

GIARDIA-KYSTIEN JA *CRYPTOSPORIDIUM*-OOKYSTIEN TOTEAMINEN
JA TUNNISTAMINEN VESINÄYTTEISTÄ, MENETELMÄN PYSTYTYS
JA KÄYTTÖÖNOTTOVALIDOINTI

Sara Kovanen
Pro gradu -tutkielma
Ympäristötieteen koulutusohjelma
Ympäristötieteen laitos
Itä-Suomen yliopisto
Marraskuu 2010

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Ympäristötieteen koulutusohjelma, Ympäristöterveyden pääaine

KOVANEN SARA: *Giardia* kystien ja *Cryptosporidium* ookystien toteaminen ja tunnistaminen vesinäytteistä, menetelmän pystytys ja käyttöönottovalidointi

Pro Gradu- tutkielma 68 sivua

Tutkielman ohjaajat: FT, dos. Ilkka Miettinen

FT, dos. Eila Torvinen

FM Anna- Maria Hokajärvi

Marraskuu 2010

avainsanat: *Giardia*, *Cryptosporidium*, raakavesi, jätevesi, IMS, talousveden turvallisuus

Giardia ja *Cryptosporidium* ovat alkueläimiä, jotka aiheuttavat suolistosairauksia elimistöön päästessään; *Giardia duodenalis* (synonyymejä *Giardia lamblia* ja *Giardia intestinalis*) aiheuttaa ihmisillä giardiaasin ja *Cryptosporidium parvum* sekä *Cryptosporidium hominis* kryptosporidioosin. Näillä alkueläimillä on kaksi elinkykyistä muotoa: ympäristössä hyvin säilyvä kystamuoto sekä suolistossa elävä infektion aiheuttava muoto. Näitä alkueläimiä löytyy kaikkialta maailmasta vesistöistä, joihin ne pääsevät mm. jätevesien mukana ja valumavesien välityksellä. Alkueläinten (oo)kystat säilyvät ympäristössä ja kestävät ympäristön muutoksia hyvin ja saattavat läpäistä talousvedentuotannon puhdistusprosesseja. Etenkin *Cryptosporidiumin* ookystat kestävät erityisen hyvin talousveden desinfioinnissa käytettävää klooria. Tästä syystä on tärkeää tutkia näiden alkueläinten esiintyvyyttä ympäristössä ja mahdollisuutta aiheuttaa sairauksia vesivälitteisesti.

Giardian ja *Cryptosporidiumin* tunnistamiseen ja toteamiseen vesinäytteistä on kehitetty kansainvälinen standardimenetelmä ISO 15553, joka pohjautuu samansisältöiseen USEPA:n menetelmään 1623. Sen mukaan suuria vesitilavuuksia suodatetaan patruunasuodattimen läpi, jonka jälkeen suodattimelta eluoidaan mahdolliset (oo)kystat, konsentroidaan näyte sentrifugoimalla ja analysoidaan syntynyt saostumapelletti immunomagneettisella separaatiolla. Lopulta eristetyt alkueläinten (oo)kystat värjätään objektilasilla FITC- ja DAPI-väreillä ja tunnistetaan epifluoresenssimikroskoopilla.

Tämän työn tarkoituksena oli pystyttää menetelmä (standardin ISO 15553 mukaisesti) *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* analysoimiseksi vedestä. Työssä tunnistettiin ja todettiin (oo)kystia tunnetuista positiivikontrollinäytteistä ja varsinaisista vesinäytteistä. Menetelmää testattiin alkuvaiheessa pinta- ja verkostovesille. Menetelmää sovellettiin myös alkueläinten analysoimiseen puhdistetusta jätevedestä.

Menetelmän todettiin toimivan, sillä (oo)kystia havaittiin kaikista sellaisista näytteistä, joihin oli lisätty positiivikontrollia. Varsinaisista raakavesinäytteistä, joihin ei ollut lisätty positiivikontrollia, mahdollisia (oo)kystia löytyi muutamista näytteistä. Yhdestä puhdistetusta jätevesinäytteestä pystyttiin toteamaan *Giardian* kysta.

Menetelmän merkittävimmät haasteet käyttöönottovalidoinnissa liittyivät (oo)kystien tunnistamiseen mikroskoopilla. Pinta- ja jätevesinäytteet ovat haasteellisia analysoitavia veden laatunsa vuoksi, sillä mikroskopoidessa mahdollisia (oo)kystia on vaikea erottaa taustapartikkeleista. Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet menetelmässä olevan myös vaihtelevia saantoja. Tuloksista voidaan päätellä, että suomalaisissa pintavesissä esiintyy todennäköisesti vain vähän *Giardia* ja *Cryptosporidium* alkueläimiä.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Science and Forestry, Degree programme in Environmental Science

KOVANEN SARA: Detection and identification of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts from water samples, building and validation the method

Master's thesis, 68 p.

Supervisors of master's thesis: Dr., doc. Ilkka Miettinen

Dr., doc. Eila Torvinen

M. Sc. Anna- Maria Hokajärvi

November 2010

keywords: *Giardia*, *Cryptosporidium*, raw water, sewage water, IMS, safety of drinking water

Giardia and *Cryptosporidium* are parasites causing gastrointestinal diseases. *Giardia duodenalis* (*Giardia lamblia* and *Giardia intestinalis* are synonyms) cause giardiasis and *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* cause cryptosporidiosis in human. These parasites have two living forms: (oo)cysts that occur in the environment and infective form that lives in intestines and cause infection. The parasites occur in waters worldwide and they can enter to surface waters via waste waters, rainfalls and surface runoffs. (Oo)cysts are very permanent in the environment and they are resistant to environmental stress and they may also pass the purification processes of water. Especially *Cryptosporidium* oocysts are very resistant to chlorine used as disinfectant in water production. It is important to investigate the occurrence of (oo)cysts and their possibility to cause waterborne diseases.

An international standard method ISO 15553, that is based in USEPA method 1623, has been developed for the detection and identification of *Giardia* and *Cryptosporidium*. In the method, a large volume of water is filtered through a cartridge filter. After filtration, the capsule is eluated and concentrated by centrifugation and pellet is analysed by immunomagnetic separation (IMS). Finally the concentrated sample is stained in a microscopy slide with FITC and DAPI staining and analysed by an epifluorescence microscope.

The object of this study was to build up the method (ISO 15553) for the detection and identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from water. In this study the object was to detect (oo)cysts from water samples spiked with positive control of (oo)cysts and from real water samples. The method was first tested for tap and surface water and then also for purified wastewater.

The method worked and (oo)cysts were detected from every sample that were spiked with the positive controls. Possible (oo)cyst-like bodies were detected in few raw water samples without spiking. One *Giardia* cyst was identified from a purified wastewater sample.

There were some difficulties when validating the method: microscopy was difficult and according to earlier studies the recoveries are variable. Low number of (oo)cysts in Finnish waters hampered the validation. Samples from surface water and purified waste water are difficult to analyze because the water can be very turbid or dirty. The other particles present may be confused with (oo)cysts in microscopy.

Esipuhe

Tein Pro Gradu- työni Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksella (THL), Ympäristöterveyden osaston Vesi ja terveys -yksikössä. Työni kokeellinen laboratorio- osuus toteutettiin heinäkuun 2009 – lokakuun 2009 välisenä aikana osana THL:n ja sosiaali- ja terveysministeriön yhteistyöhanketta ”Talous- ja uimavesien mikrobianalytiikan kehittäminen”. Osarahoitus työhön saatiin THL:n ERKKA ja POLARIS tutkimusprojekteista, joita rahoittavat Vesihuoltolaitosten kehittämisrahasto ja TEKES.

Erytisesti haluan kiittää ohjaajaani FM Anna-Maria Hokajärveä, joka auttoi minua menetelmän pystytyksessä sekä käytännön laboratoriotöissä ja on jaksanut olla aina kannustava ja kärsivällinen. Haluan kiittää myös muita ohjaajiani Dosentti Eila Torvista sekä Dosentti Ilkka Miettistä, joista viimeksi mainittu on myös yksikkömme päällikkö ja antoi mahdollisuuden tämän työn toteuttamiseen. Kiitokset kuuluu myös Pro gradu -aiheeni valinnassa ja sen toteuttamisessa minua ohjeistaneelle FT Tarja Pitkäselle sekä kaikille työtovereilleni, joilta on aina voinut kysyä apua ja jotka ovat minua jaksaneet kannustaa.

Kuopiossa 17.11.2010

Sara Kovanen

Lyhenteet ja määritelmät

CRF= Centrifugal rotation force, keskipakoiskierrosvoima

DAPI= 4', 6-diamidino-2-phenylindole

DIC= Differentiaali- interferenssikontrasti

FITC= Fluorescein isothiocyanate

IFA= Immuno fluorescence assay, immunofluoresenssimäärittäminen

IMS= Immunomagneettinen separaatio

mAB= monoklonaalinen antibodi

(Oo)kysta= *Giardia* kysta tai *Cryptosporidium* ookysta

PCR= Polymerase chain reaction, polymeerasiketjureaktio

PI= Propidium jodidi

RPM= kierrosta/ minuutti

RT-PCR= Realtime PCR

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	8
2 KIRJALLISUUSKATSAUS.....	9
2.1 <i>GIARDIA</i> - JA <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> -ALKUELÄIMET	9
2.1.1 <i>Giardia</i>	9
2.1.1.1 Giardiaasi	11
2.1.1.2 <i>Giardian</i> elinkierto.....	13
2.1.2 <i>Cryptosporidium</i>	13
2.1.2.1 Kryptosporidioosi.....	14
2.1.2.2 <i>Cryptosporidiumin</i> elinkierto	16
2.2 <i>GIARDIA</i> JA <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> YMPÄRISTÖSSÄ.....	17
2.3 <i>GIARDIAN</i> JA <i>CRYPTOSPORIDIUMIN</i> KESTÄVYYS VEDENPUHDISTUSPROSESSEISSA	19
2.4 <i>GIARDIAN</i> JA <i>CRYPTOSPORIDIUMIN</i> AIHEUTTAMAT EPIDEMIAAT	21
2.5 <i>GIARDIAN</i> KYSTIEN JA <i>CRYPTOSPORIDIUMIN</i> OOKYSTIEN MÄÄRITTÄMINEN.....	24
2.5.1 Erilaisia sovelluksia suodatus/ IMS/ IFA- menetelmällä.....	25
2.5.2 Saantotutkimukset	26
2.5.3 (Oo)kystien elävyyden määrittäminen	27
2.5.3.1 Ekskystaatio	28
2.5.3.2 Vitaalivärjäys	28
2.5.3.3 Soluviljely	29
2.5.4 PCR- detektio	30
3 TYÖN TAVOITTEET	31
4 AINEISTO JA MENETELMÄT	32
4.1 MENETELMÄN PROTOKOLLA	32
4.1.1 Konsentroidi patruunasuodattimen läpi	32
4.1.2 Eluointi ja eluaatin konsentroidi	33
4.1.3 Immunomagneettinen separaatio (IMS).....	34
4.1.4 Värjäys	35
4.1.5 Mikroskopointi ja (oo)kystien tunnistus	36
4.1.5.1 (Oo)kystien tunnistaminen FITC- asetuksella.....	37
4.1.5.2 (Oo)kystien tunnistaminen DAPI-asetuksella.....	37
4.2 MENETELMÄN VALIDOINTI VERKOSTO- JA RAAKAVESILLE.....	38
4.2.1 Kontrollinäytteet	38
4.2.2 Menetelmän validointi eri eluaatin konsentroiditavoille.....	38

4.2.2.1 Sentrifuugaus.....	39
4.2.2.2 Polykarbonaattisuodatus.....	40
4.3 MENETELMÄN VALIDOINTI PUHDISTETULLE JÄTEVEDELLE	40
4.3.1 Suora konsentroidi	40
4.3.2 Patruunasuodatus.....	41
4.3.3 Polykarbonaattisuodatus	41
4.4 (OO)KYSTIEN ESIINTYMINEN TALOUSVEDEN TUOTANTOON KÄYTETTÄVISSÄ RAAKAVESISSÄ JA JÄTEVESISSÄ.....	42
4.4.1 Tutkimuskohteet.....	42
4.4.2 Raakavesinäytteet.....	43
4.4.2.1 <i>Giardia</i> - ja <i>Cryptosporidium</i> -analyysit.....	44
4.4.2.2 Fysikaalis- kemialliset analyysit	44
4.4.3 Puhdistetut jätevesinäytteet.....	44
5 TULOKSET	45
5.1 MENETELMÄN VALIDOINTI TALOUS- JA PINTAVEDELLE	45
5.1.1 Värjäyskontrollit.....	46
5.1.2 Menetelmän validointi eri eluaatin konsentroititavoilla.....	47
5.2 MENETELMÄN VALIDOINTI PUHDISTETULLE JÄTEVEDELLE	47
5.2.1 Menetelmän validointi eri konsentroititavoilla	47
5.3 (OO)KYSTIEN ESIINTYMINEN TALOUSVEDEN TUOTANTOON KÄYTETTÄVISSÄ RAAKAVESISSÄ JA JÄTEVESISSÄ.....	48
5.3.1 Pinta- ja pohjavesinäytteet	48
5.3.2 Jätevedet.....	49
6 TULOSTEN TARKASTELU	50
7 YHTEENVETO	55
LÄHDELUETTELO	56

1 JOHDANTO

Talousveden turvallisuus koskettaa kaikkia, sillä kaikki tarvitsevat käyttöönsä vettä. Euroopan unionin jäsenmaissa talousveden turvallisuudesta säädetään talousvesidirektiivissä 98/83/EY. Suomessa direktiivi, joka määrää talousveden laadusta ja sen valvonnasta on saatettu voimaan Sosiaali- ja terveysministeriön talousvesiasetuksella 461/2000. Euroopan komissio on käynnistänyt toimet talousvesidirektiivin uudistamiseksi. Uudistamisen lähtökohdaksi on otettu WHO:n lanseeraama Water Safety Plan (WSP) konsepti, jossa pelkän lopputuotteen monitoroinnin sijasta tarkastellaan koko veden tuotanto- ja jakeluketjua veden laatua uhkaavien tekijöiden tunnistamiseksi ja poistamiseksi.

Suolistoinfektioita aiheuttavista alkueläimistä *Giardia* kystat ja *Cryptosporidiumin* ookystat voivat aiheuttaa infektioita veden välityksellä. Suomessa ei ole raportoitu *Giardia* ja *Cryptosporidium* alkueläinten aiheuttamia vesiepidemioita vuosien 1997–2007 välisenä aikana. Kuitenkin *Giardia*-alkueläin oli osasyllisenä tähän mennessä Suomen suurimmassa vesiepidemiassa Nokialla vuonna 2007, mikä osoittaa, että alkueläimet voivat olla uhka myös meillä.

(Oo)kystat sietävät hyvin erilaisia ympäristöstä tulevia altisteita. Erityisesti *Cryptosporidiumin* ookystat kestävät erittäin hyvin talousveden desinfioinnissa käytettävää klooria.

Tämän työn tarkoituksena oli pystyttää menetelmä *Giardia* kystien ja *Cryptosporidiumin* ookystien tunnistamiseksi ja määrittämiseksi talousveden raakavesinä käytettävistä pintavesistä ja puhdistetuista jätevesistä: Alkueläinten määrittäminen perustui standardiin ISO 15553, "Water quality- Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water", ja samansisältöiseen United States Environment Protection Agency: n menetelmään 1623 (method 1623, USEPA 2005). Näytteiden ottokohteina olivat eri puolilla Suomea sijaitsevat vedenottamot ja jätevedenpuhdistamot, jotka olivat mukana "Talousveden raakavesien mikrobiologisen laadun mittaaminen-Erityisanalytiikkavalmiuksien kehittäminen Suomessa (ERKKA)"-projektissa ja/tai "Vedenlaadun kokonaisjärjestelmän kehittäminen (POLARIS)"-projektissa.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 GIARDIA- JA CRYPTOSPORIDIUM-ALKUELÄIMET

Giardia- ja *Cryptosporidium*-alkueläimillä on useita alalajeja, jotka ovat sopeutuneet infektoimaan ja lisääntymään tiettyjen eliöiden suolistoissa (Taulukot 1 ja 2). *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-alkueläimet ovat luonnossa ollessaan kystamuodossa, jotka kestävät hyvin haitallisia ympäristöolosuhteita sekä niiden muutoksia. Suolistoon päästessään ne muuttuvat trofosoiteiksi (*Giardia*) ja sporotsoiteiksi (*Cryptosporidium*), jotka elävät ja lisääntyvät isäntänsä ohutsuolessa ja infektoivat tämän. (Oo)kystat (*Giardia* kystat sekä *Cryptosporidiumin* ookystat) lisääntyvät erittämällä kystamuotoa isäntäeliön suolistoon ja ulosteen mukana ulos ympäristöön, missä ne voivat kulkeutua maaperän kautta esimerkiksi vesistöön ja tartuttaa tätä kautta uusia isäntäorganismeja (Health Canada, 2004; Environment Agency, 2009).

Giardia duodenalis (jonka synonyymejä ovat *Giardia lamblia* sekä *Giardia intestinalis*) ja *Cryptosporidium parvum* sekä *Cryptosporidium hominis* ovat lajeja, jotka pystyvät elämään ihmisen suolistossa ja aiheuttamaan infektion ihmisille (Health Canada, 2004; Environment Agency, 2009).

2.1.1 *Giardia*

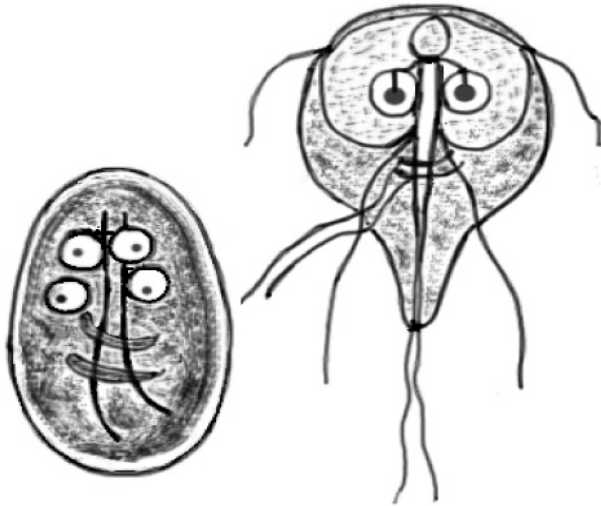
Giardia duodenalis (Kuva 1.) on maailmalla yleinen vatsatauteja aiheuttava alkueläin, joka aiheuttaa ihmiselle taudin nimeltä giardiaasi. *Giardia* (koko 8–12 µm x 7–10 µm) on maailmanlaajuisesti yleisimmin todettu siimaeliö suolistoperäisissä sairauksissa (Marshall ym., 1997). *Giardia duodenalixen* löysi ensimmäistä kertaa mikroskoopin keksijä Antonie van Leeuwenhoek vuonna 1681, joka havaitsi tämän alkueläimen mikroskopoidessaan omaa ulostenäytettään (Mank & Zaat, 2001). *Giardia* elää sekä ihmisten että eläinten suolistossa riippuen lajista ja niitä on löydetty yli 40 eri eläinlajista (Meyer, 1994). Viiden eri *Giardia*-lajin on todettu aiheuttavan infektioita eri isännille (Meyer, 1994) (Taulukko 1).

Taulukko 1. Eri *Giardia*-lajit ja niiden isännät (Caccio ym., 2005)

Laji	Isäntä
<i>Giardia duodenalis</i> * Genoryhmä A, Genotyyppi AI	Ihmiset, koirat, kissat, karja, majavat, marsut
Genoryhmä B, Genotyyppi AII, <i>Giardia enterica</i>	Ihmiset, chinchillat, koirat, majavat, rotat
Genoryhmä C, <i>Giardia canis</i>	Koirat
Genoryhmä D, <i>Giardia bovis</i>	Karja, vuohet, porsaas, alpakat, lampaat
Genoryhmä E, <i>Giardia cati</i>	Kissat
Genoryhmä F, <i>Giardia simondi</i>	Rotat
<i>Giardia microti</i>	Piisamit, myyrät
<i>Giardia muris</i>	Jyrsijät
<i>Giardia agilis</i>	Sammakot
<i>Giardia ardae</i>	Linnut
<i>Giardia psittaci</i>	Linnut

*synonyymejä ovat *Giardia lamblia* ja *Giardia intestinalis*

Giardiaa esiintyy kahtena muotona: liikkuvina ja ravintoa ottavina siimaeläiminä (trofosoiitteina) ja suoliston ulkopuolella erilaisia ympäristöolosuhteita kestävinä kystina (Evira 2010a) (Kuva 1.). Yleisimmin *Giardia* tarttuu ruoansulatuskanavan kautta saastuneen juomaveden ja siitä valmistettujen jäiden välityksellä. Myös suora kosketustartunta on mahdollinen (Evira 2010a).



Kuva 1. *Giardia duodenalis*. Vasemmalla alkueläimen kystamuoto ja oikealla suolistossa elävä trofosoiitti. (Kuva1, www.wormsandgermsblog.com/tags/giardia/)

Giardioilla vallitsee suvuton lisääntyminen ja koska lajikäsité määräytyy suvullisen lisääntymiskyvyn perusteella, on lajeja ollut vaikeaa määrittää. Suuri heterogeeninen vaihtelu eläimistä ja ihmistä eristetyistä *giardioista* (Nash ym., 1985) tekee lajityypityksestä haastavaa ja esimerkiksi *Giardia duodenalis* voidaan jakaa kahteen eri ryhmään (Homan ym., 1992). Vielä on epävarmaa, kuinka *Giardioiden* heterogeenisyys on yhteydessä sen isäntälajiin tai patogeenisyyteen (WHO, 2002).

2.1.1.1 Giardiasis

Giardiasin itämisaika on 2–3 viikkoa ja kystia alkaa erittyä ulosteisiin n. 12–19 päivän kuluttua tartunnasta (Jokipii, Hemila & Jokipii, 1985). Kystia erittyy ulosteisiin 10^6 - 10^8 kappaletta grammaa kohden (Tsuchiya, 1931). Osa ulostenäytteistä ei sisällä kuitenkaan kystia niin paljoa, että niitä pystyttäisiin määrittämään. Eritettyjen kystien runsaus riippuu pitkälti isäntäeliöstä ja *Giardia*-tyypistä.

Taudin oireita ovat ylävatsakivut, pahoinvointi, oksentelu, ilmavaivat ja ripuli. Pitkäkestoinen ripuli voi johtaa painonlaskuun (WHO, 2002). Tauti voi olla myös oireeton, mutta oireettomatkin ihmiset voivat levittää giardiasia. Giardiasis eroaa bakteeriperäisestä turistiripulista pidemmän itämisaikan ja taudin pitkän keston perusteella. Yleensä tauti kestää

alle kolme kuukautta, ja sitä voidaan hoitaa lääkityksellä (Evira, 2010a). Lapsilla giardiaasin on todettu aiheuttavan häiriöitä ravinteiden, kuten rasvojen, A- ja B12-vitamiinien, imeytymisessä (Farthing, 1994). Giardiaasi diagnosoidaan potilaan ulostenäytteestä ja ainakin kolme näytettä tulee ottaa, sillä kystien erittäminen ei välttämättä ole jatkuvaa (Upcroft, 2002).

Tutkimukset vapaaehtoisilla ihmisillä ovat paljastaneet annos-vastesuhteen niellyillä *Giardia* kystillä ja infektioiden määrillä (Rendtorff, 1954), vaikka tarkkaa tietoa elävien kystien määrästä ei ole ollutkaan. Erään tutkimuksen mukaan jo 10 kystan annos on aiheuttanut infektion kaikilla vapaaehtoisilla (2/2) (Rendtorff, 1954) ja toisen tutkimuksen mukaan infektiivinen annos *Giardia duodenaliksella* on 19–50 kystaa (Adam, 2001). Infektion todennäköisyys P_i , voidaan laskea eksponentiaalisella mallilla (Rose ym., 1991).

$$P_i = 1 - e^{-r \times \text{dose}}$$

jossa r eli annos-vaste parametri on 0,0199 (95 % CI 0,0044–0,0566). Yhden tutkimuksen mukaan 53 % vapaaehtoisista sai infektion, mutta yksikään ei saanut giardiaasin oireita ja voidaankin päätellä, että infektion ja sairastumisen välinen suhde vaihtelee eri isolaateilla (Nash ym., 1987). Muut tekijät, kuten infektion saaneiden ikä, ravitsemus, sairastumistaipumus sekä altistuminen infektion lähteelle, määrittävät infektion ilmenemisen (Flannagan, 1992). 16–86 % kantajista on oireettomia (Farthing, 1994).

Ulosteperäinen tarttuminen ihmisestä toiseen on *Giardia* kystien merkittävin kulkeutumisreitti giardiaasin leviämisessä. Elintarvikeperäiset tartunnat ovat peräisin sairastuneista työntekijöistä tai perheenjäsenistä (Osterholm ym., 1981). Eläinten rooli giardiaasin välittämisessä ihmisiin on vielä epäselvää. Vaikka *Giardia* esiintyy kotieläimillä ja lemmikeillä, ei ole varmoja todisteita siitä, että giardiaasi on levinnyt ihmisiin tätä kautta (Erlandsen, 1994). Eläimistä ja ihmisistä eristettyjä *Giardia*-isolaatteja voi olla morfologialtaan mahdotonta erottaa toisistaan (Flannagan, 1992). Tämä on johtanut mahdollisesti myös virheellisiin päätelmiin, että vesivälitteisissä *Giardia*-tapauksissa tartunnanlähteenä olisivat olleet esim. majavat ja piisamit (Dykes ym., 1980).

2.1.1.2 *Giardian* elinkierto

Giardian elinkierto on yksinkertainen (Meyer, 1994). Kestävää kystamuotoa eritetään ulosteiden mukana ympäristöön, jossa se voi päästä uuden isännän sisälle ja infektoida tämän. Päästyään uuden isännän pohjukaissuoleen kystasta vapautuu kaksi trofosoiittia (ekskystaatio), jotka tarttuvat epiteelisoluihin ja ottavat ravintonsa sieltä. Tämän jälkeen trofosoiitit jakautuvat mitoottisesti suolen onkaloissa. Ripulijakson kuluessa myös trofosoiitteja eritetään ulos isännästä ympäristöön, mutta ne eivät selviä kauaa infektiivisinä/elossa (WHO, 2002).

Giardia on ympäristössä ollessaan kestävässä kystamuodossa. Saastuneen veden, ruoan tai kosketuksen mukana isäntäeliöön päästessään kystamuoto kestää isännän happaman mahanesteen. Vasta ohutsuoleen päästessään kystasta muotoutuu liikkumaan ja lisääntymään pystyvä ja ravintoa ottava trofosoiitti (Evira 2010a; Upcroft, 2002).

2.1.2 *Cryptosporidium*

Cryptosporidiumin infektiomekanismi on vielä huonosti tunnettu, mutta tartunta aiheuttaa ihmisen suolistossa kryptosporidioosin (Carey ym., 2003). *Cryptosporidiumia* ei tunnettu ihmisille infektiota aiheuttavana organismina ennen vuotta 1976, jolloin se löydettiin akuutista oksennustaudista kärsivästä 3-vuotiaasta lapsesta (Nime ym., 1976). *Cryptosporidiumia* on useita eri lajeja ja niillä on eri isäntiä (Taulukko 2). Ihmiselle tartunnan aiheuttavia lajeja ovat *Cryptosporidium parvum* sekä *Cryptosporidium hominis*, jonka ainoa isäntä on ihminen. Näistä ensin mainittua esiintyy myös eri nisäkkäillä (Taulukko 2). Oireet alkavat 2–14 vuorokauden kuluttua tartunnasta (Environment Agency, 2009).

Taulukko 2. Eri *Cryptosporidium*-lajit ja niiden isännät (Environment Agency, 2009)

Laji	Isäntä
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Ihminen, nisäkkäät
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Ihminen
<i>Cryptosporidium canis</i>	Koira, mahdollisesti infektiivinen myös ihmiselle
<i>Cryptosporidium felis</i>	Kissa, mahdollisesti infektiivinen myös ihmiselle
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Marsu
<i>Cryptosporidium nesorum</i>	Kalat
<i>Cryptosporidium saurophilum</i>	Liskot
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Karja, voi olla infektiivinen myös ihmiselle
<i>Cryptosporidium muris</i>	Jyrsijät
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Käärmeet
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Kalat
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Kana
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Kalkkuna, voi olla infektiivinen myös ihmiselle
<i>Cryptosporidium galli</i>	Lokit
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Karja
<i>Cryptosporidium suis</i>	Sika, voi olla infektiivinen myös ihmiselle

2.1.2.1 Kryptosporidioosi

Kryptosporidioosin keskimääräinen itämisaika on noin 7 vuorokautta (Ungar, 1990, Dupont ym., 1995). *Cryptosporidium parvum*-tartunnan yleisin oire on pitkäkestoinen vesiripuli (Ungar, 1990), jossa jatkuva ja voimakas suolentoiminta voi aiheuttaa elimistön kuivumista ja painonlaskua (Arrowood, 1997). Muita oireita ovat pahoinvointi, vatsakrampit, oksentelu ja lievä kuume (Evira, 2010b). Oireet kestävät yleensä 2–4 vuorokautta, mutta ne voivat jatkua jopa 4 viikkoa (Evira, 2010b).

Henkilöillä, joilla on heikentynyt immunitetti, tauti voi johtaa vakaviin seurauksiin. Esimerkiksi AIDS-potilailla tauti voi olla hyvinkin pysyvä ja vaikea (WHO, 2002). Terveillä ihmisillä immuunijärjestelmä tuhoaa taudin ja ookystat elimistöstä, jolloin henkilö paranee.

Cryptosporidiumin patogeenisuuden ja infektion todennäköisyyden sekä niellyn ookysta-annoksen välillä näyttäisi olevan selvä vuorovaikutussuhde (DuPont ym., 1995). Teunis ym. v.1996 tekemässä tutkimuksessa käytettiin naudasta eristettyä *C. parvum*-kantaa ja alhaisin ookysta-annos oli 30 ookystaa, jolloin infektion todennäköisyys oli 20 %. Suurin ookysta-annos oli 1000 ookystaa ja infektion todennäköisyys 100 %. Kun annos-vaste -aineisto sovitetaan eksponentiaaliseen malliin, infektion todennäköisyys on:

$$P_i = 1 - e^{-r \times \text{dose}}$$

missä r (annos-vaste parametri) on 0,004005 (95 % CI 0,00205- 0,00723) tälle *C. parvum* kannalle (Teunis ym., 1996). Kaavan perusteella voidaan laskea, että jo yhden ookystan nieleminen voi aiheuttaa infektion 0,5 % todennäköisyydellä.

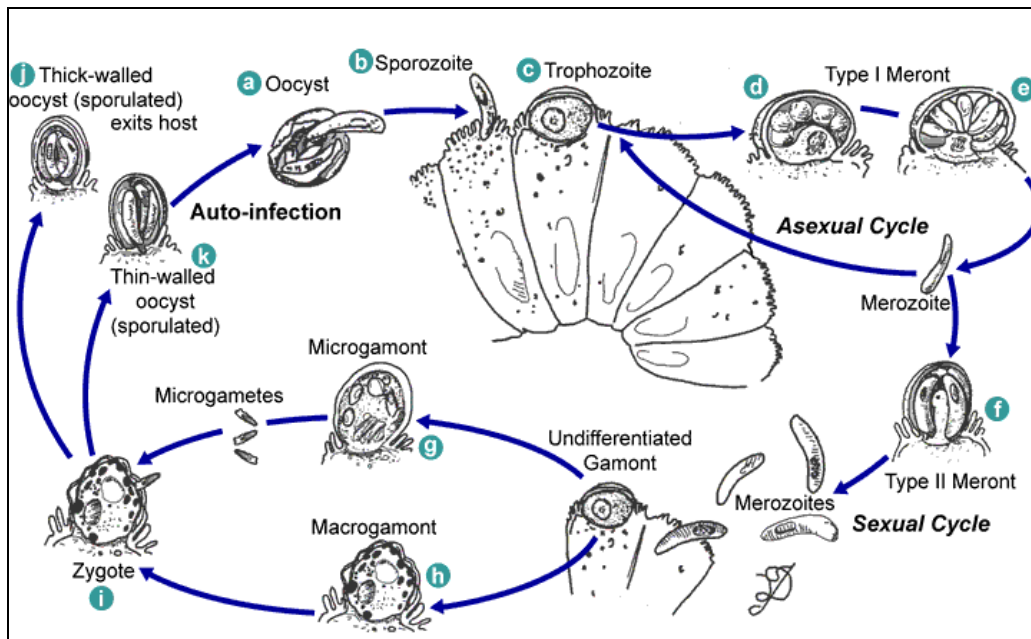
Dupont ym. (1995) mukaan keskimääräinen infektiivinen (ID_{50}) annos terveellä aikuisella on 132 ookystaa. Tähän mennessä suurimman, Milwaukeeessa tapahtuneen *Cryptosporidium* epidemian perusteella (MacKenzie, 1994) on kuitenkin esitetty, että joillakin henkilöillä jo yksi ookysta riittää kryptosporidioosin puhkeamiseen (Haas ja Rose, 1994). Etenkin ihmiset, joilla on heikentynyt immunitetti, ovat riskiryhmässä (Franzen ja Muller, 1999, Payment, 1999). Raja-arvojen ylittämisestä ookystilla on esitetty, että jos 100 l käsiteltyä vettä sisältää 10–30 ookystaa, tulee ryhtyä toimenpiteisiin (Haas ja Rose, 1994).

Merkittävin kulkeutumisreitti on tarttuminen ihmisestä toiseen, kuten on todennettu lasten päiväkotien infektioiden yhteydessä (Fayer & Ungar, 1986). *Cryptosporidium parvum* voi myös tarttua eläimistä ihmiseen, kuten infektoituneen karjan ja lampaiden ulosteiden kautta (Casemore, 1990). Kotilemmikit voivat olla myös taudinkantajia, mutta useinkaan niiden erittämät ookystat eivät aiheuta infektiota ihmiselle (Casemore, 1990). Epäsuorasti kulkeutuminen voi tapahtua saastuneen veden välityksellä esim. uima-altaissa tai ruoan ja juoman, kuten raa'an lihan ja maidon, välityksellä (Casemore ym., 1997).

Cryptosporidium parvum sekä *Cryptosporidium hominiksen* tunnistaminen ihmisen kryptosporidioosin aiheuttajiksi ja ympäristön turvallisuuskysymykset ovat saaneet tutkijat tekemään tutkimuksia näiden loisten taksonomiasta, biologiasta, epidemiologiasta, kulkeutumisesta, genomisesta karakterisoinnista, desinfioidinnista ja toteamisesta (Carey ym., 2003).

2.1.2.2 *Cryptosporidiumin* elinkierto

Infektion saanut isäntäeläin erittää *Cryptosporidiumin* ookystamuotoa ulosteissaan (Fayer & Ungar, 1986) ja ne ovat välittömästi infektiivisiä. Ookystat saattavat säilyä pitkiä aikoja ympäristössä ilman, että menettävät tartuntakykyään. Erittäin kestävä kuori suojelee ookystan sisällä olevia sporotsoiitteja fysikaalisilta ja kemiallisilta vaurioilta (WHO, 2002). Kun ookysta pääsee uuden isännän elimistöön, hapan mahaneste ja sappisuolat laukaisevat ekskystaation, jossa ookystan kuori avautuu. Neljä elävää sporozoiittia vapautuu ja ne infektoivat suoliston epiteelisoluja lähinnä ohutsuolessa (WHO, 2002). Sporotsoiitit infektoivat epiteelisolujen kärkiä menemällä soluseinien sisälle, mutta ei sytoplasmaan asti. Sporotsoiitit käyvät läpi suvuttoman ja suvullisen lisääntymissyklin (Kuva 2.), joista suvullinen lisääntyminen tuottaa ookystia (WHO, 2002). Ookystat (*C. parvum*) ovat pyöreitä, 4–6 µm halkaisijaltaan ja voivat olla joko paksu- tai ohutseinäisiä. Ohutseinäiset ookystat elävät samassa isännässä ja aloittavat uuden elinkierron ekskystaation avulla. Tämä autoinfektio voi aiheuttaa isäntäeliölle imeytymishäiriöitä ja ripulia. Paksuseinäiset ookystat eritetään ulosteen mukana ympäristöön (WHO, 2002).



Kuva 2. *Cryptosporidiumin* elinkierto (www.stanford.edu/.../index.html)

2.2 GIARDIA JA CRYPTOSPORIDIUM YMPÄRISTÖSSÄ

Infektion saanut eläin tai ihminen erittää runsaasti (oo)kystia ulosteessaan (10^6 – 10^8 / g) ja riippuen isännästä ja paikkasijainnista kystat voivat kulkeutua valumavesien ja jäteveden puhdistamon kautta vesistöihin. Ne voivat säilyä hengissä kuukausia kosteassa maaperässä tai vedessä (Carey ym., 2003). Maaperästä (oo)kystat voivat infektoida laiduneläimiä, lintuja yms. maasta ruokansa saavia isäntäeläimiä. Ottaen huomioon kuinka monia isäntäeliöitä *Giardialla* ja *Cryptosporidiumilla* on, ei ole ihme, että niitä esiintyy luonnossa ja vesistöissä hyvinkin yleisesti (Rochelle, 2002). Kuitenkin ulosteita ja jäteveettä lukuun ottamatta (oo)kystat esiintyvät ympäristössä vaihtelevina ja usein alhaisina pitoisuuksina (Carey ym., 2003).

Giardia ja *Cryptosporidiumia* esiintyy vesiympäristöissä kaikkialla maailmassa. Niitä on löydetty suurimmasta osasta pintavesiä, missä niiden pitoisuus riippuu ulostesaastumisen määrästä tai ihmisten vedenkäytöstä (Hansen & Ongerth, 1991; LeChevallier, Norton & Lee, 1991). (Ookystia) esiintyy luonnon pintavesissä yleisesti 0,01–100 kappaletta litrassa. Nämä

määrät eivät kuitenkaan ota huomioon toteamismenetelmien vaihtelevia ja heikkojakin saantoja, joten todellisuudessa pitoisuudet voivat olla kymmenkertaisia. Korkeampia pitoisuuksia on löydetty kaupunki- ja maatalousalueiden vesistöistä, kun taas koskemattomista vesistöistä löydetty pitoisuudet ovat olleet alhaisia (LeChevallier, Norton & Lee, 1991).

Tiedetään, että (oo)kystat pääsevät pintavesiin aina tietyin jaksoin, mutta niiden kulkeutumisesta ja jakaantumisesta vesissä on vain vähän tietoa (Payment ym., 1997). (Oo)kystapitoisuus on pintavesissä suurimmillaan sateiden aikana etenkin alueilla, joissa on kuivat kesät. Sadekaudella tulevat ensimmäiset sateet huuhtovat maaperään kerääntyneitä eläinten ulosteita vesistöihin, jolloin niissä olevat mikrobit ja mahdolliset (oo)kystat pääsevät vesistöön (Rochelle, 2002).

Pohjoismaista ainakin Norjassa on löydetty *Giardiaa* ja *Cryptosporidiumia* sekä pintavesistä että pohjavesikaivoista (Robertson & Gjerde, 2001). Suomessa *Giardiaa* ja *Cryptosporidiumia* on löydetty ainakin Etelä- ja Lounais-Suomen joista ja järvistä ja aineistoa näiden esiintymisestä on saatavilla eri julkaisuista (Hörman ym., 2003, Rimhanen-Finne, 2002). Vuosina 2000–2001 tutkittiin 139 pintavesinäytettä ja niistä 19:sta (13,7 %) eristettiin *Giardia* ja 14:sta (10,1 %) *Cryptosporidium*.

(Oo)kystat voivat selviytyä pintavesissä kuukausia (DeReignier ym., 1989, Chauret ym., 1995). *Giardia* kystien on havaittu kestävän hyvinkin viileitä olosuhteita ja ne selviävät +8 °C vedessä kaksikin kuukautta (Meyer and Jarroll, 1980). *Cryptosporidiumin* ookystien taas on havaittu selviävän jopa vuoden ajan +4 °C synteettisessä merivedessä (Tamburrini ja Pozio, 1999). Lämpötilan noustessa (oo)kystien kuolleisuus lisääntyy nopeasti (Jarroll ym., 1984). Etenkin matkailijoiden, jotka oleskelevat vuoristo ym. alueilla, jossa on viileää vettä, tulisi välttää raakaveden juomista sellaisenaan (Upcroft, 2002) ja vesi tulisi keittää ennen käyttöä. Jo viisi minuuttia 60 °C:ssa vedessä tuhoaa (oo)kystat (Environment Agency, 2009).

Vuodenajan vaikutuksesta alkueläinten esiintymiseen vedessä ei ole saatu yksiselitteisiä tuloksia. Eräät tutkimukset ovat osoittaneet, että *Giardia* ja *Cryptosporidium* alkueläimiä todetaan pintavesissä vähemmän talvella kuin muina vuodenaikoina (Wallis ym., 1996, Hörman ym., 2003). Toisessa tutkimuksessa maatalousalueen vaikutus näkyy alkueläinten esiintymisissä, koska eläinten ulostetta käytetään lannoitteena, jolloin mahdolliset kystat

pääsevät valumavesien mukana pintavesiin, joista (oo)kystia todettiin eniten syksyisin ja talvisin (Bodley-Tickell ym., 2002). Jotkut tutkimukset eivät taas ole osoittaneet vuodenaajalla olevan merkitystä (oo)kystien esiintymiseen pintavesissä (Robertson ym., 2001).

Luonnollisissa olosuhteissa *Cryptosporidiumin* kuolleisuus on 0,005–0,037 log₁₀ päivässä. *Giardialle* luku on korkeampi ja riippuu enemmän lämpötilasta. Kuolleisuus 1 °C lämpötilassa on 0,015 log₁₀ päivässä ja 23 °C lämpötilassa luku on 0,28 log₁₀ (DeReigner ym., 1989).

Aiemmissä tutkimuksissa korrelaatiota koliformisten indikaattoribakteerien ja *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* esiintymisellä ei ole havaittu pintavesissä (Chauret ym., 1995a). Koliformien käyttö (oo)kystien indikoimisessa ei ole luotettavaa, sillä koliformiset bakteerit tuhoutuvat veden kloorauksessa herkemmin kuin (oo)kystat (Carey ym., 2003). Koliformiset bakteerit eivät myöskään säily vesissä yhtä pitkiä aikoja kuin (oo)kystat. Veden sameuden on joissakin tutkimuksissa havaittu korreloivan positiivisesti (oo)kystien esiintymisen kanssa eli mitä sameampaa vesi on ollut, sitä useammin (oo)kystia on todettu (Robertson & Gjerde, 2001; LeChevallier ym., 1991). Joissakin tutkimuksissa minkäänlaista korrelaatiota ei ole kuitenkaan havaittu näytteen sameuden ja (oo)kystien ilmenemisen välillä (Thurman ym., 1998).

2.3 GIARDIAN JA CRYPTOSPORIDIUMIN KESTÄVYYS VEDENPUHDISTUSPROSESSEISSA

(Oo)kystien kestävyys ympäristössä, etenkin *Cryptosporidiumin* ookystien suuri kestävyys veden desinfiontikemikaaleja, kuten klooria, kohtaan sekä alhainen infektioannos tekevät *Giardiasta* ja *Cryptosporidiumista* merkittävän patogeeniriskin, kun juomavettä valmistetaan pintavedestä (WHO, 2002). Pohjavedet, jotka on suojattu hyvin, eivätkä sekoitu pintaveden kanssa, ovat puhtaita näistä patogeeneistä sekä muista enteropatogeeneistä. Hyvin suunnitelluissa ja toteutetuissa vedentuotantoprosesseissa ja jakelusysteemeissä on hyvin alhainen riski siihen, että *Giardiat* ja *Cryptosporidiumit* voisivat joutua juomaveteen (WHO, 2002). Pohjavedet, joihin on päässyt sekoittumaan pintavesiä, saattavat sisältää alhaisia pitoisuuksia (oo)kystia (Hancock, Rose & Callahan, 1997).

Makea pintavesi on vedentuotannossa talousveden raakavetenä laajasti käytössä ja suurin osa maailman väestöpöpopulaatiosta käyttää pintavettä juomavetenään (Hörman ym., 2003). Suomessa käytettiin pintavettä talousveden raakavetenä v. 2001 42 % kaikesta vedentuotannosta (Finnish Environment Institute, 2003). Nykyään pintaveden osuus vesilaitosten toimittamasta vedestä on noin 39 % ja pohjaveden osuus noin 61 % Suomessa (Ympäristö.fi, 2009).

Giardian kystien ja *Cryptosporidiumin* ookystien kestävyyydestä ja läpäisystä vedentuotantoprosesseissa on tehty tutkimuksia. Eräissä tutkimuksissa saostus ja laskeutus vedenkäsittelyinä poistivat tehokkaimmin (oo)kystia vedestä (Hsu ja Yeuh, 2003). Toisen tutkimuksen mukaan saostus, laskeutus ja suodatus kykenivät poistamaan 99 % (2 log poistuma) (oo)kystista, mikäli systeemi oli oikein suunniteltu ja toimiva (LeChevallier ym., 1991). Tyypillisesti käytettävät saostuskemikaalit ovat rauta- ja alumiinisulfaatit. (Oo)kystien poistaminen alumiinisulfaatilla, polyalumiinikloridilla, rautasulfaatilla ja rautakloridilla olivat yhtä hyviä (Ives, 1994).

Suodatus yksin voi olla tehokas tapa poistaa (oo)kystia. Tosin *Cryptosporidiumin* ookystat ovat pienempiä kuin *Giardian* kystat, mikä vaikeuttaa niiden poistamista suodatuksen avulla. Pikahiekkasuodatus on yleinen puhdistusprosessi, joka kykenee parhaimmillaan poistamaan jopa (99,99 %) *Cryptosporidiumin* ookystista. Reduktiot ovat eri tutkimuksissa kuitenkin vaihdelleet ja ovat huonoimmillaan olleet vain 90 % verran hiekkasuodatukselle (Rose ym., 1986; Ives, 1994; Hall, Presdee & Carrington, 1994). Fysikaalisista keinoista hidashiekkasuodatus on poistaa tehokkaasti (oo)kystia, mutta teho vähenee alhaisemmissa lämpötiloissa (WHO, 2002). Maahanimeyttäminen on myös tehokas keino (oo)kystien poistamiseen. Sen tehokkuus riippuu matkasta ja ajasta, jonka vesi maan läpi kulkee (Mawdsley ym., 1996).

Otsonointi on potentiaalisin keino (oo)kystien poistamiseksi vedestä. *C. parvum* ookystille tarvitaan 3,5 mg-min/l 99 % inaktivoimiseksi (Finch ym., 1993a) ja *G. duodenalis* kystien 99 % inaktivoimiseksi riittää otsonia 0,6 mg-min/l (Finch ym., 1993b). Otsonoinnin teho kuitenkin laskee lämpötilan laskiessa (WHO, 2002).

UV-desinfiointi vesilaitoksilla on tehokas inaktivoimaan (oo)kystia (Health Canada, 2004, Environment Agency, 2009). *In vitro* kokeissa 110–120 mJ/cm² annos inaktivoi 99 % *C.*

parvum ookystista (Ransome ym., 1993) ja 97 % *G. duodenalis* kystista (Rice & Hoff, 1981). *Cryptosporidiumin* on todettu olevan herkempi UV-säteilylle, pulssimainen UV- säteily inaktivoi 99,98 % ookystista jo 19 mJ/ cm² annoksella (Clancy ym., 1998).

Veden desinfiointi klooraamalla on ollut tärkeässä asemassa vedessä elävien patogeneien poistossa. Toisin kuin UV-desinfiointissa *Cryptosporidiumin* ookystien on todettu kestävän desinfiointiin käytettäviä klooria *Giardian* kystia paremmin (Sterling, 1990). 99,9 % *Giardian* kystista inaktivoituu 180–530 mg-min/l riippuen lämpötilasta sekä veden pH: sta (Hibler, 1987). Klooridioksidi on klooria tehokkaampaa, mutta sitä tarvitaan silti 78 mg-min/l 90 % ookystien inaktivoimiseksi (Korich ym., 1990). Klooridioksidia käytettäessä 4,7–28 mg-min/l riittää tuhoamaan 99,9 % *Giardian* kystista (Rubin 1988).

Yksi tärkeimmistä asioista turvallisen talousveden tuottamisessa on tunnistaa mahdolliset kontaminaation lähteet ja puhdistaa jätevedet oikein. Aktiiviliete jätevedenpuhdistuksessa tuhoaa 90–99,7 % (oo)kystista (Sykora ym., 1991). Myös maatalousjätteiden käsittely kuten lietteen käsittely aerobisesti ennen niiden lisäämistä maaperään vähentää ookystien määrää ja elävyyttä (Svoboda ym., 1997). Kuitenkaan yleiset jäteveden käsittelyprosessit ja desinfiointiaineet eivät välttämättä tuhoa (oo)kystia, vaan ne saattavat päätyä jätevesiprosessien läpi pintavesiin ja tätä kautta mahdollisesti pintavettä käyttävien vesilaitosten raakavesiin, jolloin potentiaalisten infektioiden riski kasvaa (Castro-Hermida ym. 2008).

2.4 GIARDIAN JA CRYPTOSPORIDIUMIN AIHEUTTAMAT EPIDEMIAAT

Giardia ja *Cryptosporidium* ovat aiheuttaneet maailmalla useita vesivälitteisiä epidemioita. Epidemioita on esiintynyt eniten kehitysmaissa, Pohjois-Amerikassa, Englannissa ja Uudessa-Seelannissa. USA:sta sekä Iso-Britanniasta saatujen raporttien mukaan *Giardia duodenalixen* ja *Cryptosporidium parvumin* aiheuttamat vesiepidemiat ovat kasvava ongelma (Craun ym., 1998; Hancock ym., 1998;). Suurimpia epidemioita on USA:n Milwaukeeessa vuonna 1993 puhjennut *Cryptosporidium parvumin* aiheuttama epidemia, jossa 400 000 ihmistä sairastui ja 100 kuoli. Tuolloin syynä olivat epätavallisen runsaat sateet, jolloin eläin- ja ihmisperäistä jätettä pääsi valumaan Michigan-järvestä vedentuotantoprosessiin (MacKenzie ym., 1994).

Pelkästään USA:ssa yli 400 vesivälitteistä epidemiaa on raportoitu vuodesta 1980 vuoteen 1996. Näistä tapauksista *Giardia duodenalis* aiheutti 20,9 %. 82,5 % sairaustapauksista taas oli *Cryptosporidium parvum* aiheuttamia, tosin Milwaukeen tapaus on vastuussa suurimmassa osassa tapauksista (Cohn ym., 1999, Chauret 2002).

Giardiaa esiintyy kaikissa maanosissa, sekä kehittyneissä maissa että kehitysmaissa (Evira, 2010a). Siihen sairastuu vuosittain n. 280 miljoonaa ihmistä tartuntatiheyden ollessa suurin kehitysmaissa (Upcroft, 2002). WHO (2002) on arvioinut, että jopa 3 miljardia ihmistä asuu viemäröimättömillä alueilla kehitysmaissa. Tämä voi nostaa arviota giardiaasin esiintymisestä jopa 30 %:lla, mikä tarkoittaisi miljardia giardiaasitapausta ja 2,5 miljoonaa kuolemantapausta vuosittain. *Giardia*-infektiot ovat erittäin tavallisia lapsilla kehitysmaissa (Farthing, 1994). Infektioiden esiintyvyyden piikit ovat 1–4 vuotiailla lapsilla (Flannagan, 1992) ja 20–40 vuoden iässä, johtuen osittain matkustelusta ja osittain tartunnoista sairastuneiden lasten kautta.

Vesivälitteisiä giardiaaseja on raportoitu yli 70 vuoden ajan (vuonna 1969 30 vuoden ajan, Moore ym., 1969) ja onkin arvioitu, että n. 60 % *Giardia*-tartunnoista johtuu kontaminoituneesta juomavedestä (Bennett ym., 1987). USA:ssa *Giardia* on epidemiologiseen aineistoon perustuen yleisimmin tunnistettu patogeeni tutkituissa yli 100 vesivälitteisessä epidemiassa (Craun, 1990). Lisäksi vesivälitteisiä epidemioita on raportoitu Uudesta-Seelannista, Ruotsista ja Iso-Britanniasta. Nämä epidemiat ovat johtuneet jätevesillä kontaminoituneiden pinta- ja pohjavesien käytöstä (Craun ym., 1990), talousveden puhdistuksen puutteellisuudesta, kuten pelkästä klooridesinfioinnista (Craun, 1984), puutteellisesta suodattamisesta (Craun, 1990; Dykes ym., 1980) tai vaurioista vedenjakelujärjestelmässä (Craun, 1986).

Vesivälitteiset kryptosporidioosit ovat johtuneet saastuneesta vedestä, sekä pinta- että pohjavesilähteissä (Mackenzie ym., 1994) ja virkistyskäyttöön otetusta vedestä kuten uimaltaista (Joce ym., 1991). Pintavesilähteet ovat voineet saastua rankkasateiden tai lumensulamisen seurauksena (Mackenzie ym., 1994) sekä jätevesivalumien vuoksi. Pohjavesikaivot voivat saastua esimerkiksi jätevesivalumista johtuen (Kramer ym., 1998). Myös vedentuotantoprosessien puutteellisuuden tai toimimattomuuden vuoksi ookystat saattavat päätyä juomavesiin (Craun ym., 1998). Vuodot ja väärät liitokset vedenjakelujärjestelmissä ovat myös aiheuttaneet epidemioiden puhkeamisia (Craun ym.,

1998). Arviolta jopa 400 000 ihmistä sairastuu vuosittain vesivälitteiseen cryptosporidioosiin maailmalla (WHO, 2002).

Suolistotulehduksesta kärsivien potilaiden ulostenäytteiden perusteella näistä tulehduksista *Cryptosporidium* on aiheuttanut 1–4 % Euroopassa ja Pohjois- Amerikassa ja 3–20 % Afrikassa, Aasiassa, Australiassa ja Etelä- Amerikassa (Current & Carcia, 1991). Iso-Britanniassa raportoidaan vuosittain n. 5000 kryptosporidioositapausta (Environment Agency, 2009). Infektioiden esiintyvyyden piikit ovat olleet kehitysmaissa keväisin (Casemore, 1990) ja loppukesästä (Van Asperen ym., 1996) ja suurin osa sairastumistapauksista on alle 5 vuotiailla lapsilla (Environment Agency, 2009).

Pohjoismaissa esiintyneitä epidemioita on ollut mm. Ruotsissa v. 1982, jossa jätevedellä saastunutta verkostovettä juoneet ihmiset sairastuivat. Osasta sairastuneista henkilöistä (56) eristettiin *Giardia duodenalis* (Neringer ym., 1987).

Suomessa giardiaasi on huomattavasti yleisempi kuin kryptosporidioosi. Vuosittain ilmoitetaan 220–420 *Giardia*-tartuntaa (Kuusi, 2009). Vuonna 2009 Suomen tartuntatautirekisteriin ilmoitettiin 378 giardiaasitapausta. Tapausten potilaiden iän mediaani oli 24 vuotta ja 52 % sairastuneista oli miehiä (THL, 2010). Suurin osa tartunnoista on peräisin ulkomailta (Evira, 2010a), mutta tietoa tartuntamaasta ei ole kerätty. Kryptosporidioositapauksia tapauksia ilmoitetaan vuosittain vain 7–18, mikä on huomattavasti vähemmän kuin muissa pohjoismaissa (Kuusi, 2009). Vuonna 2009 Suomen tartuntatautirekisteriin ilmoitettiin 11 kryptosporidioositapausta (THL, 2010). Tapaukset olivat yksittäisiä ja naisia ja miehiä oli tapauksista yhtä paljon.

Suomessa *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* aiheuttamia vesivälitteisiä epidemioita ei ole raportoitu aikaisemmin valtakunnallisessa tartuntatautirekisterissä (The Finnish National Public Health Institute, 2003). Nokian vesiepidemiassa v. 2007 todettiin potilaasta kuitenkin vesivälitteinen giardiaasi (THL, 2007; Rimhanen-Finne ym., 2010) ja epidemian aikana 52 nokialaiselta diagnosoitiin giardiaasi-tartunta (Kuusi, 2009). Epidemiassa 400 000 l puhdistettua jätevettä oli päässyt juomavesiverkostoon ja sitä kautta *Giardian* kystia sekä useita muita suolistopatogeenia oli juomavedessä (THL, 2007). Verkostovedestä todettiin monien muiden patogeenien lisäksi *Giardiaa*, joka analysoitiin vedestä Standardimenetelmän

15553 mukaisesti, jossa kystat todettiin mikroskopoimalla koon, muodon ja FITC värjäytyvyyden perusteella (Rimhanen-Finne ym., 2010).

Elintarvikevälitteisiä *Giardia*- tai *Cryptosporidium*-epidemioita ei ole aikaisemmin juurikaan raportoitu Suomessa. Ensimmäinen ruokavälitteinen *Cryptosporidium parvum* aiheuttama kryptosporidioosiepidemia todettiin kuitenkin Helsingissä marraskuussa 2008 (Pönkä ym. 2008). Siinä samassa työpaikkaruokalassa aterioineita ihmisiä sairastui 72 kpl. 12 sairastunutta antoi ulostenäytteen ja heistä neljältä todettiin *Cryptosporidium parvum*. Sairastumisen lähdettä ei saatu varmuudella todettua, mutta salaattia epäiltiin *Cryptosporidiumin* lähteeksi (Pönkä ym. 2008).

2.5 GIARDIAN KYSTIEN JA CRYPTOSPORIDIUMIN OOKYSTIEN MÄÄRITTÄMINEN

Menetelmät *Giardia* kystien ja *Cryptosporidiumin* ookystien analysointiin vesinäytteistä ovat muuttuneet vuosien varrella. Kehityksen myötä menetelmän saannot ovat parantuneet ja toteaminen on tehokkaampaa.

Patruunasuodattimen (EnvirocheckTM, Pall, Germany, 1 µm huokoskoko, suodatinmateriaali polypropyleeni) eluointitavat ovat muokkautuneet tehokkaammiksi. Nykyään menetelmä perustuu ISO: n standardiin 15553, joka pohjautuu USEPA: n vuonna 2001 tekemään method 1623: een (Standard 15553; USEPA, 2001), jossa (oo)kystat analysoidaan vesinäytteistä käyttäen suodatus/ IMS/ IFA (Immunofluoresenssimääritys)-menetelmää. Menetelmässä näyte kerätään patruunasuodattimeen, eluoidaan ja konsentroidaan. Tämän jälkeen näytekonsentraatille tehdään immunomagneettinen separaatio, jonka jälkeen eristetyt ja konsentroidut alkueläinten (oo)kystat värjätään objektilasin kaivolla kahdella väriaineella: spesifisellä FITC:lla, joka tunnistaa (oo)kystan soluseinän vasta-aineet ja värjää sen sekä DAPI:lla, joka värjää epäspesifisesti nukleiiniaineksen.

Alkueläinten analyysiin liittyy oleellisesti näytteen jatkokonsentroidointi eluaatille ja nykyään konsentroidointi tehdään sentrifugoimalla ja ottamalla pelletti talteen. Aiemmin näytettä on

konsentroidu mm. kalsiumkarbonaattiflokkulaatiolla, jossa näytteeseen lisätyt CaCl_2 -, NaHCO_3 - ja NaOH -yhdisteet muodostivat flokin ja konsentroidu näytteen sen laskeutumisen aikana, jonka jälkeen muodostunut flokki liuotettiin happoon ja konsentroidu uudelleen analysoimista varten (Carey, ym., 2004).

Konsentraatin käsittelyssä käytetään nykyisin immunomagneettista separaatiota (IMS), joka perustuu *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* vasta-aineilla päällystettyihin magneettisiin helmiin, joihin näytteessä olevat (oo)kystat sitoutuvat. IMS on korvannut mm. aiemmin käytetyn sakkaroosiselkeytyksen, jossa konsentroidu pellettä vuorotellen käsiteltiin sakkaroosikäsittelyllä ja sentrifugoitiin taas uudelleen ja lopulta konsentraatti värjättiin sellaisenaan mikroskopointia varten objektilasille (Karanis ym., 1998).

2.5.1 Erilaisia sovelluksia suodatus/ IMS/ IFA- menetelmällä

Kerättävä näytetilavuus riippuu näytevesityypistä, ja herkkyyden ja tulosten nopeuden tarpeesta. Pienet vesitilavuudet (10–100 l) voidaan kerätä kentällä tai kuljettaa laboratorioon analyysia varten. Suuret tilavuudet (100–1000 l) vaativat kentällä suodatuksen. Näytteen suodatus saattaa kestää 24 tuntia, koska virtausnopeus suodattimen läpi on rajoitettu (1–2 l/min). Pienet näytetilavuudet (10–100 l) indikoivat vedenlaatua näytteenottohetkellä ja suuret tilavuudet (1000 l) indikoivat vedenlaatua pidemmällä jaksolla. Koska *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* pitoisuudet ovat useimmiten hyvin alhaisia, suuret näytetilavuudet ovat tarpeen (100–1000 l).

Raakavesille on sovellettu eri menetelmiä, joissa patruunasuodatuksen jälkeen eluaatti on joko konsentroidu sentrifugoimalla (Standardi 15553, USEPA 2001) tai suodattamalla eluaatti polykarbonaattisuodattimen läpi (Rimhanen-Finne ym., 2002).

Jätevesiä tutkittaessa tulevalle jätevedelle tai aktiivilietteelle on käytetty suoraa värjäystä tai näytteen sentrifugointia ilman patruunasuodatusta. Jos taas kyseessä on ollut puhdistettu jätevesi, on näyte (n. 10 l) ensin suodatettu patruunan läpi ja eluoitu kuten raakavesissä. Eluaatti on joko konsentroidu sentrifugoimalla tai suodatettu uudelleen polykarbonaattisuodattimen (142 mm halkaisija, 1 μm huokoskoko) läpi. Suodatinta on

eluoitu PBST:llä (Phosphate buffered saline, 0,05 % Tween-20), jolloin eluaattiin on tehty IMS suoraan (Rimhanen-Finne ym., 2001).

Hyvin likaisia vesinäytteitä (puhdistamaton jätevesi) analysoitaessa näytteen suurimpien partikkeleiden annetaan ensin laskeutua pullossa, jotta suurimmat irtopartikkelit eivät tulisi analysointiin. Vaikka (oo)kystia saattaa laskeutua partikkeleiden mukana, on silti todennäköisempää todeta (oo)kystia hieman puhtaammasta vedestä, missä suurimmat partikkelit eivät häiritse analyysiä. Kun suurimmat partikkelit ovat laskeutuneet, voidaan supernatantti siirtää sentrifuugiputkiin ja sentrifugoida näytettä normaalisti 1100 g 15 minuuttia. Mikäli supernatantti näyttää likaiselta sentrifugauksen jälkeen, se voidaan pipetoida varovasti pois, jonka jälkeen lisätään deionisoitua vettä ja pestään pelletti sentrifugoimalla se uudelleen. Jos supernatantti on sentrifugauksen jälkeen kirkas, voidaan pelletin tilavuus määrittää ja tehdä tämän jälkeen IMS (Watkins, 2010).

(Oo)kystiä voidaan eristää myös kiinteistä matriiseista kuten hiekasta tai uima-altaasta eristetyistä tavaroista (esim. hiukset). Hiekkaa (tai maaperänäytettä) laitetaan litran lasipulloon ja päälle kaadetaan eluutiopuskuria. Pulloa heilutellaan, jotta kaikki hiekassa oleva aines sekoittuu puskuriin. Pulloa ei kuitenkaan saa ravistaa, etteivät (oo)kystat vaurioitu hiekan kanssa. Kun hiekka- tai maa ainesta on sekoiteltu, otetaan eluaatti talteen, jonka jälkeen se voidaan sentrifugoida ja jatkaa IMS-vaiheeseen (Watkins, 2010).

2.5.2 Saantotutkimukset

On havaittu, että eluointivaiheessa (oo)kystia häviää näytteestä ja saanto on täten heikompi. Saannot ovat vaihdelleet paljon eri tutkimuksissa, joissa (oo)kystilla ympättyjä vesinäytteitä on analysoitu (Carey ym., 2003; DiGiorgio ym., 2002). Hävikkiä tapahtuu suodatinta eluoitaessa, sentrifugoinnin ja konsentroidin aikana sekä myös immunomagneettisessa separaatioissa (Environment agency, 2009).

McCuin ja Clancy arvioivat method 1623:n saantotehokkuutta (oo)kystilla ympätyillä näytteillä eri matriiseilla. Filta-max laitteistolla suodatettuna saanto oli ympätyillä hanavesinäytteillä ookystilla $48,8 \pm 11,8$ % ja kystilla $57,1 \pm 10,9$ % (McCuin ja Clancy, 2003).

Environment Agency (2009) on arvioinut saantoja eri matriiseille. Filta-max laitteistoa käytettäessä ja raakavettä analysoitaessa saannot ovat vaihdelleet 5–46 % *Giardian* kystille ja 11–41 % *Cryptosporidiumin* ookystille (Environment Agency, 2009).

DiGiorgio ym. vertailivat eri patruunasuodattimien, Envirocheck standard- (Envirocheck™ STD capsule, Pall, Germany) ja Envirocheck high volume patruunan (Envirocheck™ HV capsule, Pall, Germany), suodatuskapasiteettia alhaisen (oo)kysta pitoisuuden omaavista vesinäytteistä (DiGiorgio ym., 2002). Vesinäytteen sameuden ollessa 11 NTU ja (oo)kystakonsentraation ollessa n. 10 (oo)kystaa/l high volume patruuna antoi saannoksi ookystilla $51 \pm 0,02/132$ l ja kystilla $52 \pm 0,05/132$ l. Envirocheck standard patruunalla vastaavat saannot olivat $43 \pm 0,01/132$ l ookystaa ja $61 \pm 0,06/132$ l kystaa (DiGiorgio ym., 2002). Teoreettinen maksimisaanto 10 l:n näytteelle olisi ollut 1320 (oo)kystaa/132 l eli saannot olivat alhaiset molemmilla Envirocheck-suodattimilla. Sameammilla vesinäytteillä (99 NTU) ei havaittu huomattavaa eroa *Cryptosporidiumin* saannoissa kahden eri patruunan välillä. *Giardian* saannot olivat vain alle 1 % *Giardian* kystien teoreettisista saannoista molemmilla suodattimilla (DiGiorgio ym., 2002). Tämän tutkimuksen mukaan Envirocheck High volume- patruunat olisivat hieman parempia luonnonvesille ookystien osalta kuin Envirocheck standard-kapselit. Environment agency (2009) on myös määrittänyt saantoja Envirocheck™ patruunoille ja *Cryptosporidiumin* osalta saannot ovat olleet raakavedelle 17–61 % (10 l, n= 10) ja verkostovedelle 34–70 % (Environment Agency, 2009) (> 1000 l, n= 10).

Envirocheck-patruunoita on vertailtu myös puhdistetulla jätevedellä (Quintero-Betancourt ym., 2003). High volume-patruunalla saanto oli ookystilla keskimäärin 32 % ja kystilla 27 %. Envirocheck standard patruunoilla saannot olivat vastaavasti 40 % ookystilla ja 26 % kystilla (Quintero-Betancourt ym., 2003).

2.5.3 (Oo)kystien elävyyden määrittäminen

(Oo)kystien löytyminen vesistöistä ei ole taekalle, että (oo)kystat ovat eläviä ja infektoivia (WHO, 2002). Eräessä tutkimuksessa *Giardian* kystien elävyyttä arvioitiin mikroskooppilla morfologian perusteella eri pintavesinäytteistä. Kystista 12,8–14,6 % oli eläviä ja kykeneviä infektoimaan oikeanlaisen isännän (LeChevallier ym., 1994 ja 1995). Toisessa tutkimuksessa

vesijohtovedestä löydetty kystat taas olivat suurimmaksi osaksi kuolleita ja mikroskopoidessa 40/46 (86 %) kystalla oli vääristynyt ja kutistunut solulima, jolloin ne todettiin kuolleiksi (LeChevallier ym., 1991). Samaisessa tutkimuksessa myös *Cryptosporidiumin* ookystien elävyyttä määritettiin ja verkostovedestä löydettyistä ookystista 21/23 (91 %) oli kuolleita morfologisesti arvioituna (sporoitsoiittien puuttuminen, kutistunut solulima).

2.5.3.1 Ekskystaatio

Eniten käytetty menetelmä (oo)kystien elävyyden määrittämiseen on ekskystaatio. Määrittystä ei käytetä standardin ISO 15553 yhteydessä, koska sitä on vaikeaa sisällyttää menetelmään (WHO, 2002). Ekskystaatiota käytetään usein PCR-tunnistamisen ohella, kun näytteestä halutaan todeta eläviä (oo)kystia (Wiedenmann ym., 1997). Menetelmässä (oo)kystia käsitellään hapolla ja entsyymeillä (esim. trypsiini), jolloin ekskystaation pitäisi tapahtua elävillä (oo)kystilla ja voidaan havaita mikroskopoimalla. Ekskystaatiolla pystytään arvioimaan (oo)kystien elävyyttä, mutta ei tartuntakykyä, sillä on havaittu, että ei-eksykstoituneet ookystat ovat infektoineet vastasyntyneitä hiiriä (Neumann, ym., 2000). Ekskystaation määrä sekä *G. duodenaliksella* että *C. parvumilla* on ollut alhainen, eikä se ole täten hyvä indikoimaan (oo)kystien elävyyttä (Black, 1996). Ekskystaatiomenetelmää on myös käytetty arvioitaessa (oo)kystien kestävyyttä desinfioidussa, mutta menetelmä on antanut alhaisempia infektiivisyysarvoja kuin tutkittaessa infektiivisyyttä vastasyntyneillä hiirillä (Clancy ym., 1998).

2.5.3.2 Vitaalivärjäys

Giardian kystia voidaan värjätä propidiumjodidilla (PI), joka pääsee ainoastaan kuolleiden solujen sisälle ja värjää tuman DNA:n. Värjäytyvyyden on havaittu korreloivan kystien infektoimiskyvyttömyyden kanssa (Smith & Smith, 1989). Täten on mahdollista käyttää PI-värjäystä kystien elävyyden indikaattorina.

Cryptosporidiumille on kehitetty oma menetelmänsä PI-värjäykseen, jossa 4' 6-diaminidino-2-phenyl indolia (DAPI) käytetään toisena väriaineena PI:n lisäksi. Menetelmä korreloi hyvin ekskystaatiomenetelmän kanssa (Campbell ym., 1992). Menetelmässä voidaan erottaa neljänlaisia ookystia: DAPI:a sisältäviä eläviä, PI:a sisältäviä kuolleita, molempia värejä

sisältäviä kuolleita ja kumpaakaan väriä sisältämättömiä ookystia. Värjäytymättömät ookystat voivat olla eläviä tai kuolleita ja mahdollinen elävyys voidaan arvioida tutkimalla näytettä DIC-mikroskoopilla (Differentiaali-interferenssikontrasti-mikroskooppi). Mikäli ookystassa näkyy sisällä sporotsoiitteja, ookystat ovat eläviä. Jos ookysta on tyhjä sisältä, se on kuollut (Campbell, 1992). DAPI/PI-värjäys on helppo tehdä, joten sitä voidaan käyttää rutiinisti ympäristönäytteitä analysoitaessa (WHO, 2002).

Vaihtoehto DAPI/PI-värjäykselle on ollut ookystien elävyyden määrittäminen nukleiinihappojen värjäyksellä (Belosevic & Finch, 1997). SYTO 9-värillä kuolleet ookystat värjäytyvät vihreiksi tai kirkkaankeltaisiksi, kun taas elävät ookystat eivät värjäydy, haalean vihreää haloa lukuun ottamatta. MPR71059-väriaine taas värjää kuolleet ookystat punaisiksi, mutta elävät ookystat eivät värjäydy. Näitä värjäysmenetelmiä ei ole kuitenkaan laajalti testattu, joskin menetelmä on korreloinut hyvin hiirien infektoitumisen kanssa (Belosevic & Finch, 1997).

Koska vitaalivärjykset ovat helppoja ja nopeita toteuttaa, ne voivat olla sopivia sisällytettäväksi menetelmään ookystien havaitsemiseksi vesinäytteistä. Tätä ei kuitenkaan vielä ole todistettu (WHO, 2002).

2.5.3.3 Soluviljely

Ookystien infektiivisyyttä on yritetty määrittää myös käyttämällä kudosisviljelyä (Rochelle ym., 1996). Tässä määrittämisessä vesinäytteet on kerätty ja konsentroidu standardi ISO 15553 protokollan mukaisesti ja bakteerit on poistettu näytteestä klooraamalla annoksella, joka tappaa bakteerit, mutta ei aiheuta vahinkoa ookystille. Ookystat on injektoitu yksikerroksiseen kudosisnäytteeseen, inkuboitu 24–48 tuntia, jonka jälkeen kudosisnäytteestä on määritetty alkueläimen antigeeni tai nukleiinihappokoostumus. Immunofluoresenssitekniikoita on käytetty tunnistamaan infektoituneet solut. Tämä menetelmä tarjoaa mahdollisuuden tutkia infektiota kvantitatiivisesti, mutta ei ole selvää, voiko yksi infektiivinen ookysta aiheuttaa tartunnan useammassa solussa. Teoriassa yksi infektiivinen (oo)kysta (*Giardia* tai *Cryptosporidium*), jonka ekskystaatio onnistuu hyvin, voi tartuttaa kahdesta neljään solua. Analyseissa tätä ei kuitenkaan ole onnistuttu todistamaan (WHO, 2002).

2.5.4 PCR-detektio

PCR (polymeraasiketjureaktio) on molekyylibiologinen menetelmä, jossa voidaan monistaa haluttua DNA:ta. Perinteisen suodatus/IMS/IFA-menetelmän lisäksi *Giardia* kystien ja *Cryptosporidiumin* ookystien toteamiseen ja lajikohtaiseen tunnistamiseen on kehitetty erilaisia PCR-menetelmiä. Menetelmiä ei ole vielä standardisoitu eikä virallista yleisohjetta ole, mutta PCR-detektio on ollut käytössä virallisen Standardi 15553 menetelmän rinnalla useissa tutkimuksissa, joissa on analysoitu (oo)kystia (muun muassa Rimhanen-Finne ym., 2002; Guy ym., 2003; Yu ym., 2009). PCR-menetelmän hyvä puoli on sen nopeus ja edullisuus sekä mahdollisuus (oo)kystien lajikohtaiseen tunnistamiseen.

PCR-menetelmissä, joissa *Giardiaa* ja *Cryptosporidiumia* määritetään vesinäytteistä, on useita eri toimintavaihtoehtoja. Näyte voidaan jakaa IMS-vaiheen jälkeen puoliksi, jolloin toinen osa analysoidaan PCR:llä ja toinen osa mikroskopomalla (Rimhanen-Finne, 2002). Julkaisussa Guy ym. (2003) näyte suodatettiin selluloosanitraattisuodattimelle (3 µm huokoskoko, 47 mm halk., Sartorius, Göttingen, Germany) ja DNA-eristys sekä sitä seuraava PCR tehtiin suoraan suodattimesta eluoidulle liuokselle ilman IMS:ää. Yu ym (2009) on vertaillut julkaisussaan erilaisia menettelyjä DNA:n eristykseen, alukkeiden ja probien käyttöön.

Ennen varsinaista DNA-eristystä, näytteessä olevat (oo)kystia voidaan käsitellä sulatus-jäädätyssykleillä (nestetyppi -196 °C, 100 °C vesi), jolloin (oo)kystan kuori rikkoutuu ja DNA vapautuu (mm. Guy ym., 2003). DNA-eristykseen on olemassa erilaisia kaupallisia kittejä (mm. Qiagen) ja PCR:oon tarvittavia alukkeita ja probeja on kehitelty erilaisia (mm. Guy ym., 2003; Yu ym., 2009; Rimhanen-Finne ym., 2002).

3 TYÖN TAVOITTEET

Tämän pro gradu –työn tavoitteena oli:

- Pystyttää menetelmä *Giardian* kystien ja *Cryptosporidiumin* ookystien analysoimiseen raaka- ja talousvesinäytteistä, sekä soveltaa menetelmä puhdistetun jäteveden analysoimiseen
- Validoida *Giardian* kystien ja *Cryptosporidiumin* ookystien toteamis- ja tunnistusmenetelmä tunnetuilla positiivikontrollikannoilla sekä ympätyillä vesinäytteillä
- Selvittää *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* esiintymistä talousveden tuotantoon käytettävissä raakavesissä

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 MENETELMÄN PROTOKOLLA

Giardian kystien ja *Cryptosporidiumin* ookystien toteamisessa ja tunnistamisessa noudatettiin pääasiallisesti standardin ISO 15553 mukaista menettelytapaa (Envirocheck STD™, 10- 100 l) sekä samansisältöisen USEPA:n method 1623:n (10 l näytetilavuuksille) sekä vastaavan Iso-Britannian ohjeistuksen mukaista menettelyä (Environment agency, UK, 2009).

4.1.1 Konsentroidi patruunasuodattimen läpi

Menetelmässä *Giardian* kystat ja *Cryptosporidiumin* ookystat konsentroidaan 10–100 l:n näytetilavuudesta patruunasuodattimelle (Envirocheck STD™ sampling capsules, Pall, Germany). Suuremmille tilavuuksille (100–1000 l) voidaan käyttää erilaista High volume-patruunasuodatinta (Envirocheck HV™ sampling capsules, Pall, Germany).

Suurien tilavuuksien suodatuksessa noudatetaan valmistajan antamia ohjeita virtausnopeuden (2 l/ min) ja virtaussuunnan asetuksessa. Mikäli patruuna kuljetetaan laboratorioon, se pitää tiivistää näytteenottamisen jälkeen valmistajan valmistamilla sulkijoilla.

Pienet tilavuudet kuljetetaan näyteastiassa laboratorioon pimeässä ja lämpötilassa, joka vastaa ympäristön lämpötilaa. Näyte suositellaan analysoitavaksi heti tai 24 tunnin kuluessa, mutta ehdottomasti 4 päivän kuluessa. Mikäli näytettä ei analysoida heti, se tulee säilyttää 5 ± 3 °C. Jos suodattimia säilytetään viileässä, niiden pitää antaa lämmitä huoneenlämpöiseksi ennen eluinnin aloittamista.

Giardian ja *Cryptosporidiumin* käyttäytymisestä säilytyksen aikana ei ole tietoa. Tästä syystä olisi parasta suorittaa näytteen analyysi mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen.

4.1.2 Eluointi ja eluaatin konsentrointi

Suodatuksen jälkeen patruunasuodatin pidetään pystyasennossa valkoisen vuotoventtiilin ollessa yläpäässä. Sulkijat poistetaan ja vesi valutetaan pois suodattimen ulostulopäästä. Ulostuloaukko suljetaan ja patruuna täytetään eluutiopuskurilla siten, että puskuria on 1 cm suodattimen yli. Kiinnitetään toinenkin sulkija ja laitetaan patruuna vaakasuorasti ravistelijaan valkoisen vuotoventtiilin osoittaessa ylöspäin. Ravistellaan 600 kierrosta minuutissa (± 25 kierrosta minuutissa) 5 min (± 30 sek.) ajan. Vaihtoehtoisesti ravistelijan nopeuden voi säätää 900 rpm, jonka standardissa sanotaan irrottavan tehokkaammin partikkeleita suodattimelta.

Ylempi sulkija poistetaan ja eluaatti kaadetaan n. 200 ml:n sentrifuugiputkeen. Lisätään eluutiopuskuria patruunaan, suljetaan yläsulkija ja laitetaan ravistelijaan jälleen 5 min \pm 30 sekuntia vuotoventtiilin ollessa ensin 20° ja sitten 40° asennossa.

Ravistelun jälkeen yläsulkija poistetaan ja eluaatti kaadetaan samaan 200 ml:n sentrifuugiputkeen. Sentrifugoidaan 1100 x g 15 minuuttia ilman taukoja. Mikäli pelletti on näkyvässä, sen tilavuus arvioidaan sentrifugauksen jälkeen. Supernatanttia kaadetaan pois varovasti siten, että pohjalle jää pelletti sekä supernatanttia n. 50 ml. Pelletti resuspendoidaan supernatanttiin ja siirretään 50 ml sentrifuugiputkiin. Toinen sentrifugaus tehdään 50 ml sentrifuugiputkessa (1100 g, 15 min) ja muodostuneen pelletin tilavuus määritetään.

Pipetillä (tai käyttäen alle 20 kPa eli 0,2 bar vakuumlähdettä) otetaan varovasti supernatanttia putkesta jättäen sitä pelletin yläpuolelle 2–5 ml. Jos pellettiä ei näy, pitää olla erittäin varovainen, ettei pipetoi pois vahingossa kystia tai ookystia.

Lisätään deionisoitua vettä sentrifuugiputkeen siten, että kokonaistilavuus on 9 ml ja resuspendoidaan pelletti nesteeseen. Näytteelle tehdään IMS tai mikäli IMS ei tehdä heti, näyte säilytetään viileässä (5 ± 3 °C).

Jos pellettivilavuus ylittää valmistajan antamat suositukset IMS:ää (yli 0,5 ml), näyte sentrifugoidaan toistamiseen putkessa, josta voidaan tarkasti määrittää pelletin tilavuus. Näyte jaetaan useampaan osaan siten, että pelletin tilavuus on 0,5 ml yhtä IMS-analyysiä kohti. Lisätään osiin deionisoitua vettä siten, että tilavuudet ovat 9 ml/ putki.

4.1.3 Immunomagneettinen separaatio (IMS)

Kystat ja ookystat erotetaan muusta taustamateriaalista käyttäen IMS-tekniikkaa, eli immunomagneettista separaatiota. Anti-*Giardia*- ja anti-*Cryptosporidium*-vasta-aineilla päällystetyt helmet kiinnittävät näytteessä olevat (oo)kystat itseensä ja (oo)kystillä päällystetyt helmet voidaan erottaa ympäröivästä nesteestä ja muista taustapartikkeleista magneettipartikkelierottelijan (MPC-1) avulla. HCl-happokäsittelyn avulla (oo)kystat saadaan irrotettua helmistä ja magneettipartikkelierottelijan avulla saadaan pipetoitua lopullinen konsentraatti (n. 50 µl) kaivollisille objektilaseille.

Ennen IMS:n aloitusta puskurien (Dynabeads GC combo, Invitrogen) annetaan tasaantua huoneenlämpöön. Kutakin näytettä varten valmistetaan 1 ml/näyte 1 x puskuri-A:ta laimentamalla 100 µl 10 x puskuria 900 µl:aan deionisoitua vettä (1:10) ja laitetaan talteen myöhempää käyttöä varten. Erikoismuotoiltuun Dynal L10- putkeen pipetoidaan näytettä kohden 1 ml 10 x puskuria A:ta ja 1 ml 10 x puskuria B:tä ja lisätään putkeen vesinäytekonsentraatti.

Anti-*Cryptosporidiumia* sekä Anti-*Giardia* (Dynabeads GC combo, Invitrogen) vasta-aineita sekoitetaan Vortex-sekoittajassa 10 s ja pipetoidaan molempia 100 µl Dynal L10- putkeen. Näytettä sekoitetaan pyörösekoittajassa 15–20 rpm vähintään 1 tunti. Tämän jälkeen putki irrotetaan pyörittäjästä ja asennetaan MPC-1 magneettiin litteä puoli magneettiin päin siten, että putki on vaakatasossa magneetin päällä.

Putkea käännellään kevyesti 90 ° kulmassa kallistellen 2 min ajan, 1 käänнос sekunnissa. Putki laitetaan takaisin magneettiin pystyasentoon. Korkki aukaistaan ja supernatantti kaadetaan varovaisesti pois siten, että magneetti on putken yläpuolella. Putki poistetaan magneetista ja näyte resuspensoidaan aikaisemmin valmistettuun 1 x puskuri-A:han ja sekoitellaan varovasti.

Neste siirretään uuteen putkeen ja asetetaan pystyasennossa magneettiin siten, että helmet muodostavat putken pohjalle pelletin. Putkea pyöritellään ja keinutellaan 1 min ajan käännellään putkea 90 astetta. Tämän kääntelyn jälkeen Dynabeads helmi-

(oo)kystakompleksin pitäisi muodostaa selkeä pelletti putken alaosaan. Supernatantti pipetoidaan pois varovaisesti koskematta pellettiin.

(Oo)kystat erotetaan helmistä poistamalla putki magneetista lisäämällä helmien sekaan 50 µl 0,1 M HCl ja sekoittamalla vortexilla 10 s. Tämän jälkeen putken annetaan seisoa vähintään 10 min huoneenlämmössä ilman magneettia, toistetaan sekoitus vorteksoimalla ja laitetaan putki magneettiin kallistettuun pystyasentoon siten, että pelletti on pohjalla.

Värjäystä varten objektilasin kaivolle pipetoidaan 5 µl 1 M NaOH:a HCl:n neutraloimiseksi. Pipetoidaan kaivolle kaikki neste näyteputkesta varovaisesti koskematta helmiin ja yrittäen saada kaikki neste pois. Näyte kuivataan ja kaivolle lisätään 45 µl metanolia, jonka jälkeen näyte voidaan värjätä heti tai seuraavana päivänä.

4.1.4 Värjäys

Varsinaisten näytteiden lisäksi valmistetaan kaksi erillistä värjättyä kontrollinäytettä: positiivi- ja negatiivikontrollinäytteet. Positiivikontrolli sisältää 10 µl positiivikontrollia (PC101, Aqua-Glo™ G/C Direct Comprehensive Kit, 2×10^5 kpl kystia sekä ookystia/ml). Negatiivikontrolli sisältää 50 µl PBS: ää. Kaivot voidaan haihduttaa kuivaksi + 36 °C:een inkubaattorissa tai huoneenlämmössä.

Metanolikäsitellyille ja kuivaneille kaivoille lisätään 50 µl DAPI-käyttöliuosta (1 µl DAPI (2 mg/ml) stokkiliuosta, 5 ml PBS) ja annetaan seisoa huoneenlämmössä 1–4 min, jonka jälkeen lisätään pesupuskuria (1x SureRinse™ Washing buffer) 50–100 µl, annetaan seistä 1 min ja pipetoidaan liika neste pois kallistaen objektilasia varovasti. Tämän jälkeen kaivoille lisätään pisara FITC- väriainetta (Aqua-Glo™ G/C Direct, FL, Comprehensive Kit, fluoresenssillä ja kahdella spesifisellä vasta- aineella merkitty reagenssi) ja sen annetaan vaikuttaa + 37 °C:een kosteuskaapissa 30 min. Pesupuskuria lisätään väriaineen päälle, annetaan seistä 1 min ja pipetoidaan taas liika neste pois. Kaivojen päälle lisätään pisara Blockout-väriainetta (Evan's Blue-liuos, PBS, 0,04 % natriumatsidi), joka inhiboi taustafluoresenssin esiintymistä. Annetaan seistä 1 min, lisätään 50–100 µl pesupuskuria ja minuutin vaikutusajan jälkeen pipetoidaan taas liika neste pois kallistaen lasia. Näytelasin annetaan kuivaa pimeässä ja

näytteet säilytään pimeässä ja viileässä ($+5\pm 3$ °C) kunnes näyte on valmis mikroskopoitavaksi. Näytteet pitäisi tutkia mahdollisimman pian värjäämisen jälkeen tai viimeistään seuraavana päivänä.

Ennen mikroskopointia kaivon päälle lisätään pisara No fade-liuosta (Mounting medium, PBS, glyseroli, formaliini, 2 % DABCO), joka estää DAPI:n fluoresenssia haalistumasta mikroskoopin UV-valossa.

4.1.5 Mikroskopointi ja (oo)kystien tunnistus

Epifluoresenssimikroskoopilla (Olympus BX51/ 52) tutkitaan värjätyt kontrollinäytteet ensin FITC-asetuksella 400x suurennoksella (tai 200x), jotta saadaan selville positiivikontrollinäytteiden oikeanlainen värjäytyvyys FITC:lla ja että negatiivikontrolleissa ei ilmene (oo)kystia. Tämä tutkimus toistetaan 1000 x suurennoksella värjäytyvyyden varmistamiseksi ja kystien ja ookystien identifioimiseksi koon ja muodon perusteella. Tämän jälkeen kystien ja ookystien sisältö tutkitaan UV-valaistuksella, jotta nähdään oikeanlainen DAPI-värjäytyvyys.

Mikäli positiivikontrollinäyte on negatiivinen, värjäys toistetaan ennen kuin muita näytteitä tutkitaan. Mikäli negatiivikontrollinäyte on positiivinen, selvitetään, mistä kontaminaatio on johtunut. Tätä varten valmistetaan tuoret reagenssit ja värjätään uudet kontrollinäytteet ennen muiden näytteiden analysointia.

Edellyttäen, että nämä kontrollien tulokset toimivat, jokainen objektilasin kaivo tutkitaan systemaattisesti ja tarkasti epifluoresenssimikroskoopilla (Olympus BX51/52) ensin FITC-asetuksilla (eksitaatio: 460–500 nm, emissioaallonpituus: 510–560 nm) ja sitten DAPI-asetuksilla (eksitaatio 330–385 nm, emissioaallonpituus: 420 nm) liikkumalla systemaattisesti sivulta sivulle tai ylhäältä alas. Skannataan läpi koko kaivo käyttäen 200- ja 400-kertaista suurennosta ja numeroidaan alustavat *Giardiat* ja *Cryptosporidiumit*. Näytteissä, joissa on ainoastaan yksi tai kaksi (oo)kystaa, tarkastellaan kutakin kohdetta 800–1000-kertaisilla suurennoksilla käyttäen immersioöljyä sen varmistamiseksi, että kyseessä on kysta tai

ookysta. Näytteessä, jossa on useampia (oo)kystia, tarkastellaan koko objektilasin kaivoa 800–1000-kertaisilla suurennoksilla ja varmistetaan jokainen (oo)kysta.

4.1.5.1 (Oo)kystien tunnistaminen FITC-asetuksella

Kun näytteet on värjätty FITC-vasta-ainevärillä ja tarkasteltu epifluoresenssimikroskoopilla, tulisi organismien näyttää seuraavanlaisilta (Taulukko 3.; Kuva 3).

Taulukko 3. *Cryptosporidium* ookystien ja *Giardia* kystien tunnistaminen

<i>Cryptosporidium</i> ookystat	<i>Giardia</i> kystat
Omenanvihreä fluoresenssi (usein kirkkailla reunoilla)	Omenanvihreä fluoresenssi (usein kirkkailla reunoilla)
pallonmuotoinen tai hieman munanmuotoinen ookystissa voi esiintyä ryppyjä tai saumoja	munanmuotoinen kystissa voi olla ryppyjä tai taitoksia
Halkaisija 4–6 µm	Mitat (8–12 µm) x (7–10 µm)

Kaikki vääristyneet ja tuhoutuneet kohteet katsotaan huolella, etenkin, jos tyypillisiä kystia tai ookystia ei ole näkyvillä objektilasilla.

4.1.5.2 (Oo)kystien tunnistaminen DAPI-asetuksella

Jokainen alustava kohde tulee varmistaa kystaksi tai ookystaksi DAPI:n nukleinihapon värjäytymisen avulla käyttäen immersioöljyä ja 1000 kertaista objektiivia. DAPI-tunnistuksen ajaksi valitaan mikroskooppiin UV-valo (DAPI-asetus).

Alustava kohde varmistuu *Cryptosporidiumin* ookystaksi tai *Giardian* kystaksi, mikäli ne ilmentävät joitakin seuraavista tunnuspiirteistä:

- kahdesta neljään erillistä taivaansinistä ydintä (Kuva 4)
- tuma-aines voi olla hieman levinnyt ja värjäys sen vuoksi epäselvä tai epätasainen
- levinnyt sininen sisäinen värjäytyvyys, missä erilliset ydinainekset eivät ole tunnistettavissa

Kaksi viimeisintä tuntomerkkiä luetaan (oo)kystien tuntomerkeiksi, mikäli ei esiinny epätyypillistä morfologiaa, kuten yli neljää ydintä tai yhtä tai kahta suurta hyvin voimakkaasti värjäytynyttä ydintä.

4.2 MENETELMÄN VALIDOINTI VERKOSTO- JA RAAKAVESILLE

4.2.1 Kontrollinäytteet

Ennen varsinaisten näytteiden analysoimista, menetelmän toimivuutta testattiin lisäämällä vesijohtoveteen tai vaihtoehtoisesti pintaveteen positiivikontrollikantoja (PC101, 2×10^5 kystaa sekä ookystaa/ml). Ei-infektiivisiä ja kuolleita, formaldehydiin säilöttyjä *Giardia*-kystia ja *Cryptosporidium*-ookystia sisältävää suspensiota (PC101, 2×10^5 kpl/ml) lisättiin 100 µl suodatettavaan näytteeseen (100 l ja 75 l).

Lisäksi varsinaisia näytteitä tutkittaessa analysoitiin samanaikaisesti aina myös kontrollikannoilla ympätty, positiivinen näyte, jotta analyysin toimivuus voitiin varmistaa. Samanaikaisesti näytteen ja positiivikontrollin kanssa tehtiin myös negatiivikontrolli, joka valmistettiin suodattamalla 100 l puhdasta verkostovettä patruunasuodattimen läpi.

Aina ennen mikroskopointia tehtiin myös positiivinen ja negatiivinen värjäyskontrolli. Positiivikontrolli tehtiin pipetoimalla 10 µl PC101-positiivikontrollia suoraan objektiivilasille. Negatiivikontrollina oli 50 µl PBS. Ennen näytteiden mikroskopointia tarkasteltiin mikroskopoimalla värjäyskontrollit, joista näki värjäyksen onnistumisen, (oo)kystien esiintymisen sekä niiden ulkonäön.

4.2.2 Menetelmän validointi eri eluaatin konsentroitavaille

Konsentroitavien vertailussa analysoitiin kaksi verkostovesinäytettä (75 l ja 100 l), joihin lisättiin patruunasuodatusvaiheessa (envirocheck STDTM sampling capsules, Pall, Germany).

positiivikontrollia 100 µl tai 50 µl/ näyte irrottamalla letku hanasta 50 l:n kohdalla ja pipetoimalla letkun sisälle positiivikontrollia. Suodatuksen jälkeen patruunasuodatinta eluoiitiin eluutiopuskurilla (EDTA, Tris, Laureth-12-paste, deionisoitu vesi) ravistelijassa (tasoravistelijä Heidolph Vibramax 100) vuotoventtiili ylöspäin 5 min 600 rpm nopeudella. Eluaatti (n. 100 ml) kaadettiin 200 ml:n sentrifuugiputkeen. Patruuna täytettiin uudelleen eluutiopuskurilla ja toistettiin ravistelu kahdesti (5 min, 600 rpm) patruunan vuotoventtiilin ollessa ensin 20° ja sitten 40°-asennossa, jonka jälkeen eluaatti kaadettiin samaan sentrifuugiputkeen (200 ml).

Suodatuksien jälkeen toisen patruunasuodattimen eluaatti jatkokonsentroidiin sentrifugoimalla ja toisen näytteen eluaatti suodatettiin polykarbonaattisuodattimelle (142 mm halkaisija, 1 µm huokoskoko).

4.2.2.1 Sentrifugaus

Sentrifuugiputkessa olevaa eluaattia (200 ml) sentrifugoitiin (Sorvall RC-5C, roottori GSA) 1100 g 15 min, jonka jälkeen supernatanttia kaadettiin pois ja loppu neste (pellettiä ei ollut näkyvässä) kaadettiin 50 ml:n sentrifuugiputkeen ja sentrifugaus toistettiin (Sorvall RC-5C, roottori SS-34). Supernatanttia pipetoitiin pois jättämällä n. 5 ml pohjalle. Loppunäytteeseen lisättiin deionisoitua vettä siten, että lopputilavuus oli 9 ml.

Immunomagneettinen separaatio (IMS) tehtiin protokollan ohjeen mukaan (ks. kappale 4.1.3) lisäämällä Dynal putkeen puskurit, helmet, näyte ja laittamalla putki tunniksi pyörittäjään (FINEPCR, Rotator Ag) huoneenlämpöön asentoon 4 (n. 20 rpm). Pyöriksen jälkeen supernatantti erotettiin helmistä magneettipartikkelierottelijalla. Lopulta 50 µl 0,1 M HCl lisättiin putkeen erottaen (oo)kystat helmistä ja pipetoitiin näyte (50 µl) kaivolliselle objektilasille ja annettiin kuivaa yön yli. Seuraavana päivänä näyte käsiteltiin värjäyskitin (Aqua- Glo, AFLK 100) ohjeen mukaan ja mikroskopoiitiin kuten aiemmin on kerrottu (kappale 4.1.5).

4.2.2.2 Polykarbonaattisuodatus

Toinen (200 ml) eluaatti suodatettiin polykarbonaattisuodattimen (142 mm halkaisija, 1 µm huokoskoko, Whatman, UK) läpi, jonka jälkeen suodatin siirrettiin 50 ml:n sentrifuugiputkeen ja lisättiin 10 ml PBST (PBS, Tween-20). Tämän jälkeen putki laitettiin ravistelijaan (tasoravistelija, Heidolph Vibramax 100) 10 min 1050 rpm, jonka jälkeen 10 ml:n eluaatille tehtiin IMS (ks.kappale 4.1.3).

4.3 MENETELMÄN VALIDOINTI PUHDISTETULLE JÄTEVEDELLE

Menetelmän toimivuutta jätevesille testattiin tunnetuilla positiivikontrollikannoilla (PC101), jotka ympättiin jätevedenpuhdistamolta haettuun lähtevään, puhdistusprosessit läpikäyneeseen jäteveteen. Vettä otettiin 10 l kanistereihin ja kuljetettiin laboratorioon jatkoanalyysija varten.

Jätevesiä analysoitaessa näyte joko suodatettiin patruunasuodattimelle (9 l), suoraan polykarbonaattisuodattimelle (1 l) tai sentrifugoitiin pieni osa näytettä (600 ml) suoraan ja analysoitiin muodostunutta pellettä.

4.3.1 Suora konsentroidi

Jäteveden suorassa sentrifugoinnissa sovellettiin menettelyä jäteveden aktiivilietteen analysoinnista (Rimhanen-Finne ym., 2006) sekä puhdistetun jäteveden analysointimenettelyä (Lim ym., 2007).

Näyte (10 l) sekoitettiin hyvin ja siitä otettiin 1,2 l erilliseen astiaan. Astiasta 600 ml näytettä jaettiin sellaisenaan 200 ml:n sentrifuugiputkiin. Jäljelle jääneeseen näytteeseen lisättiin positiivikontrollia (PC101) 50 µl ja näyte jaettiin 200 ml:n sentrifuugiputkiin. Putkia sentrifugoitiin 1500 g 15 min. Supernatantit poistettiin ja syntyneet pelletit yhdistettiin 50

ml:n sentrifuugiputkiin. Näytteet sentrifugoitiin uudelleen 1500 g 15 min. Supernatanttia kaadettiin pois siten, että putkiin jäi n. 5 ml näytettä. Pelletit resuspensoitiin ja deionisoitua vettä lisättiin putkiin siten, että kokonaistilavuudeksi tuli 9 ml ja jatkettiin IMS- vaiheeseen. Immunomagneettinen separaatio tehtiin sekä positiivikontrollia sisältävälle että pelkkää lähtevää jätevettä sisältävälle näytteelle kuten aiemmin on kuvailtu. Pelkkää jätevettä sisältävästä näytteestä otettiin suoraa mikroskopointia varten 50 µl kaivolliselle objektilasille tarkoituksena nähdä miltä näyte näyttää ilman IMS-vaihetta.

4.3.2 Patruunasuodatus

Jäljelle jääneeseen näytteeseen (9 l) lisättiin positiivikontrollia 50 µl (PC101). Näyte (9 l lähtevää jätevettä) pumpattiin ämpäristä pilssipumpun (TMC 02303, 300 GPH, 12 V) avulla patruunasuodattimen läpi (Envirocheck STDTM, Pall, Germany). Suodatin eluoiitiin eluutiopuskurilla (Tris, EDTA, Laureth paste + steriili deionisoitu vesi) ja saatu eluaatti sentrifugoitiin 1500 g 15 min. Eluaatti siirrettiin 50 ml:n sentrifuugiputkeen, jonka jälkeen sentrifugointi toistettiin. Supernatanttia kaadettiin pois sen verran, että pohjalle jäi näytettä n. 5 ml. Pelletin resuspendoinnin jälkeen kokonaistilavuus tasattiin 9 ml:aan lisäämällä deionisoitua vettä tarvittava määrä ja jatkettiin IMS-vaiheeseen.

4.3.3 Polykarbonaattisuodatus

Vertailuna patruunasuodattimelta saataviin saantoihin kokeiltiin samanlaista, positiivikontrollilla lisättyä näytettä, suodatettuna polykarbonaattisuodattimelle. 10 l:aan lähtevää jätevettä lisättiin 50 µl positiivikontrollia (PC101) ja näyte suodatettiin polykarbonaattisuodattimen läpi (142 mm halkaisija, 1 µm huokoskoko, Whatman, UK). Suodatin meni tukkoon nopeasti, eikä näytettä saatu suodatettua kuin n. 1 l. Loput (n. 9 l) näytteestä hylättiin. Tarkoituksena oli vertailla onko silmämääräisesti eroa (oo)kystien määrällä objektilasilla. Suodatuksen jälkeen suodatinta eluoiitiin 10 ml:lla PBST:tä (PBS, Tween-20) ja laitettiin ravistelijaan (tasoravistelija, Heidolph Vibramax 100) 10 min 1050 rpm. Tämän jälkeen eluaatille (n.10 ml) tehtiin IMS, kuten aiemmin on kerrottu.

4.4 (OO)KYSTIEN ESIINTYMINEN TALOUSVEDEN TUOTANTOON KÄYTETTÄVISSÄ RAAKAVESISSÄ SEKÄ JÄTEVESISSÄ

Tutkittavat viisi pinta- ja pohjavesinäytettä tulivat ERKKA- ja POLARIS-projektien kohteista ja niistä selvitettiin mikrobiologista laatua laajemminkin. Näytteet analysoitiin elo-lokakuussa 2009 Terveyden ja Hyvinvoinnin laitoksella, Vesi ja Terveys-yksikössä.

4.4.1 Tutkimuskohteet

Ensimmäisen kohteen vesinäyte oli Itä-Suomessa sijaitsevan järven pintavettä, jota käytetään talousveden raakavetenä. Pinta-alaltaan suureen järveen laskee myös kaupungin jätevedenpuhdistamon lähtevä vesi. Vesilaitoksen ensimmäisenä käsittelynä toimii rantaimetyys, joka poistaa noin puolet järvisedessä olevasta humuksesta. Rantaimetytetystä vedestä poistetaan rauta ja mangaani kemiallisella hapetuksella ja ilmastuksella. Tämän jälkeen vesi käsitellään kemiallisella saostuksella. Vesi selkeytetään flotaatiolla ja hiekkasuodatuksella ja desinfioidaan kloorilla ennen verkostoon pumppaamista.

Toisena kohteena oleva vedenottamo oli myös Itä-Suomessa sijaitseva tekopohjavesilaitos, jossa läheisen järven vettä pumpataan siiviläputkikaivoista uppopumpuilla ilmastukseen, jossa vesi hapettuu ja siitä poistuu hiilidioksidia. Hapettuneeseen veteen lisätään kalkkia, jolloin rauta ja mangaani saostetaan hämmennysaltaissa. Selkeytysaltaissa saostumat laskeutuvat pääosin altaiden pohjille. Vesi menee ylivuotona hiekkasuodattimille, joissa loput saostumista poistetaan. Suodattimille menevän veden pH säädetään rikkihapolla sopivaksi.

Kolmantena kohteena oli Etelä-Suomessa sijaitseva pieni pintavesilaitos, jossa talousveden raakavesi koostuu 90 % läheisen järven pintavedestä ja 10 % pohjavettä läheisestä kaivosta. Vesi käsitellään pikahiekkasuodatuksella, otsonoinnilla, aktiivihiehellä klooraamalla sekä pH:n säädöllä ennen verkostoon pumppaamista.

Neljäntenä kohteena oli Etelä-Suomessa sijaitseva tehdas, joka käyttää pintavettä kahdesta läheisestä vedenottopaikasta omiin tuotantoprosesseihinsa sekä tuottaa vettä myös ympäröivän teollisuuden ja kunnan käyttöön talousvedeksi. Järvestä avo-ojaa pitkin valuva vesi pumpattiin kauempana olevalta keräysalueelta putkea pitkin tehtaalle, jossa vesi käsitellään eri puhdistusprosessien avulla (saostus, flotaatio, aktiivihiili, UV ja klooraus).

Viides kohde oli myös Etelä- Suomessa sijaitseva tekopohjavesilaitos, joka imeyttää läheisen järven pintavettä imeytysaltaaseen, jonka jälkeen veden pH säädetään ja klooria lisätään ennen verkostoon jakelua.

4.4.2 Raakavesinäytteet

Ensimmäisessä kohteessa suodatimme pintavesinäytettä 62 litraa patruunan (Envirocheck STD™, Pall, Germany) läpi paikan päällä. Tarkoituksena oli suodattaa 100 l pintavettä, mutta humuspitoisuuden vuoksi suodatin alkoi tukkeutua ja virtaus hidastui niin paljon, että suodatus päätettiin lopettaa. Paine pysyi alle 0,5 bar ja virtaus oli n. 2 l/ min ja lopussa n. 1 l/ 3 min, vaikka hana käännettiinkin kokonaan auki asentoon.

Toisen tutkimuskohteen näytteenottopaikassa ei ollut hanaa, johon suodatuslaitteiston olisi saanut kiinni. Vettä laskettiin kloorattuun astiaan, josta näytevettä pumpattiin pilssipumpulla patruunan läpi. Suodatuksessa onnistuimme saamaan kapselin läpi vain 25 litraa. Suodatin tukkeutui nopeasti, eikä veneen tyhjennykseen tarkoitettu pilssipumppu jaksanut pumpata vettä kovempaa suodatinkapselin läpi.

Kolmannen kohteen näytteenotto ja keräys tapahtui ohjeistamalla paikkakunnalla olevia henkilöitä puhelimitse ja sähköpostitse. Klooraamalla desinfioitu näytteenkeräyslaitteisto ja patruunasuodatin lähetettiin paikan päälle ja näytteenoton jälkeen tavarat lähetettiin analysoitavaksi laboratorioon. Näytteenottopaikassa oli hana, johon letkusto saatiin kiinnitettyä. Suodatus kesti kolme tuntia ja suodatettu tilavuus oli n. 100 litraa. Suodatustilavuus oli arvio, koska virtausmittarin lukema ei ollut pysynyt vakaana mittauksen aikana ja virtausnopeus oli hidastunut paljon.

Neljännän kohteen näytteenotto ja keräys tapahtui ohjeistamalla paikkakunnalla olevia henkilöitä puhelimitse ja sähköpostitse. Näyte alkueläinanalyysiä varten otettiin talousveden raakavedestä ennen mitään prosesseja ja näyte kerättiin hanasta letkuja pitkin kapseliin. Näytetilavuus oli 13 l, jonka jälkeen suodatin tukkeutui eikä vettä enää saatu läpi.

Viidennen kohteen näyte otettiin veneellä järveltä keräämällä näytevettä kanistereihin letkun ja pilssipumpun avulla. Näytetilavuus oli 20 l ja se kuljetettiin Kuopioon kanistereissa kylmälaukuissa ja näytteen analysointi tapahtui laboratoriossa. Näyte kaadettiin klooraamalla desinfioituun ämpäriin, josta näyte suodatettiin pilssipumpun avulla patruunasuodattimeen.

4.4.2.1 *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-analyysit

Giardia ja *Cryptosporidiumin* analysoinnissa meneteltiin standardin ISO 15553 protokollan mukaan (ks. kappale 4.1).

4.4.2.2 Fysikaalis- kemialliset analyysit

Näytteistä määritettiin fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, joita olivat sameus, pH ja johtokyky. pH ja johtokyky (eC) mitattiin yhteisellä mittarilla (pH-johtokykymittari, Cond 340i, WTW, Germany) laitteen ohjeen mukaisesti. Sameus määritettiin sameusmittarilla (Turb555IR, WTW, Germany).

4.4.3 Puhdistetut jätevesinäytteet

Ensimmäisen ja toisen kohteen näytteenoton yhteydessä otettiin myös läheiseltä jätevedenpuhdistamolta lähtevä jätevesinäyte, josta tehtiin samat analyysit kuin talousveden raakavedestä. Ensimmäisen kohteen lähtevä jätevesi laskee samaan järveen, josta raakavettä pumpataan. Toisen näytteenottokohteen lähtevä jätevesi ei laske samaan järveen, josta raakavesi otettiin.

Näytteet otettiin 10 l kanistereihin, jotka kuljetettiin kylmälaukuissa laboratorioon tutkimuksia varten. Näytteet kaadettiin kloorattuun ämpäriin, josta näytteet suodatettiin pilssipumpun avulla patruunasuodattimen (Envirocheck STDTM, Pall, 1 µm) läpi. Virtauksen piti olla 2 l/min, mutta virtaus oli nopeampi. Virtausta hillittiin käyttämällä letkunpuristimia, mutta virtauksen nopeutta ei saatu tarkasti määritettyä.

5 TULOKSET

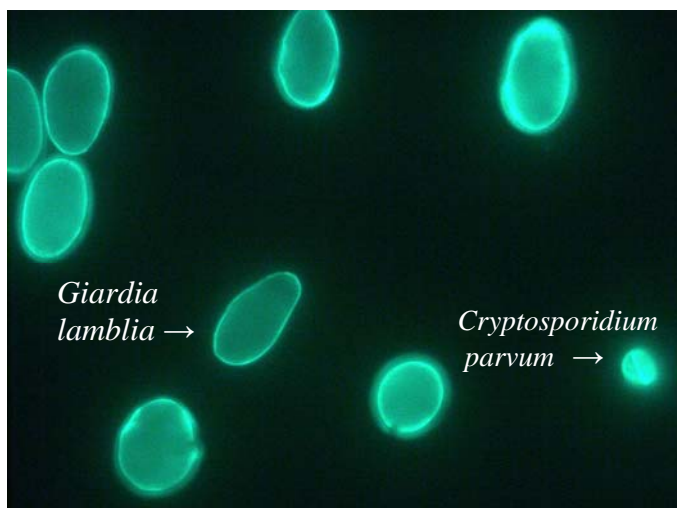
Tulokset ilmoitettiin kvalitatiivisesti muodossa: (oo)kystiä todettiin/ei todettu näytteessä/tutkitun vesinäytteen tilavuus. Numeerista, kvantitatiivista määritystä ei tehty. Toteaminen ja tunnistus edellyttivät, että partikkelien koko, muoto ja värjäytyvyys täsmäsivät standardin ISO 15553 kuvauksiin (ks. kappale 4.1.5).

5.1 MENETELMÄN VALIDOINTI TALOUS- JA PINTAVEDELLE

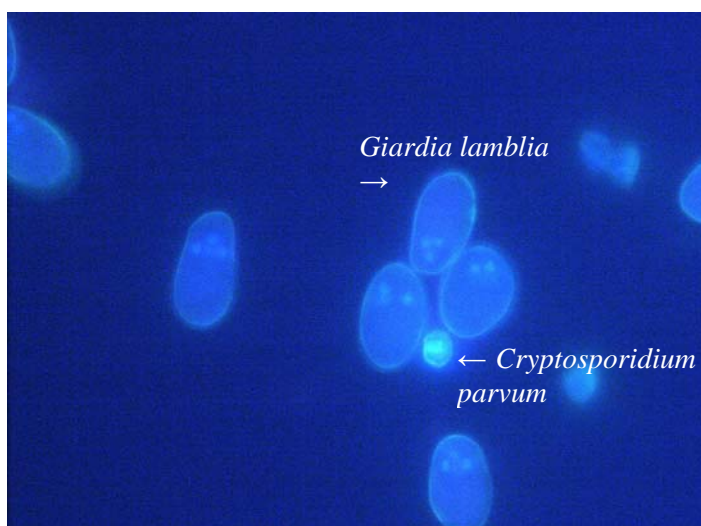
(Oo)kystiä todettiin ja pystyttiin tunnistamaan kaikista pinta- ja verkostovesinäytteistä, joihin oli lisätty positiivikontrollia. (Oo)kystat näyttivät tyypillisiltä sekä FITC- että DAPI-asetuksilla katsottuna. Positiivikontrollia lisättiin näytteisiin 100 µl ja 50 µl, jolloin näytteessä olisi pitänyt olla 10 000 tai 5000 (oo)kystaa. Kyseinen positiivikontrolli ei kuitenkaan sovellu saantotestauksiin vaan pitoisuus on suuntaa-antava. Näytteistä todettiin mikroskopoidessa vain useita kymmeniä (oo)kystiä, joten hävikkiä on tapahtunut paljon.

5.1.1 Värjäyskontrollit

Värjäyskontrolleissa (10 µl PC101) näkyi aina runsaasti (oo)kystia sekä FITC-asetuksella (Kuva 3.), että DAPI-asetuksella (Kuva 4).



Kuva 3. *Giardia lamblia* kystia ja *Cryptosporidium parvum* ookystia FITC-asetuksella katsottuna 1000- kertaisella suurennoksella. (Kuva 16.7.2009 Sara Kovanen)



Kuva 4. *Giardia lamblia* kystia ja *Cryptosporidium parvum* ookystia DAPI-asetuksella katsottuna 1000- kertaisella suurennoksella. (Oo)kystien sisällä näkyy selvästi siniset fluoresoivat tumat (2- 4 kpl). (Kuva 16.7.2009 Sara Kovanen)

5.1.2 Menetelmän validointi eri eluaatin konsentroititavoilla

Eluaatin eri konsentroititapoja (sentrifugointi ja pc-suodatus) vertailtaessa (oo)kystien toteamisessa ei havaittu eroa sentrifugoinnin ja suodattamisen välillä. Sekä sentrifugoimalla että polykarbonaattisuodatuksella konsentroidusta näytteestä todettiin ja tunnistettiin mikroskoopilla katsottaessa sekä *Giardia* kystia että *Cryptosporidiumin* ookystia suunnilleen saman verran.

5.2 MENETELMÄN VALIDOINTI PUHDISTETULLE JÄTEVEDELLE

5.2.1 Menetelmän validointi eri konsentroititavoilla

Jätevedestä, jota sentrifugoitiin suoraan ja johon oli lisätty positiivikontrollia, todettiin (oo)kystia mikroskopoitessa sekä paljon muita fluoresoivia taustapartikkeleita. Sen sijaan samassa jätevedessä, jota oli sentrifugoitu suoraan (600 ml) ja johon ei ollut lisätty positiivikontrollia, näkyi vain fluoresoivia taustapartikkeleita, mutta ei (oo)kystia.

Patruunasuodattimen läpi suodatetusta, positiivikontrollilla lisätystä puhdistetusta jätevedestä todettiin kymmeniä (oo)kystia mikroskopoitessa, mutta hävikki oli jälleen suuri ympättyyn positiivikontrollin määrään nähden. Lisäksi sekä FITC- että DAPI-asetuksella näkyi paljon taustapartikkeleita, jotka osittain fluoresoivat.

Puhdistetusta jätevedestä, joka suodatettiin ilman patruunaa polykarbonaattisuodattimelle, todettiin myös (oo)kystia mikroskopoitessa, mutta koska suodatin tukkeutui 1 l:n jälkeen ja loppunäyte (9 l) jouduttiin hylkäämään, (oo)kystia todettiin vain muutama ja hävikki oli erittäin suuri.

5.3 (OO)KYSTIEN ESIINTYMINEN TALOUSVEDEN TUOTANTOON KÄYTETTÄVISSÄ RAAKAVESISSÄ SEKÄ JÄTEVESISSÄ

5.3.1 Pinta- ja pohjavesinäytteet

Ensimmäisestä, toisesta ja kolmannelta kohteesta otetuista raakavesinäytteistä ei löydetty *Giardia* kystia tai *Cryptosporidiumin* ookystia (Taulukko 4). Pintavesien sameus vaihteli näissä näytteissä välillä 0,51 NTU–4,6 NTU. (Taulukko 4). Kohteista 4 ja 5 todettiin alustavia *Giardia*oita (Taulukko 4) ja näissä vesinäytteissä myös sameus ja sähkönjohtokyky olivat suurimmat. Alustavia *Cryptosporidiumeja* ei tunnistettu.

Taulukko 4. *Giardia* ja *Cryptosporidiumin* toteaminen sekä sameus, pH ja eC raakavesinäytteistä

Paikka	<i>Giardia</i> / suodatettu tilavuus	<i>Cryptosporidium</i> / suodatettu tilavuus	Sameus (NTU)	pH	eC (mSv/ cm ²)
Raakavesi 1	ei todettu/ 62 l	ei todettu/ 62 l	1,10	-	-
Raakavesi 2	ei todettu/ 25 l	ei todettu/ 25 l	2,75	-	-
Raakavesi 3	ei todettu/ n.100 l	ei todettu/ n.100 l	0,51	7,1	33,2
Raakavesi 4	todettiin alustavasti/ 20 l	ei todettu/ 20 l	3,00	7,4	122
Raakavesi 5	todettiin alustavasti/ 13 l	ei todettu/ 13 l	4,60	6,66	128

Alustavat kystat kohteista 4 ja 5 todettiin niiden koon (8–12 µm), muodon (ovaali) ja värjäytyvyyden perusteella (fluoresoivat reunat FITC-asetuksella). DAPI-asetuksella mahdollisten kystien sisällä näkyi värjäytynyttä ainesta, mutta tumat eivät olleet laskettavissa, joten toteaminen oli epävarmaa.

5.3.2 Jätevedet

Lähtevän jäteveden ensimmäisestä näytteestä ei löydetty tyypillisiä *Giardia* kystia tai *Cryptosporidiumin* ookystia (Taulukko 2). Toisen kohteen lähtevästä jätevedestä löytyi *Giardia* kysta (Taulukko 2) (Kuvat 5 ja 6).

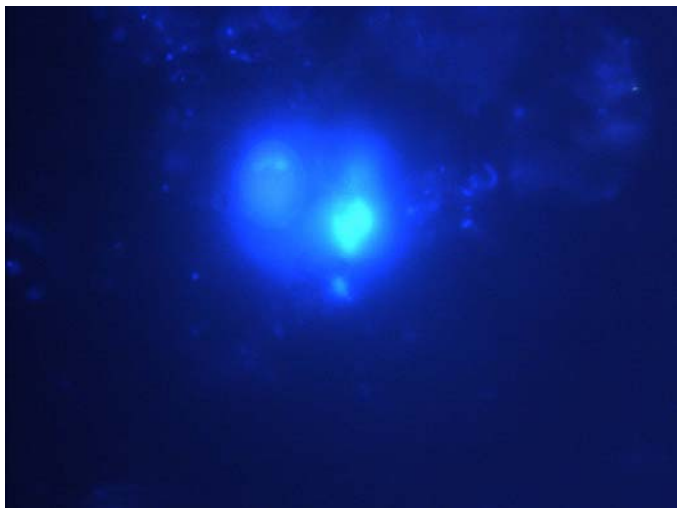
Taulukko 5. *Giardia* ja *Cryptosporidiumin* toteaminen puhdistetusta jätevedestä

Paikka	<i>Giardia</i> / suodatettu tilavuus	<i>Cryptosporidium</i> / suodatettu tilavuus
Puhdistettu jätevesi 1	ei todettu/ 10 l	ei todettu/ 10 l
Puhdistettu jätevesi 2	todettiin/ 10 l	ei todettu/ 10 l

Todettu *Giardia* kysta oli värjäytynyt reunoiltaan vihreäksi ja fluoresoi FITC-asetuksella katsottuna (Kuva 5). DAPI-asetuksella kystan sisällä näkyi kaksi tumaa. Koko (8–12 µm) ja muoto (ovaali) olivat kystalle sopivat (Kuva 6).



Kuva 5. Kuvassa *Giardia* spp. FITC-asetuksella (1000 x suurennos). Vihreä fluoresoiva värjäytyvyys ja koko (8–12 µm) täsmäävät *Giardia* tuntomerkkeihin. (Kuva 26.8.2009 Sara Kovanen)



Kuva 6. *Giardia* spp. DAPI-asetuksella katsottuna (1000 x suurennos). Vieressä oleva taustapartikkeli häiritsee *Giardian* tunnistamista, mutta sisällä erottuvat tumat (2 kpl) näkyvät kuitenkin selvästi. (Kuva 26.8.2009 Sara Kovanen)

6 TULOSTEN TARKASTELO

Giardian kystien ja/ tai *Cryptosporidiumin* ookystien havaitsemisen vesinäytteistä todettiin olevan haastavaa. Nämä määritykset tapahtuivat nyt ensimmäistä kertaa Terveiden ja Hyvinvoinnin laitoksella ja aikaisempaa käytännön kokemusta ei ollut. Vertailuna käytettiin positiivi- ja negatiivikontrolleilla ympättyjä näytteitä, joista pääteltiin, miltä tulisi näyttää (oo)kystille positiivinen tai negatiivinen näyte.

Menetelmän toimivuuden testauksissa eli validoinnissa kaikissa näytteissä, joihin oli lisätty positiivikontrollia (50 tai 100 µl, PC101), pystyttiin tunnistamaan *Giardian* kystia ja *Cryptosporidiumin* ookystia. Täten menetelmän voi katsoa toimivan sekä talous- ja pintavesi että puhdistetulle jätevedelle. (Oo)kystia oli kuitenkin vähäinen määrä verrattuna sellaiseen näytteeseen, jossa objektilasille oli pipetoitu pelkkää positiivikontrollia 10 µl. Tästä voidaan päätellä, että (oo)kystien hävikkiä tapahtui menetelmän eri vaiheissa. Saanto oli vähäinen sekä sellaisissa konsentraateissa, joihin oli lisätty positiivikontrollia ennen patruunasuodatusta, että sellaisissa konsentraateissa, joissa positiivikontrollia (PC101) oli lisätty steriiliin veteen vasta IMS-vaiheen alkaessa. (Oo)kystien häviämistä tapahtui siis sekä kapselia eluotaessa ja eluaattia konsentroidaessa, että immunomagneettisessa separaatiassa.

Positiivikontrollia lisättiin näytteisiin 5000–10 000 kappaletta (oo)kystia ja mikroskopoidessa todettiin vain useita kymmeniä (oo)kystia eli hävikki oli suuri. Todettuja (oo)kystia ei kuitenkaan laskettu tarkasti, vaan niiden lukumäärä arvioitiin suurpiirteisesti. Samanlaista hävikkiä menetelmien eri vaiheissa on todettu myös useissa aiemmissa tutkimuksissa (mm. Environment agency, 2009). DiGiorgio ym. 2002 mukaan Envirocheck high volume patruunat (EnvirocheckTM HV capsule, Pall, Germany) olisivat antaneet paremman saannon *Cryptosporidiumille*. Saanto oli kuitenkin vain hiukan parempi kuin Envirocheck standard patruunoilla (EnvirocheckTM STD capsule, Pall, Germany), joilla taas *Giardian* saannot olivat paremmat. Patruunatyypillä ei täten luultavimmin ole suurta merkitystä saantojen kannalta pintavesiä analysoitaessa.

Eri eluaatin konsentroititapoja vertaillessa mikroskopoidessa todettiin aina (oo)kystia. Polykarbonaattisuodatin oli kuitenkin vaikeahko käsitellä ja tuntui työläältä. Eluaatin konsentrinti standardin mukaisesti sentrifugoimalla vaikutti paremmalta tavalta analysoida näytettä.

Menetelmässä käyttämämme tasoravistelija oli erilainen malliltaan, kuin standardissa suositeltu ravistelija. Myös sentrifugoinnissa käyttämämme putket olivat tasapohjaisia, kun standardissa suositeltiin käyttämään kartiopohjaisia putkia, jolloin pelletti jää paremmin putken pohjalle. Nämä eroavuudet ovat voineet vaikuttaa epäsuotuisasti myös saantoihimme.

Koska (oo)kystien hävikkiä tapahtuu ja saanto on myös aikaisempien tutkimusten mukaan osoittautunut vaihtelevaksi ja välillä hyvinkin heikoksi (mm. DiGiorgio ym., 2002; Environment agency, 2009), on epävarmaa, millainen määrä (oo)kystia näytteessä tulee olla, jotta niiden toteaminen ja määrittäminen onnistuvat. Jos näytteessä on vain muutama (oo)kysta, on epävarmaa, että kyseiset (oo)kystat päätyvät mikroskopointiin ja toteamiseen asti. Mikroskopoidessa avautuva näkymä on hyvin pieni verrattuna koko objektilasien kaivon eli näytteen pinta-alaan. Siksi onkin tärkeää mikroskopoida näyte erittäin huolellisesti läpi ja tarkastaa jokainen kohta, jottei (oo)kystia jäisi huomaamatta.

Mikroskopoinnin todettiin olevan erityisen haastavaa, sillä vedessä olevat (oo)kystat voivat olla vaurioituneita, jolloin värjäytyvyys ja muoto voivat olla hyvin erilaisia (Environment agency, 2009) verrattuna positiivikontrollien tyyppikantoihin. Tämä vaikeutti myös (oo)kystien toteamista vesinäytteistä. Kaikissa raakavesinäytteissä nähtiin FITC-asetuksella

40 x- ja 100 x- suurennoksilla värjäytyneitä, fluoresoivia hiukkasia, joissa oli myös omenanvihreä reunus. Alustavia *Giardian* kystia sisältäviksi todetuissa näytteissä oli läheisesti kystia muodoltaan ja värjäytyvyydeltään muistuttavia partikkeleita, mutta varmasti niiden ei voi sanoa olevan kystia, koska värjäytyvyys DAPI:lla oli vaikeasti tulkittavissa, sillä hiukkasten sisällä ei näkynyt erillisiä tumia ja ne olivat muutenkin heikosti värjäytyneitä. Täysin varmasti myöskään negatiivisten näytteiden ei voi sanoa olevan negatiivisia, sillä taustahiukkasissa löytyi fluoresoivia ja kooltaan (oo)kystamaisia partikkeleita, mutta muodoltaan erilaisia. Myös värjäytyvyys DAPI:lla oli erilainen kuin (oo)kystilla pitäisi (partikkelin sisällä ei näkynyt mitään tai se oli kokonaan fluoresoiva tai vääränvärisen). Kuitenkin mahdollisia (oo)kystia ilmoitettiin olevan näytteessä mikäli niiden kokoa ja muotoa vastaavia sekä läheisesti samalla tavalla värjäytyneitä partikkeleita löytyi.

Puhdistettuja jätevesinäytteitä mikroskopoitaessa taustaa oli runsaasti sekä FITC- että DAPI-asetuksilla katsottuna ja se vaikeutti näytteiden analysointia. Kuitenkin yhdestä näytteestä todettu *Giardian* kysta erottui muusta taustasta molemmilla mikroskoopin asetuksilla ja näin ollen sen voitiin todeta olevan kysta.

(Oo)kystia voi sekoittaa mikroskopoitaessa mm. leviin tai muihin taustapartikkeleihin. Muutkin partikkelit kuin (oo)kystat (esim. levät) saattavat värjäytyä FITC:llä (Carey, ym. 2004), vaikka väriaineen pitäisi olla spesifinen (oo)kystien vasta-aineille. (Oo)kystien ja muiden mikrobien sisällä oleva nukleiniaine värjäytyy aina DAPI-väriaineella epäspesifisesti. DAPI:lla katsottuna mikroskooppiliuskoilla näkyi paljon taustahiukkasia ja se heikensi tulosten arviointia. Mikroskopointia hankaloittaa myös se, että *Cryptosporidiumin* eri lajeillakin on eroja. *Cryptosporidium andersoni*, jota löytyy karjasta, on kooltaan jonkin verran isompi (7–9 µm halkaisija) kuin ihmiselle infektiiviset *Cryptosporidium hominis* ja *Cryptosporidium parvum* (4–6 µm halkaisija) (Environment Agency, 2009).

Suodatetut tilavuudet raakavesissä vaihtelivat 13–100 l:n välillä ja täten näytteet indikoivat vedenlaatua kyseisellä ajanhetkellä, eikä vedenlaatua pystytty arvioimaan pidemmältä aikaväliltä. Suuremmat tilavuudet (1000 l) antaisivat enemmän merkkejä vedenlaadusta pidemmällä aikavälillä. Pintavesiä ei pysty suodattamaan niin suuria tilavuuksia, mutta verkostovesiä pystyy ja koska verkostovedet ovat huomattavasti pintavesiä puhtaampia, ei niissä taustan värjäytyvyys vaikeuta juurikaan tunnistamista.

Pintavesinäytteistä määritettiin myös sameus ja se vaihteli välillä 0,51 NTU–4,6 NTU. Sameus vaikutti suodatettuun tilavuuteen siten, että sameinta näytettä (4,6 NTU) saatiin suodatettua patruunan läpi vain 13 l, kun taas kirkkainta näytettä suodatettiin n. 100 l. 100 l:n tilavuus on tosin vain arvio, koska virtausmittari ei näyttänyt oikeata lukemaa eikä mitannut virtausta koko aikaa. Puhdistetuista jätevesistä emme määrittäneet lainkaan veden sameusarvoa. Sameuden, joka liittyy vedessä olevien partikkelien lukumäärään, on joissakin aiemmissa tutkimuksissa korreloinut positiivisesti (oo)kystien esiintymiseen (Robertson & Gjerde, 2001; LeChevallier ym., 1991). Omien analysoitujen näytteiden ja sameuden välillä ei voi sanoa olleen korrelaatiota, koska (oo)kystia ei voinut varmuudella todeta. Sameimmista näytteistä (4,6 NTU ja 3 NTU) kuitenkin todettiin alustavasti kystia ja lisäksi paljon muuta taustamateriaalia, mikä osaltaan häiritsi näytteen mikroskopointia.

Mikroskopoidessa taustaa näkyi myös negatiivikontrolleissa. Pelkkää vesijohtovettä sisältävillä kaivoilla näkyi värjäytynyttä mattoa, mikä ei kuitenkaan fluoresoinut ja paljon pieniä hippuja, jotka fluoresoivat. Kuitenkin hippuset olivat liian pieniä ollakseen *Giardia* tai *Cryptosporidium*ejä. Taustaa kuitenkin oli näkyvissä ja voidaan miettiä mistä kyseinen tausta ja hiukkaset ovat peräisin. Vaikka värjäyksessä käytettävä FITC sitoutuukin spesifisesti alkueläinten solujen vasta-aineisiin, myös epäspesifistä sitoutumista ainakin leviin ja hiivoihin on havaittu (Carey ym., 2004). Pelkkää eluutiopuskuria värjätessä taustaa ei näkynyt paljoa. Myöskään värjäyksessä käytetyssä negatiivikontrolissa (50 µl PBS) ei taustaa juuri näkynyt. Pienet hiput voivat olla esimerkiksi pölyä, joka värjäytyy ja fluoresoi. Mattomainen, vihertävä tausta voi johtua joistakin epäpuhtauksista näytteessä tai IMS- tai väriaineissa olevista partikkeleista.

Immunomagneettisesta separaatiosta (IMS) huolimatta myös ei-spesifisiä hiukkasia ja partikkeleita jää kiinni vasta-aineilla päällystettyihin helmiin ja kulkeutuu aina objektilasille asti. Ylimääräistä taustaa aiheuttaa myös se, että supernatanttia pipetoidessa eroon helmistä sitä jää aina hieman ja se päättyy lopulta mikroskoopille asti. IMS:ssä helmiä pestään kahdesti puskureilla (10 x puskurilla A ja B kerran ja kerran 1 x puskurilla A), jolloin taustamateriaalia saadaan ainakin vähennettyä. Useampi peseminen puskurilla saattaisi puhdistaa taustamateriaalia entisestään, mutta varmaan myös lisää riskiä (oo)kystien irtoamiseen helmistä ja sen myötä lisähävikkiä.

Talousvesien raakavesien tilasta on tärkeää saada jatkossakin tietoa, jotta tiedämme saavamme turvallista vettä käyttöömme. Muiden mikrobien ohella alkueläinten, kuten *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* tutkiminen on tärkeää, sillä ne pystyvät läpäisemään vedentuotantoprosesseja paremmin kuin esim. useat bakteerit. *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* tutkiminen on vielä haasteellista menetelmän kalleuden ja analyysin epävarmuustekijöiden vuoksi. Olisi kuitenkin tärkeää omata valmiudet näiden alkueläinten tutkimiseen, koska niitä on löydetty pintavesistä Suomesta. Hörman ym., v 2003 löysivät *Giardiaa* 13,7 % ja *Cryptosporidiumia* 10,1 % tutkituista 139 näytteestä. Ne ovat aiheuttaneet vesiepidemioita myös Ruotsissa (Neringer ym., 1987) ja ne ovat olleet osallisena vesiepidemioissa myös meillä (Rimhanen-Finne ym., 2010). Norjassa *Giardiaa* ja *Cryptosporidiumia* on löydetty pohjavesistä samanlaisilta leveysasteilta kuin Suomi (Robertson & Gjerde, 2001), joten ne voivat olla potentiaalisia suolistomikrobeja myös meillä. Kokemus, koulutus ja yhteistyö eri tahojen välillä helpottaisivat näiden alkueläinten tutkimista. Mikäli tulevaisuudessa menetelmän kehitystä pidetään yllä ja tutkimusta laitoksessa jatketaan, antaa se luultavasti tärkeää tietoa Suomen vesien tilasta, vedenpuhdistuksen riittävydestä ja juomaveden turvallisuudesta.

7 YHTEENVETO

Giardian ja *Cryptosporidiumin* toteamiseen ja tunnistamiseen suunniteltu menetelmä toimii parhaiten puhtaille vesille, kuten talousvesi, missä ei ole paljon taustaa vaikeuttamassa mahdollisten (oo)kystien tunnistamista mikroskopoitaessa. Myös pintavesiä sekä puhdistettua jätevettä voidaan analysoida menetelmällä, mutta analysointi on haastavampaa.

Menetelmällä saadaan analysoitua (oo)kystien mahdollista esiintymistä sekä pinta- että talousvesissä ja tätä kautta arvioida niiden mahdollisuutta aiheuttaa vesivälitteisiä epidemioita myös Suomessa.

Menetelmässä on heikkouksia ja etenkin saannot (oo)kystien lukumäärissä ovat olleet vaihtelevia ja välillä hyvinkin alhaisia. Eri vaiheissa analyysia tapahtuvaa (oo)kystien hävikkiä pitäisi pyrkiä vähentämään. Menetelmään kehitetyt tarvikkeet ja reagenssit ovat myös kalliita, joten menetelmää on vaikeaa toteuttaa kovin usein.

Harjoittamalla tekniikkaa saannot voivat parantua. Myös PCR-tekniikat kehittynevät tulevaisuudessa, jolloin (oo)kystien tunnistaminen ja toteaminen voi tulla helpommaksi ja luotettavammaksi. PCR itsessään on myös nopeahko ja edullisempi tehdä, tosin näytteelle on tehtävä ennen PCR:ää kuitenkin myös suodatus- ja IMS-käsittely.

LÄHDELUETTELO

Adam, R.D. 1991. *Giardia*: Detection and occurrence in the environment. Kirjassa: Bitton, G (toim).: Encyclopedia on Environmental Microbiology vol. 3. s. 1477- 1489. Wilson and Sons, New York, USA.

Arrowood, M.J.,1997. Diagnosis. Kirjassa: Fayer, R. (toim).: Cryptosporidium and cryptosporidiosis. s. 43-64. Boca Raton, FL, CRC Press.

Belosevic, M., Finch, G.R. 1997. Esitetty Kansainvälisessä Artikkelikokoelmassa vesivälitteisestä Cryptosporidiumista. Maaliskuu 1997. Newport beach, CA, USA.

Bennett, J.V., Scott, D., Holmberg, M., Rogers, F., Solomon, S.L. 1987. Infections and Parasitic Diseases. American Journal of Preventive Medicine 3: 102-114.

Bodley-Tickell, A. T., Kitchen, S. E., and Sturdee A. P. 2002. Occurrence of *Cryptosporidium* in agricultural surface waters during an annual farming cycle in lowland UK. Water Research 36: 1880- 1886.

Black, E. K., Finch, G.R., Taghi-Kilani, R., and Belosevic, M. 1996. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. FEMS Microbiology Letters 135: 187–189.

Caccio, S.M., Thompson, J., McLauchlin, J., Smith, H.V. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends in Parasitology 21: 430-437.

Campbell, A.T., Robertson, L.J., Smith, H.V. 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts- correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. Applied and Environmental Microbiology 58: 3488- 3493.

Carey, C.M, Lee, H., Trevors, J.T. 2003. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water Research 38: 818- 862.

Casemore, D.P. 1990. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiology and Infection*, 104: 1- 28.

Casemore, D.P, Wright, S. E, Coop, R.L. 1997. Cryptosporidiosis- human and animal epidemiology. Kirjassa: Fayer, R. (toim). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. s. 65- 92. Boca Raton, USA, Florida, CRC Press.

Castro-Hermida J. A, García- Presedo I, Almeida A, González- Warleta M, Correia de Costa J, Mezo M. 2008. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia Duodenalis*. *Water Research* 42: 3528-3538.

Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Langer- Curry R., Widmer, G., Akiyoshi, D.E., Tanriverdi, S., Tzipori, S., 2006. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 851- 857.

Chauret, C, Armstrong, N., Fisher, J., Sharma, R., Springthorpe, S., Sattar, S. 1995(a). Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. *Journal of American Water Works Association* 1995; 87 (11): 76-84.

Chauret, C., Chen, P., Springthorpe, S., Sattar, S. 1995(b). Effect on environmental stressers on the survival of *Cryptosporidium* oocysts. Kirjassa: Proceeding of American Water Works Association Water Quality Technology Conference, November 1995, New Orleans. Denver, CO, American Water Works Association.

Chauret, C. 2002. Disinfection of Protozoan Parasites. Kirjassa: Bitton, G. (toim.). *Encyclopedia of Environmental Microbiology* vol 2. s. 1066- 1073. Wilson and Sons, New York, USA.

Clancy, J.L., Hargy, T.M., Marshall, M.M. 1998. UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. *Journal of the American Water Works Association* 90:92–102.

Craun, G.F. 1986. Waterborne giardiasis in the United States 1965–84. *Lancet* 513–514.

- Craun, G.F. 1984. Waterborne outbreaks of giardiasis: current status. Kirjassa: Erlandsen, S.L., Meyer, E.A. (toim.). *Giardia and giardiasis*. s. 243– 261. New York, Plenum.
- Craun, G.F. 1990. Waterborne giardiasis. Kirjassa: Meyer, E.A. (toim). Human parasitic diseases. Vol. 3, Giardiasis. s.267- 293. Amsterdam, Elsevier.
- Craun, G. F, Hubbs, S. A., Frost, F. 1998. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. Journal of the American Water Works Association 90: 81- 91.
- Cohn, P. C. 1999. Kirjassa: Letterman, R. D. (toim.). Water Quality and Treatment. A Handbook of Community Water Supplies. 14.1- 14.60. McGraw- Hill, New York.
- Current, W.L., Garcia, L.S. 1991. Cryptosporidiosis. Clinical Microbiology Reviews 4: 325- 328.
- DeReigner, D.P. ym., 1989. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river and tap water. Applied and Environmental Microbiology, 55: 1223- 1229.
- DiGiorgio, C. L., Gonzales, D. A., Huitt, C. C. 2002. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using environmental protection agency method 1623. Applied and Environmental Microbiology 2002: 68(12): 5952- 5.
- DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.P., Jakubowski, W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. The New England Journal of Medicine 332: 855- 859.
- Dykes, A.C. ym. 1980. Municipal waterborne giardiasis: an epidemiological investigation. Annals of Internal Medicine 92:165–170.
- Environment Agency. 2009. The Microbiology of Drinking Water (2009) - Part 14- Methods for isolation, identification and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. Methods for the Examination of Waters and Associated Materials.

Erlandsen, S. L. 1994. Biotic transmission—Is giardiasis a zoonosis? Kirjassa: Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A., Lymbery, A. J. (toim.). *Giardia*: from molecules to disease. s. 83–97. Wallingford, England, CAB International.

Evira(2010a).http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia_aiheuttavia_loisia_ja_alkuelaimia/giardia_duodenalis/ (luettu 10.6.2010).

Evira(2010b).http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia_aiheuttavia_loisia_ja_alkuelaimia/cryptosporidium_parvum/ (luettu 10.6.2010).

Farthing, M. J. G. 1994. Giardiasis as a disease. Kirjassa: Thompson, R.C.A., Reynoldson, J.A., Lymbery, A.J. (toim.) *Giardia*: from molecules to disease. 15–37 Wallingford, England, CAB International.

Fayer, R., Ungar, B.L.P. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. Microbiological Reviews, 50: 458- 483.

Finch, G.R., Black, E.K., Gyürék, L., Belosevic, M. 1993(a). Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by in vitro excystation and animal infectivity. Applied and Environmental Microbiology, 59:4203–4210.

Finch, G.R., Black, E.K., Labatiuk, C.V., Gyürék, L., Belosevic, M.1993(b). Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. Applied and Environmental Microbiology, 59:3674– 3680.

The Finnish National Environmental Institute. 30 June 2003, revision date. Water services in Finland. [Online.] The Finnish Environment Institute, Helsinki, Finland. <http://www.vyh.fi/eng/environ/state/waterre/waterser/waterser.htm>.

Flannagan, P.A., 1992. *Giardia*—diagnosis, clinical course and epidemiology—a review. Epidemiology and Infection, 109:1–22.

Franzen, C., Muller, A. 1999. Cryptosporidia and microsporidia- waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 34: 245- 262.

Guy, R. A., Payment, P., Krull, U. J., Horgen, P. A., 2003. Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5178- 5185.

Haas, C. N., Rose J. B. 1995. Reconciliation of microbial risk models and outbreak epidemiology: the case of the Milwaukee outbreak. Kirjassa: Proceeding of the 1994 Annual conference: Water Quality. s. 517- 23. Published in New York, 1994. American Water Works Association.

Hall, T., Pressdee, J., Carrington, E. C. 1994. Removal of *Cryptosporidium* oocysts by water treatment processes. Marlow, England, Foundation for Water Research.

Hancock, C. M., Rose, J. B., Callahan, M. 1997. The prevalence of cryptosporidium in US groundwaters. Kirjassa: Fricker, C. R., Clancy, J. L., Rochelle, P. A. Proceedings of the International Symposium on Waterborne Cryptosporidium, s. 147- 152. March 1997. Newport Beach, CA, USA. Denver, CO, American Water Works Association.

Hancock, C. M., Rose, J. B., Callahan, M. 1998. *Cryptosporidium* and *Giardia* in US groundwater. *Journal of American Water Works Association* 90(3): 58- 61.

Hansen, J. S., Ongerth, J. E. 1991. Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2790- 2795.

Health Canada, Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Supporting Documentation. Protozoa: *Giardia* and *Cryptosporidium*. April 2004. Health Canada. Ottawa, Ontario.

Hibler, C. P., Hancock, C. P., Perger, L. M., Wegrzn, J. G., Swabby, K. D. 1987. Inactivation of *Giardia* cysts with chlorine at 0.5 °C and 5 °C. Denver, CO, American Water Works Association Research Foundation.

Homan, W. L. ym. 1992. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitology Research*, 78:313–323.

Homan, W. L. ym. 1994. Characterization of *Giardia* isolates. Kirjassa: Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A., Lymbery, A. J. (toim.) *Giardia: from molecules to disease*. s.54. Wallingford, England, CAB International.

Hsu, B. M., Yeh, H. H. 2003. Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water treatment: A pilot- scale study. *Water Research*, 37: 1111-7.

Hörman, A., Rimhanen- Finne, R., Maunula, L., Von Bonsdorff, C- H., Torvela, N., Heikinheimo A., Hänninen, M- L., 2003. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses, and Indicator Organisms in Surface Water in Southwestern Finland, 2000-2001. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 87- 95.

International Standard ISO/FDIS 15553: Water quality- Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water.

Ives, K. 1994. *Cryptosporidium* and water supplies: treatment processes and oocyst removal. Kirjassa: Badenoch, J. (toim.) *Cryptosporidium* in water supplies. London, Her Majesty's Stationery Office.

Jarroll, E. L., Erlandsen, S. L., Meyer E. A. 1984. *Giardia* and Giardiasis. s. 311- 382. Plenum Press, New York.

Joce, R. E. Bruce, J., Kiely, D. 1991. An outbreak of cryptosporidiosis associated with a swimming pool. *Epidemiology and Infection*, 107: 497-508.

Jokipii, A. M. M., Hemila, M., Jokipii, L. 1985. Prospective study of acquisition of *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, and gastrointestinal illness. *Lancet*: 487–489.

Karanis, P., Schoenen, D., Seitz, H. M. 1998. Distribution and removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* on water supplies in Germany. *Water Science and Technology* 37: 2: 9-18.

Kramer, M.H., Sorhage, F. E., Goldstein, S. T. 1998. First reported outbreak in the United States of cryptosporidium associated with recreational lake. *Clinical Infectious Diseases* 26: 27- 33.

Korich, D.G. Mead, J. R., Madore, M. S., Sinclair, N. A., Sterling, C. R. 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1423–1428.

Kuusi M. 2009. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos, Helsinki. 2009. Akuutin ripulin aiheuttajat Suomessa. *Moodi* 5/ 2009.

LeChevallier, M. W., Norton W. D., Lee, R. G. 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium spp.* in surface water supplies. *Applied Environmental Microbiology* 57: 2610- 2616.

LeChevallier, M. W., Norton, W. D., J. 1995. *American Water Works Association* 89(9), 54-68.

LeChevallier, M. W., Norton, W. D., Siegel, J. E., Abbaszadegan, M. 1995. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Girdia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Applied Environmental. Microbiology* 61, 690- 697.

Lim, Y. A. L., Wan Hafiz, W. I., Nissapatorn, V. 2007. Reduction of *Cryptosporidium* and *Giardia* by sewage treatment processes. *Tropical Biomedicine* 24:1: 95- 104.

MacKenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., David, J. P. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine* 331: 161- 167.

Mank, T. G., Zaat, J. O. M. 2001. Diagnostic advantages and therapeutic options for giardiasis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2001:10: 8: 1513- 1519.

Marshall, M.M., Naumovitz, D., Ortega, Y.1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 67- 85.

Mawdsley, J. L., Brooks, A. E., Merry, R. J. 1996. Movement of the protozoan pathogen *Cryptosporidium parvum* through three contrasting soil types. *Biology and Fertility of Soils*, 21: 30–36.

McCuin, R. M., Clancy, J. L. Modification to United States Environmental Protection Agency methods 1622 and 1623 of *Cryptosporidium* oocysts and *Girdia* cysts in water. *Applied Environmental Microbiology* 2003; 69(1): 267-74.

McCuin, R. M., Clancy, J. L. 2004. Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. *Journal of Microbiological Methods* 63: 73- 88.

Meyer, E. A.,1994. *Giardia* as an organism. Kirjassa: Thompson, R. C. A, Reynoldson, J. A., Lymbery A. J. (toim). *Giardia: from molecules to disease*. s. 3- 14. Wallingford, England, CAB International.

Meyer, E. A., Jarroll, E. J., 1980. Giardiasis. *American Journal of Epidemiology* 111, 1- 12.

Moore, G.T. Cross, W. M., McGuire, D., Mollohan, C. S., Gleason,. N. N., Healy, G. R., Newton, L. H.1969. Epidemic giardiasis in a ski resort. *New England Journal of Medicine*, 281:402–407.

Nash, T. E., Herrington, D. A., Losonsky, G. A., Levine, M. M. 1987. Experimental human infections with *Giardia intestinalis*. *Journal of Infectious Diseases*, 156:974–984.

Nash, T. E., McCutchan, T., Keister, D., Dame, J. B., Conrad, J. D., Gillin, F. D. 1985. Restriction endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *Journal of Infectious Diseases*, 152:64–73.

Neringer, R., Andersson, Y., Eitrem, R. 1987. A Waterborne Outbreak of Giardiasis in Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 19: 85- 90.

Neumann, N. F., Gyurek, L. L., Gammie, L., Finch, G. R., Belosevic, M. 2000. Comparison of animal infectivity and nucleic acid staining for assessment of *Cryptosporidium parvum* viability in water. *Applied Environmental Microbiology*, 66(1): 406–412.

Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A., Yardley, J. H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. Abstract.

Osterholm, M.T., Forfang, J. C., Ristinen, T. L. 1981. An outbreak of foodborne giardiasis. *New England Journal of Medicine* 304:24–28.

Payment, P. 1999. Poor efficacy residual chlorine disinfectant in drinking water to inactivate waterborne pathogens in distribution systems. *Canadian Journal Microbiology* 45: 709-715.

Payment, P., Berte, A., Fleury, C. 1997. Sources of variation in isolating rate of *Giardia lamblia* cysts and their homogeneous distribution in river water entering a water treatment plant. *Canadian Journal Microbiology* 43: 687- 689.

Plutzer, J., Takó, M.H., Márialigeti, K., Törökné, A., Karanis, P. 2007. First investigations into the prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in Hungarian drinking water. IWA Publishing 2007. *Journal of Water and Health*/05.4/2007.

Pönkä, A., Kotilainen, P., Rimhanen-Finne, R., Hokkanen, P., Hänninen, M L., Kaarna, A., Meri, T., Kuusi, M. A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki, November 2008. Food Control Unit, Helsinki City Health Department, Finland.

Quintero-Betancourt, W., Gennaccaro, A., Scott, T. M., Rose, J. B. 2003. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. *Applied Environmental Microbiology* 69: 5380- 8.

Ransome, M.E., Whitmore, T.N., Carrington, E.G. 1993. Effect of disinfectants on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Water Supply* 11:75–89.

Rendtorff, R.C. 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites: *Giardia intestinalis* cysts given in capsules. *American Journal of Hygiene* 59:209–220.

Rice, E.W., Hoff, J.C. 1981. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by ultraviolet radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 42:546–547.

Rimhanen-Finne, R. 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection in environmental and faecal samples. Department of Food and Environmental Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki. Helsinki, Finland.

Rimhanen-Finne, R., Enemark, H. L., Kolehmainen, J., Toropainen, P., Hänninen, M-L. 2006. Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme- linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology* 145:345- 348.

Rimhanen-Finne, R., Hänninen, M-L., Vuento, R., Laine, J., Jokiranta, T. S., Snellman, M., Pitkänen, T., Miettinen, I., Kuusi, M. 2010. Contaminated water caused the first outbreak of giardiasis in Finland, 2007: A descriptive study.

Rimhanen-Finne, R., Hörman, A., Ronkainen, P., and Hänninen, M-L. 2002. An IC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface waters in Finland. *J. Microbiol. Methods* 50: 299-303.

Rimhanen-Finne, R., Ronkainen, P., Hänninen, M-L. 2001. Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage sludge by IC-PCR. *Journal of Applied Microbiology* 91:1030- 1035.

Robertson, L. J., Gjerde, B. 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw waters in Norway. *Scandinavian Journal of Public Health* 29: 200- 207.

Rochelle, P. A. 2002. *Giardia*: Detection and Occurrence in the Environment. *Luettavissa: Kirjassa: Bitton, G (toim): Encyclopedia on Environmental Microbiology vol. 3. s. 1477-1489. Wilson and Sons, New York, USA.*

Rose, J. B., Cifrino, A., Madore, M.S., Gerba, C. P., Sterling, C. R., Arrowood, M. J. 1986. Detection of *Cryptosporidium* from wastewater and freshwater environments. *Water Science and Technology* 18: 233–239.

Rose, J. B., Haas, C. N., Regli, S. 1991. Risk assessment and control of waterborne giardiasis. *American Journal of Public Health* 81: 709–713.

Rubin, A. J. 1988. Factors affecting the inactivation of *Giardia* cysts by monochloramine and comparison with other disinfectants. Kirjassa: Proceedings of the Conference on Current Research in Drinking Water Treatment, s. 224–229. Cincinnati, OH, United States Environmental Protection Agency (Report EPA/600/9-88/004).

Smith, H.V., Smith, A. L., Girdwood, R. W. A., Carrington, E. C. 1990. The effect of free chlorine on the viability of *Cryptosporidium* sp. oocysts isolated from human faeces. Kirjassa: Badenoch, J. (toim). *Cryptosporidium* in water supplies. London, Her Majesty's Stationery Office.

Sterling, C.R., 1990. Waterborne cryptosporidiosis. Kirjassa: Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. (toim). *Cryptosporidiosis of Man and Animal*. s. 51- 58. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Suomen Ympäristökeskus. Luettavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=6738&lan=fi>. Päivitetty 4.6.2010.

Svoboda, I., Read, I., Kemp, J. S., Wright, S. E., Coop, R. L., Mawdsley, J. L., Merry, R. J., Theodoru, M. K., Pain, B. F., Bukhari, Z. and Smith, H. V. 1997. *Cryptosporidium* on cattle farms. Kirjassa: Proceedings of the Chartered Institution of Water and Environmental Management symposium, *Cryptosporidium* in water—the challenge to policy makers and water managers, Glasgow, 4 December 1997. London, Chartered Institution of Water and Environmental Management.

Sykora, J. L., Sober C. A., Casson L. W., Gavaghan P. D. 1991. Distribution of *Giardia* cysts in waste water. *Water Science and Technology* 24:187–192.

Tamburrini, A., Pozio, E., 1999. Long- term survival of, *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). International Journal for Parasitology 29: 711- 715.

Teunis, P. F. M., van der Heijden, O. G., van der Giessen, J. W. B., Havelaar, A. H. 1996. The dose- response relation in human volunteers for gastrointestinal pathogens. Bilthoven, Netherlands, Rijksinstituut voor Milieuhygiene en Volksgezondheid (RIMV Report no. 28455002).

THL, Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. Raportti 17/ 2010. Tartuntataudit Suomessa 1995-2009. Terhi Hulkko, Outi Lyytikäinen, Markku Kuusi, Säde Seppälä, Petri Ruutu. Luettavissa: <http://www.thl.fi/thl-client/pdfs/a4c2f994-438c-4f3e-9d72-7d0bf17f551c>.

THL, Terveysten ja hyvinvoinnin laitos, 2007. Luettavissa osoitteessa: www.ktl.fi/attachments/suomi/julkaisusarja_b/2008/2008b09.pdf

Thompson, R. C. A., Meloni, B. P., Lymbery, A. J. 1988. Humans and cats have genetically identical forms of *Giardia*: evidence of a zoonotic relationship. Medical Journal of Australia, 148: 207–209.

Thurman, R., Faulkner, B., Veal, D., Cramer, G., Meiklejohn, M. 1998. Water quality in rural Australia. Journal of Applied Microbiology 84(4), 627- 632.

Tibayrenic, M. 1994. How many species of *Giardia* are there? Kirjassa: Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A., Lymbery, A. J. (toim.). *Giardia*: from molecules to disease. s. 41–48. Wallingford, England, CAB International.

Tsuchiya, H. 1931. A study on the variability in dimensions and number of discharged *Giardia lamblia* (Stiles, 1915) from day to day under normal conditions. American Journal of Hygiene 13:544–567.

United States Environmental protection agency (USEPA), (1999) Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA, EPA 821- R- 99- 006. United States Environmental protection agency, 2005. Washington D. C.

Upcroft, J. A., Upcroft, P. *Giardia*: Basic Biology, Genetics and Epidemiology. Kirjassa: Bitton, G. (toim.). Encyclopedia of Environmental Biology. Vol 3. 2002. Wilson and Sons, New York.

Van Asperen, A., Mank, T., Medema, G. J., Stijnen, C., de Boer, A. S., Groot, J. F. 1996. An outbreak of cryptosporidiosis in Netherlands. European Communicable Diseases Bulletin 1: 11- 12.

Yu, X., Van Dyke, M .I., Portt, A., Huck, P. M. 2009. Development of a direct DNA extraction protocol for real-time PCR detection of *Giardia lamblia* from surface water. Ecotoxicology. 2009. 18:661–668.

Watkins, J. 2010. Centre for research into environment and health (CREH) - analytical. Henkilökohtainen tiedonanto/ koulutus 22.2.2010- 23.2.2010. Leeds, Iso- Britannia.

WHO 2002. Guidelines for drinking- wter quality, second edition. Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*). Luettavissa: www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob5.pdf (luettu 23.9.2010)