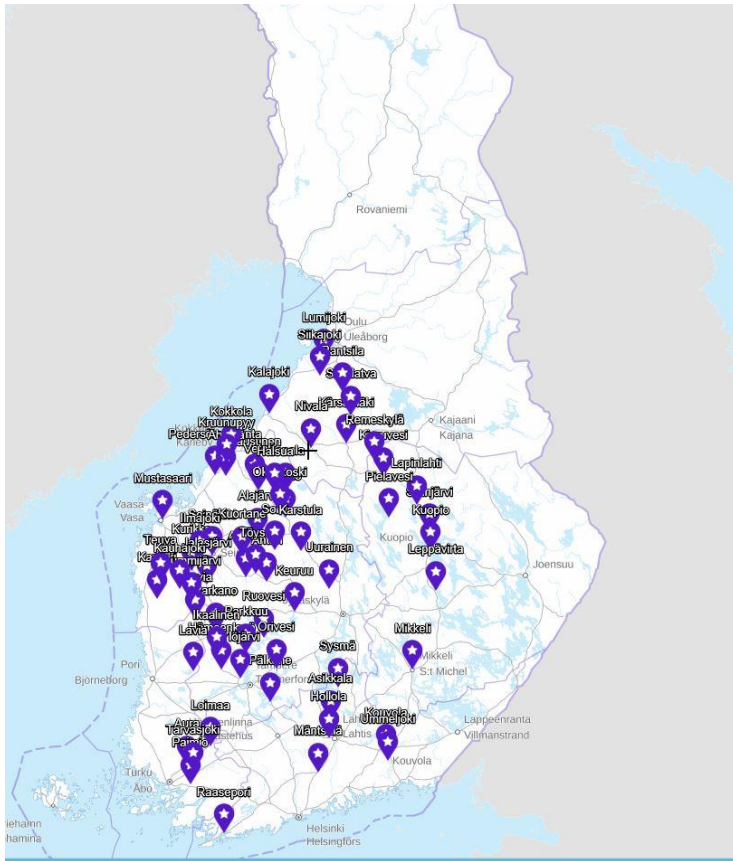
Tutkimuksen tavoitteena on nopeuttaa *C. parvum* -alkueliön aiheuttamien naudakarjan ripulitautien infektiodiagnostiikkaa ja selvittää *C. parvum* -alatyypin esiintyvyyttä Suomessa. Diagnostiikan kehittämistä varten testataan kaupallinen antigeenin osoitukseen perustuva Fassisi BoDia -pikatesti *C. parvum* -antigeenin osoituksen toimivuuden osalta. Lisäksi tutkimuksessa on tarkoituksena kartoittaa vasikoilla infektioita aiheuttavien *C. parvum* -alatyypin esiintyvyys Suomessa alueittain eri aikoina vuosina 2013–2017 ja verrata tyypitystuloksia ihmisillä esiintyneisiin löydöksiin. *C. parvum* -alatyyppejä verrataan Suomessa aikaisemmin tyypitettyihin löydöksiin, tutkittuihin epidemioihin ja yleisellä tasolla maailmalla tehtyihin alatyypityksiin.

4 AINEISTOT JA MENETELMÄT

*4.1 Aineisto *Cryptosporidium parvum* -alatyypitystä varten*

4.1.1 Näytteiden keräys

Aineisto kerättiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Kuopion tutkimusyksikköön saapuneista vasikkaripulinäytteistä ja patologis-anatomiseen sairauden syyn tutkimukseen tulleiden vasikoiden jatkotutkimuksiin lähetetyistä ulostenäytteistä. Aineisto sisälsi yhteensä 100 vasikoiden ulostenäytettä 84:ltä eri tilalta vuosilta 2012–2017. Aineisto valikoitiin mahdollisimman kattavasti eri puolelta Suomea tulleista näytteistä ja vuosilta 2013–2017 noin 20 eri näytettä vuosittain (Kuva 5). Vuodelta 2012 tutkittiin vain kaksi näytettä. Aineiston ulostenäytteistä oli todettu *C. parvum* sekä osoittamalla ookystia mikroskopoimalla että tekemällä lajimääritys PCR-RFLP-menetelmällä. Vasikoiden iät olivat pääasiassa 4 vrk – 5 viikkoa (4–36 vrk) ja olivat vasikkaripulitutkimukselle asetetuissa rajoissa, yksi vasikoista oli 7 viikkoa (49 vrk) (Evira 2016b). Vasikoiden iän keskiarvo oli 11,6 vrk ja mediaani 9 vrk. 20 vasikan iästä ei ollut tarkkaa tietoa saatavilla. Suurin osa näytteistä (82 kpl) tuli maitotiloilta, emolehmätiloilta oli viisi (5) näytettä, lihatiloilta neljä (4) näytettä, ternivasikkakasvattamoilta kaksi (2) näytettä ja välikasvattamoista yksi näyte. Kuuden (6) näytteen tilatietoja ei ollut saatavilla. Näytteistä 74 oli vasikkaripulinäytteitä, loput sairauden syyn tutkimukseen tulleita näytteitä.



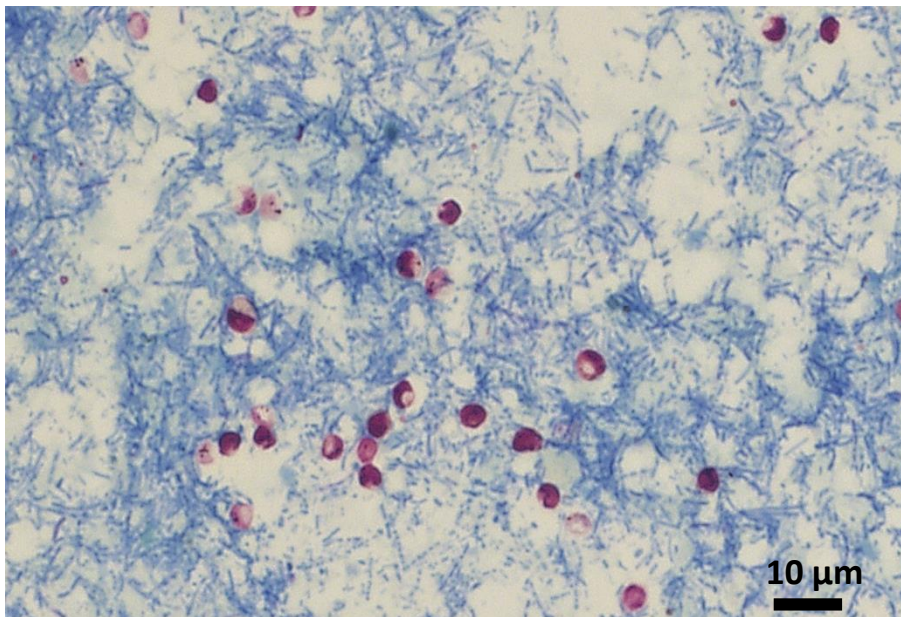
Kuva 5. Tutkimuksessa käytettyjen vasikkanäytteiden alkuperän (84 tilaa) sijoittuminen maantieteellisesti Suomessa v. 2012–2017. Kuva tehty Maanmittauslaitoksen Karttapaikka-ohjelmistolla v. 2017.

Vasikoiden ulostenäytteiden lisäksi aineistoon kuului kymmenen (10) ihmisten ulostenäytettä, jotka olivat samasta epidemiasta Pietarsaaresta vuodelta 2017. Näytteet oli todettu *Cryptosporidium*-positiivisiksi ja ne tulivat lajimääritykseen ja alatyypitykseen Kuopion eläntautibakteriologian ja -patologian tutkimusyksikköön. Näytteille oli tehty ennen tutkimusta lajimääritys ja ne käsiteltiin alatyypityksen osalta kuten vasikkanäytteet.

4.1.2 Näytteille aiemmin tehty käsittely ja lajimääritys

4.1.2.1 Näytteiden konsentrointi, mikroskointi ja DNA:n eristäminen

Kaikista vasikoiden ulostenäytteistä oli jo aikaisemmin konsentroidu *Cryptosporidium*-alkueliön ookystat kyllästettyä NaCl-liuosta käyttäen, Eviran menetelmäohjeen 2045/1 mukaisesti (2012). Käsittelemättömät näytteet säilytettiin +4 °C. Konsentroiduista näytteistä oli tehty objektilaseille Ziehl-Neelsen-värjäys Eviran menetelmäohjeen 2045/1 mukaisesti (2012) ja värjätyt näytteet mikroskojettiin 10 ja 40 x -objektiiivia käyttäen. *Cryptosporidium*-ookystat värjäytyivät punaisiksi (Kuva 6). Värjäyspositiiviset konsentroidut näytteet säilytettiin -20 °C DNA:n eristystä varten.



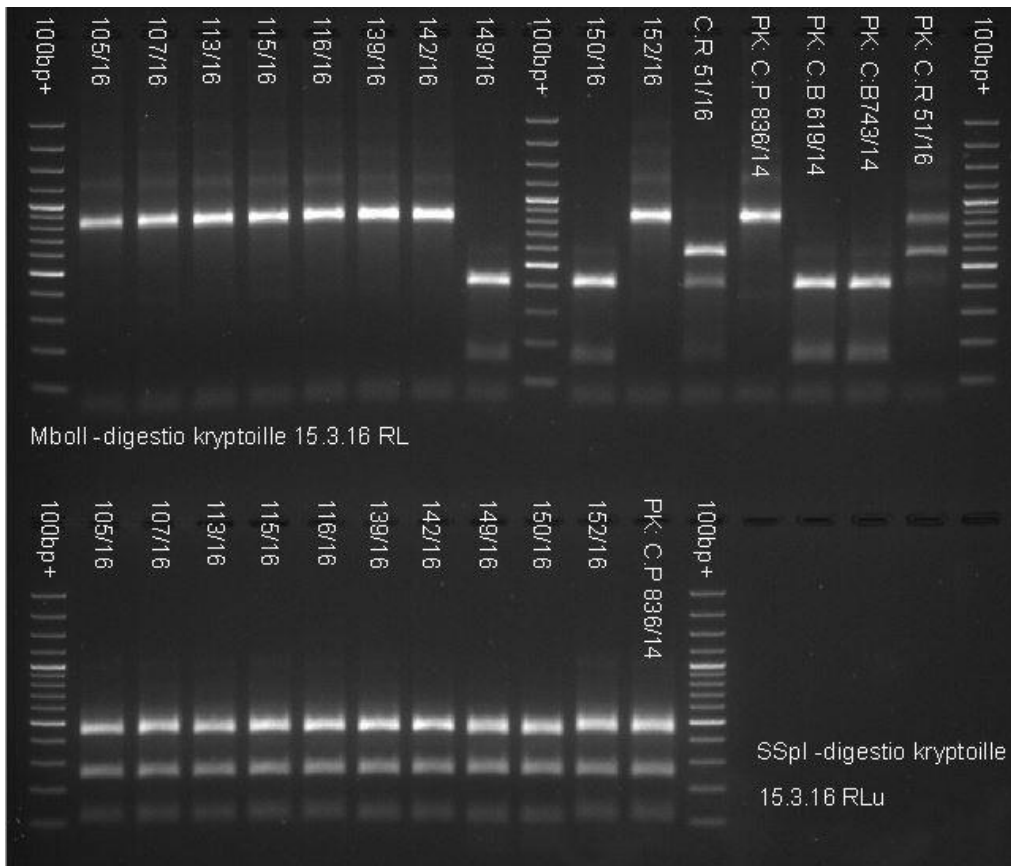
Kuva 6. *Cryptosporidium*-ookystat modifioidulla Ziehl-Neelsen -värjäyksellä 40x suurennoksena.

Värjäyspositiivisista ja pakastetuista (-20 °C) näytteistä oli eristetty ja puhdistettu DNA:ta Eviran menetelmäohjeen 2045/1 (2012) mukaisesti. DNA:n eristyksessä oli käytetty MagNA Lyser -ravistelijaa (Roche, Basel, Sveitsi) ja TeSeE Purification Kit -putkia (5144A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), sekä Qiagen DNA MiniKit -kittiä (51306, Qiagen, Hilden, Saksa) valmistajien ohjeiden mukaisesti. Eristetty DNA säilytettiin -20 °C.

4.1.2.2 *Cryptosporidium* -nested PCR ja RFLP

Ulostenäytteistä eristetystä ja puhdistetusta DNA:sta oli monistettu nested-PCR -menetelmällä 18S rRNA-geenin 826-864 emäsparin pituinen jakso, jolle oli tehty katkokirjoanalyysi (RFLP) lajinimen saamiseksi. Ensimmäinen PCR-tuote oli 1325 emäsparia ja siihen oli käytetty alukkeita KRYPTO_F (171113B027H06, 3/8, 1078, Metabion International AG, Steinkirchen, Saksa), ja KRYPTO_R (171113B027A07, 4/8, 1078, Metabion International AG, Steinkirchen, Saksa), (Xiao ym. 2000; Xiao ym. 1999). Toinen PCR-tuote oli 826-864 emäsparia ja siihen oli käytetty alukkeita Krypton-F (171113B027F06, 1/8, 1078, Metabion International AG, Steinkirchen, Saksa) ja Krypton-R (171113B027G06, 2/8, 1078, Metabion International AG, Steinkirchen, Saksa) (Xiao ym. 2000; Xiao ym. 1999). PCR-reaktioosokset ja PCR-laitteen (C1000 Touch, Thermal Cycler 00006335, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ohjelma noudattivat Eviran menetelmäohjetta 2045/1 (2012). PCR-reaktioosoksissa oli käytetty Fast Start Taq DNA -kittiä (Roche, Basel, Sveitsi).

RFLP (restriction fragment length polymorphism, eli katkokirjoanalyysi) oli tehty nested-PCR-tuotteelle noudattaen Eviran menetelmäohjetta 2045/1 (2012). Restriktiossa oli käytetty MboII-entsyymiä (R0148S, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) ja (10x) CutSmart-puskuria (B7204S, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). *Cryptosporidium parvum* -lajinimen varmistukseen oli ollut mahdollista käyttää lisäksi SspI (R0132S, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) ja VspI (AseI, R0132S, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) -restriktioentsyymejä. Katkaistut DNA-juosteet oli eroteltu 2 % SeaKem LE-agaroosigeelielektroforeesiajossa (50004, Lonza, Basel, Sveitsi) menetelmäohjeen mukaisesti (Kuva 7).



Kuva 7. RFLP-agarosigeelielektroforeesi: *Cryptosporidium*-lajimääritys. Käytetty restriktioentsyymjä MboII (ylärivi) ja SspI (alarivi), molekyylikokostandardina GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. PK. C.R = Pos. kontrolli *Cryptosporidium ryanae*; PK. C.B = Pos. kontrolli *Cryptosporidium bovis*; PK. C.P Pos. kontrolli *Cryptosporidium parvum*. Kuva: Riikka Luukkanen.

4.2 Aineisto Fassisi BoDia -pikatestiin

Aineisto kerättiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Kuopion tutkimusyksikköön saapuneista vasikkaripulinäytteistä ja patologis-anatomiseen sairauden syyn tutkimukseen tulleiden vasikoiden jatkotutkimuksiin lähetetyistä ulostenäytteistä. Aineisto sisälsi yhteensä 68 vasikoiden ulostenäytettä vuosilta 2016–2017, suurin osa näytteistä (64 kpl) oli vuodelta 2017. Yksi näytteistä hylättiin tutkimuksista, koska näytteen kohdalla oli vahva epäily *Cryptosporidium*-lajimäärityksen epäonnistumisesta ja sen myötä virheellisestä tuloksesta. Lopullinen aineisto oli 67 ulostenäytettä. Aineisto valikoitiin mahdollisimman kattavasti sekä todetuista negatiiviseksi jääneistä näytteistä että positiivisista yksittäisinfektioista ja

sekainfektioista. Ulostenäytteille oli tehty Vasikkaripuli-ELISA -testi, jossa oli osoitettu rota- ja koronavirukset spesifisiä vasta-aineita ja peroksidaasi-entsyymiä käyttäen Eviran työohjeen LAB2310/3 (2012) mukaisesti, sekä *C. parvum* -lajin määrittäminen mikroskopoimalla ja PCR-RFLP -menetelmällä Eviran menetelmäohjeen 2045/1 (2012) mukaisesti.

4.3 Menetelmät

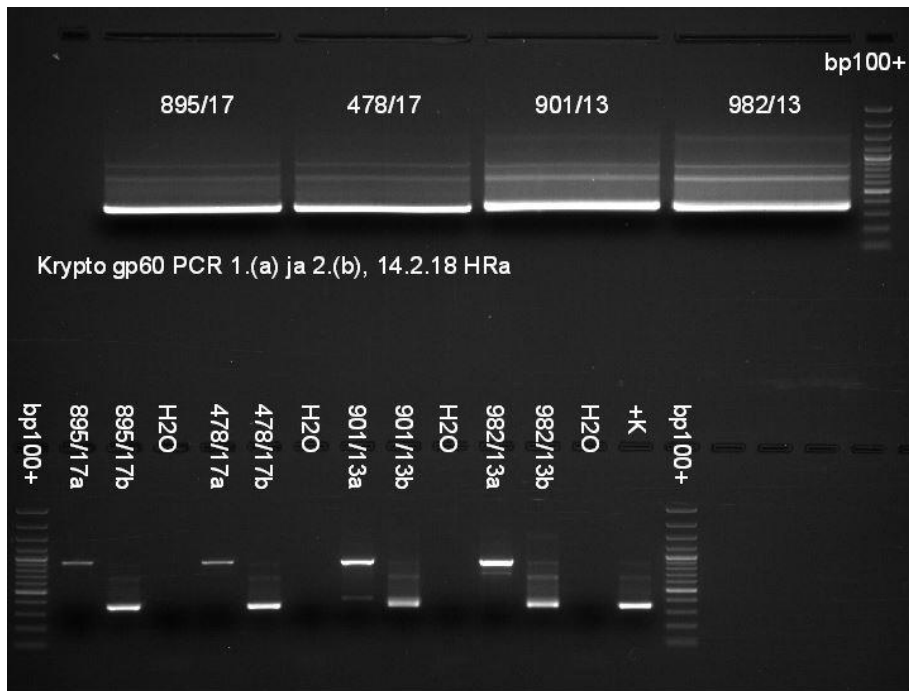
4.3.1 DNA:n monistaminen gp60-geenin sekvensointia varten

C. parvum -positiivisten löydösten alatyypittämiseen käytettiin gp60-geenin monistamista ja sekvensointia. Geenin monistamiseen käytettiin nested-PCR -menetelmää. Menetelmä valittiin sen herkkyyden vuoksi perustuen Eviran Kuopion tutkimusyksikön aiempiin geenimonistuskäytäntöihin *C. parvum* -lajin alatyypityksessä. *C. parvum* -alatyypit erotettiin toisistaan sekvensoitujen geenien toistojaksojen perusteella (Sulaiman ym. 2005). Ulostenäytteistä eristetystä ja puhdistetusta DNA:sta monistettiin gp60-geenin DNA-juostetta nested-PCR -menetelmällä Eviran menetelmäohjeen 2045/1 (2012) mukaisesti. Tutkimuksessa käytetyt alukkeet oli valittu tutkimusyksikön aiempien alatyypitysten ja kirjallisuuden perusteella (Sulaiman ym. 2005; Alves ym. 2003). Ensimmäinen PCR-tuote oli noin 920 emäsparia ja siihen käytettiin (10 mM) AL3531-etualuketta (5682-047, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), ATA GTC TCC GCT GTA TTC, ja (10mM) AL3535-taka-aluketta (5682-048, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), GGA AGG AAC GAT GTA TCT, (Sulaiman ym. 2005; Alves ym. 2003). Reaktioseos sisälsi 2 µl näytettä, 5 µl (10x) Fast Start Taq DNA -puskuriliuosta (12161559001, Roche, Basel, Sveitsi), 1 µl (10mM) dNTP Mix -liuosta (0192, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 6 µl (25mM) MgCl₂ Stock Solution -liuosta (11600770001, Roche, Basel, Sveitsi), 0,5 µl (5 U/µl) Fast Start Taq DNA -polymeraasientsyymiä (12032937001, Roche, Basel, Sveitsi) ja 33,5 µl Ultra Pure Disstilled Water H₂O:ta (10977-049, Invitrogen, Carlstad, CA, USA). Reaktioseoksen tilavuudeksi tuli 50 µl, jokaisesta näytteestä tehtiin neljä reaktioseosta, jolloin monistettua PCR-tuotetta saatiin n. 200 µl. Jokaisen näytteen jälkeen tehtiin negatiivinen kontrolli (Ultra Pure Disstilled Water, 10977-049, Invitrogen, Carlstad, CA, USA), jolla todennettiin PCR-tuotteiden puhtaus. Positiivisena kontrollina käytettiin *Cryptosporidium parvum* -lajiksi aiemmin todettua ja

varmistettua näytettä. Ensimmäinen monistusreaktio tehtiin PCR-putkissa steriilin mineraaliöljyn alla (J217, 8042-47-5, Amresco LLC, Solon, OH, USA) kontaminaationriskin välttämiseksi. PCR-laitteella (C1000 Touch, Thermal Cycler 00006335, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) käytettiin ohjelmaa, jossa oli alkudenaturaatiolämpötila +95 °C (15 min), syklin denaturaatioissa +94 °C (45 s), alukkeiden kiinnittymislämpötilaa +50 °C (45 s), pidentymislämpötilaa +72 °C syklin pidentymisvaiheessa (60 s) ja lopetuksessa (10 min), sekä jäähtymislämpötilaa +4 °C. Syklejä toistettiin 35 kertaa.

Toinen PCR-tuote oli noin 400 emäsparia ja siihen käytettiin (10 mM) AL3532-etualuketta (5682-049, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), TCC GCT GTA TTC TCA GCC, ja (10mM) LX0029-taka-aluketta (5682-051, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) CGA ACC ACA TTA CAA ATG AAG T (Sulaiman ym. 2005). Reaktioseos sisälsi 2 µl näytettä, 5 µl (10x) Fast Start Taq DNA -puskuriliuosta, 1 µl (10mM) dNTP Mix -liuosta, 4 µl (25mM) MgCl₂ Stock Solution -liuosta, 0,5 µl (5 U/µl) Fast Start Taq -polymeraasientsyymiä ja 35,5 µl Ultra Pure Disstilled Water H₂O:ta. PCR-laitteella käytettiin samaa ohjelmaa kuin ensimmäisessä ajossa.

Lopullinen nested-PCR-tuote tarkistettiin ja eroteltiin geelielektroforeesilla, jossa käytettiin 1,5 % SeaKem LE-agarosia (50004, Lonza, Basel, Sveitsi) ja 1 x TAE-puskuria (Tris-asetatti-EDTA, pH 8) (Kuva 8). Geelissä käytettiin SYBR Safe DNA gel stain -väriainetta (S33102, Invitrogen, Carlstad, CA, USA). Molekyylirikostandardina oli GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (SM0322, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Ajolaitteessa (121128 300, MSMAXI, Cleaver Scientific, Rugby, Warwickshire, UK) käytettiin Electroforesis Power Supply -virtalähdettä (EPS600, Pharmacia, New Jersey, USA) ajo-ohjelmalla 140 V, 400 mA ja 50 min. Geeli kuvattiin Image Lab 5.1 -ohjelmistoa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ja Universal Hood II Gel Doc System -kuvauslaitetta (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) käyttäen.



Kuva 8. 1,5 % agarosigeelielektroforeesi *C. parvum* gp-60-geenin nested-PCR -tuotteille. Ylärivissä lopullisen PCR-tuotteen näytemäärä n. 200 μ l, juosteen koko n. 400 emäsparia. Alarivissä rinnakkainen näytteiden ensimmäinen PCR-tuote (a), toinen PCR-tuote (b) ja negatiivinen kontrolli (H₂O), sekä rivin lopussa positiivinen kontrolli *C. parvum* (+K). Molekyylikokostandardina GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (bp100+).

4.3.2 DNA:n eristys ja puhdistus agarosigeeliltä, sekä pitoisuuden mittaus

Noin 400 emäsparin kokoiset, 200 μ l:n näytemäärällä ajetut DNA-juostevyöhykkeet leikattiin geelistä (Kuva 8). DNA:n puhdistukseen käytettiin kahta eri kittiä, joko Silica Bead DNA Gel Extraction -kittiä (K0513, Fermentas, Waltham, MA, USA) tai MinElute Gel Extraction -kittiä (28604, Qiagen, Hilden, Saksa). Eristykset tehtiin valmistajien ohjeiden mukaisesti, sentrifugaatioihin käytettiin Centrifuge 5424-sentrifuugia (22331, Eppendorf, Hamburg, Saksa). Puhdistetun DNA:n pitoisuus mitattiin näytteistä käyttämällä Qubit dsDNA HS Assay -kittiä (Q32854, Invitrogen, Carlstad, CA, USA) tai Qubit dsDNA BR Assay -kittiä (Q32850, Invitrogen, Carlstad, CA, USA) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Mittaukseen käytettiin Qubit 2.0 fluorometer -laitetta (Invitrogen, Carlstad, CA, USA).

4.3.3 *Gp-60-geenin sekvensointi ja alatyypitys*

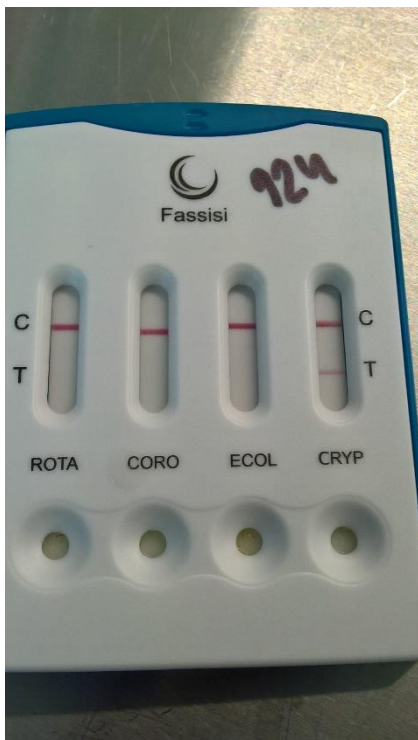
DNA-näytteet lähetettiin Helsinkiin sekvensoitaviksi. Näytteet sekvensoitiin Sangerin menetelmällä Helsingin yliopiston biotekniikan instituutissa, Viikin biokeskuksessa. Sekvensointiin käytettiin etualuketta (5 μ M) AL3532 (5682-049, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) ja taka-aluketta (5 μ M) LX0029 (5682-051, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Näytteet sekvensoitiin ensin etualukkeella ja tarvittaessa myös taka-alukkeella. Geenisekvenssien laatu tarkastettiin BioEdit-ohjelmalla (BioEdit Sequence Alignment Editor 2017, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA) ja verrattiin NCBI:n BLAST-ohjelmalla (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> 2018) tunnettuihin gp60-geeneihin. Tarvittaessa sekvenssit analysoitiin sekä etu- että taka-alukkeella sekvensoituina ja käännettiin taka-alukkeella tehdyt sekvenssit Bio-Edit ohjelmalla laadullisesti riittävän tuloksen saamiseksi. Sekvensseistä etsittiin toistojaksot ja trinukleotidien esiintyvyydet laskettiin käsin. Tuloksia verrattiin BLAST-ohjelmalla (Basic Local Alignment Search Tool) saatuihin tuloksiin sekä näytetietoihin.

4.3.4 *Fassisi BoDia -pikatesti*

Fassisi BoDia -pikatesti tehtiin valmistajan ohjeen mukaisesti (Fassisi BoDia 2017). Pakastetut ulostenäytteet sulatettiin +4 °C:ssa yön yli. Ripuliulostetta siirrostettiin 3-6 tippaa pakkauksen mukana tulleella pipetillä reagenssiliuosta sisältävään näyteputkeen (Kuva 9). Mikäli näyte oli kiinteää ulostetta, käytettiin siirrostuksessa pumpulitikkaa. Näytettä siirrettiin ohjeen mukaisesti pieni määrä reagenssiliuosta sisältävään näyteputkeen. Näyte ja reagenssiliuos sekoitettiin vorteksoimalla tai ravistaen. Näyteputkesta tiputettiin 3-4 tippaa näyteliuosta testikasetin jokaiseen neljään kuoppaan. Testikasettia seisotettiin 10 minuuttia tasaisella alustalla huoneenlämmössä. Tulos luettiin testikasetin ikkunoista: 1 kontrolliviiva = negatiivinen, 2 viivaa = positiivinen tulos (Kuva 10).



Kuva 9. Fassisi BoDia -pikatestin testikasetti, reagenssinäyteputki ja pakkauksen mukana tullut pumpulitikki näytteen siirrokseen.

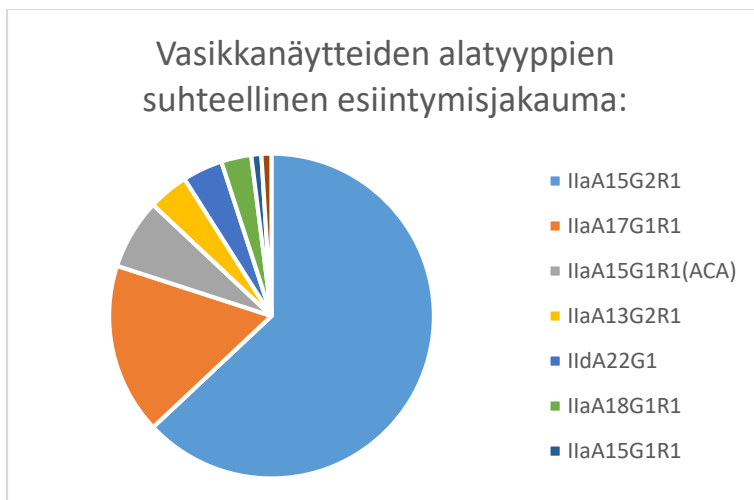


Kuva 10. Fassisi BoDia -pikatestikasetti. *C. parvum* -antigeenin (CRYP) osalta testituloks on positiivinen. C = kontrolliviiva, joka kertoo testin onnistuneen; T = testiviiva, joka kertoo testin tuloksen (vaaleanpunainen viiva = positiivinen tulos; ei nähtävää viivaa = negatiivinen tulos).

5 TULOKSET

5.1 *Cryptosporidium parvum* -alatyypit

Kaikki tutkitut löydökset kuuluivat alatyypiperheisiin IIA (106 kappaletta) ja IID (4 kappaletta). Vasikoilla *C. parvum* alatyyppejä IIAA15G2R1 oli eniten, 63 kappaletta (63,0 %), 55:ltä eri tilalta (Taulukko 1; Kuva 11). Toiseksi eniten oli alatyyppejä IIAA17G1R1, 17 kappaletta (17,0 %). Ihmisnäytteistä löytyi ainoastaan alatyyppejä IIAA18G1R1 (10 kappaletta). IID-alatyypiperheeseen kuuluvia löydöksiä oli ainoastaan alatyyppejä IIDAA22G1. Yhdeltä tilalta löytyi kahta eri alatyyppeä, näytteet olivat eri vuosilta (2013 ja 2017). Yleisimmät alatyypit olivat jakautuneet melko tasaisesti eri vuosille (Taulukko 1).



Kuva 11. *Cryptosporidium parvum* -alatyypin jakautuminen vasikkanäytteissä.

Taulukko 1. *Cryptosporidium parvum* -alatyypit Suomessa vuosina 2012–2017.

Alatyyppi:	Löydösmäärä:	Maakunnat:	Tilat:	Vuodet:
IlaA15G2R1	63 vasikkaa	P-Savo, P-Pohjanmaa, Keski-Pohjanmaa, E-Pohjanmaa, Pohjanmaa, Keski-Suomi, Satakunta, E-Savo, Päijät-Häme	55 tilaa (joista 45 maitotilaa, 3 lihakarjatilaa, 3 emolehmättilaa, 2 ternivasikkatilaa ja 1 välikasvattamo)	2013-2017
IlaA17G1R1	17 vasikkaa	Keski-Pohjanmaa, E-Pohjanmaa, Pirkanmaa, Satakunta, Uusimaa, Kymenlaakso	15 tilaa (joista 13 maitotilaa, 1 lihakarjatila ja 1 emolehmättila)	2012-2017
IlaA15G1R1(ACA)	7 vasikkaa	P-Savo, Päijät-Häme, Varsinais-Suomi	5 maitotilaa	2013-2017
IlaA13G2R1	4 vasikkaa	Keski-Pohjanmaa, E-Pohjanmaa	3 maitotilaa	2012-2016
IIdA22G1	4 vasikkaa	E-Pohjanmaa, Pirkanmaa, Kymenlaakso	3 maitotilaa	2014-2015, 2017
IlaA18G1R1	3 vasikkaa, 10 ihmistä	Vasikat: P-Savo, Uusimaa; ihmisenäytteet: Pohjanmaa	3 maitotilaa	2015-2017
IlaA15G1R1	1 vasikka	Pirkanmaa	tilan toiminta ei tiedossa	2014
IlaA16G1R1	1 vasikka	Pirkanmaa	1 emolehmättila	2017

Alatyypit jakautuivat maakunnittain (Taulukko 2). Pohjois-Pohjanmaalta, Keski-Suomesta, Etelä-Savosta ja Pohjanmaalta löytyi ainoastaan yhtä alatyyppeä; *C. parvum* IlaA15G2R1. Alatyyppeä IlaA15G2R1 on keskittynyt läntiseen Suomeen, etenkin Pohjanmaan alueelle. Eteläisestä ja Keski-Suomesta löytyi eri alatyyppejä, yleisintä alatyyppeä (IlaA15G2R1) ei löytynyt Varsinais-Suomesta, Uudeltamaalta, Kymenlaaksosta, eikä Pirkanmaalta. Varsinais-Suomessa oli ainoastaan alatyyppeä IlaA15G1R1(ACA-mutaatiolla).

Taulukko 2. Vasikoiden *C. parvum* -alatyypit maakunnittain Suomessa vuosina 2012–2017.

	IlaA15G2R1	IlaA17G1R1	IlaA15G1R1(A)	IlaA13G2R1	IIdA22G1	IlaA18G1R1	IlaA15G1R1	IlaA16G1R1	Yht:
Pohjois-Savo:	3	-	1	-	-	2	-	-	6
Pohjois-Pohjanmaa:	14	-	-	-	-	-	-	-	14
Keski-Pohjanmaa:	11	2	-	2	-	-	-	-	15
Etelä-Pohjanmaa:	23	5	-	1	1	-	-	-	30
Pohjanmaa:	4	-	-	-	-	-	-	-	4
Keski-Suomi:	3	-	-	-	-	-	-	-	3
Pirkanmaa:	-	7	-	-	2	-	1	1	11
Satakunta:	2	1	-	-	-	-	-	-	3
Etelä-Savo:	2	-	-	-	-	-	-	-	2
Päijätähäme:	2	-	1	-	-	-	-	-	3
Varsinais-Suomi:	-	-	5	-	-	-	-	-	5
Uusimaa:	-	1	-	-	-	1	-	-	2
Kymenlaakso:	-	1	-	-	1	-	-	-	2

5.2 Fassisi BoDia –pikatesti

Fassisi BoDia -pikatestissä saatiin *C. parvum* -alkueliön diagnostiikassa sensitiivisyydeksi 91,7 ja spesifisyydeksi 83,9 (Taulukko 3). Tuloksista väärä positiivisia oli viisi (5) ja väärä negatiivisia kolme (3).

Taulukko 3. Fassisi BoDia –pikatestin tulokset.

	Rotavirus:	Koronavirus:	<i>C. parvum</i> :	<i>E. coli</i> (F5):
Oikeat positiiviset:	35	2	33	-
Oikeat negatiiviset:	29	58	26	-
Väärät positiiviset:	3	4	5	-
Väärät negatiiviset:	0	3	3	-
yht.	67	67	67	-

Sensitiivisyys (%):	100,0	40,0	91,7	-
Spesifisyys (%):	90,6	93,5	83,9	-

6 TULOSTEN TULKINTAA

6.1 *Cryptosporidium parvum* -alatyypit

6.1.1 Tulosten luotettavuus

Nested-PCR -menetelmällä saadut gp60-geenimonistukset onnistuivat hyvin. Jokaisen näytteen geenimonistuksen yhteydessä käytettiin negatiivista kontrollia mahdollisten kontaminaatioiden huomaamiseksi. Negatiiviset kontrollit onnistuivat, joten voidaan tehdä oletus, ettei kontaminaatiota muista näytteistä tapahtunut. Positiivista kontrollia käytettiin jokaisessa näytesarjassa menetelmän toimivuuden tarkistamiseksi. Positiiviset kontrollit onnistuivat poikkeuksetta. PCR-monistustuotteet tarkastettiin agarosigeelielektroforeesin avulla, jolloin voitiin arvioida juosteiden koko ja määrä. Muutama näyte jouduttiin uusimaan, koska geelielektroforeesiajossa saatiin epäselvä tulos, eikä selkeää juostevyöhykettä ilmaantunut. Uusituilla näytteillä ei ongelmaa esiintynyt.

Sekvensoitavaksi lähetettyjen PCR-tuotteiden pitoisuudet olivat pääasiassa 40–360 ng/μl. Yhdessä näytesarjassa pitoisuudet olivat 20–40 ng/μl, mikä oli kuitenkin riittävä pitoisuus sekvensoinnin onnistumiseen. Sekvensointitulokset analysoitiin BioEdit-ohjelmalla ja jokaisen sekvenssituloksen laatu arviotiin Sangerin sekvensointimenetelmän antamien emäspiikkien koon ja mahdollisten tulosta häiritsevien tekijöiden osalta. Joidenkin näytteiden PCR-tuotteen puhtaus ei ollut täydellistä, mutta sekvenssitulos pystyttiin analysoimaan vertaamalla etu- ja taka-alukkeen tuloksia toisiinsa, tai tarvittaessa uusimalla näyte. Yhteensä yhdeksän vasikkanäytteen kohdalla käytettiin taka-alukkeella tehtyä sekvensointitulosta etualukkeen tuloksen rinnalla, jotta saatiin riittävän hyvä laatu ja emäsjärjestys voitiin analysoida luotettavasti. Muutama yksittäinen näyte jouduttiin uusimaan kokonaan, mutta lopullinen tulos oli laadultaan riittävä. Yhden näytteen kohdalla sekvenssitulos yhden emäksen kohdalla jäi hieman epävarmaksi ja tulos jouduttiin arvioimaan muiden esiintyneiden alatyypin perusteella. Tämän ei kuitenkaan katsottu vaikuttavan merkittävästi tutkimustulosten luotettavuuteen. BLAST-ohjelman mukaan jokainen sekvensoitu PCR-tuote oli *C. parvum*-lajin gp60-geeni tai geenin toistojakson sisältävä osa.

6.1.2 Alatyypit Suomessa

C. parvum -lajin alatyypien sekvensointia on tehty Suomessa ainoastaan Eviran Kuopion tutkimusyksikössä. Aiemmin on sekvensoitu gp-60 alatyyppejä vasikkanäytteistä vuosilta 2005–2012, jolloin yleisimmät alatyypit ovat Eviran tilastojen mukaan olleet IIAA15G2R1 (11 vasikkaa, 11 eri tilaa), IIAA17G1R1 (8 vasikkaa, 8 eri tilaa) ja IIAA18G1R1 (9 vasikkaa, 7 eri tilaa) (Autio 2013a). Lisäksi Eviran tilastojen (2018) mukaan vuosina 2005–2012 on löytynyt alatyyppejä IIAA15G1R1 12:lta vasikalta kuudelta eri tilalta, mutta sekvenssitulos on ollut epävarma. Yhdeltä tilalta on löytynyt alatyyppejä IIAA16G1 kahdeksalta vasikalta, samaa alatyyppejä ei löytynyt tässä tutkimuksessa yhdestäkään tutkitusta vasikkanäytteestä.

Alatyyppejä IIAA15G2R1 yleistymisen vasikkanäytteissä on tämän tutkimuksen mukaan ollut vuodesta 2013 lähtien runsasta. On kuitenkin otettava huomioon aiemmin tehtyjen tyypitysten vähäinen määrä (47 vasikkaripuli- ja sairauden syyn selvitysnäytettä). Lisäksi tulee ottaa huomioon aiemmassa alatyypin määrityksessä löytyneen alatyypin IIAA15G1R1:n epäselvyys, ovatko kyseiset alatyypit todella olleet IIAA15G1R1-tyyppejä, vai mahdollisesti IIAA15G2R1? *C. parvum* alatyypin gp60-geenin toistojaksojen mutaatiofrekvenssistä ei löytynyt kirjallisuutta, mutta sillä ei todennäköisesti ole merkittävää vaikutusta eri alatyypin yleisyyden muuttumisessa. Yksittäisen nukleotidin pistemutaatiot ovat tyypillisiä geenimutaatioita, joita esiintyy mikro-organismien genomissa (Lawrence 2006). *C. parvum* gp60-geenin toistojakson trinukleotidit kuitenkin koodaavat kaikki samaa aminohappoa, jolloin yksittäisillä pistemutaation aiheuttamalla nukleotidin vaihtumisella ei ole merkitystä glykoproteiinin rakenteelle (Nichols ym. 2014). Yksittäisen nukleotidin muutoksilla adenosiinista guanosiiniksi (tai toisinpäin) ei ole merkitystä alkueliön patogeneesille. On siis mahdollista ettei gp60-geenin toistojaksojen alatyypitykseen vaikuttava pistemutaatiofrekvenssi ole kovin suuri, jolloin sillä ei olisi suurta merkitystä eri alatyypin vaihtumisessa (Cooper 2006). Suuremmat mutaatiot gp60-geenissä ovat mahdollisia, mutta niiden esiintymisfrekvenssi on huomattavasti pienempi.

Alatyypin IIAA15G2R1 sijoittuminen pääasiassa Pohjanmaalle ja Keski-Suomeen on pysynyt vasikkanäytteissä samanlaisena verrattuna edellisiin tuloksiin. Tähän saattaa vaikuttaa näytemäärien jakautuminen eri maakuntien välillä, itäisestä Suomesta vasikkaripulinäytteitä on tullut tutkittavaksi huomattavasti vähemmän kuin läntisestä

Suomesta. *C. parvum* -alatyypin IIAA18G1R1 on aiemmin (v. 2006–2011) löytynyt Pohjois-Karjalasta ja Pohjois-Savosta, nyt alatyypin löytyi Pohjois-Savon lisäksi Uudeltamaalta. Pohjois- ja Etelä-Karjalasta ei ollut tässä tutkimuksessa yhtään näytettä, mikä voi osaltaan vaikuttaa kyseisen alatyypin vähäisiin löydösmääriin. Alatyypin IIAA18G1R1 on aiheuttanut vuosina 2009 ja 2011 Pohjois-Karjalassa ja Pohjois-Savossa ihmisten todettuja kryptosporidiooseja (5 löydöstä), lisäksi alatyypin IIAA15G2R1 on vuonna 2010 infektoinut kolme ihmistä Pohjois-Pohjanmaalla. Tampereella oli vuonna 2012 epidemia, jossa kryptosporidioosin aiheuttaja ihmisillä oli alatyypin IIAA17G1 (6 löydöstä). Tampereen epidemian tartuntalähteenä oli todennäköisesti salaatti, muut tartunnat olivat Eviran tilastojen mukaan peräisin nautakarjatilojen vasikoista. Tässä tutkimuksessa kaikki ihmisten tautitapaukset olivat alatyypin IIAA18G1R1:n aiheuttamia. Kaikki tutkitut ihmisnäytteet tulivat Pietarsaaresta Pohjanmaalta (2017) ja on todennäköistä, että tartuntalähde on ollut sama tai suurin osa tartunnoista on tapahtunut sairastuneiden välillä. *C. parvum* alatyypin IIAA18G1R1 ei löytynyt yhdestäkään tutkitusta vasikkanäytteestä koko Pohjanmaan alueella, jolloin tartunnan lähdettä ei tämän tutkimuksen perusteella voida osoittaa maatilalta peräisin olevaksi. Tutkimuksessa käytetty näytemäärä oli kuitenkin suhteellisen pieni, jolloin nautakarjatilalta saatu tartunta on mahdollinen, sen osoittamiseksi tarvittaisiin kuitenkin laajempi tutkimus isommalla näytemäärällä. Vaikka Suomessa ihmisten kryptosporidioositartunnat ovat usein lähtöisin mautiloilta, vuoden 2017 Pietarsaaren tartuntojen lähde on jäänyt epäselväksi (Autio 2013b; Autio ym. 2012). Yhtenä mahdollisuutena on ehdotettu tartuntalähteen alkuperäksi nautakarjan ulosteita, jolloin ookystat olisivat levinneet runsaiden sateiden myötä juomaveteen (Lumio 2018). Vesivälitteistä epidemiaa ei kuitenkaan ole virallisesti todettu, joten tartuntalähde jää tässä tutkimuksessa selvittämättä.

Alatyypin IIAA22G1 edusti Suomessa tässä tutkimuksessa ainoastaan alatyypin IIAA22G1, jota löytyi vasikkanäytteistä yksittäisinä Etelä-Pohjanmaalta, Pirkanmaalta ja Kymenlaaksosta. Alatyypin IIAA22G1 on aiemmin (vuonna 2010) löytynyt pari yksittäistapausta Pirkanmaalta ja Varsinais-Suomesta, joten sen esiintyvyys on pysynyt samankaltaisena. Lisäksi alatyypin IIAA22G1 on aiemmin löytynyt vuohilta (6 löydöstä), jotka ovat samalta tilalta vuosilta 2010 ja 2012. Tässä tutkimuksessa sekvensoitujen alatyypin IIAA22G1 trinukleotiditoistojakson lopussa oleva ACATCA-toistojakso oli jokaisen neljän näytteen sekvenssissä muotoa ACATCG ja trinukleotiditoistojaksoa edeltävä GGGC-sekvenssi oli muodossa GGGT. Kirjallisuudesta ei löytynyt mainintaa ovatko kyseiset mutaatiot tyypillisiä

alatyypille, mutta usean NCBI:n BLAST-ohjelmalla haetun alatyypin IIdA22G1 eri isolaattien gp60-geenien sekvenssit olivat tämän tutkimuksen tuloksia vastaavat.

Kirjallisuudesta löytyi vain harvoja viitteitä eri *C. parvum*-alatyyppeiden eroihin alkueliön taudinaiheuttamiskyvyssä ja leviämisessä, tai epidemioiden aiheuttamisessa. Feng ym. (2013) totesivat tutkimuksessaan IIAA15G2R1-alatyypipopulaation olevan heterogeeninen, jolloin alatyypiryhmän sisällä on eroja taudinaiheuttamiskyvyssä ja leviämisessä. Alatyypin IIAA15G2R1 on kuitenkin yleisimmin levinnyt infektoita aiheuttava *C. parvum*-alatyypin maailmalla, jolloin on olemassa mahdollisuus, että alatyypin virulenssitekijät eroavat merkittävästi muista alatyypeistä. Tässä tutkimuksessa ei eroteltu vasikoiden ripulitautien oireiden vaikeutta tai taudin kestoa näytteittäin, mutta jokaisella tutkitulla vasikkanäytteen lähde-eläimellä oli kuitenkin todettu oireinen ripulitauti. Tarkemman tutkimusnäytön puuttuessa oletetaan tämän tutkimuksen myötä jokaisen Suomessa ilmenevän alatyypin voivan aiheuttaa merkittäviä ripulioireita vasikoille. Kuitenkin myös tässä tutkimuksessa yleisimmäksi nousseen alatyypin IIAA15G2R1 runsas leviäminen on huomioitava mahdollisena tekijänä lisääntyneeseen epidemiariskiä niin vasikoilla kuin ihmisillä, ja alatyypin mahdollisia virulenssitekijöitä olisi hyvä tulevaisuudessa tutkia enemmän. Eri epidemioita aiheuttavien *C. parvum* ja *C. hominis* -populaatioiden geneettisiä eroja ja mahdollisia geenien rekombinaatioita on tutkittu jonkin verran, mutta tutkimuksissa ei ole käytetty gp60-geeniin perustuvaa alatyypitystä, joten virulenssitekijöiden eroja ei voida verrata tämän tutkimuksen tuloksiin (Feng ym. 2014; Drumo ym. 2012). Tämän tutkimuksen tuloksilla ei pystytä osoittamaan selkeitä tartuntareittejä tai *C. parvum*-alatyyppeiden zoonoottista tarttumista vasikoista ihmiseen. Jatkotutkimuksissa tarvittaisiin suurempi näytemäärä ihmisillä todetuista kryptosporidioosi-infektioista ja mahdollisesti haastatteluihin perustuva tiedonkeruu tartuntareittien selvittämiseksi. Vasikoiden alatyyppeiden esiintyvyys ei vaikuta toistaiseksi infektoituneiden vasikoiden hoitoon tai ripulitautien ehkäisyyn, mutta antaa tärkeää tietoa eri alatyyppeiden esiintyvyydestä ja leviämisestä myöhempiä tutkimuksia varten.

6.1.3 Alatyypit maailmalla

Maailmalla nautakarjan *C. parvum* -alatyypin esiintyvyys vaihtelee (Robertson ym. 2014; Imre & Dărăbuș 2011). Euroopassa ehdottomasti yleisin alatyypiperhe on IIA, toiseksi yleisin on IID, mitkä ovat yhtenäiset tässä tutkimuksessa saatujen tuloksien kanssa (Nichols ym. 2014). Alatyypiperheille IIA ja IID on ominaista, että ne löytyvät sekä karjasta että ihmisistä, mikä viittaa zoonoottiseen leviämiseen. Verrattuna uudemmissa julkaisuista (vuosilta 2007–2013) tehtyyn yhteenvetoon tämän tutkimuksen mukaan Suomessa tällä hetkellä vasikoiden yleisin alatyypin IIAA15G2R1 on yleinen myös Iranissa (22/25), Italiassa (34/62), Romaniassa (8/13), Espanjassa (26/27) ja Tsekeissä (48/131) (Robertson ym. 2014). Etiopiassa *Cryptosporidium*-lajien ja alatyypin esiintyvyyttä ihmisillä on tutkittu sekä yleisesti vuonna 2010 että HIV/AIDS-potilailla vuonna 2014 (Adamu ym. 2014; Adamu ym. 2010). Yleisin ihmisiä infektoiva laji oli *C. parvum* (2010: 39/41; 2014: 92/140) ja sen alatyypin IIAA15G2R1 (2010: 8/13; 2014: 60/82). Alatyypiperhe IIA oli yleisin löydös, ja sen katsottiin levinneen zoonoottisesti karjasta aiheuttaen merkittävän infektioriskin.

Vanhemmissa julkaisuissa vuosilta 2000–2010 alatyypin IIAA15G2R1 löytyi lisäksi yleisimpänä *C. parvum* -alatyypinä Belgiasta (98,4 %), Englannista (68,6 %), Saksasta (81,1 %), Alankomaista (69,0 %), Portugalista (84,7 %), Sloveniasta (60,0 %) ja Espanjasta (75,7 %) (Imre & Dărăbuș 2011). Iranissa alatyypin IIAA15G2R1 löytyi sekä nautakarjasta (22) että ripulioireisilta lapsilta (6), mutta tartuntareitti karjasta ihmisiin ei muiden tulosten perusteella ole kuitenkaan yleistä (Nazemalhosseisi-Mojarad ym. 2011). Brasiliasta on löydetty ainoastaan alatyypin IIAA15G2R1, mutta näyttemäärä on ollut pieni (7).

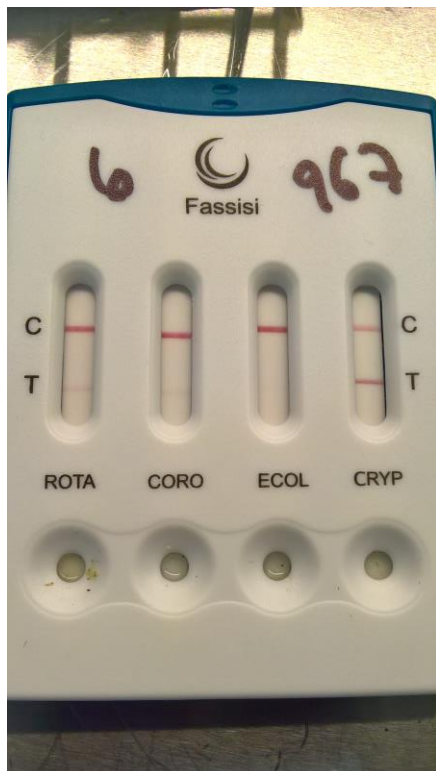
Alatyypin IIAA17G1R1 esiintyy yleisenä Englannissa ja Walesissa (10/13). Vuoden 2003–2010 julkaisujen mukaan alatyypin IIAA17G1R1 löytyi nautakarjalla yleisenä lisäksi Unkarissa (14,2 %) ja Alankomaissa (10,9 %), sekä muutamia tapauksia todettiin Pohjois-Irlannista ja Sloveniasta (Imre & Dărăbuș 2011). Ruotsissa puolestaan yleisimmät alatyypit ovat IIAA16G1R1 (58/171) ja IIAA17G1R1c (17/171), sekä IIDAA20G1e (14/171) (Silverlås ym. 2013). Ruotsissa alatyypin IIAA15G2R1 löytyi vasikoilta huomattavasti vähemmän kuin Suomesta (4/171), samoin alatyypin IIAA17G1R1 (6/171). Kuwaitissa *C. parvum* -alatyypit IIAA15G2R1 ja IIDAA20G1 olivat yleisimmät ripulitautia sairastuneilla lapsilla

(Sulaiman ym. 2005). Perussa on tutkittu pienten lasten *Cryptosporidium*-lajien ja alatyypien esiintyvyyttä (Cama ym. 2008), jolloin ainoa löytynyt *C. parvum* -lajin alatyypiperhe oli IIc.

6.2 Fassisi BoDia -pikatesti

Kirjallisuuden mukaan nuorilla vasikoilla ripulin aiheuttaa usein sekainfektio, jossa yleisimmät patogeenit ovat *C. parvum* ja rotavirus, harvemmin *C. parvum* ja koronavirus, joskus sekainfektiossa on useita enteropatogeeniä (Scott ym. 2004). Vasikan iällä on huomattava merkitys infektion aiheuttajaan, alle kahden vuorokauden ikäisillä vasikoilla tyypillisin ripulin aiheuttaja on ETEC (enterotoksinen *Escherichia coli*), kun taas noin kymmenen vuorokauden ikäisillä vasikoilla yleisin aiheuttaja on rotavirus ja/tai *C. parvum* (Scott ym. 2004). Fassisi Bo Dia -pikatesti löysi sekä sekainfektioita että *C. parvum* -lajin aiheuttamat yksittäiset infektiot. Tutkituissa näytteissä tyypillisin sekainfektio oli rotaviruksen ja *C. parvum* -alkueliön aiheuttama. Fimbriaa ja sen antigeeniä ilmentävää F5 *E. coli* (K99) -kantaa ei ollut käytettävissä tutkimuksissa, joten *E. coli* (ETEC) osuutta sekainfektioissa ei voitu todeta. Pikatestin tuloksissa oli *C. parvum* -antigeenin osalla viisi väärää positiivista tulosta. Tuloksista neljä oli hyvin haaleita viivoja, joiden tulkinta oli epäselvää, yksi tulos oli selvä viiva, vaikka näytteestä ei ollut löydetty *Cryptosporidium*-lajia. Yhdessä väärän positiivisen tuloksen saaneessa näytteessä oli *Cryptosporidium bovis*. Toisaalta kahdelle muulle *C. bovis* -lajille positiiviseksi todetulle näytteelle pikatesti antoi oikean negatiivisen tuloksen. Ristireaktion mahdollisuus eri *Cryptosporidium*-lajien välillä on siis olemassa, mutta näyteotanta oli niin pieni (3 kappaletta *C. bovis* -lajille positiiviseksi todettua näytettä) ettei johtopäätöksiä testin toimivuudesta lajien erottamisessa voida tehdä. Fassisi BoDia -pikatestillä saatiin myös kolme väärää negatiivista tulosta. Kaikista kolmesta näytteestä oli määritetty *C. parvum* -laji sekä mikroskopoimalla että PCR-RFLP -menetelmällä. Kaksi tuloksista olivat erittäin himmeitä ”haamu”viivoja, yksi tulos oli selkeästi negatiivinen. Kontrolliviivat ilmestyivät jokaiseen testiin kaikkien näytteiden kohdalla. Testi todettiin menetelmänsä puolesta toimivaksi ja tulokset sen osalta luotettaviksi, jotta niitä voitiin arvioida tässä tutkimuksessa.

Fassisi BoDia -pikatestin suurin ongelma oli erittäin haaleiden viivojen ilmestyminen testikasetin ikkunaan inkubaatioajan lopussa (Kuva 12). Tulosviivojen tulkinta oli vaikeaa ja riippui valaistuksesta sekä tulkitsijasta. Kysyttäessä muiden laboratorioissa työskennelleiden työntekijöiden mielipiteitä, tulosten tulkinnat olivat keskenään eriäviä. Samoin kävi valaistusta vaihtamalla. Haamuviivat olivat lisäksi sekä vääriä positiivisia että vääriä negatiivisia, joten yhtenäistä linjaa tulkintoihin ei voitu tehdä. Tällaisia vaikeasti tulkittavia haamuviivoja oli *C. parvum* -tulosten osalta yhteensä neljä, lisäksi ilmeni kaksi heikkoa positiivista, joissa viiva oli luettavissa, mutta se oli haaleampi kuin muilla positiivisilla tuloksilla. Haamuviivojen ja heikosti positiivisten viivojen määrä oli 9 % tuloksista, mikä oli kohtalaisen paljon verraten pikatestin tarkoitukseen toimia diagnostisena menetelmänä eläinlääkäreiden ja karjatilojen työntekijöiden käytössä myös navettaolosuhteissa.



Kuva 12. Fassisi BoDia -pikatestin testiviivojen eroavaisuus inkubaatioajan lopussa. Rotaviruksen (ROTA) ja Koronaviruksen (CORO) kohdalla on havaittavissa haalea haamuviiwa tulosviivan kohdalla (T), *C. parvum* (CRYP) kohdalla on puolestaan selkeä positiivinen testiviiva.

Kaiken kaikkiaan Fassisi BoDia -pikatestin toiminta oli riittävän hyvä, että testiä voisi suosittelaa nautakarjatiloiilla käyvien eläinlääkäreiden ja karjatilojen työntekijöiden käyttöön vasikkaripulidiagnostiikassa. Herkkyys (sensitiivisyys) 91,7 % ja tarkkuus (spesifisyys) 83,9 % eivät kuitenkaan yltäneet valmistajan määrittämiin tuloksiin (herkkyys 99,99 % ja tarkkuus 95,85 %) (Fassisi BoDia 2017). Testi oli kuitenkin helppo tehdä ja näytemateriaalia riitti pienikin määrä. Pikatestin käyttäjiä pitäisi ohjeistaa selkeällä toimintamallilla, mikäli testin tulkinnassa on epäselvyyttä. Kaikki positiiviset tapaukset tulisi varmistaa asianmukaisesti näytteitä tutkivassa laboratorioissa, samoin tulisi tehdä negatiivisten näytteiden kohdalla, mikäli epäily kryptosporidioosista on olemassa. Pikatestin tulos antaisi kuitenkin suuntaa oikeassa diagnostiikassa ja auttaisi oikean hoidon ja lääkityksen valinnassa. Tässä tutkimuksessa kaikki pikatestin antamat epäselvät tulokset (haamuviivat) tulkittiin vääriksi, huolimatta olivatko ne väärää positiivisia vai väärää negatiivisia. Mikäli tulosten tulkinta olisi tehty löysemmillä kriteereillä, ja suhteutettu epäselvät tulokset ennalta tiedettyihin löydöksiin, olisi Fassisi BoDia -pikatestissä päästy tässäkin tutkimuksessa päästy herkkyydessä yli 97 %:n ja tarkkuudessa yli 90 %:n tulokseen. Tutkimuksessa haluttiin kuitenkin antaa mahdollisimman realistinen ja käytännön tulkintaongelmiin suhteutettu tulos.

7 POHDINTAA

Kryptosporidioosi on määritelty zoonosikeskuksen ohjausryhmän ja strategiatyöryhmän (2013) mukaan työperäiseksi zoonositartunnaksi, jolle altistuvia riskiryhmiä ovat muun muassa maataloilla työskentelevät, karjanhoitajat, teurastamotyöntekijät ja eläinlääkärit (Suomen zoonosistrategia 2013–2017). Lisäksi *Cryptosporidium*-lajit aiheuttavat elintarvikkeiden ja talousveden välityksellä leviäviä zoonooseja. Elintarvikeväälitteisten tartuntatautien torjuntaan on yleisiä keinoja, kuten tautisuojaus ja hygieniakäytännöt maatilalla, mutta työryhmämuistion mukaan päävastuu zoonosien torjunnassa on kuitenkin elinkeinon toimijoilla. Tämä edellyttää kehittyvää analytiikkaa zoonoottisten taudinaiheuttajien toteamiseksi ja torjuntakeinojen aloittamiseksi.

Kryptosporidioositapausten lisääntyminen on lisännyt tietoisuutta myös nautaeläinten kanssa työskentelevien parissa. Viime aikoina on todettu muutamia vakavia *C.*

parvum -alkueliön aiheuttamia tautitapauksia, joissa tartunnan lähde on ollut ripuliin sairastunut vasikka (Tirkkonen 2018). Ruotsissa on dokumentoitu eläinlääkäriopiskelijoiden sairastuneen kryptosporidioosiin nautakarjatiloiilla vierailun jälkeen, ja yhteys vasikoiden ja sairastuneiden opiskelijoiden *C. parvum* -alatyypin välillä on osoitettu tutkimuksissa (Kinross ym. 2015).

Väestön sairastuminen zoonooseihin aiheuttaa suoria ja välillisiä kustannuksia, joita aiheutuu sairastuneiden toimintakyvyn heikkenemisestä, sairauspoissaoloista, tartuntojen ehkäisystä ja hoidosta (Suomen zoonoosistrategia 2013–2017). Suomessa ei ole tehty kattavaa terveystaloudellista kustannusarviointia zoonoosien osalta. Kryptosporidioosi on edelleen merkittävä kroonisen ripulitaudin ja kuolleisuuden aiheuttaja HIV/AIDS-potilailla ja muilla immuunipuutospotilailla, sekä vakavien ripulitautien aiheuttaja muilla immuunipuutteisilla potilailla ja pienillä lapsilla (Adamu ym. 2014; Shikani & Weiss 2014). Lisäksi *Cryptosporidium* voi aiheuttaa immuunipuutteisilla ja perussairailta potilailla vakavia yleisinfektioita ja elinvaurioita levitessään suoliston ulkopuolelle, pidentäen sairaalahoitajaksoja merkittävästi ja lisäten sairastuneiden kuolleisuutta (Hunter & Nichols 2002). Tartuntojen välttäminen on etenkin näiden potilasryhmien kohdalla erittäin tärkeää. Koska merkittävä osa kotimaisista kryptosporidioositartunnoista on arvioitu olevan peräisin nautakarjasta, nautojen infektioiden diagnostiikan parantamisella on merkittävä vaikutus ihmisten zoonoottisten tartuntojen torjuntaan (Coccia & Putignani 2014; Autio ym. 2012). Lisäksi vesivälitteiset epidemiat ovat uhka myös Suomessa, jolloin *Cryptosporidium*-lajeja epäiltäessä tarkan ja nopean diagnostiikan merkitys on suuri ja yhteistyö eri asiantuntijatahojatarhojen kanssa tärkeää (Rimhanen-Finne 2013; Adamu ym. 2014). Tulevaisuudessa tulisi parantaa mahdollisesti zoonoottisten *Cryptosporidium* -löydösten laji- ja alatyypimääritysten analytiikkaa, jolloin tartuntalähde voitaisiin osoittaa paremmin. Ihmisten kryptosporidioositapauksissa lajimääritystä ei useinkaan tehdä, eikä alatyypitykseen lähetetä isolaatteja kuin satunnaisesti. Vaikka tutkimuksessa selvitettyjen ihmisten kryptosporidioositapausten tartuntalähde on voitu Eviran tilastojen mukaan yhdistää *C. parvum* -alatyypityksen perusteella nautakarjatiloihin, näytteiden diagnostiikka on pysynyt vähäisenä. Terveystalouden piirissä tulisi käydä keskustelua näytteiden keräämisen ja diagnostiikan järjestämisestä epidemiatilanteissa tai sellaista epäiltäessä. Mahdollisissa epidemiatilanteissa tartuntalähteen selvittämiseksi tulisi olla ohjeistus näytteiden analysointiin ja jatkotutkimuksiin lähettämisestä. Yhteistyön kehittäminen niin potilaita hoitavan tahon, diagnostiikkaa tekevien yksiköiden kuin elintarviketurvallisuusvirastonkin kanssa olisi ensisijaista. Tartuntalähteiden

selvitys etenkin vesivälitteisissä epidemioissa olisi tärkeää tilanteen hoitamisessa ja ennaltaehkäisyssä. Ihmisillä kryptosporidioosi on edelleen alidiagnosoitu tauti ja infektion aiheuttava laji jää yleensä määrittämättä (Zoonosikeskuksen ohjausryhmä ja strategiatyöryhmä 2013-2017; Autio ym. 2012). Tietoisuuden lisääminen, diagnostiikan kehittäminen ja alatyypien määrittäminen voisivat parantaa tutkimuksiin ohjattavien potilaiden hoitoa ja vähentää tartuntalähteitä ympäristöstä.

Tuotantoeläinten kryptosporidioosien aiheuttamat kustannukset ovat merkittävät (Uzal ym. 2016). Kustannukset muodostuvat eläinten kuolleisuudesta ja sairastuvuudesta, sekä sairauden hoidon ja ehkäisyn kustannuksista (Thrusfield 2005). Kustannuksia voidaan jaotella tuotannon sekä laadullisena että määrällisenä heikkenemisenä, tuotantotehokkuuden laskuna sekä tuotantoeläinten menetyksenä. Lisäksi eläinten sairastumisella on sekä välittömiä että pitkäaikaisia kustannuksia lääkityksen, hoidon, eläintilojen puhdistuksen sekä infektioiden leviämisen ehkäisyn vuoksi. Maailmalla *C. parvum* -alkueliön aiheuttaman ripulitaudin kuolleisuus voi nousta jopa yli 50 % etenkin sekainfektiossa (Peek ym. 2018). Vasikkaripuli on Kestävä karjatalous -hankkeen vasikkatutkimuksien (2014) mukaan vasikoiden yleisin sairaus, ja näin ollen suurin karjan hoitoon kuluva työaika ja kustannuksia lisäävä tekijä. Nopea diagnostiikka auttaa oikean hoitomuodon, eristystoimenpiteiden sekä tilojen puhdistuksen toteutuksen valinnassa. Pikatestiin perustuva diagnostiikka voi tuoda nopeutta jatkotoimenpiteiden toteutukseen, mutta menetelmässä on omat haasteensa. Alatyypitysten lisääminen voi auttaa epidemioiden ja tartuntareittien selvittelyssä. Tulevaisuudessa olisi tarpeellista tutkia alatyypien yhteyttä eri *C. parvum*-populaatioiden taudinaiheuttamiskykyyn ja leviämiseen. Alatyypitysten perusteella olisi siten mahdollisuus kiinnittää huomiota vaikeita tautimuotoa aiheuttavien isolaattien leviämisen ehkäisyyn.

Diagnostiikan lisäksi nautakarjataloudessa tulisi kiinnittää erityisesti huomiota ripulitautien ennaltaehkäisyyn. Vasikkaripulin ehkäisemisellä vasikoiden oloja parantamalla, stressiä vähentämällä sekä ravinnon ja kuivituksen tarkistamisella on todettu merkittäviä vaikutuksia vasikkaripulitautien esiintyvyyteen ja vasikkakuolleisuuteen (Koikkalainen ym. 2015; Huuskonen ym. 2014). Vaikka vasikoiden stressillä on todettu yhteys sairastuvuuteen, vasikat erotetaan emästään Suomessa lähes heti syntymän jälkeen ja sijoitetaan ryhmäkarsinoihin (Huuskonen ym. 2014). Erotuksesta aiheutuvan stressin välttämiseksi, ternimaidon riittävän saannin turvaamiseksi ja luonnollisen ravinnonsaannin parantamiseksi onkin ehdotettu vaihtoehtoksi myös lypsykarjatilojen vasikoiden pitämistä emolehmän kanssa

vierihoidossa noin kahden kuukauden ikään asti (Wallenius 2014; Lappalainen 2012). Valitettavasti käytännön esteeksi muodostuvat tässäkin kohonneet kustannukset.

8 KIITOKSET

Kiitokset ohjaajille Evirassa, erikoistutkija Tiina Autiolle ja professori Sinikka Pelkoselle, sekä ohjaajalle Helsingin yliopistolla, professori Per Sarikselle. Kiitokset myös Eviran Kuopion tutkimusyksikön koko henkilökunnalle kaikesta avusta, neuvoista ja kärsivällisyydestä! Erityiskiitos Riikka Luukkaselle ja Tuulia Enbomille avusta käytännön laboratoriotöissä ja aineiston keruussa.

LÄHTEET

Adamu H, Petros B, Zhang G, Kassa H, Amer S, Ye J, Feng Y & Xiao L. 2014. Distribution and Clinical Manifestations of *Cryptosporidium* Species and Subtypes in HIV/AIDS Patients in Ethiopia. PLOS Neglected Tropical Diseases 8(4).

<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002831>. Viitattu 12.4.2018.

Adamu H, Petros B, Hailu A & Petry F. 2010. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Ethiopia. Acta Tropica 115(1-2): 77-83. Elsevier.

Aho P. 2002. Lähiympäristön vaikutus vasikoiden ja lihanautojen hyvinvointiin. Teoksessa: Yliaho M & Teräväinen H (toim.). Nauta- ja sikatilan olosuhdeopas. Vantaa: ProAgria Maaseutukeskusten Liitto. s. 15-20.

Altman D G & Bland J M. 1994. Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. The British Medical Journal 308(6943): 1552.

Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal A, Matos O & Antunes F. 2003. Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal. Journal of Clinical Microbiology 41(6): 2744-2747. American Society of Microbiology.

Apley M D & Coetsee J F. 2013. Antimicrobial Drug Use in Cattle. Teoksessa: Giguere S, Prescott J F & Dowling P M (toim.). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 5. painos. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell. s. 495-518.

Autio T. 2013a. Vasikkaperäiset kryptosporidioosit. Esitelmämateriaali. Eläinlääkäripäivät. Helsingissä 29.11.2013.

Autio T. 2013b. Vasikkaperäiset kryptosporidioosit. Eläinlääkäripäivät. Luentokokooma. Helsinki: Fennovet Oy. s.259-260.

Autio T, Karhukorpi J, Mäkelä M, Meri T, Savolainen S & Rimhanen-Finne R. 2012. Kotoperäinen kryptosporidioosi – alidiagnosoitu tauti. Duodecim 128(18): 1887-1890. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim.

Bandyopadhyay K, Kellar K L, Moura I, Carallo M C C, Graczyk T K, Slemenda S, Johnston S P & de Silva A. 2007. Rapid Microsphere Assay for Identification of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* in Stool and Environmental Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 45(9): 2835-2840. American Society of Microbiology.

Bauerfeind R, Von Graevenitz A, Kimmig P, Schiefer H, Schwarz T, Slenczka W & Zahner H (toim.). 2016. Zoonoses, Infectious Diseases Transmissible Between Animals and Humans. 4. painos. Washington, DC, USA: ASM Press. s. 324-327.

Borad A & Ward H. 2010. Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiology* 5(3): 507-519.

Caccio S M & Putignani L. 2014. Epidemiology of Human Cryptosporidiosis. Teoksessa: Caccio S M & Widmer G (toim.). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Wien, Itävalta: Springer. s. 43-79.

Cama V A, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling C R, Ortega Y, Gilman R H & Xiao L. 2008. *Cryptosporidium* Species and Subtypes and Clinical Manifestions in Children, Peru. *Emerging Infectious Diseases* 14(10): 1567-1574.

Chalmers R M & Davies A P. 2010. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology* 124(1): 138-146. Elsevier.

Chappell C L, Okhuysen P C, Sterling C R & DuPont H L. 1996. *Cryptosporidium parvum*: Intensity of Infection and Oocysts Excretion Patterns in Healthy Volunteers. *Journal of Infection diseases* 173(1): 232-236.

Cooper V S. 2006. The Study of Microbial Adaptation by Long-Term Experimental Evolution. Teoksessa: Seifert H S & DiRita V J (toim.). *Evolution of Microbial Pathogens*. Washington, DC, USA: ASM Press. s. 55-82.

Current W L & Garcia L S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Review* 4(3): 325-358.

Darwish I A. 2006. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *International Journal of Biomedical Science* 2(3): 217-235.

Dowling P M. 2013. Aminoglycosides and Aminocyclitols. Teoksessa: Giguere S, Prescott J F & Dowling P M (toim.). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 5. painos. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell. s. 233-255.

DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. 2017. Cryptosporidiosis. <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA, USA. Viitattu 27.10.2017.

Drumo R, Widmer G, Morrison L J, Tait A, Grelloni V, D'Avino N, Pozio E & Caccio S M. 2012. Evidence of Host-Associated Populations of *Cryptosporidium parvum* in Italy. Applied and Environmental Microbiology 78(10): 3523-3529. American Society of Microbiology.

DuPont H L, Chappell C L, Sterling C R, Okhuysen P C, Rose J B & Jakubowski. 1995. The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. The New England Journal of Medicine 332: 855-859.

Eshetu T, Sibhatu G, Megiso M, Abere A, Baynes H W, Biadgo B & Zeleke A J. 2017. Intestinal Parasitosis and Their Associated Factors among People Living with HIV at University of Gondar Hospital, Northwest-Ethiopia. Ethiopian Journal of Health Science 27(4): 411-420.

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2017. Eläintaudit Suomessa 2016. Eviran julkaisuja 2(2017): 62 s. Helsinki.

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2016a. Tiedote. <https://www.evira.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/ajankohtaista-elaintaudeista/2016/useita-cryptosporidium-tartuntoja-pohjanmaalla/>. Helsinki. Viitattu 22.2.2018.

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2016b. Vasikkaripulinäytteen tutkiminen. Menetelmäohje LAB 2309/4. Eläintautibakteriologian tutkimusyksikkö. Kuopio: 1 s.

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2012a. *Cryptosporidium*-loisen osoittaminen ulostenäytteistä, lajimääritys ja *Cryptosporidium parvum* genotyypitys. Menetelmäohje Evira 2045/1. Eläintautibakteriologian tutkimusyksikkö. Kuopio: 10 s.

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2012b. Vasikkaripuli-ELISA (rota- ja koronaviruksen osoittaminen vasikan ulosteesta). Työohje LAB 2310/3. Eläintautibakteriologian tutkimusyksikkö. Kuopio: 2 s.

Eläinten hyvinvointikeskus EHK. 2018. Nauta tuotantoeläimenä. <http://www.elaintieto.fi/nauta-tuotantoelaimena/>. Viitattu 30.4.2018. Helsinki.

Eskola S, Finnilä T, Hohenthal U & Oksi J. 2016. Vastadiagnosoitujen HIV-potilaiden kliininen kuva ja kokonaistilanne Tyksissä vuonna 2013. Duodecim 132(21): 2001-2008. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim.

Eläinten Terveystieteiden tutkimuskeskus ETU. 2011. Vasikan hoidon ABC. https://www.ett.fi/sites/default/files/user_files/terveydenhuolto/vasikkakuolleisuus/VASIKA_N%20HOIDON%20ABC_26.05.2011.pdf. Eläinten Terveys ETT Ry. Seinäjoki. Viitattu 3.5.2018.

Fassisi. 2017. <https://en.fassisi.de/products/livestock-animals/cattle-bodia/>. Göttingen, Saksa: Fassisi, Gesellschaft für Veterinärmedizin und Umweltanalysen mbH. Viitattu 4.1.2018.

Fassisi BoDia. 2017. Käyttöohje. Der Schnelltest bei Kälberdurchfall. Zul. –Nr.: FLI-B 458. Göttingen, Saksa.

Fayer R, Gasbarre L, Pasquali P, Canals A, Almeria S & Zarlenga D. 1998. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. International Journal of Parasitology 28(1): 49-56. Elsevier.

Feng Y, Tiao N, Li N, Hlavsa M & Xiao L. 2014. Multilocus Sequence Typing of an Emerging *Cryptosporidium hominis* Subtype in the United States. Journal of Clinical Microbiology 52(2): 524-530. American Society of Microbiology.

Feng Y, Torres E, Li N, Wang L, Bowman D & Xiao L. 2013. Population genetic characterization of dominant *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA15G2R1. International Journal of Parasitology 43(14): 1141-1147. Elsevier.

Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, Fayer R, Gatei W, Cama V & Xiao L. 2007. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. Veterinary Parasitology 144(1-2):1-9. Elsevier.

Garcia L S & Shimizu R Y. 1997. Evaluation of Nine Immunoassay Kits (Enzyme Immunoassay and Direct Fluorescence) for Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 35(6): 1526-1529. American Society of Microbiology.

Gerba C P. 2015. Environmentally Transmitted Pathogens. Teoksessa: Pepper I L, Gerba C P & Gentry T J. *Environmental Microbiology*. 3. painos. San Diego, CA, USA: Elsevier Inc. s. 509-550.

Hadfield S J, Pachebat J A, Swain M T, Robinson G, Cameron S JS, Alexander J, Hegarty M J, Elwin K & Chalmers R M. 2015. Generation of whole genome sequences of new *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* isolates directly from stool samples. *BMC Genomics* 16(1): 650. BioMed Central.

Hartmeyer G N, Hoegh S V, Skov M N, Dessau R B & Kemp M. 2017. Selecting PCR for the Diagnosis of Intestinal Parasitosis: Choice of Targets, Evaluation of In-House Assays, and Comparison with Commercial Kits. *Journal of Parasitology Research* 2017(6205257): 6.

Hunter P R & Nichols G. 2002. Epidemiology and Clinical Features of *Cryptosporidium* Infection in Immunocompromised Patient. *Clinical Microbiology Reviews* 15(1): 145-54. American Society for Microbiology.

Huuskonen A, Kivinen T, Hokkanen A-H & Herva T. 2014. Kestovasikka – tuloksia Kestävä karjatalous -hankkeen vasikkatutkimuksista. MTT Raportti 166 -julkaisu. Jokioinen: MTT. 109 s.

Imre K & Dărăbuș G. 2011. Distribution of *Cryptosporidium* species, genotypes and *C. parvum* subtypes in cattle in European countries. *Scientific Parasitology* 12(1): 1-9.

Jaakola S, Lyytikäinen O, Rimhanen-Finne R, Salmenlinna S, Vuopio J, Roivainen M, Nohynek H, Löflund J-E, Kuusi M & Ruutu P. 2013. Tartuntataudit Suomessa 2012. Raportti 10/2013. Helsinki: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (THL). 66 s.

Jay J M, Loessner M J & Golden D A. 2005. *Modern Food Microbiology*. 7. painos. New York, USA: Springer. s. 679-708.

Jokiranta S, Siikamäki H & Meri S. 2003. Parasitologinen diagnostiikka. Teoksessa: Huovinen P, Meri S, Peltola H, Vaara M, Vaheri A & Valtonen V (toim.). Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja II. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. s. 39-52.

Kerttula A-M & Lavikainen A. 2017. Nukleiinihapon osoitus parasitologisessa diagnostiikassa. Duodecim 133(8): 742-748. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim.

Khalil I A, Troeger C, Rao P C, Blacker B F, Brown A, Brewer T G, Colobara D V, De Hostos E L, Engmann C, Guerrant R L, Haque R, Houpt E R, Kang G, Korpe P S, Kotloff K L, Lima A A, Petri W A, Platts-Mills J A, Shoultz D A, Forouzanfar M J, Hay S I, Reiner R C & Mokdad A H. 2018. Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from *Cryptosporidium* infection in children younger than 5 years: a meta-analysis study. The Lancet 6(7): 758-768.

Kinross p, Beser J, Troell K, Silverlås C, Björkman C, Lebbad M, Winiecka-Krusnell J, Lindh J & Löfdahl M. 2015. *Cryptosporidium parvum* infections in a cohort of veterinary students in Sweden. Epidemiology and Infection 143(13): 2748-2756. Cambridge University Press.

Kirkpatrick B D, Noel F, Rouzier P D, Powell J L, Pape J W, Bois G, Alston W K, Larsson C J, Tenney K, Powden C V, Sreenivasan M & Sears C. 2006. Childhood Cryptosporidiosis Is Associated with a Persistent Systemic Inflammatory Response. Clinical Infectious Diseases 43(5): 604-608.

Koikkalainen K, Miettinen A & Wallenius E. 2015. Selvitys Manner-Suomen maaseudun kehittämisohjelmaan 2007-2013 sisältyneen eläinten hyvinvoinnin tuen vaikutuksista. Maa- ja metsätalousministeriön julkaisuja 8(2015): 43 s. Maa- ja metsätalousministeriö (MMM).

Krauss H, Weber A, Appel M, Enders B, Isenberg H D, Schiefer H G, Slenczka W, von Graevenitz A & Zahner H. 2003. Zoonoses: Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans. 3. painos. Washington, DC, USA: ASM Press. s. 278-280.

Lappalainen E. 2012. Syötäväksi kasvatetut. Jyväskylä: Atena Kustannus Oy. 355 s.

Lawrence J G. 2006. Studying Evolution Using Genome Sequence Data. Teoksessa: Seifert H S & DiRita V J (toim.). Evolution of Microbial Pathogens. Washington, DC, USA: ASM Press. s. 11-34.

Leitch G J & He Q. 2011. Cryptosporidiosis – an overview. *The Journal of Biomedical Research* 25(1): 1-6.

Lopez-Velez R, Tarazona R, Camacho A G, Gomez-Mampaso E, Guerrero A, Moreira V & Villanueva R. 1995. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14(8): 677-681.

Lumio J. 2018. Alkueläinten aiheuttamat suolistoinfektiot. Lääkärikirja Duodecim. https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01172. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 3.4.2018.

Lähteinen P. 2012. Antibiootit vasikkaripulin hoidossa, kirjallisuuskatsaus. Lisensiaatin tutkielma. Helsingin yliopisto, eläinlääketieteellinen tiedekunta, kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto. 47 s.

Madigan M T, Martinko J M, Bender K S, Buckley D H & Stahl D A. 2015. *Brock Biology of Microorganisms*. 14. painos. Lontoo, UK: Pearson Education Limited. 1040 s.

Mac Kenzie W R, Hoxie N J, Proctor M E, Gradus M S, Blair K A, Peterson D E, Kazmierczak J J, Addiss D G, Fox K R, Rose J B & Davis J P. 1994. A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted through to Public Water Supply. *The New England Journal of Medicine* 331(3): 161-167.

Mattila L & Järvinen A. 2011. Maha-suolikanavan infektiot ja ripulitaudit. Teoksessa: Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P, Järvinen A, Meri S & Vaara M. *Infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. s. 475-503.

Mead J R & You X. 1998. Susceptibility Differences to *Cryptosporidium parvum* Infection in Two Strains of Gamma Interferon Knockout Mice. *The Journal of Parasitology* 84(5): 1045-1048.

Meale S J, Li S, Azevedo P, Derakhshani H, De Vries T J, Plaizier J C, Steele M A & Khafipour E. 2017. Weaning age influences the severity of gastrointestinal microbiome shifts in dairy calves. *Scientific Reports* 7: 198-211.

Meale S J, Li S, Azevedo P, Derakhshani H, Plaizier j C, Khafipour E & Steele M A. 2016. Development of Ruminant and Fecal Microbiomes Are Affected by Weaning But Not Weaning Strategy in Dairy Calves. *Frontiers in Microbiology* 7: 582-595.

Medema G, Teunis P, Blokker M, Deere D, Davison A, Charles P, Loret J-F. 2006. *Cryptosporidium*. WHO Guidelines for Drinking Water Quality. EHC *Cryptosporidium* draft 2. World Health Organization (WHO).

Mehlhorn H (toim.). 2008. *Encyclopedia of Parasitology*. 3. painos. New York, USA: Springer. s. 301-305.

Morgan-Ryan U N, Fall A, Ward L A, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, Thompson R C, Olson M, Lal A & Xiao L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49(6): 433-440. Society of Protozoologists.

Nazemalhosseini-Mojarad E, Haghighi A, Taghipour N, Keshavarz A, Mohebi S R, Zali M R & Xiao L. 2011. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from human and cattle in Iran. *Veterinary Parasitology* 179(1-3): 250-252. Elsevier.

Nichols G L, Chalmers R M & Hadfield S J. 2014. *Molecular Epidemiology of Human Cryptosporidiosis*. Teoksessa: Caccio S M & Widmer G (toim.). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Wien, Itävalta: Springer. s. 81-147.

Nolte F S & Wittwer C T. 2016. *Nucleic Acid Amplification Methods Overview*. Teoksessa: Persing D H, Tenover F C, Hayden R T, Ieven M, Miller M B, Nolte F S Tang Y-W & van Belkum A (toim.). *Molecular Microbiology*. 3. painos. Washington, DC, USA: ASM Press. s. 3-18.

Nydam D V, Wade S E, Schaaf S L & Mohammed H O. 2001. Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp cysts shed by dairy calves after natural infection. *American Journal of Veterinary Research* 62(10): 1612-1615.

O'Connor R M, Mackay M R & Ward H D. 2004. *Molecular Approaches for Detection, Species Identification, and Genotyping of Cryptosporidium*. Teoksessa: Persing D H, Tenover F C, Versalovic J, Tang Y-W, Unger E R, Relman D A & White T J (toim.). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Washington, DC, USA: ASM Press. s. 583-601.

O'Hara S P & Chen X-M. 2011. The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes and Infection* 13(8-9): 721-730. Elsevier.

Okhuysen P C, Chappell C L, Crabb J H, Sterling C R & DuPont H L. 1999. Virulence of Three Distinct *Cryptosporidium parvum* Isolates for Healthy Adults. *The Journal of Infection Diseases* 180(4): 1275-1281.

Peek S F, McGuirk S M, Sweeney R W & Cummings K J. 2018. *Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract*. Teoksessa: Peek S F & Divers T J (toim.). *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. 3. painos. St. Louis, MO, USA: Elsevier Inc. s. 249-356.

Peltola H. 1997. Minkä makrolidin valitsen ja miksi? *Duodecim* 113(19): 1931. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim.

Pollok R C, Farthing M J, Bajaj-Elliott M, Sanderson I R & McDonald V. Interferon gamma induces enterocyte resistance against infection by the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology* 120(1): 99-107.

Pönkä A, Kotilainen H, Rimhanen-Finne R, Hokkanen P, Hänninen M L, Kaarna A, Meri T & Kuusi M. 2009. A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki, November 2008. *Eurosurveillance* 14(28).

Riihikoski U. 1982. *Vasikan ja lihanaudan terveydenhoito*. Helsinki: Kirjayhtymä. 191 s.

Rimhanen-Finne R. 2013. *Kryptosporidioosiepidemiat Suomessa*. *Eläinlääkäripäivät*. Luentokokoelma. Helsinki: Fennovet Oy. s.253-255.

Robertson L J, Björkman C, Axen C & Fayer R. 2014. *Cryptosporidiosis in Farmed Animals*. Teoksessa: Caccio S M & Widmer G (toim.). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Wien, Itävalta: Springer. s. 149-235.

Ryan U & Xiao L. 2014. *Taxonomy and Molecular Taxonomy*. Teoksessa: Caccio S M & Widmer G (toim.). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Wien, Itävalta: Springer. s. 3-41.

Räsänen S. 2012. *Cryptosporidium* aiheuttamat ripuliepidemiat. Ajankohtaisia infektioasioita 5(2012). Tampereen kaupunki, Tays. s. 2.

Sachse K. 2003. Specificity and Performance of Diagnostic PCR Assays. Teoksessa: Sachse K & Frey J (toim.). PCR Detection of Microbial Pathogens. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc. s. 3-30.

Sallon S, Deckelbaum R J & Schmid I I. 1988. *Cryptosporidium*, Malnutrition, and Chronic Diarrhea in Children. American Journal of Diseases of Children 142(3): 312-315.

Santin M, Trout J M & Fayer R. 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. Veterinary Parasitology 155(1-2): 15-23.

Schmidt G D & Roberts L S. 2005. Foundations of Parasitology. 7. painos. New York, NY, USA: McGraw-Hill, Inc. s. 123-146.

Scott P, Hall G, Jones P & Morgan J. 2004. Calf Diarrhoea. Teoksessa: Andrews A, Blowey R, Boyd H & Eddy R (toim.). Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. s. 185-214.

Shikani H & Weiss L M. 2014. Human Cryptosporidiosis: A Clinical Perspective. Teoksessa: Caccio S M & Widmer G (toim.). *Cryptosporidium*: parasite and disease. Wien, Itävalta: Springer.

Siikamäki H, Jokiranta S & Meri S. 2010. Alkueläimet. Teoksessa: Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P, Järvinen A, Meri S & Vaara M. Mikrobiologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. s. 338-381.

Siikamäki H, Kyrönseppä H & Jokiranta S. 2002. Suoliston parasiitti-infektiot. Duodecim 118(12): 1235-1247. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim.

Silverlås C, Bosaeus-Reineck H, Näslund K & Björkman C. 2013. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? International Journal of Parasitology 43(2): 155-161. Elsevier.

Strong W B, Gut J & Nelson R G. 2000. Cloning and Sequence Analysis of a Highly Polymorphic *Cryptosporidium parvum* Gene Encoding a 60-Kilodalton Glykoprotein and Characterization of Its 15- and 45-Kilodalton Zoite Surface Antigen Products. *Infection and Immunity* 68(7): 4117-4134.

Sulaiman I, Hira P, Zhou L, Al-Ali F, Al-Shelahi F, Shweiki H, Iqbal J, Khalid N & Xiao L. 2005. Unique Endemicity of Cryptosporidiosis in Children in Kuwait. *Journal of Clinical Microbiology* 43(6): 2805-2809. American Society for Microbiology.

Sun T. 1988. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Parasitology*. New York, USA: Igaku-Shoin Medical Publishers, Inc. s. 60-63.

Suomen zoonoosistrategia 2013-2017. 2013. Eläinten ja ihmisten välillä tarttuvat taudit. Työryhmämuistio 2013:1, Maa- ja metsätalousministeriö, sosiaali- ja terveysministeriö. Helsinki.

Taylor M A, Coop R L & Wall R L. 2007. *Veterinary Parasitology*. 3. painos. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. 874 s.

Taylor M. 2004. Antiparasitics. Teoksessa: Andrews A, Blowey R, Boyd H & Eddy R (toim.). *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. s. 1019-1034.

Tenhunen M J. 2011. Vastasyntyneiden vasikoiden infektiot –ohje. https://www.ett.fi/sites/default/files/user_files/terveydenhuolto/vasikkakuolleisuus/Vastasyntyneiden%20vasikoiden%20infektiot.pdf. Eläinten Terveys ETT Ry, ETU-Nautatautiryhmä. Seinäjoki. Viitattu 25.1.2018.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos THL. 2018. Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta: Kryptosporidioosi. https://sampo.thl.fi/pivot/prod/fi/ttr/shp/fact_shp?row=area-12260&column=time-12059&filter=reportgroup-12109. Viitattu 31.1.2018.

Tirkkonen M. 2018. Kryptosporidioosi on vakava sairaus ihmiselle ja vasikalle. *MKVET Kotieläinten Terveystiedote* 1(23): 38-41.

Trotz-Williams L A, Jarvie B D, Martin S W, Leslie K E & Peregrine A S. 2005. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *The Canadian Veterinary Journal* 46(4): 349-351.

Thrusfield M. 2005. *Veterinary epidemiology*. 3. painos. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. s. 357-367.

Utriainen M. 2010a. Ripulivasikan lääkitseminen/ Ohje eläinlääkärille. https://www.ett.fi/sites/default/files/user_files/terveydenhuolto/E%20ElainlaakarilleRipulivasikanhoito-ohje.pdf. Eläinten Terveys ETT Ry, Nautatautiryhmä. Seinäjoki. Viitattu 25.1.2018.

Utriainen M. 2010b. Ripulivasikan hoito-ohje tuottajalle. https://www.ett.fi/sites/default/files/user_files/terveydenhuolto/D%20TuottajalleRipulivasikanhoito-ohje.pdf. Eläinten Terveys ETT Ry, Nautatautiryhmä. Seinäjoki. Viitattu 25.1.2018.

Utriainen M. 2010c. Ternimaito. https://www.ett.fi/sites/default/files/user_files/terveydenhuolto/G%20Ternimaito-ohje.pdf. Eläinten Terveys ETT Ry, Nautatautiryhmä. Seinäjoki. Viitattu 25.1.2018.

Uzal F A, Plattner B L & Hostetter J M. 2016. *Alimentary System*. Teoksessa: Maxie M G (toim.). Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, volume 2. 6. painos. St. Louis, MO, USA: Elsevier Inc. s. 1-257.

Verweij J, van Belkum A & Stenvold C R. 2016. Molecular detection of Gastrointestinal Parasites. 2016. Teoksessa: Persing D H, Tenover F C, Hayden R T, Ieven M, Miller M B, Nolte F S Tang Y-W & van Belkum A (toim.). *Molecular Microbiology*. 3. painos. Washington, DC, USA: ASM Press. s. 530-541.

Verweij J, Blange R A, Templeton K, Schinkel J, Brienen E A, van Rooyen M A, van Lieshout L & Polderman A M. 2004. Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42(3): 1220-1223. American Society for Microbiology.

Vesikari T. 2003. Maha-suolikanavan infektiot ja ripulitaudit. Teoksessa: Huovinen P, Meri S, Peltola H, Vaara M, Vaheri A & Valtonen V (toim.). *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*, kirja II. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. s. 403-414.

Wallenius E. 2014. Mansikin maidot molemmille?

<https://www.sey.fi/ajankohtaista/blogi/536-mansikin-maidot-molemmille>. Suomen Eläinsuojeluyhdistysten liitto ry. Helsinki. Viitattu 22.3.2018.

Weber R, Bryan R T & Juranek D D. 1992. Improved Stool Concentration Procedure for Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 30(11): 2869-2873.

Westermeier R. 2005. *Electrophoresis in Practice*. 4. painos. Weinheim, Saksa: Wiley-VCH. 403 s.

Xiao L. 2009. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology* 124(2010): 80-89. Elsevier Inc.

Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M & Lal A. 2000. Identification of Species and Sources of *Cryptosporidium* Oocysts in Storm Waters with a Small-Subunit rRNA-Based Diagnostic and Genotyping Tool. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12): 5492-5498. American Society for Microbiology.

Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante A A, Montali R J, Fayer R & Lal A A. 1999. Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* Parasites Based on the Small-Subunit rRNA Gene Locus. *Applied and Environmental Microbiology* 65(4): 1578-1583. American Society for Microbiology.

Xu P, Widmer G, Wang Y, Ozaki L S, Alves J M, Serrano M G, Puiu D, Manque P, Akiyoshi D, Mackey A J, Pearson W R, Dear P H, Bankier A T, Peterson D L, Abrahamsen M S, Kapur V, Tzipori S & Buck G A. 2004. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 431(7012): 1107-1112.

Yang R, Murphy C, Song Y, Ng-Hublin J, Estcourt A, Hijjawi N, Chalmers R, Hadfield S, Bath A, Gordon C & Ryan U. 2013. Specific and quantitative detection and identification of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in clinical and environmental samples. *Experimental Parasitology* 135(1): 142-147. Elsevier Inc.

Åberg R, Sjöman M, Hemminki K, Pirnes A, Räsänen S, Kalanti A, Pohjanvirta T, Caccio S M, Pihlajasaari A, Toikkanen S, Huusko S & Rimhanen-Finne R. 2015. *Cryptosporidium parvum* Caused a Large Outbreak Linked to Frisee Salad in Finland, 2012. *Zoonoses Public Health* 62(8): 618-624.