



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Förekomst av *Giardia intestinalis* i svenska dikobesättningar

Jenny Fällman

*Uppsala
2017*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2017:69*

Förekomst av *Giardia intestinalis* i svenska dikobesättningar

Prevalence of *Giardia intestinalis* in Swedish beef cattle

Jenny Fällman

Handledare: Camilla Björkman, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Karin Troell, SVA

Examinator: Madeleine Tråvén, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Delnummer i serie: Examensarbete 2017:69

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *Giardia*, dikor, kalv, parasit, protist, superspridare, ålder, strandbete, zoonos, livsmedel

Key words: *Giardia*, beef cattle, calf, parasite, protist, super shedder, age, pasture, zoonosis, produce

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Giardia är encelliga parasiter, så kallade protozoer. Släktet *Giardia* omfattar flera arter varav en, *Giardia intestinalis* (synonymer: *Giardia duodenalis* och *Giardia lamblia*), infekterar mag-tarmkanalen och kan orsaka sjukdom hos djur och människor. Många infektioner förlöper helt symtomfritt både hos djur och människor men dessa individer kan ändå sprida smittan vidare. Vanliga symtom vid infektioner hos människa är diarré, buksmärta, magkramper, trötthet och viktninskning. Hos vuxna nötkreatur och kalvar har endast lös avföring kunnat kopplas till giardiasis men det finns även undersökningar som inte hittat några samband mellan lös avföring och infektion. Parasiten smittar fekalt-oralt via cystor som utsöndras med avföringen. Vanliga smittvägar är direktsmitta, vatten och när det gäller människor till en mindre del livsmedel.

Syftet med studien var att undersöka prevalensen av *G. intestinalis* hos kalvar i svenska dikobesättningar samt att undersöka om det fanns något samband mellan andelen smittade djur och deras ålder.

277 avföringsprover samlades in från 24 dikobesättningar i 2 områden i Sverige. Alla djur i undersökningen var under 3 månader vid provtagningen. En översiktlig klinisk undersökning gjordes av varje individ. Proverna koncentrerades, kylförvarades och undersöktes sedan med fluorescensmikroskopering. Den yngsta positiva individen var bara 1 dygn gammal. Prevalensen var 38,3 % (CI 95 % 32,6 – 43,9 %) och det fanns ett samband mellan ålder och andelen infekterade djur. Störst andel infekterade djur fanns i den 7e till 9e levnadsveckan. Det fanns också ett samband mellan kalvens kön och infektion. Fler tjurkalvar var infekterade än kvigkalvar. Kvantifiering av antalet utsöndrade cystor tyder på förekomst av ”superspridare”.

SUMMARY

Giardia intestinalis (synonyms: *Giardia duodenalis* and *Giardia lamblia*) is a microscopic, single cell, intestinal parasite that infects humans and animals. Common clinical signs in humans include diarrhea, abdominal pain, abdominal cramps, fatigue and weight loss. In cattle, the only symptom associated with infection is loose stool but there are also publications that contradict those findings. However, it is quite common for both humans and animals to be infected and have no signs of illness. These individuals can still transmit the parasite to others and contaminate the environment. The parasite is transmitted as cysts via the fecal-oral route, either by individual-to-individual contact or by ingestion of contaminated food or water. Animals also contract the infection from their environment and their herd/pack-members through oral contact with fur, soil, plants, beddings, fecal matter stuck to tools and stable interior etc.

A study was conducted to investigate the prevalence of *Giardia intestinalis* in beef calves in Swedish suckler herds. I further aimed to investigate if any significant correlation could be found between the age of the infected animal and the percentage of infected animals.

277 faecal samples were collected from 24 beef suckler herds in two different regions in Sweden. The animals were all under 3 months old at the time of sample collection. A brief, clinical examination was performed on every individual. The samples were concentrated, stored and later examined with fluorescence microscopy. The youngest positive calf sampled was only 1 day old. The prevalence was 38,3 %, (CI 95% 32,6 – 43,9%) and there was a correlation between age and percentage of positive animals. The animals between 7 and 9 weeks of age had the highest infection rate. There was also a correlation between gender and infection by *Giardia intestinalis*. The bull calves were more frequently infected than the heifers. Quantification of excreted cysts per gram of faecal matter implies the existence of super shedders.

INNEHÅLL

INLEDNING.....	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Historia och taxonomi	2
Livscykel.....	3
Anatomi och celledning.....	4
Encysteringsprocessen	4
Ämnesomsättning och miljökrav.....	5
Patologi.....	6
G. intestinalis hos människa	6
Behandlingar och vacciner för människa	7
Köttboskap i Sverige idag	8
G. intestinalis hos nötkreatur	9
Symtom och patogenes hos nötkreatur.....	11
Behandling och förebyggande åtgärder i nötbosättningar	11
Diagnostik.....	13
MATERIAL OCH METODER.....	14
Statistisk analys	15
RESULTAT	15
DISKUSSION	20
REFERENSER	22

INLEDNING

Giardia är encelliga parasiter, så kallade protozoer. Släktet *Giardia* omfattar flera arter varav en, *Giardia intestinalis* (synonymer: *Giardia duodenalis* och *Giardia lamblia*), infekterar mag-tarmkanalen och kan orsaka sjukdom hos djur och människor. En infektion förlöper ofta asymtomatiskt och när symtom på sjukdom uppstår är de inte patogena, dvs specifika för just giardiasis (Lane & Lloyd, 2002). Vanliga symtom är diarré, buksmärta, magkramper, trötthet och viktminskning (Robertsson, 1996; Adam, 2001; Hill & Nash, 2015).

Parasiten smittar fekalt-oralt via cystor som utsöndras med avföringen. Vanliga smittvägar är direktsmitta, vatten och till en mindre del livsmedel (Smith *et al.*, 2007; EFSA & ECDC, 2015). *G. intestinalis* är uppdelad i undergrupper som kallas genotyper eller assemblages. En del av dessa genotyper har zoonotisk potential, det vill säga de kan smitta mellan människor och djur (Feng & Xiao, 2011).

G. intestinalis är en vanligt förekommande parasit hos nötkreatur och andelen infekterade djur ökar fram till 6 månaders ålder (Xiao & Herd, 1994; Nydam *et al.*, 2001; Ralston *et al.*, 2003b; Becher *et al.*, 2004). Nötkreatur kan vara bärare av genotyper som kan infektera människor (O’Handley *et al.*, 2000; Coklin *et al.*, 2007; Inpankaew *et al.*, 2015) och en studie utförd i Indien indikerar att nötkreatur kan smitta de som arbetar med djuren (Khan *et al.*, 2011). I teorin skulle de betande nötkreaturen även kunna förorena vatten och livsmedel avsedda för mänsklig konsumtion med cystor av dessa genotyper (Grit *et al.*, 2012; Abeywardena *et al.*, 2013).

G. intestinalis förekommer i svenska mjölkobesättningar men det är inte känt hur vanlig den är hos våra dikor. Det pågår ett kontinuerligt arbete med att skydda befolkningen både i Sverige och i övriga världen från vattenburna smittor och i detta arbete ingår *Giardia* som en potentiell patogen som behöver kontrolleras och bekämpas (Smittskyddsinstitutet, Livsmedelsverket, Svenskt Vatten, 2012). Både dricksvatten och badvatten diskuteras som källor för smittsamma sjukdomar (Shuval, 2003; SMI, 2012) och i Livsmedelsverkets kontrollhandbok ”Vägledning – Dricksvatten” (Livsmedelsverket, 2014) ingår krav på en mikrobiologisk analys eller motsvarande riskbedömning för att bestämma om ett vattenreningsverk behöver ha en UV-behandling eller en mikrofiltrering installerad. Båda dessa metoder renar vattnet tillfredsställande från *Giardia* men är inte standard i alla reningsverk. Huruvida sådana så kallade säkerhetsbarriärer krävs eller inte vid framställningen beror på kvaliteten på råvattnet som används för anläggningens dricksvattenberedning (Livsmedelsverkets föreskrifter om dricksvatten, SLVFS 2001:30).

Obehandlat dagvatten i Sverige innehåller höga halter av *Giardia*-cystor (Ottosson *et al.*, 2006) och *Giardia* är den vanligaste mag- tarmparasiten som diagnostiseras i landet med 1491 rapporterade fall år 2016. Ett genomsnitt av antalet fall de senaste 5 fullständiga åren 2012 – 2016 är 1312 fall per år (Folkhälsomyndigheten, 2016). Antalet rapporterade infektioner av *Giardia* i EU- och EEA-länderna har legat stadigt på ungefär samma nivå mellan 2007 och 2012 (ECDC, 2014). Det bör dock noteras att detta inkluderar siffror från länder där flera inte har anmälningsplikt för *Giardia*-infektion. Eftersom både smittspårning vid utbrott av epidemier och riskbedömningar vid upprättandet av skyddsområden för vattentäkter är beroende av korrekta grunddata är detta arbete av intresse ur ett folkhälsoperspektiv.

Syftet med studien var att undersöka prevalensen av *G. intestinalis* hos kalvar i svenska dikobesättningar samt att undersöka om någon ålderskategori utsöndrar fler cystor än övriga.

LITTERATURÖVERSIKT

Historia och taxonomi

Parasitens historia presenteras i översiktsartiklar av Adam (2001) och Ford (2005). *Giardias* officiella upptäckt tillskrivs Anthony van Leuwenhock år 1681. Han drabbades under en period av svår diarré och undersökte då sin egen avföring i ett ljusmikroskop. Han beskrev att han observerade små djur som han tyckte liknade väggloss eller gråsuggor som till synes rörde sig fritt över synfältet. En mer detaljerad beskrivning görs sedan av Vilém Lambl år 1859 som döpte organismen till *Cercomonas intestinalis*. Efter det har Lambls namn använts som benämning på både släktet, *Lamblia intestinalis*, och den specifika art i släktet som infekterar både människa och djur, *Giardia lamblia* (Adam, 2001).

Namnet *Giardia* används första gången 1882 av Kunstler som beskriver och döper en organism han hittat i tarmen hos grodyngel. Stiles döper så småningom organismen som hittats hos människa till *Giardia duodenalis* (Adam, 2001). 1915 antogs *Giardia lamblia* officiellt som namn på arten för att kunna hedra två professorer som båda arbetat med parasiten och efter det blev *Giardia* det vedertagna namnet på hela släktet (Ford, 2005). Idag används alla tre namnen (*G. intestinalis*, *G. lamblia* och *G. duodenalis*) synonymt.

Taxonomiskt anses *Giardia* idag ha sex arter där *G. intestinalis* är en. *G. intestinalis* är sedan uppdelad i åtta s.k. assemblages (genomgående refererat till som genotyper i denna uppsats), från genotyp A till H baserat på genetiska olikheter och vilka värddjur de infekterar (Lebbad, 2010; Feng & Xiao, 2011). Genotyperna A och B har sedan delats in i numrerade subtyper, AI, AII och AIII samt BIII och BIV (Monis *et al.*, 1996).

Det är fortfarande inte helt klarlagt hur de olika *Giardia*-arterna, och i förekommande fall genotyperna, är besläktade med andra encelliga organismer eller ens med varandra och en snar revision av släktträdet är sannolik. Nu har man börjat studera genomet för varje genotyp och subtyp i detalj och stödja sig på dessa fynd för klassificering istället för morfologi, värdspecificitet eller patogenes (Luján & Svärd, 2011; Plutzer *et al.*, 2010). Dessutom har genetisk forskning visat tillräckligt stora skillnader mellan generna hos exemplar inom samma genotyp att det kan bli aktuellt att dela upp dem i nya arter istället (Ankarklev, 2012).

Vi vet idag ganska mycket om vilka arter och genotyper som kan infektera och spridas av vilka värddjur men ny information kompletterar ständigt vår kunskap om parasitens utbredningsområden, infektionspotential och patogenicitet. Våra sällskaps- och tamdjur är kända potentiella bärare av genotyper A och B (Feng & Xiao, 2011) som är de genotyper som oftast identifieras hos sjuka människor (Sprong *et al.*, 2009). Nötkreatur är oftast infekterade med genotyp E men man har också identifierat genotyperna A och B (Coklin *et al.*, 2007; Inpankaew *et al.*, 2015). En studie av människor på egyptiska landsbygden visade att så många som 62,5 % var infekterade med genotyp E (Abdel-Moein & Saeed, 2016) så den zoonotiska potentialen hos *G. intestinalis* genotyp E bör inte avfärdas utan behöver undersökas vidare. Man kan heller inte helt utesluta att människor i vissa fall skulle kunna vara en smittkälla för nötkreatur.

Genotyperna A och B har också nyligen påträffats i sjölejon i Australien (Delpont *et al.*, 2014), hos jaguar, chinchilla, struts och primater i fångenskap i Brasilien (Soares *et al.*, 2011) och i

odlade och vildfångade fiskar i Egypten (Ghoneim *et al.*, 2012). De har också hittats i hjort, känguru, dingo, häst och räva (Ng *et al.*, 2011).

Tabell 1. Genotyper och subtyper av *Giardia intestinalis* och hos vilka värddjur de påträffats. I förekommande fall har zoonotisk potential angetts. Tabellen baseras på Feng & Xiao (2011), Sprong *et al.* (2009), Lebbad (2010) och Abdel-Moein & Saeed (2016)

Genotyp med numrering av subtyper	Värddjur
AI	Människa och andra däggdjur, zoonotisk potential
AII	I huvudsak människa, zoonotisk potential
AIII	I huvudsak andra däggdjur än människa, zoonotisk potential
BIII BIV	Människa och andra däggdjur, zoonotisk potential
C/D	Hund, enstaka fynd hos människa
E	Idisslare, häst, gris, enstaka fynd hos människa
F	Katt, enstaka fynd hos människa
G	Råtta
H	Säl

Livscykel

G. intestinalis har en direkt livscykel och smittar fekalt-oralt (Smith *et al.*, 2006). Cystor är det smittsamma stadiet av parasiten. De intas av värdjuret och reagerar på det låga pH-värdet i magsäcken så att cystan börjar sin kläckningsfas, sin excytering (Gardner & Hill, 2001). Den fullbordar excyteringen i övre tunntarmen och släpper ut en s.k. excyzoit med fyra cellkärnor. Excyzoiten är ett förstadium till parasitens fullvuxna stadium som kallas trofozoit. Den nykläckta excyzoiten delar sig två gånger i snabb följd utan replikationsfas och sedan mognar dessa ut till trofozoiter (Bernander *et al.*, 2001) Varje cysta ger på så vis upphov till fyra trofozoiter med två cellkärnor vardera. Väl etablerade i tarmen förökar sig sedan trofozoiterna via binär delning. De koloniserar tarmen där de fäster till slemhinnan med hjälp av en rund, sugkoppsliknande struktur på cellens tillplattade sida. De förflyttar sig i miljön med hjälp av fyra par flageller (House *et al.*, 2011). Trofozoiterna encystreras till sist i jejunum, den nedre delen av tunntarmen, och cystorna

utsöndras med avföringen (Adam, 2001). Cystorna är omedelbart infektiösa, mycket tåliga (Wolfe, 1992; Olson *et al.*, 1999; Robertson & Gjerde, 2004) och en komplett livscykel kan genomföras på 72 timmar (Thompson *et al.*, 1993).

Anatomi och celledelning

Trofozoiten är 5–9 * 12–15 µm stor och innehåller två cellkärnor. Den har formen av ett halverat päron med åtta flageller arrangerade på kroppen i fyra par. På den tillplattade undersidan sitter ett vidhäftningsorgan som ser ut som en rund skiva (Brown *et al.*, 2016; Adam, 2001). De fyra paren flageller är placerade kranialt, lateralt, kaudalt och ventralt. De fungerar som organismens rörelseapparat, mest i frisimmande situationer men de används även när organismen sitter vidhäftad (Holberton, 1974; Erlandsen, 2004; House *et al.*, 2011). De är uppbyggda på samma sätt som flageller i andra eukaryota celler med liknande tubuliner. Parasitens ventrala skiva består av jämnt fördelade, överlappande mikrotubuli arrangerade i en konkav spiralstruktur (Brown *et al.*, 2016; Holberton, 1973a). Den bildar en flexibel, förmodat rörlig (Kattenbach *et al.*, 1996; Feely *et al.*, 1982), grund skål på den bredaste delen av parasitens tillplattade sida. Den används för vidhäftning på tarmens slemhinna (Brown *et al.*, 2016) och hindrar trofozoiten, troligtvis tillsammans med flagellerna och framförvarande mikrovilli i tarmen som fungerar på samma sätt som ett vindskydd, från att transporteras vidare tillsammans med flödet av ingesta som passerar genom tarmen (Holberton, 1973b; Erlandsen *et al.*, 2004.).

Giardia är en tetraploid organism, dvs den har fyra genomkopior. Den är också en diplomonad vilket innebär att det genetiska materialet är fördelat på två cellkärnor. Dess genom är mellan 11,5 och 11,7 Mb stort och är lagrat i 5 kromosomer. (Morrison *et al.*, 2007; Jerlström-Hultqvist *et al.*, 2010). Precis som andra celler har *Giardia* flera stadier i sin cellcykel. Det som skiljer *Giardia*-cellen från de flesta andra eukaryota celler är att G2-fasen är den längsta (Bernander *et al.*, 2001; Sagolla *et al.*, 2006).

Cystan är oval och 5 * 7–10 µm stor. En mogen cysta innehåller 16 genomkopior fördelat på 4 cellkärnor (Erlandsen *et al.*, 1996; Elmendorf *et al.*, 2003). Detta möjliggör en snabb delning när cystan ska etablera sig i nästa värd, då två celledelningar kan ske i följd utan att arvsmassan behöver replikeras (Bernander *et al.*, 2001). Cystan innehåller även fragmenterade flageller och andra delar av cytoskelettet och allt material är inneslutet i ett tåligt skal (Adams, 2001).

Encysteringsprocessen

Trofozoiterna reagerar på höjt pH-värde och frånvaro av lipider (Luján *et al.*, 1996) genom att påbörja encysteringen (Gardner & Hill, 2001). Processen regleras av transkriptionsfaktorer som är unika för encysteringsprocessen, kromatin-arrangerande enzymer och enzymer som reglerar post-translationala ändringar av proteiner (Einarsson *et al.*, 2016). De första förändringarna i en trofozoit som påbörjat encystering kan observeras redan efter 1,5 timme, under kontrollerade förhållanden, då encysteringsvesikler (ESV) uppträder. ESV är specialiserade vesikler som transporterar cystväggsmaterial till parasitens ytmembran (Reiner *et al.*, 1990).

I det endoplasmiska retiklet (ER), som märkbart ökar i storlek under encysteringsprocessen, bildas proteiner som bygger upp cystans vägg och dessa transporteras till cellytan inuti ESV där innehållet töms ut och cystväggen bildas (Gillin *et al.*, 1996). Flagellerna internaliseras gradvis

förutom de mest kaudala som så småningom bildar en svans på den omogna cystan och sedan stöts av. Den ventrala skivan fragmenteras och lagras inuti cystan i fyra delar (Midlej & Benchimol, 2009). Efter ca 14 timmar har trofozoiten antagit en ny form, mer lik ett helt pären än ett delat (Langfredi-Rangel *et al.*, 2003). Den fortsätter sedan ändra form och till slut är den symmetriskt oval. En mitos utan påföljande cytokines sker under encystringen. Även om *Giardia* inte har någon dokumenterad sexuell förökning så tyder mycket på en viss rekombination mellan cellkärnorna. Detta har påvisats just under encystringen då de fyra nybildade cellkärnorna har förmågan att byta genetiskt material med varandra. Denna process kallas diplomixis av författarna (Poxleitner *et al.*, 2008) och gör att genetiskt material kan utväxlas mellan cellkärnorna (Carpenter *et al.*, 2012). En mogen, infektiös cysta med fyra tetraploida cellkärnor kan sedan passera ut i miljön med värdens avföring. (Erlandsen *et al.*, 1996; Bernander *et al.*, 2001).

Ämnesomsättning och miljökrav

G. intestinalis har en minimal biosyntes och är helt beroende av upptag av fettsyror och aminosyror från miljön (Jarroll *et al.*, 1981; Guo *et al.*, 2015) men den är inte beroende av glukos som enda energikälla utan verkar kunna nyttja andra ämnen, främst kvävehaltiga sådana, vid behov. De fullvuxna trofozoiterna har visats kunna överleva och föröka sig i miljöer helt utan glukos men med reducerad tillväxthastighet (Schofield *et al.*, 1990). Produktionen av framför allt etanol minskade vid låga eller inga halter av glukos. Effekter av olika enzymhämmare i försöket gör också gällande att etanolen produceras i en aldehydreduktasreaktion. (Schofield *et al.*, 1990). Parasiten hämtar sin näring via endocytos med ytreceptorer som sedan i vesikler transporterar ämnena intracellulärt till sina respektive organeller (Faso & Hehl, 2011).

G. intestinalis använder sig inte, som de flesta eukaryoter, av aerob förbränning utan saknar mitokondrier och oxidativ fosforylering (Gillin *et al.*, 1991). Istället har de mitosomer och fermenterar fram sin energi anaerobt, även vid tillgång på syre, och tillverkar energi med en ofullständig glykolys där slutprodukterna, förutom ATP, blir acetat, etanol, alanin, vätgas och kolsyra (Tovar, 2003; Schofield *et al.*, 1990). Mitosomerna har dubbla membraner som en mitokondrie men innehåller inget DNA (Martincová *et al.*, 2015).

Ämnesomsättningen hos olika genotyper av *G. intestinalis* varierar, exakt till vilken grad och effekt är inte utrett men det är skillnader i ämnesomsättningen även inom arterna (Steuart *et al.*, 2008). Detta föreslås vara en del i förklaringen till skillnader i zoonotisk potential, motståndskraft mot behandlingar och patogenicitet (Steuart *et al.*, 2008).

Cystorna är mycket motståndskraftiga i miljön. Det finns rapporter på att de förblir livskraftiga i 1 vecka i faeces. Cystorna anses också kunna överleva länge (veckor till månader) i kallt vatten (Wolfe, 1992) och på stallinredning (Olson *et al.*, 1999; Robertson & Gjerde, 2004).

Det krävs särskilda desinficeringsmedel för att neutralisera dem. 10 % ammoniak kan användas, likaså UV-strålning (Nasser *et al.*, 2012). Cystorna är också känsliga för uttorkning och upprepade nedfrysningar (Sattar, 1999).

Patologi

Parasitens sjukdomsalstrande egenskaper är mångfacetterade. Tunntarmens funktion är normalt mycket noggsamt reglerad. Vid en infektion med *Giardia* ökar tarmens genomsläpplighet och barriären som ska skydda kroppen försämras. Parasiten påverkar epitelcellerna och inducerar så kallad apoptos, programmerad celldöd, och bromsar omsättningen av celler i tarmen så att den inte förnyas och läker i normal takt. Dessutom påverkas ämnen som tarmcellerna behöver för att kunna fästa i varandra och bygga upp tarmslemhinnan. När kroppen sedan försöker bekämpa infektionen uppstår ännu fler symtom. Inflammationen förkortar mikrovilli, tarmborsten, och förhållandet mellan villi och kryptor i tarmen ändras vilket dramatiskt minskar tarmens yta och därmed också dess förmåga att ta upp näring och vätska. Tarmen blir hypermotil och samtidigt retas dess gobletceller, slemproducerande celler, till ökad sekretion och utsöndring av anjoner (Halliez & Buret, 2013 tabell 1).

Försök gjorda på knock-out-möss där T-cellerna gjorts defekta visade att tarmslemhinnans egenskaper till största delen ändras av värdens eget immunsvaret mot parasiten och inte är en direkt effekt av någon parasitär aktivitet (Scott *et al.*, 2000). Ökad permeabilitet har påvisats i infekterad tarmvägg och verkar bero på apoptos av enterocyter (Buret *et al.*, 2002) och reaktioner i cellernas cytoskelett som en effekt av toxiska, parasitära utsöndringar (Scott *et al.*, 2000). Epitelcellernas cytoskelett försämras och det i sin tur påverkar tillgängligheten av proteiner som används i tight-junctions intercellulärt och vävnaden i tarmslemhinnan luckras då upp (Buret *et al.*, 2002). Den ökade genomsläppligheten stimulerar till en större andel intraepiteliala lymfocyter och aktiverar passerande T-lymfocyter (Scott *et al.*, 2000). En inflammation i tunntarmen leder till flera symtom hos den drabbade individen så som magkramper, malabsorption och smärta.

Toxiner från trofozoiterna och aktiverade T-lymfocyter ger tillsammans en generell förkortning av mikrovilli och en reducerad aktivitet hos matsmältningsenzymer på slemhinnans yta, särskilt hos lipas, laktas, maltas, sucras och vissa proteaser (Buret *et al.*, 1990). Dessa förkortade mikrovilli ger en påtagligt minskad absorptionsyta och reducerar upptaget av vatten, elektrolyter och näringsämnen från tarmen. Detta tillsammans med en försämrad enzymatisk aktivitet resulterar ofta i en malabsorptiv diarré och i längden en minskad tillväxt (Buret *et al.*, 1990). Gobletcellerna i tarmen retas dessutom till ökad slemproduktion och detta ökar sannolikheten ytterligare för diarréer (Moncada *et al.*, 2003).

G. intestinalis hos människa

G. intestinalis är spridd över hela världen och är allmänt förekommande i miljön, även om majoriteten av de människor som insjuknar bor och verkar i utvecklingsländer (Feng & Xiao, 2011 jmf tabell 1 och 2). En obehandlad infektion kan i enstaka fall övergå i ett kroniskt stadium med återkommande perioder av sjukdom (Escobedo & Cimerman, 2007). Hos barn kan kroniska infektioner medföra ledsmärtor (Meza-Ortiz, 2001), synovit (Letts *et al.*, 1998) och artros (Leblanc & Birdi, 1999). Även matallergier har kopplats till kroniska infektioner hos människor (Di Prisco *et al.*, 1998). En obehandlad, kronisk infektion av *Giardia* skulle också kunna förvärra celiaki (Carroccio *et al.*, 2001) Resultat av undersökningar pekar också på att kronisk giardiasis kan medföra utvecklings- och tillväxtrubbningar (Fraser *et al.*, 2000). Ungefär 280 miljoner sjukdomsfall uppskattas drabba människor varje år (Lane & Lloyd, 2002).

Infektionsdosen för människa är mycket låg, 10 cystor räcker för att orsaka infektion (Rendtorff, 1954; Leber *et al.*, 2007). De vanligaste infektionsvägarna är via smittat vatten och direktsmitta (fekal-oral) mellan människor men även livsmedel och anala samlag kan sprida sjukdomen (Hill, 1993; Pakianathan & McMillan, 1999). Barn är kända smittspridare och förskolebarn mellan 0 – 4 år drabbas oftare av symtomatisk giardiasis än vuxna (ECDC, 2014). Förskolebarn har en prevalens på 28,5 – 35 % jämfört med 2 – 5 % i den vuxna befolkningen i I-länder (Miotti *et al.*, 1986; Oliveira-Arbex *et al.*, 2016). Även om de flesta av barnens infektioner är asymtomatiska kan de sprida infektionen till övriga familjemedlemmar som utvecklar sjukdom (Adam, 1991).

Inkubationstiden för de som utvecklar symtom av infektionen är vanligen 1–2 veckor (Watkins & Eckmann, 2014) men allt från 1-42 dagar har uppmätts. Uppskattningsvis förlöper 60 % av humana infektioner asymtomatiskt men de som insjuknar drabbas av diarré eller lös avföring som ofta är fettrik, slemmig och mycket illaluktande (Wolfe, 1992; Cotton *et al.*, 2011). Immunstatus hos den som infekteras påverkar sjukdomsförloppet (Eckmann, 2003). Gaskolik, uppblåsthet, magkramper och flatulens är vanligt förekommande och illamående och anorexi är inte ovanligt. Feber är mycket ovanligt men om det förekommer så är det i början av infektionen. I motsats till många andra diarrésjukdomar fortgår giardiasis i veckor och ibland i månader även om den oftast självläker (Wolfe, 1992). Malabsorption av fetter och sockerarter är dokumenterat under infektion av *Giardia* och bristen på matsmältningsenzymer kan kvarstå länge efter att parasiterna eliminerats, det vanligaste enzymet som saknas är laktas (Hill, 1993; Singh *et al.*, 2000; Buret, 2007).

Även efter en utläkt infektion finns det risk för kvarstående symtom och funktionsnedsättningar. Det kan röra sig om artrit (Carlsson & Finger, 2004; Hill Gaston & Lillicrap, 2003), allergier och klåda (Giacometti *et al.*, 2003; Nenoff *et al.*, 2006), störningar i tillväxt, utveckling och ämnesomsättning (Halliez & Buret, 2013 tabell 2), Cronic Fatigue Syndrome och IBS (Spiller, 2007; Mørch *et al.*, 2012; Wensaas *et al.*, 2012).

Två epidemiologiska undersökningar har i fall - kontrollstudier påvisat samband mellan infektion med *Giardia* genotyp A hos människa och ägande av hund (Minetti *et al.* 2015). Samband har också påvisats mellan infektion med genotyp B och att byta blöjor och att ha barn i skolåldern i hushållet (Tengku *et al.* 2014). Hos barn i förskoleåldern i Nederländerna fann man en markant förhöjd risk för *Giardia*-infektion hos de som deltog i organiserad förskoleverksamhet (Heusinkveld *et al.*, 2016). Utövande av analsex är också en riskfaktor för att drabbas av infektion (Pakianathan & McMillan, 1999).

Behandlingar och vacciner för människa

Flagyl rekommenderas som behandling mot giardiasis hos människa och anses ha god effekt och säkerhetsmarginal (Pasupuleti *et al.*, 2014). Det är ett nitroimidazolderivat (5-nitroimidazol; metronidazol) och verkar genom att reducera halten av tillgängligt thiol hos *Giardia* (Raether & Hänel, 2003; Leitsch *et al.*, 2012). Thiol är ett ämne som används i flera viktiga processer inuti celler. Behandling med 5-nitroimidazol anses förstöra DNA i celler med anaerob förbränning (Watkins & Eckmann, 2014). Behandling med flagyl är omdebatterat då det är listat av WHO:s IARC som kategori 2B (möjlig cancerogen) men försök med terapeutiska doser har inte kunnat visa på något samband mellan cancer och metronidazol hos människa (Falagas *et al.*, 1998). I FASS Vårdpersonal (2016) står angivet att det inte har rapporterats resistens hos *G. intestinalis*

mot nitroimidazoler. Trots det så har resistens redan för 25 år sedan, och flera gånger efter det, beskrivits hos parasiten (Boreham *et al.*, 1988; Lalle, 2010). Humaninfektioner som emotstår standardbehandling är inte ovanlig (Ellis *et al.*, 1993) och uppgår ofta till runt 20 % av behandlade fall (El-Taweel, 2015). Behandlingseffekten rapporteras i en review-atrikel från 2007 ligga mellan 60 – 100 % och medianeffekten på ca 89 % (Escobedo & Cimerman, 2007).

Tinidazol, en annan nitroimidazol, är välanvänt mot giardiasis hos människa världen över och är effektivt redan vid engångsdos (Pasupuleti *et al.*, 2014; Ortega & Adam, 1997). Ornidazol, ytterligare en nitroimidazol, har visats ha bättre effekt, 90 – 100 %, än metronidazol vid behandling av människa (Escobedo & Cimerman, 2007).

Nitazoxanid är ett relativt nytt preparat för behandling av olika infektioner på människa och har ett mycket brett spektrum. Det har ungefär lika god effekt på giardiasis, 65 – 94 %, som metronidazol och tinidazol (Escobedo & Cimerman, 2007).

L-arginin, en semi-essentiell aminosyra, används som energiprekursor av *G. intestinalis* under infektionsfasen och ett speciellt enzym den använder (arginindeiminias) har föreslagits som målmolekyl för behandling av infektioner då enzymet har fler nyckelroller under livscykeln hos parasiten (Trejo-Soto *et al.*, 2016). Samtidigt dämpar parasiternas upptag av L-arginin immunförsvaret i tarmen på olika sätt. (Rópolo & Touz, 2010).

Giardia kan inte syntetisera egna fettsyror utan är beroende av ett upptag av dem från miljön (Jarroll *et al.*, 1981; Guo *et al.*, 2015). När parasiten sedan ska nyttja de fettsyror den skördat ur miljön använder den särskilda enzymer. Dessa enzym tror man ska kunna användas som målmolekyler för läkemedel mot giardiasis (Guo *et al.*, 2015). Dessutom har man hittat ett ämne, ett tranferas, som används vid encystringen som när det hämmas minskade produktionen av cystor (Hernandez *et al.*, 2008).

Man har gjort *in vitro*-studier på olika bärfenolers avdödande effekt på *G. intestinalis* och fått lovande resultat med hjortron, jordgubbar, åkerbär och björnbär. In vitro-resultaten visar en lika god avdödande effekt på parasiterna som metronidazol vid fenolkoncentrationer som lätt kan uppnås i tarmen via oralt intag av bären eller extrakt av dem (Anthony *et al.*, 2011). Även passionsfrukt, yuccapalm och andra växter har visats ha god effekt. (Neiva *et al.*, 2014; Quihui-Cota *et al.*, 2014). Ytterligare studier visar lovande effekt av getabocksplommon (Rayan *et al.*, 2015), sommarfläder (Rahimi-Esboei *et al.*, 2013) och extrakt från avocadokärna (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2013). En studie på barn mellan 3 och 11 månaders ålder med klinisk giardiasis visade på lika stor effekt av behandling med dill-avkok som behandling med metronidazol (Flagyl) efter 14 dagar (Sahib *et al.*, 2014).

Köttboskap i Sverige idag

Sextio procent av djuren som blir nötkött i svensk köttproduktion kommer från mjölkko-besättningar. Det är dels mjölkkor som av olika anledningar inte behålls i sina besättningar och dels tjurkalvar från mjölkborna som föds upp till slaktvikt av mjölkbonden själv eller av specialiserade kalvuppfödare (Branschorganisationen Svenskt Kött, 2015). Resterande 40 % av de djur som slaktas för kött är olika kötttraser och korsningar. I Sverige används kötttraser Charolais, Hereford, Simmental, Highland Cattle, Limousin, Aberdeen Angus och Blond

d'Aquitaine samt ett mindre antal av Dexter, Galloway, Chianina och Piemontese (Branschorganisationen Svenskt Kött, 2015); Jamieson, 2010).

Som diko räknas en ko som hålls i syfte att producera en kalv per år för uppfödning till slakt (Jamieson, 2010) och vanligtvis hålls djuren i stallar och på bete. Stallperioden är 5–7 månader beroende på vid vilken latitud produktionen bedrivs och stallarna är antingen lösdrifter med liggbås eller djupströbäddar (SJVFS 2010:15 2 kap. § 1)

Endast ca 11 % av dikorna som hålls för uppfödning av köttdjur är renrasiga, den största delen är korsningsdjur av olika kombinationer av raser (Jamieson, 2010). Kalvarna föds mellan januari och maj och avväns under hösten. Ungdjuren väger då 200–400 kg.

Slaktas ett djur före 8 mån ålder kallas det för ljust kalvkött och är djuret mellan 8–12 mån kallas det kalvkött. (LIVSFS 2010:6). Vidare uppfödning av ungdjur fram till slakt bedrivs antingen av specialiserade uppfödare eller av kalvproducenten själv. De slaktas mellan 16 – 24 månaders ålder beroende på ras (Jamieson, 2010). Dessa blir våra vanliga styckningsdetaljer och en liten del blir färs (Branschorganisationen Svenskt Kött, 2015).

G. intestinalis hos nötkreatur

Det finns många studier av hur vanligt förekommande *Giardia*-infektion är hos kött- och mjölkkor och parasiten finns beskriven från fall runt hela världen. Prevalensen på individnivå varierar mellan 9 och 55 % (Tabell 2). Tittar man på besättningsprevalens hamnar den ofta mellan 50 och 100 %. Att parasiten är så vanlig i besättningar kan förklaras av att den är ubikvitär i miljön i kombination med hur vi håller och sköter tamboskap. En longitudinell studie visade att den kumulativa prevalensen hos köttaskalvar låg mellan 80 och 100 % uppmätt fram till 6 månaders ålder (Ralston *et al.*, 2003b).

Att resultaten varierar så kraftigt kan ha flera anledningar. Studiens design spelar in där antal djur och åldersspann varierar och det är även olikheter i klimat, djurhållning och naturtyper. Vilken detektionsmetod som använts påverkar också resultatet (Zimmerman & Niedham 1995).

Tabell 2. Sammanställning av resultat från internationella prevalensstudier där – indikerar att uppgift saknas

Land/världsdel, provtagningsår, produktionsinriktning	Antal prover	Ålder på provtagna individer	% positiva individer	% positiva besättningar	Referens
Argentina, 2010, mjölk	620	<7 veckor	35,5	97	(Tiranti <i>et al.</i> , 2011)
Europa, 2012, mjölk	2072	2–16 veckor	45,4	89,9	(Geurden <i>et al.</i> , 2012)
Tyskland	536		51,2	100	
Frankrike	477		39,8	84,2	
Storbritannien	556		54,9	100	
Italien	503		32,2	88,6	

Belgien, 2001 – 2005, kött	333	<10 veckor	45	64	(Geurden <i>et al.</i> , 2008)
Danmark, 2003–2004, mjölk	1150	2 dagar->4 år	43,5		(Maddox-Hyttel, 2006)
	255	Kor	20	-	
	377	Unga kalvar	36		
	518	Äldre kalvar	40		
Norge, 2001–2003, mjölk	1386	3 - 183 dagar	49	93	(Hamnes <i>et al.</i> , 2006)
Portugal, 2004 – 2006, kött och mjölk	291	”kalvar”	25,4	-	(Mendonca <i>et al.</i> , 2007)
Sverige, 1998 - 1999, mjölk	270	<3 mån	29	50	(Björkman <i>et al.</i> , 2003)
Tyskland, 2013, ospecificerat	1564	<1 år med diarré	7,2	-	(Gillhuber, 2014)
Turkiet, 2005 – 2006, mjölk	182	<6 mån	9,3	-	(Abdurrahman <i>et al.</i> , 2008)
Kanada, 1998, kött	193	2–70 dagar	36	100	(McAllister <i>et al.</i> , 2005)
Kanada, 2002, kött	605	0–211 dagar	22,6	48	(Gow & Waldner, 2006)
	560	> 2år	17,1	69,5	
Kanada, 2004, kött	296	> 1år	32	91	(Uehlinger <i>et al.</i> , 2011)
USA, sydvästra 2007 – 2008, kött	819	6–18 mån	33,5	85,7	(Santin <i>et al.</i> , 2011)
USA, Kalifornien 2007 – 2010, kött	819	6–18 mån	34,3	-	(Oates <i>et al.</i> , 2012)

Det finns en prevalensstudie gjord i mjölkbesättningar i Sverige som omfattar kor och icke avvanda kalvar i konventionell och ekologisk drift. Proverna testades med ett ELISA-kit och de prover som låg runt gränsvärdet för positivt prov dubbelkollades med immunfluorescensmikroskopering. Där konstateras att *G. intestinalis* är ubikvitär och förekom hos kalvarna i 25 av 26 provtagna besättningar. Total förekomst hos kalv var 44 % (97 av 220 individer) och varierade mellan 11–78 % hos kalvarna i de olika besättningarna. Total prevalens hos korna var 0,4 % (1 av 259). Ingen skillnad kunde ses mellan ekologisk och konventionell drift men ju äldre kalven var desto större var risken att den hunnit smittats (Larsson, 2010).

Kalvar upp till 8 veckors ålder (Geurden, 2012) och mellan 16–20 veckors ålder (Huetink, 2001) har i studier pekats ut som de ålderskategorierna som hyser störst andel smittförande individer. Den variationen överensstämmer med ny forskning som visar på en naturlig immunisering vid ca 15 veckors ålder av naturligt infekterade kalvar (Grit *et al.*, 2014).

Intensiv, trångbodd djurhållning inomhus (Klein-Jöbstl *et al.*, 2014) med en relativt hög andel ungdjur (Geurden *et al.*, 2012), så som ofta är fallet i mjölkobesättningar, är värst drabbade av kalvdiarréer. Det antas bero på att i dessa besättningar finns jämförelsevis fler djur som kan utsöndra stora mängder smittförande avföring samt en kontinuerlig tillförsel av nya, mottagliga individer. De tåliga *Giardia*-cystorna medger också ett över tid ökande smittryck från miljön vid otillräcklig rengöring (Klein-Jöbstl *et al.*, 2014; Geurden *et al.*, 2012).

Indirekt smitta via miljön förekommer och djur uppfödda inomhus löper 3 gånger så stor risk för infektion som frigående boskap. Även personal och redskap har kunnat pekats ut som ansvariga för smittspridning (Ruest *et al.*, 1998; Geurden *et al.*, 2012; Klein-Jöbstl *et al.*, 2014). Infektionsdosen är mycket låg, teoretiskt räcker det med en enda cysta men man har påvisat smitta vid så låg infektionsdos som 10 cystor på människa (Leber *et al.*, 2007).

Symtom och patogenes hos nötkreatur

Hos nötkreatur är *Giardia*-infektion mycket vanligt (Thompson *et al.*, 2008) men orsakar sällan kliniska symtom. Symtom hos nöt som man har associerat med *Giardia*-infektion är akuta eller kroniska diarréer (Geurden *et al.*, 2006; O’Handley *et al.*, 1999), men det finns andra studier där man inte hittat något samband mellan diarré och *Giardia*-infektion (Quilez *et al.*, 1996; Björkman *et al.*, 2003; Huetink *et al.*, 2001). Ungdjur och kalvar kan uppvisa diarré, koliksymtom och ökad gasavgång medan vuxna individer inte uppvisar några symtom eller endast mycket milda symtom (Xiao, 1994; O’Handley, 1999; Geurden *et al.*, 2005). Det diskuteras om ett högt smittryck kan ge lägre tillväxt hos kalvar och ungdjur eftersom sådana samband har visats hos lamm (Aloizio *et al.*, 2006; Sweeny *et al.*, 2011) men av de studier som jämfört kalvars vikt har hittills bara en enda kunnat påvisa någon påverkan på tillväxten (O’Handley *et al.*, 2000). På köttraskalvar i s.k. feedlots har man inte hittat något samband mellan infektion och foderintag, foderomvandling och tillväxt (Ralston *et al.*, 2003a).

Patogenesen vid giardiasis hos nötkreatur är inte helt klarlagd. Det antas vara en multifaktoriell process som beror både av värdens immunsvaret och av parasitens egenskaper. Skillnader i både patogenes och symtom har också påvisats mellan olika *Giardia*-genotyper i försök på gerbiler (ökenråttor) (Bénére *et al.*, 2012). I kontrollerade försök på nötkreatur har både påverkan (Ruest *et al.*, 1997) och ingen påverkan (Dreesen *et al.*, 2012) på tarmstrukturen i jejunum påvisats. En studie har visat att framgångsrik behandling med fenbendazol av infekterade kalvar gav en signifikant normalisering av tunntarmens struktur och av matsmältningsenzymerna maltas och laktas (O’Handley *et al.*, 2001) och båda dessa faktorer påverkar kalvens förmåga till näringsupptag från tarmen.

Behandling och förebyggande åtgärder i nötkreatur

Vanligen självläker en asymtomatisk eller lindrig infektion av *Giardia* utan behandling hos både människor och djur (Adam, 2001; Lane & Lloyd, 2002). För de som blir sjuka av infektionen

finns läkemedel registrerade med indikation giardiasis på både människor och djur. Det finns dock inga preparat registrerade för produktionsdjur i Sverige med indikationen *Giardia*-infektion så ska en nötbosättning eller -individ behandlas måste det ske enligt kaskadprincipen, se vidare nedan. Medtagna och nedsatta individer kan behandlas med understödjande vätsketerapi, extra näring och även medicinskt med fenbendazol i anpassad dos.

Giardia bekämpas bättre på både kort och lång sikt med att minska smittrycket från miljön och skydda de känsligaste individerna. Eftersom drabbade djur med diarréer kan utsöndra stora mängder infektiösa cystor (Geurden *et al.*, 2006 Xiao *et al.*, 1996), 10^6 cystor/gram har uppmätts (O'Handley & Olson, 2006), bör de som utvecklar diarréer hållas avskilda från flocken tills de är symtomfria och noggrann hygien iakttagas kring skötseln av dessa djur för att förhindra spridning.

Rengöring och användande av högtrycksutrustning med hett vatten med efterföljande uttorkning/tomgång när stallarna töms är att rekommendera eftersom smittan är fekal-oral och cystorna trivs i fuktig, sval miljö och kan överleva i månader i stallinredning, vattenkoppar, gödselrännor och på foderbord (Olson *et al.*, 1999). Utan tillräcklig rengöring av miljön återsmittas djuren snabbt även vid fungerande, medicinsk behandling (Xiao *et al.*, 1996). De vanliga rengöringsmedlen oskadliggör dem inte då de har viss tålighet mot klorin (Lane & Lloyd, 2002;) och tål tensider. Ny forskning pekar på att chitosan har mycket god avdödande effekt på *Giardia*-cystor (Yarahmadi *et al.*, 2016). Chitosan är dock inte utvärderat i praktiken än.

Nedfrysning minskar cystornas överlevnad med över 90 % efter 24 timmar (Sattar, 1999) så vintertid tycker författaren att nedfrysning av inredning och redskap borde användas som alternativ till, eller ännu hellre i kombination med, uttorkning för bekämpning på besättningsnivå.

För att förebygga kalvdiarré oavsett agens är hygien extra viktig. De allra flesta sjukdomsframkallande agens som sprids via avföringen, inklusive *Giardia*, kan bekämpas med god kalvhygien. Konsekvenserna av kalvdiarré blir försämrat välbefinnande och tillväxt hos kalven (Virtala *et al.*, 1996, Donovan *et al.*, 1998), och den ökade kostnaden det innebär att behöva sköta om sjuka kalvar med extra tillsyn, veterinärbesök, eventuell tillförd vätska, mediciner, extra matningar, extra urmöckningar belastar gården ytterligare.

Bensimidazoler har visats ha god effekt mot giardiasis på nöt men måste ges i en högre dos än vid behandling mot helmintinfektioner. Fenbendazol (Axilur) ger symtomlindring och minskar produktionsbortfallet och utsöndringen av cystor hos kalvar (Xiao *et al.*, 1996) men påverkar enligt en undersökning inte infektionstiden (O'Handley *et al.*, 2000). De verkar genom att störa betatubulinproduktionen (Morgan *et al.*, 1993). Fenbendazol kan förskrivas till nötkreatur men då det inte har indikation *Giardia*-infektion måste det ske i undantagsfall och enligt kaskadprincipen. Denna innebär att om veterinärmedicinskt läkemedel för rätt djurslag och indikation saknas får en veterinär, för att förhindra att djuret utsätts för onödigt lidande, förskriva ett annat läkemedel. I första hand ett med samma indikation till ett annat djurslag eller till rätt djurslag med annan indikation och i andra hand ett humanläkemedel (med vissa undantag) eller ett läkemedel för rätt djurslag och indikation godkänt i annat EU-land om veterinären innehar licens för detta. I sista hand får en så kallad "ex tempore" beredning förskrivas, det är ett läkemedel som beretts specifikt för det aktuella tillfället och får blandas och distribueras endast av någon med särskild behörighet. För produktionsdjur finns det även bestämmelser gällande vilka läkemedel som över huvud taget får användas och hur lång tid som måste passera från administration av läkemedlet tills dess att djuret slaktas eller mjölkas. Det kallas för MRL-värde

och står för Maximal Residue Level. För att få användas på produktionsdjur, djur som ska bli eller producera livsmedel, måste ett läkemedel ha ett fastställt MRL-värde och innan det får bli till eller producera livsmedel måste den s.k. slaktkarensen gå ut. Det är tiden som behövs för att det inte ska finnas rester kvar av läkemedlet i maten.

Immunodominanta proteiner har identifierats i grupperna A, B och E som teoretiskt skulle kunna fungera som en komponent i vaccin mot giardiasis men vidare forskning krävs innan det kan bli verklighet. (Feliziani *et al.*, 2011). Ett vaccin finns utvecklat för hundar men Companion Animal Parasite Council (CAPC) anser inte att tillräckliga data finns för att stödja en användning av vaccinet utöver den undantagsmässiga användning som finns idag (CAPC, 2013).

Diagnostik

Om ett djur eller en besättning ska provtas för smitta rekommenderas att man tar avföringsprover från tre på varandra följande dagar. Vid besättningsprovtagning tas avföringsprover från flera unga djur både med och utan symtom över en tidsperiod om 1-2 veckor (McHardy *et al.*, 2014; Garcia, 2009; Hiatt *et al.*, 1995). Proverna analyseras traditionellt med direkt mikroskopering av utstryk där trofozoiter och cystor kan identifieras och kvantifieras men inte artbestämmas. Olika infärgningar som jod, järnhematoxylin, Giemsa och tricolorfärgning kan användas på utstryket eller blandas med provmaterialet innan det stryks ut på objektglaset för att underlätta analysen (Koehler *et al.*, 2014). Cystor från provmaterial kan också koncentreras med olika metoder för att öka känsligheten för det diagnostiska test som ska utföras (Stojecki *et al.*, 2014).

I immunologiska metoder utnyttjas specifika antikroppar riktade mot *Giardia* för att påvisa parasiterna i olika provmaterial. Exempel på sådana immunologiska metoder är direkt immunfluorescens (IFA), immunokromatografi (t. ex. så kallade SNAP-test) och ELISA. Metoderna har länge använts på olika laboratorier, och finns nu också som kommersiella testkit.

I IFA, som görs på direktutstryk eller efter att proverna renats, färgas proverna med specifika, fluorescerande antikroppar som fäster till ytprotein på *Giardia*-cystorna. Objektglaset placeras sedan i fluorescensmikroskop där det belyses med ultraviolett ljus vilket gör att de infärgade cystorna fluorescerar med ett gulgrönt ljus

Mot en mörk bakgrund ser de självlysande ut. På så sätt kan man uppnå en hög specificitet (99,8 – 100 %) och en hög sensitivitet (93 – 100 %) vid analys av miljöprover och fekalier (Koehler *et al.*, 2014). I prover som innehåller mycket fibrer, fett, pollen, bakterier och annat som kan göra det svårt för analytikerna att urskilja enskilda cystor så är det till stor hjälp med IFA. Vid SVA används IFA på direktutstryk rutinmässigt för undersökning av *Giardia* och *Cryptosporidium*.

Olika ELISA kit och immunkromatografi kan användas för att påvisa *Giardia*-antigen i avföring. Med ELISA kan man analysera många prover åt gången vilket är en fördel vid screening av stora provmaterial. Man kan också påvisa antigen i avföringen redan innan cystor börjat utsöndras, men med risk för nedsatt specificitet och sensitivitet. Artbestämning eller genotypning av cystor är inte möjligt med dagens tillgängliga immunologiska metoder (Koehler *et al.*, 2014).

PCR, undersökning av genetiskt material, kan användas både för diagnostik, artbestämning och genotypning. Olika former av PCR-teknik med replikering av en eller flera loci i DNA finns utprovade (Koehler *et al.*, 2014). PCR är en känslig och precis metod men kräver noggranna förberedelser av ett material av god kvalitet för att extrahera DNA och filtrera bort ämnen som

hämmar PCR-reaktionen (Laude *et al.*, 2016)). Markörer som kan användas för PCR-diagnostik är SSU-rDNA (Amar *et al.*, 2003; Siripattanapibong *et al.* 2011), glutamatdehydrogenas (GDH), β -giardin (BG), triosfosfatisomeras (TPI), elongation factor 1- α (EF1- α), GLORF-C4 och variable surface proteins (VSP) (Cacciò *et al.*, 2005). SSU kan identifiera vilken art och genotyp provet innehåller. GDH, BG, TPI och EF1- α kan identifiera vilken art, genotyp och subtyp provet innehåller. GLORF-C4 och VSP används vid fastställande av genotyp och subtyp (GLORF-C4) eller enbart subtyp (VSP) vid fördjupade tester där art och eventuell genotyp redan fastställts.

MATERIAL OCH METODER

Analyserna har utförts på 277 avföringsprover insamlade i södra och mellersta Sverige under maj-juni 2012 inom ramen för en annan studie (SLF projektnr H1150199: Kryptosporidier i dikobesättningar – utgör de en smittkälla för människor?). Proverna togs från kalvar yngre än 3 månader i 24 dikobesättningar. Tolv besättningar låg i sydvästra Sverige i kusttrakterna mellan Göteborg och Helsingborg och tolv besättningar låg i sydöstra Sverige runt Uppsala och Enköping. Båda områdena är tätbebyggda, har betande nötkreatur nära vattendrag och hade pågående diskussioner om avstängsling av vattennära betesmarker. Nitton besättningar hade under hela betesperioden djuren på vattennära betesmarker, 2 besättningar hade det sällan/ibland och 3 aldrig. Antal dikor per besättning varierade mellan 10 och 99 och antalet provtagna kalvar var mellan 3 och 18 per besättning. Två av kalvarna behandlades med antibiotika och två andra kalvar uppvisade symtom på sjukdom vid provtagningen. Symtomen som observerades var nedsatt allmäntillstånd respektive ökad andningsfrekvens och lindrig uttorkning.

Proverna renades och koncentrerades med en flotationsmetod beskriven av Maddox-Hyttel *et al.* (2006). 1 gram faeces blandades väl med 3,5 ml PBS med 0,01 % Tween i ett 15 ml provrör (rör 1). Blandningen filtrerades genom gasväv ned i ett nytt 15 ml rör (rör 2). Rör 1 sköljdes ur med ytterligare 3,5 ml PBS med 0,01 % Tween och vätskan filtrerades ned i rör nr 2. Därefter tillsattes 3,5 ml flotationsvätska (mättad saltlösning med glukos (50 g/100 ml) spädd 1:1 med destillerat vatten) under vätskan i rör 2 varefter röret centrifugerades vid 750 rpm i 3 minuter. Supernatanten överfördes till ett nytt 15 ml rör (rör 3). Detta fylldes upp med destillerat vatten och centrifugeras vid 3000 rpm i 10 minuter. Supernatanten sögs försiktig bort tills 2 ml återstod. Återstoden homogeniseras med Vortex och röret fylldes upp med destillerat vatten igen, skakades om och centrifugeras i 10 minuter vid 3000 rpm. Detta upprepades två gånger till. Reningen avslutades med att det var 2 ml i rör nr 3. De renade proverna förvarades sedan i kylrum med en temperatur mellan +4 och +8°C. Proverna kom att bli utsatta för förhöjd temperatur under ett okänt antal dagar vilket kan ha påverkat cystorna.

De renade proverna homogeniserades med Vortex och 10 μ l blandades med 50 μ l destillerat vatten i brunnar på mikroskoperingsglas med tre brunnar per glas. Efter att glaset fått torka i rumstemperatur fixerades proverna i aceton i 7 minuter. När glaset torkat tillsattes 20 μ l fluoresceinmärkt monoklonal antikropp riktad mot ett ytprotein på *Giardia*-cystan (*Giardia* Cel – RG1 från Cellabs, Sydney) per brunn och fick verka under 1 timme. Därefter tvättades brunnarna 3 gånger med 100 μ l PBS, 10 μ l monteringslösning tillsattes och ett täckglas lades på. Antal cystor per brunn räknades och morfologin undersöktes med fluorescensmikroskop (Nikon Eclipse E400) vid 200 och 400 gångers förstoring. Den högre upplösningen nyttjades när den lägre inte räckte för att med säkerhet kunna fastställa det infärgade föremålets kategori.

Bedömning av form, storlek, 3D-struktur och infärgning gjordes för varje misstänkt cysta. Kriterierna för att ett infärgat föremål skulle godkännas som *G. intestinalis*-cysta ”klass 1” var en stark, jämn infärgning, intakt 3D-struktur, 9-15 µm storlek, rund till oval form utan synliga veck eller gropar och hela kanten skulle vara skarp och synlig (Sauch, 1985). Om något av dessa kriterier inte var uppfyllda typades ett föremål som ”klass 2”. Om två eller fler kriterier inte var uppfyllda eller om det bedömdes som att föremålet kunde vara något annat än en cysta typades föremålet som ”kross”.

Som positivt prov räknades de som innehöll minst ett föremål ur klass 1 eller 2. Prover utan infärgade föremål och prover med enbart förekomst av kross eller andra infärgade föremål räknades som negativa prov. Ett positivt prov kunde i materialet innehålla allt från 1 till 595 cystor/brunn. Den summan ska sedan multipliceras med 400 för att få antalet cystor per gram provtagen avföring. Detektionsgränsen låg följaktligen vid 400 cystor/g avföring (CPG).

Statistisk analys

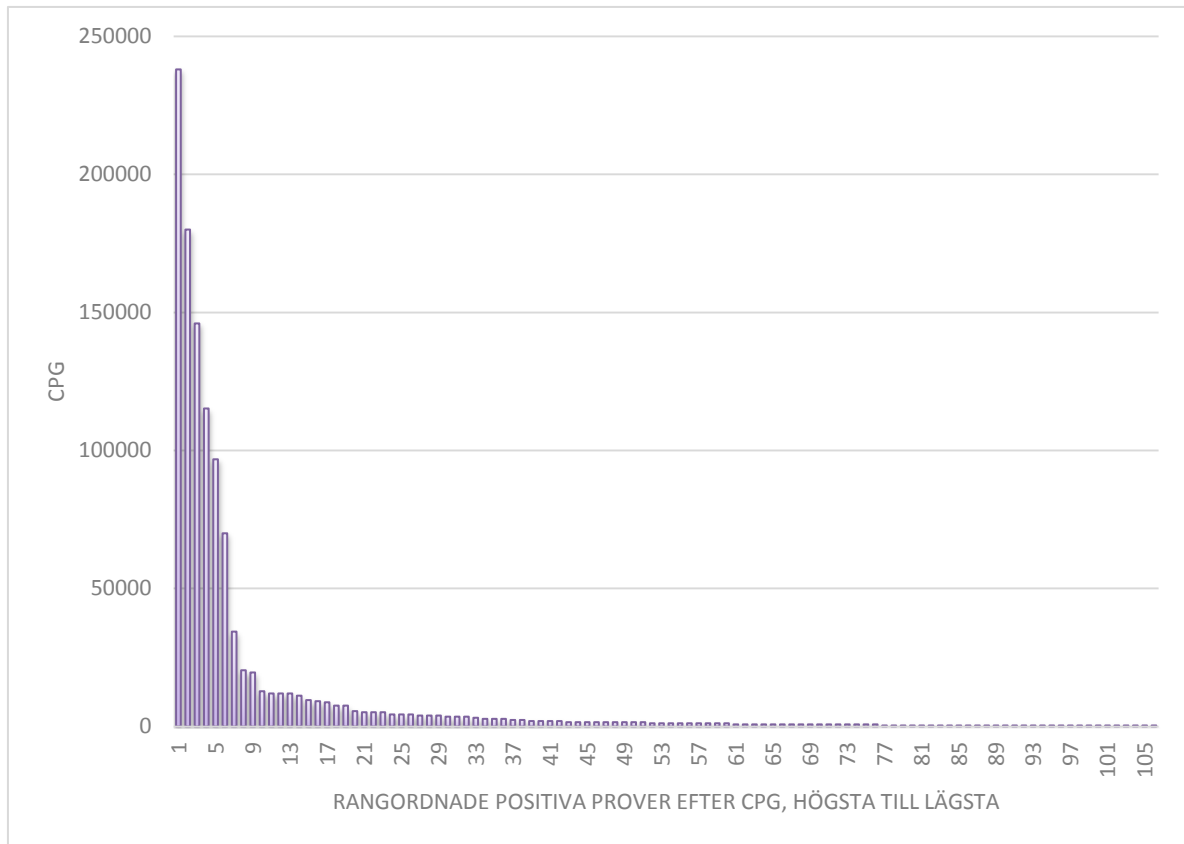
Resultaten registrerades i Microsoft® Office Excel® 2010 (Microsoft Corp., 2006, USA). Statistisk bearbetning gjordes i Microsoft® Office Excel® 2010 och IBM SPSS Statistics version 20, © 2017 (IBM Corporation 1994, 2017). Chi2-test användes för att jämföra andelen infekterade och icke-infekterade kalvar i olika ålder och av olika kön samt samband mellan infektion med *G. intestinalis* och *Cryptosporidium* spp. Odds ratio beräknades för sambandet mellan infektion med *G. intestinalis* och *Cryptosporidium* spp. För att vidare undersöka sambandet mellan ålder och *Giardia*-infektion utfördes en logistisk regressionsanalys med respons prevalens (%) och prediktorer kalvens ålder i veckor och kalvens ålder kvadrerat.

RESULTAT

Etthundrasex av 277 prover (38,3 %, CI 95 % 32,6 – 43,9 %) var positiva för *G. intestinalis*. Tjugotre av 24 besättningar hade minst ett positivt djur (96 %). Prevalensen inom besättningarna varierade mellan 0 och 78,6 %.

Antalet cystor i de positiva proven varierade mellan 400 och 238 000 CPG (Figur 1). Sex prover innehöll fler än 40 000 CPG och 80 prover innehöll 4 000 CPG eller färre. Typvärdet (det värde som förekom flest gånger) var 400 CPG (30 prover). Medianantalet CPG var 1 200 och medelantalet 10 325 CPG. Samtliga ålderskategorier utom 13 veckor eller äldre fanns representerade bland de 51 prover som hade ett CPG över medianvärdet, dvs 1 600 CPG eller mer. I de 10 % av proverna som hade allra högst CPG finns prover från kalvar ifrån 2a till 9e levnadsveckorna representerade. Samma åldersfördelning sågs hos de 7 kalvar som utsöndrade allra högst antal cystor.

Det fanns ett samband mellan att vara positiv för *Giardia* och att vara positiv för *Cryptosporidium* (chi2-test gav $p=0,003$) Sannolikheten var drygt två gånger så stor (Odds ratio, OR=2,29) för att en *Giardia*-infekterad kalv skulle vara positiv för *Cryptosporidium* än att den skulle vara *Cryptosporidie*-negativ.

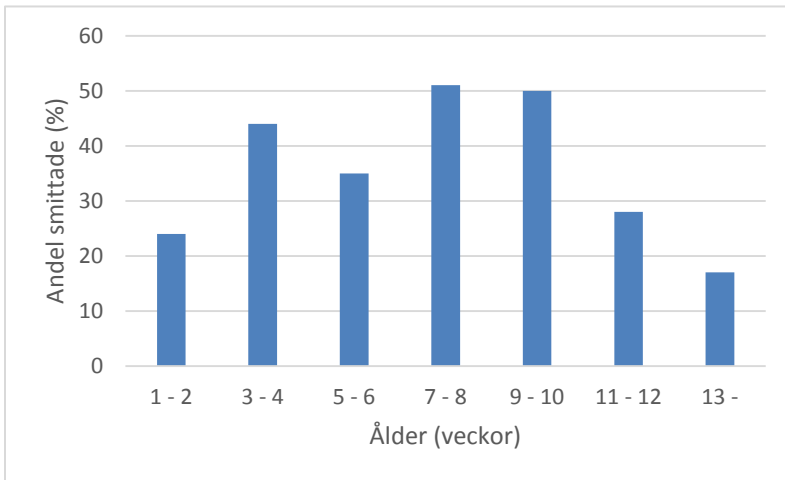


Figur 1. Illustration av fördelningen av antal utsöndrade cystor i de positiva proverna

För att undersöka om det fanns något samband mellan kalvarnas ålder och fynd av parasitcystor delades kalvarna in i ålderskategorier efter antal levnadsveckor vid provtagningstillfället och andelen positiva prover i varje kategori noterades (Tabell 3). Den högsta andelen positiva kalvar återfanns i den 6e och 7e levnadsveckan, alltså mellan 36 och 48 dagars ålder, då 60 % av kalvarna utsöndrade cystor. Det fanns ett statistiskt signifikant samband mellan förekomst av *Giardia* och kalvarnas ålder i veckor ($p=006$ i chi2-test). I Figur 2 nedan presenteras resultaten i Tabell 4 som ett diagram för att åskådliggöra en ökande andel smittade individer fram till 7 - 10 veckors ålder och därefter en minskande andel. Logistisk regressionsanalys visade att prevalensen var som högst vid 7,5 veckors ålder (Tabell 4 och Figur 3).

Tabell 3. *Positiva prover fördelat på kalvens ålder i veckor*

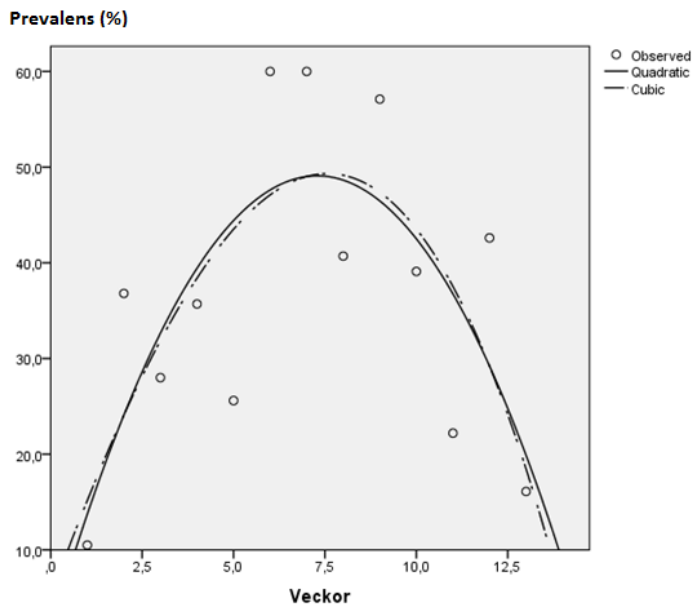
Ålder veckor	Provresultat		Andel positiva %
	+	-	
1	2	17	10,5
2	7	12	36,8
3	7	18	28,0
4	5	9	35,7
5	10	29	25,6
6	9	6	60,0
7	18	12	60,0
8	11	16	40,7
9	20	15	57,1
10	9	14	39,1
11	4	14	22,2
12	3	4	42,6
13	1	5	16,7
Totalt	106	171	277



Figur 2. Diagram över andel smittade individer fördelat på ålderskategorier

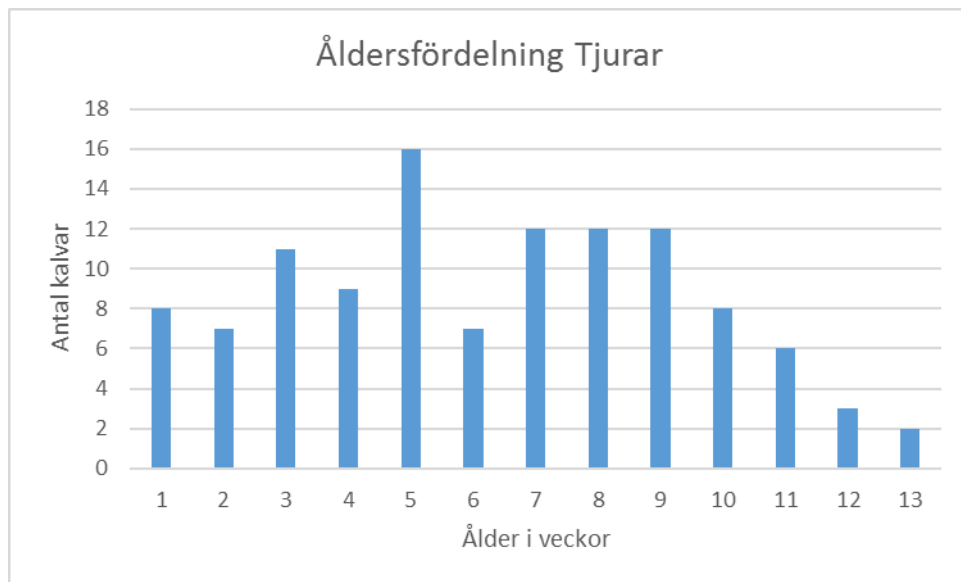
Tabell 4. Resultat av logistisk regression. Respons prevalens (%) och prediktorer kalvens ålder i veckor och kalvens ålder kvadrerat

	coefficient	Std. error	t	p
Veckor	0,128	0,037	3,484	0,001
Veckor ²	-0,009	0,003	-3,112	0,002
Constant	0,002	0,108	0,018	0,986

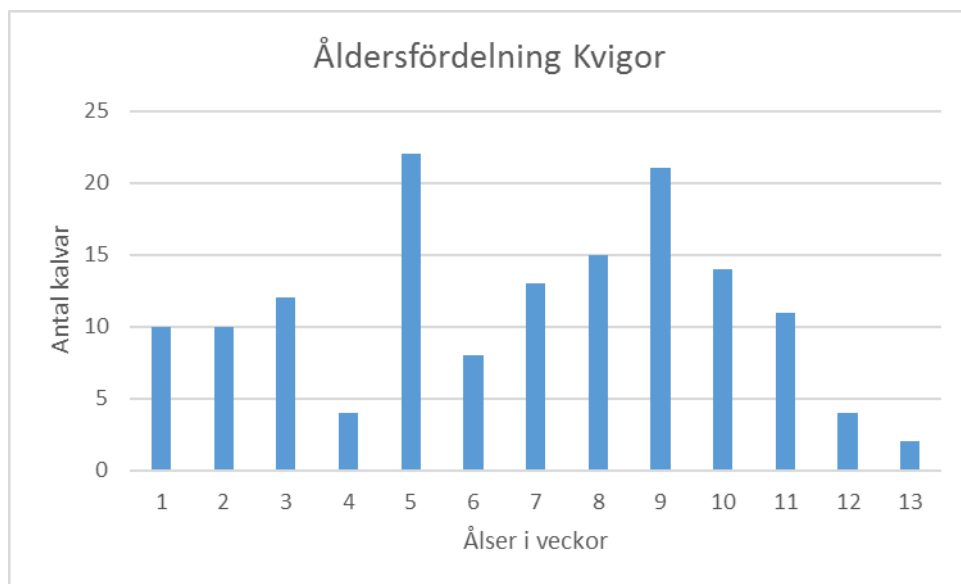


Figur 3. Resultat av logistisk regression. Respons prevalens (%) och prediktorer kalvens ålder i veckor och kalvens ålder kvadrerat

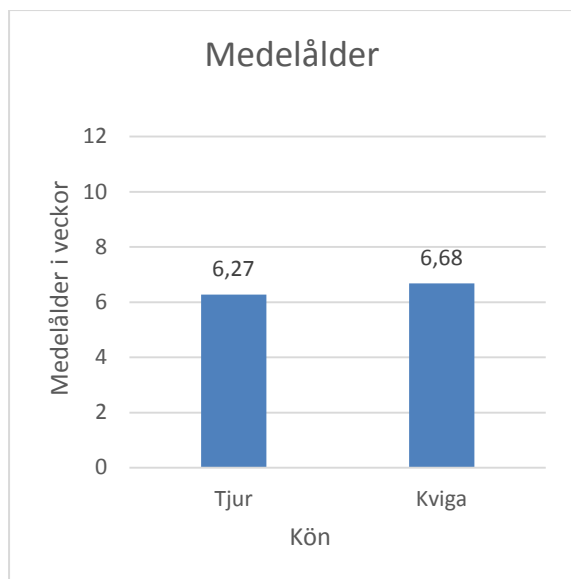
I 259 av proverna hade man registrerat vilket kön kalven hade. Kalvarnas kön jämfördes med andelen positiva prover och 46 av 146 kvigkalvar (31,5%, CI 95 % 24,0 – 39,0 %) och 51 av 113 (45,1 %, CI 95 % 35,9 – 54,3 %) tjurkalvar var positiva för *Giardia*. Prevalensen var högre hos tjurkalvarna och skillnaden var signifikant ($p=0,047$ i chi2-test). Ett jämförande av medelvärden och en visuell kontroll av åldersfördelningen mellan könen tydde inte på att skillnaden mellan könen påverkats av deras ålder (Figur 4, 5 och 6) men fler beräkningar krävs på materialet för att helt utesluta ålderbias som orsak till skillnaden.



Figur 4 Grafisk illustration tjurar



Figur 5 Grafisk illustration kvigor



Figur 6 Grafisk illustration av medelåldern hos de två könskategorierna

DISKUSSION

I denna studie var 38,3 % av de undersökta kalvarna positiva med avseende på *G. intestinalis* och 23 av 24 besättningar hade minst en smittad individ. Det stämmer tämligen väl överens med resultat från övriga världen där kalvar har en prevalens mellan 9 och 55 % (Tabell 2).

Fyra provtagna kalvar var yngre än 3 dygn. En av dessa, som enligt uppgift var 1 dygn gammal, var positiv för *Giardia*, det hittades 4000 CPG. Detta fynd är överraskande då det enligt litteraturen ska ta minst 3 dygn för *Giardia* att genomföra en fullständig livscykel (Thompson *et al.*, 1993). Det finns dock minst ett dokumenterat fynd av *Giardia*-cystor hos en 2 dagar gammal kalv (Mark-Carew *et al.*, 2010). Den smittade kalven i denna studie kan vara ett unikt fynd men det kan helt inte uteslutas att kalvens öronnummer eller ålder blivit fel registrerade vid provtagningen.

Sambandet mellan kalvarnas ålder och andelen som var smittade antyder att smittspridningen når sin kulmen mellan 6e och 7e levnadsveckorna för att därefter avta. En studie på kalvar i mjölkbesättningar i Norge har fått liknande resultat med en stigande andel smittförande djur fram till 12 veckors ålder och sedan en sjunkande trend (Hamnes *et al.*, 2006). Andra studier har visat på en maximalt spridd smitta vid 30 dagar (Gillhuber *et al.*, 2014) och 5 – 6 veckors ålder (Tiranti *et al.*, 2011). Varför kalvar i dikobesättningar skulle ha en något tidigare kulmen än de i mjölkbesättningar kan ha flera anledningar. Skötselrutinerna vid kalvning skiljer sig åt mellan produktionerna och lösdrift och betestid likaså. Då *Giardia* anses ubikvitär och smittar via miljön och fekalier kan det finnas faktorer i hur vi håller djuren som orsakar sambandet. En möjlig applikation av resultaten är att rekommendera uppfödare av köttboskap som vill göra någon förbättring att koncentrera sig på kalvar upp till 10 veckors ålder som enligt detta resultat ska vara de som sprider flest cystor. Beroende på var i landet besättningen ligger och vilken årstid det är kan både högtryckstvätt av stallar med upptorkning under tomgång och upprepade nedfrysningar av stallarna eller stallsektioner sänka smittrycket från stallmiljön. Resultaten kan också tjäna som hjälp till kommande studier som vill kartlägga vilka arter som förekommer

genom att koncentrera provtagningen till dessa djur för att maximera totalantalet insamlade protozoer. Proverna i denna undersökning är insamlade enbart från kalvar. Det är den del av en smittad population som utsöndrar mest cystor. Urvalet är inte representativt för hela kött djurspopulationen men åldersfördelningen gör ändå att man kan jämföra studien internationellt då det även i många av dessa studier är kalvar i liknande ålder som provtagits.

Sambandet mellan infektion och kön i denna studie där en högre andel av tjurkalvarna testade positivt var oväntat. Åldersfördelningen var likartad (visuell bedömning) och medelåldern skiljdes åt av mindre än en halv vecka, detta samband har förmodligen inte uppkommit genom ojämn åldersfördelning men ett sådant förhållande går inte att utesluta utan en djupare studie. En färsk studie på kalvar upp till 5 månaders ålder i Etiopien kunde inte hitta något signifikant samband mellan smitta och kön (Wegayehu *et al.*, 2016). Tänkbara faktorer som skulle kunna bidra till en skillnad mellan könen är kalvens vikt vid partus, komplikationer vid partus och kons/kvigans antal tidigare kalvningar. Ju större och tyngre kalv desto större är risken för en utdragen, svår kalvning med ökad stress på både kalv och ko/kviga. Stress hos neonatala är en allmänt känd riskfaktor för att drabbas av infektioner post partum hos både djur och människor. Tjurkalvar hos köttrasen Angus har t ex en högre snittvikt vid födseln och att födas som tjurkalv ökar risken för komplikationer vid partus (Herring, 1995).

Risken att vara infekterad med *Cryptosporidium* spp var förhöjd hos de *Giardia*-infekterade kalvarna men om sambandet är kausalt kan ifrågasättas. Värdet är måttligt förhöjt och de besättningar som har rätt miljö för att härbärgera stora mängder *Cryptosporidium* har också rätt miljö för *G. intestinalis* då båda parasiterna trivs i fekalier, svalka och hög fuktighet. Jag anser därför att inga långtgående slutsatser kan dras ifrån dessa resultat. Det behövs noggrannare studier mellan grupper där miljöfaktorerna är identiska. En studie där sambandet undersökts mellan de två infektionerna hos människa har inte kunnat visa på något samband (Skeels, 1986). Däremot har det visats att förekomst av *Helicobacter pylori* tredubblar risken att drabbas av infektion med *G. intestinalis* hos människa (Ankarklev *et al.*, 2012; Zeyrec *et al.*, 2008).

Beräkningarna av CPG visar att i den här studien utsöndrades 93 % av alla cystor (1 069 600 st) av 11 % av kalvarna. I gruppen av dessa ”superspridare” (författarens benämning) har jag inte kunnat hitta några tydliga samband och urvalet är också för litet (29 djur) för att dra några slutsatser till totalpopulationen men fenomenet känns viktigt. En kanadensisk, longitudinell studie har fått resultat som kan tolkas som att utsöndringen av cystor inte bara ökar till en enda maxpunkt där individen utsöndrar som mest cystor för att därefter minska, utan att det även förekommer variationer i mängden utsöndrade CPG under infektionens förlopp och att utskiljningen kan vara intermittent (Ralston *et al.*, 2003a). Jag hoppas att efterföljande studier kan sprida ljus över varför, och när, vissa individer blir superspridare och i och med det hjälpa till att rikta åtgärder i framtiden för ökad hälsa och livsmedelssäkerhet. Även i USA har fenomenet med superspridare noterats i minst en artikel (Hoar *et al.*, 2009).

Eftersom jag inte hade någon erfarenhet av att bedöma förekomst av cystor i mikroskop har jag utgått från litteratur för att hitta lämpliga kriterier (Sauch, 1985) och sedan fått hjälp av personal med mångårig vana på SVA för att säkerställa att jag gjort korrekta bedömningar. Detta gjordes genom att vi gick igenom ett antal glas tillsammans och bland annat diskuterade vad som är en stark infärgning och hur man kan se 3D-strukturen på bästa sätt i ett fluorescensmikroskop där proverna, som i mitt fall, är fulla av annat material som kan försvåra avläsningen.

Efter att detta arbete avslutades har några av de positiva proverna analyserats vidare på SVA, avdelningen för mikrobiologi, med molekylärbiologiska metoder för att bestämma genotyp. Preliminära resultat visar att två genotyper, A och E har identifierats bland proverna. Både A och E är vanligt förekommande på nötkreatur och har identifierats tidigare i flera europeiska studier. Detta är dock första gången som genotyp A kunnat påvisas i Sverige, något som kan förklaras av de oerhört få prover som isolerats för molekylär analys tidigare (17 djur, alla i Lebbad *et al.* 2010).

Efter att ha undersökt den här organismens utbredning hos svenska köttraskalvar är min bedömning att det är av större nytta än potentiell risk att låta våra köttdjur behålla sina strandbeten och andra beten nära annan mänsklig aktivitet. Information till badande bör finnas då riskgrupper med nedsatt immunförsvar kan bli svårt sjuka men de grupperna löper på en allmän badstrand en mycket högre risk att drabbas av andra smittor än just *Giardia* (Robertson, 2009). Flera faktorer ger en kraftig utspädning av koncentrationen av cystor. De betande djuren är av blandade åldrar och lejonparten av cystorna utsöndras av kalvar. Absolut största delen av sin tid tillbringar djuren på annan plats än just vid vattenbrynet vilket ytterligare minskar risken för kontaminering av vattnet och parasiten kan inte föröka sig i cystastadiet (Olson *et al.*, 2004). Nu har besökanden av våra badstränder också ökat i antal i takt med att befolkningen blivit tätare så om det här hade varit ett stort problem hade vi sett en ökning av antalet fall men så är inte fallet (Folkhälsomyndigheten, 2016).

Parasiten är en tidig eukaryot, finns överallt och har samexisterat med oss genom den medicinska historien. Även om mänskligheten som helhet skulle tjäna på att den bekämpades hårdare och mer systematiskt i form av vacciner, eller ökad och ny läkemedelsanvändning anser författaren att sådan bekämpning av *G. intestinalis* endast är försvarbar i endemiska områden med hög dödlighet på grund av diarrésjukdomar, till exempel bland små barn. Visst ska vi ha säkert dricksvatten och tillräckligt säkra badstränder kvar men med tanke på hur vi målat in oss i ett hörn genom överdriven användning av antibiotika mot bakterier känns det som en dålig idé att riskera att påbörja samma misstag i iveren att bekämpa en parasit som, i jämförelse med t ex *C. parvum*, i en överväldigande majoritet av sjukdomsfallen på människa har ett benigt förlopp.

REFERENSER

- Abdel-Moein, K.A. & Saeed, H. (2016). The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings. *Parasitology Research*, 115:3197-3202.
- Abdurrahman, G., Mutalip, C. & Özlem, K. (2008). Prevalence of *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. and *G. intestinalis* spp. in calves in the Van Province. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 32:202-204.
- Abeywardena, H., Jex, A.R., Firestone, S.M., McPhee, S., Driessen, N., Koehler AV, Haydon, S.R., von Samson-Himmelstjerna, G., Stevens, M.A. & Gasser, R.B. (2013). Assessing calves as carriers of *Cryptosporidium* and *Giardia* with zoonotic potential on dairy and beef farms within a water catchment area by mutation scanning. *Electrophoresis*, 34:2259–2267.
- Adam, R. D. (1991). The biology of *Giardia* spp. *Microbiological Reviews*, 55:706–732.
- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiological Review*, 14:447 - 475.
- Aloisio, F., Filippini, G., Antenucci, P., Lepri, E., Pezzotti, G., Caccio, S. M. & Pozio, E. (2006). Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. *Veterinary Parasitology*, 142:154–158.

- Amar, C.F., Dear, P.H. & McLauchlin, J. (2003). Detection and genotyping by real-time PCR/RFLP analyses of *Giardia duodenalis* from human faeces. *Journal of Medical Microbiology*, 52:681–683.
- Ankarklev, J. (2012). Inter- and intraassemblage characterization of *Giardia intestinalis*: from clinic to genome. Diss. Uppsala University ISBN 978-91-554-82596.
- Ankarklev, J., Hestvik, E., Lebbad, M., Lindh, J., Kaddu-Mulindwa, D.H., Andersson, J.O., Tylleskär, T., Tumwine, J.K. & Svärd, S.G. (2012) Common coinfections of *Giardia intestinalis* and *Helicobacter pylori* in non-symptomatic Ugandan children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 6:e1780.
- Anthony, J-P., Fyfe, L., Stewart, D. & Mcdougall, G. J. (2011). Differential effectiveness of berry polyphenols as anti-Giardial agents. *Parasitology*, 138:1110–1116.
- Becher, K.A., Robertson, I.D., Fraser, D.M., Palmer, D.G., & Thompson, R.C. (2004). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Veterinary Parasitology*, 123:1–9.
- Bénére, E., Geurden, T., Robertson, L., Van Assche, T., Cos, P. & Maes, L. (2010). Infectivity of *Giardia duodenalis* Assemblages A and E for the gerbil and axenisation of duodenal trophozoites. *Parasitology International*, 59:634-7.
- Bernander, R., Palm, J.E. & Svärd, S.G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*, 3:55-62.
- Björkman, C., Svensson, C., Christensson, B. & de Verdier, K. (2003). *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44:145–152.
- Boreham, P.F., Phillips, R.E. & Shepherd, R.W. (1988). Altered uptake of metronidazole in vitro by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82:104–106.
- Branschorganisationen Svenskt Kött (2015). www.svensktkott.se [2016-04-01]
- Brown, J. R., Schwartz, C.L., Heumann, J.M., Dawson, S.C & Hoenger, A. (2016). A detailed look at the cytoskeletal architecture of the *Giardia lamblia* ventral disc. *Journal of Structural Biology*, 194:38-48.
- Buret A., Gall D.G., & Olson M.E. (1990). Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. *The Journal of Parasitology*, 76:403–409.
- Buret, A. G. (2007). Mechanisms of epithelial dysfunction in Giardiasis. *Gut*, 56:316–317.
- Buret, A. G., Mitchell, K., Muench, D. G. & Scott, K. G. (2002). *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology*, 125:11–19.
- Caccio, S.M., Thompson, R. P., McLauchlin, J. & Smith, H.P. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, 21:430–437.
- CAPC, Companion Animal Parasite Council (2013) CAPC's General Guidelines <https://www.capcvet.org/capc-recommendations/Giardia> [2016-09-24]
- Carlson, D.W. & Finger, D.R. (2004). Beaver fever arthritis. *Journal of clinical rheumatology practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*, 10:86-88.
- Carpenter, M.L., Assaf, Z.J., Gourguechon, S. & Cande, W.Z. (2012). Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *Journal of Cell Science*, 125:2523–32.

- Carroccio, A., Cavataio, F., Montalto, G., Paparo, F., Troncone, R. & Iacono, G. (2001). Treatment of Giardiasis reverses 'active' coeliac disease to 'latent' celiac disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13:1-5.
- Coklin, T., Farber J., Parrington L., & Dixon, B. (2007). Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, 150:297–305.
- Cotton, J. A., Beatty, K. & Buret, A. G. (2011). Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *International Journal for Parasitology*, 41:925–933.
- Delport, T. C., Asher, A. J., Beaumont, L. J., Webster, K. N., Harcourt, R. G., & Power, M. L. (2014). *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* occurrence in Australian sea lions (*Neophoca cinerea*) exposed to varied levels of human interaction. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3:269–275.
- Di Prisco, M.C., Hagel, I., Lynch, N.R., Jiménez, J.C., Rojas, R., Gil, M. & Mata, E. (1998). Association between Giardiasis and allergy. *Annals of allergy asthma & immunology*, 81:261-265.
- Donovan, Dohoo & Montgomery (1998). Calf and disease factors affecting growth in female Holstein calves in Florida, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 33:1–10.
- Dreesen, L., Rinaldi, M., Chiers, K., Li, R., Geurden, T., Van den Broeck, W., Goddeeris, B., Vercruyse, J., Claerebout, E. & Geldhof, P. (2012). Microarray analysis of the intestinal host response in *Giardia duodenalis* assemblage E infected calves. *PLoS One*. 2012;7:e40985.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) 2014. Annual epidemiological report 2014 – food- and waterborne diseases and zoonoses. Stockholm: ECDC; 2014.
- Eckmann, L. (2003). Mucosal defenses against *Giardia*. *Parasite Immunology*, 25:259–270.
- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). 2015. The European Union Summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13:3991.
- Einarsson, E., Troell, K., Hoepfner, M.P., Grabherr, M., Ribacke, U. & Svärd, S.G. (2016). Coordinated Changes in Gene Expression Throughout Encystation of *Giardia intestinalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10:e0004571.
- El-Taweel, H. (2015). Understanding drug resistance in human intestinal protozoa. *Parasitology Research*, 114:1647 - 59.
- Ellis J., Wingfield J., Cole D., Boreham P. & Lloyd D. (1993). Oxygen affinities of metronidazole-resistant and -sensitive stock of *Giardia intestinalis*. *International Journal for Parasitology*, 23:35-9.
- Elmendorf, H. G., Dawson, S. C. & McCaffery, J. M. (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*, 33:3–28.
- Erlandsen S.L., Macechko P.T., Van Keulen H., & Jarrol E.L. (1996). Formation of *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43:416–429.
- Erlandsen, S.L., Russo, A.P. & Turner, J.N. (2004). Evidence for Adhesive Activity of the Ventrolateral Flange in *Giardia lamblia*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51:73–80.
- Escobedo, A.A. & Cimerman, S. (2007). Giardiasis: a pharmacotherapy review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8:1885-902.

- European Centre for Disease Prevention and Control (2014). Annual epidemiological report 2014 –food- and waterborne diseases and zoonoses. Stockholm: ECDC
- Falagas, M.E., Walker, A.M., Jick, H., Ruthazer, R., Griffith, J. & Snyderman, D.R. (1998). Late incidence of cancer after metronidazole use: a matched metronidazole user/nonuser study. *Clinical Infectious Diseases*, 26:384-388.
- Faso, C. & Hehl, A.B. (2011). Membrane trafficking and organelle biogenesis in *Giardia lamblia*: use it or lose it. *International Journal of Parasitology*, 41:471–480.
- FASS Vårdpersonal (2017). <https://www.fass.se/LIF/startpage?userType=0> [2017-01-10]
- Feely, D.E., Schollmeyer, J.V. & Erlandsen, S.L. (1982). *Giardia* spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Experimental Parasitology*, 53:145-54.
- Feliziani, C., Merino, M.C., Rivero, M.R., Hellman, U., Pistoresi-Palencia, M.C. & Rópolo, A.S. (2011). Immunodominant proteins α -1 giardin and β -giardin are expressed in both assemblages A and B of *Giardia lamblia*. *BMC Microbiology*, 11:233.
- Feng, Y. & Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24:110-140.
- Ford, B.J. (2005). The Discovery of *Giardia*. *Microscope*, 53:147-153.
- Folkhälsomyndigheten (2016). <https://www.folkhalsomyndigheten.se/folkhalsorapportering-statistik/statistikdatabaser-och-visualisering/sjukdomsstatistik/Giardiainfektion/?y=2015> 160916 [2016-03-27]
- Fraser, D., Bilenko, N., Deckelbaum, R. J., Dagan, R., el-On, J. & Naggan, R. (2000). *Giardia lamblia* carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors and consequences. *Clinical Infectious Diseases*, 30:419–424.
- Garcia, L.S. (2009) *Practical guide to diagnostic parasitology*. 2nd Ed. Washington: ASM press.
- Gardner, T.B. & Hill, D.R. (2001). Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:114– 28.
- Geurden, T., Claerebout, E. & Vercruysse, J. (2005). [Protozoan infection causes diarrhoea in calves]. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 130:734-737.
- Geurden, T., Claerebout, E., Dursin, L., Deflandre, A., Bernay, F., Kaltsatos, V. & Vercruysse, J. (2006) The efficacy of an oral treatment with paromomycin against an experimental infection with *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology*, 135:241–247.
- Geurden, T., Geldhof, B., Levecke, C., Martens, D., Berkvens, S., Casaert, J., Vercruysse, J. & Claerebout, E. (2008). Mixed *Giardia duodenalis* genotyp A and E infections in calves. *International Journal for Parasitology*, 38:259–264.
- Geurden, T., Vanderstichel, R., Pohle, H., Ehsan, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Morgan, E.R., Camuset, P., Capelli, G., Vercruysse, J. & Claerebout, E. (2012). A multicentre prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. *Veterinary Parasitology*, 190:383-390.
- Ghoneim, N. H., Abdel-Moein, K. & Saeed, H. (2012). Fish as a possible reservoir for zoonotic *Giardia duodenalis* assemblages. *Parasitology Research*, 110:2193-2196.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Antonicelli, L., D'Amato, G., Silvestri, C., Del Prete, M.S. & Scalise, G. (2003). Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic skin diseases. *Journal of Parasitology*, 89:490-92.

- Gillin, F.D., Reiner, D.S. & McCaffery, M. (1991). Organelles of protein transport in *Giardia lamblia*. *Parasitology Today*, 7: 113-116.
- Gillin, F. D., Reiner, D.S. & McCaffery, M. (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annual Review of Microbiology*, 50:679–705.
- Gillhuber, J., Rügamer, D., Pfister, K. & Scheuerle, M. C. (2014). Giardiasis and other enteropathogenic infections: a study on diarrhoeic calves in Southern Germany. *BMC Research Notes*, 7:112.
- Gow, S. & Waldner, C. (2006). An examination of the prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves from western Canadian cow–calf herds. *Veterinary Parasitology*, 137:50-61.
- Grit, G.H., Bénéré, E., Ehsan, A., De Wilde, N., Claerebout, E., Vercruyse, J., Maes, L. & Geurden, T. (2012). *Giardia duodenalis* cyst survival in cattle slurry. *Veterinary Parasitology*, 184:330-4.
- Grit, G.H., Van Coppennolle, S. & Devriendt, B. (2014). Evaluation of cellular and humoral systemic immune response against *Giardia duodenalis* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 202:145–155.
- Guo, F., Ortega-Pierres, G., Argüello-García, R., Zhang, H. & Zhu, G. (2015). *Giardia* fatty acyl-CoA synthetases as potential drug targets. *Frontiers in Microbiology*, 6:753. doi:10.3389/fmicb.2015.00753
- Halliez, M. C., & Buret, A. G. (2013). Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World Journal of Gastroenterology*, 19:8974–8985.
- Hamnes, I.S., Gjerde, B. & Robertson, L. (2006). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Veterinary Parasitology*, 140:204–216.
- Herring, W.O. (1995). Calving difficulty in Beef cattle. Department of Animal Sciences. University of Missouri-Columbia.
- Hernandez, Y., Shpak, M., Duarte, T.T., Mendez, T.L., Maldonado, R.A. & Roychowdhury, S. (2008). Novel role of sphingolipid synthesis genes in regulating Giardial encystation. *Infection and Immunity*, 76:2939–2949.
- Heusinkveld, M., Mughini-Gras, L., Pijnacker, R., Vennema, H., Scholtz, R., van Huisstede-Vlaanderen, K. W., Kortbeek, T., Kooistra-Smid, M. & van Pelt, W. (2016). Potential causative agents of acute gastroenteritis in households with preschool children: prevalence, risk factors, clinical relevance and household transmission. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, 35:1691-1700.
- Hiatt, R.A., Markell, E.K. & Ng, E. (1995). How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53:36–39
- Hill, D. R. (1993). Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infectious Disease Clinics of North America*, 7:503–525.
- Hill, D.R. & Nash, T.E. (2015). Giardiasis. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease*. Philadelphia: Elsevier, 281:3154–60.
- Hill Gaston, J.S. & Lillicrap, M.S. (2003). Arthritis associated with enteric infection. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, 17:219-39.
- Hoar, B. R., Paul, R. R., Siembieda, J., Pereira, M. das G. C., & Atwill, E. R. (2009). *Giardia duodenalis* in feedlot cattle from the central and western United States. *BMC Veterinary Research*, 5:37.
- Holberton, D. V. (1973a). Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *Journal of Cellular Science*, 13:11–41.

- Holberton, D. V. (1973b). Mechanism of attachment of *Giardia* to the wall of the small intestine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 67:29–30.
- House, S.A., Richter, D.J., Pham, J.K. & Dawson, S.C. (2011). *Giardia* flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces. *PLoS pathogens*, 7:e1002167.
- Huetink, R.E.C., Giessen, J.W., Noordhuizen, J.P.T.M. & Ploeger, H.W. (2001). Epidemiology of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Veterinary Parasitology*, 102:53–67.
- Inpankaew, T., Jiyipong, T., Thadtapong, N., Kengradomkij, C., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W. & Jittapalapong, S. (2015). Prevalence and genotype of *Giardia duodenalis* in dairy cattle from Northern and Northeastern part of Thailand. *Acta Parasitologica*, 60:459–461.
- Jamieson, A., Salevid, P., Hessle, A. & Stenberg, H. (2010). Nötkött. Stockholm:Natur Kultur Läromedel. ISBN 9789127417526
- Jarroll, E., Muller, P., Meyer, E. & Morse, S. (1981). Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 2:187–96.
- Jerlström-Hultqvist J., Franzen O., Ankarklev J., Xu F., Nohynkova E., Andersson J. O., Svärd, S. G. & Andersson B. (2010). Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC Genomics*, 11:543.
- Jiménez-Arellanes, A., Luna-Herrera, J., Ruiz-Nicolás, R., Cornejo-Garrido, J., Tapia, A. & Yépez-Mulia, L. (2013). Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:109.
- Kattenbach, W.M., Diniz Junior, J.A., Benchimol, M. & De Souza, W. (1996). A deep-etch study of the cytoskeleton of *Giardia duodenalis*. *Biology of the Cell*, 86:161–166.
- Khan, S.M., Debnath, C., Pramanik, A.K., Xiao, L., Nozaki, T. & Ganguly, S. (2011). Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Veterinary Parasitology*, 178:342–345.
- Klein-Jöbstl, D., Iwersen, M. & Drillich, M. (2014). Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: a case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *Journal of Dairy Sciences*, 97:5110–5119.
- Koehler, A.V., Jex, A.R., Haydon, S.R., Stevens, M.A. & Gasser, R.B. (2014). *Giardia*/Giardiasis — a perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnology Advances*, 32:280–289.
- Lalle, M. (2010). Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. *Infectious Disorders Drug Targets*, 10:283–294.
- Lane, S. & Loyd, D. (2002). Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*, 28:123–147.
- Lanfredi-Rangel, A., Attias, M., Reiner, D.S., Gillin, F.B. & De Souza, W. (2003). Fine structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles. *Journal of Structural biology*, 143:153–163.
- Larsson (2010). *Förekomst av Giardia intestinalis i svenska mjölkbesättningar*. Examensarbete inom veterinärprogrammet. SLU. Institutionen för kliniska vetenskaper. 2011:4
- Laude, A., Valot, S., Desoubeaux, G., Argy, N., Nourrisson, C., Pomares, C., Machouart, M., Le Govic, Y., Dalle, F., Botterel, F., Bourgeois, N., Cateau, E., Leterrier, M., Le Pape, P. & Morio, F. (2016) Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* and

- Entamoeba histolytica* from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review. *Clinical Microbiology and Infection*, 22:190 e1-8.
- Lebbad, M. (2010). Molecular diagnosis and characterization of two intestinal protozoa: *Entamoeba histolytica* and *Giardia intestinalis*. Diss. Stockholm. Karolinska institutet.
- Lebbad, M., Mattsson, J., Christensson, B., Ljungstrom, B., Backhans, A., Andersson, J. O. & Svärd, S. G. (2010). From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Veterinary Parasitology*, 168:231–239.
- Leber, A. L. & Novak-Weekley, S. (2007). Intestinal and urogenital amebae, flagellates, and ciliates. In P. R. Murray (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology* (ASM Press ed., pp. 2092-2112) Washington D.C.
- Leblanc, C.M. & Birdi, N. (1999). *Giardia lamblia* associated arthritis in a 19-month-old child (letter). *Journal of Rheumatology*, 26:2066-2067.
- Leitsch, D., Schlosser, S., Burgess, A., & Duchêne, M. (2012). Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance*, 2:166–170.
- Letts, M., Davidson, D. & Lalonde, F. (1998). Synovitis secondary to giardiasis in children. *American Journal of Orthopedics*, 27:451-454.
- Livsmedelsverket (2014). Vägledning Dricksvatten, Fastställt: 2014-12-19
- Livsmedelsverkets föreskrifter om dricksvatten; SLVFS 2001:30
- Livsmedelsverkets författningssamling; LIVFSF 2010:6 H135:2 ISSN 1651 - 3533
- Luján, H.D., Mowatt, M.R., Byrd, L.G. & Nash, T.E. (1996). Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 93:7628-7633.
- Luján, H. D. & Svärd, S. (2011) *Giardia, a model organism*. Wien: Springer.
- Maddox-Hyttel, C., Langkjaer, R. B., Enemark, H. L. & Vigre, H. (2006). *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs—occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology*, 141:48–59.
- Mark-Carew, M. P., Khan, Y., Wade, S. E., Schaaf, S. & Mohammed, H. O. (2010). Incidence of and risks associated with *Giardia* infections in herds on dairy farms in the New York City Watershed. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52:44.
- Martincová, E., Voleman, L., Pyrih, J., Žárský, V., Vondráčková, P., Kolísko, M., Tachezy, J. & Doležal, P. (2015). Probing the Biology of *Giardia intestinalis* mitosomes using in vivo enzymatic tagging. *Molecular Cellular Biology*, 35:2864-74.
- McAllister, T. A., Olson, M. E., Fletch, A., Wetzstein, M., & Entz, T. (2005). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. *The Canadian Veterinary Journal*, 46:47–55.
- McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Couturier, M.R. & Humphries, M. (2014). Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 52:712–720.
- Mendonca, C., A. Almeida, A., Castro, M., de Lurdes Delgado, S., Soares, J. M., da Costa, N. D. & Canada, N. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Veterinary Parasitology*, 147:47–50.
- Meza-Ortiz, F. (2001). Giardiasis-associated arthralgia in children. *Archives of Medical Research*, 32:248-250

- Midlej, V. & Benchimol, M. (2009). *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur. *Parasitology International*, 58:72–80.
- Minetti, C., Lamden, K., Durband, C., Cheesbrough, J., Platt, K., Charlett, A., O'Brien, S.J., Fox, A. & Wastling, J. M.. (2015). Case-control study of risk factors for sporadic Giardiasis and parasite assemblages in North West England. *Journal of Clinical Microbiology*, 53:3133–3140.
- Miotti, P.G., Gilman, R.H., Santosham, M., Ryder, R.W. & Yolken, R.H. (1986). Age- related rate of seropositivity and antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 24:972–5.
- Moncada, D., Kammanadiminti, S. & Chadee, K. (2003). Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends in Parasitology*, 19:305-311.
- Monis, P.T., Mayrhofer, G., Andrews, R.H., Homan, W.L., Limper, L. & Ey, P.L. (1996). Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology* 112:1–12.
- Morgan, U.M., Reynoldson, J.A. & Thompson, R.C. (1993). Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37:328-331.
- Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., Davids, B.J., Dawson, S.C., Elmendorf, H.G., Hehl, A.B., Holder, M.E., Huse, S.M., Kim, U.U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J.E., Palm, D., Passamaneck, N.E., Prabhu, A., Reich, C.I., Reiner, D.S., Samuelson, J., Svard, S.G. & Sogin, M.L. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317:1921-6.
- Mørch, K., Hanevik, K., Rortveit, G., Wensaas, K.A., Eide, G.E., Hausken, T. & Langeland, N. (2009). Severity of *Giardia* infection associated with post-infectious fatigue and abdominal symptoms two years after. *BMC Infectious Disease*, 9:206.
- Nasser, A.M., Vaizel-Ohayon, D., Aharoni, A. & Rebhun, M. (2012). Prevalence and fate of *Giardia* cysts in wastewater treatment plants. *Journal of Applied Microbiology*, 113:477–484.
- Neiva, V.A., Maria, N.S., Ribeiro, F.R.F., Maria, S.S., Cartagenes, D.F., Coutinho, M. & Flavia, M.M.A. (2014). Plant species used in Giardiasis treatment ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-*Giardia* activity. *Brazilian Journal of Pharmacognocny* 24:215-224.
- Nenoff, P., Domula, E., Willing, U. & Herrmann, J. (2006). *Giardia lamblia*--cause of urticaria and pruritus or accidental association? *Hautarzt*. 57:518-20, 521-2.
- Ng, J., Yang, R., Whiffin, V., Cox, P. & Ryan, U. (2011). Identification of zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes infecting animals in Sydney's water catchments. *Experimental Parasitology*, 128:138-44.
- Nydam, D.V., Wade, S.E., Schaaf, S.L. & Mohammed, H.O. (2001). Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp. cysts shed by dairy calves after natural infection. *American Journal of Veterinary Research*, 62: 1612–1615.
- Oates, S. C., Miller, M. A., Hardin, D., Conrad, P. A., Melli, A., Jessup, D. A. & Miller, W. A. (2012). Prevalence, environmental loading, and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from domestic and wild animals along the Central California coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:8762–8772.

- O'Handley, R.M., Cockwill, C., McAllister, T.A., Jelinski, M., Morck, D.W. & Olson, M. E. (1999). Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhoea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214:391–396.
- O'Handley, R. M., Cockwill, C., Jelinski, M., McAllister, T. & Olson, M. (2000). Effects of repeat fenbendazole treatment in dairy calves with giardiasis on cyst excretion, clinical signs and production. *Veterinary Parasitology*, 89: 209–21.
- O'Handley, R.M., Buret, A.G., McAllister, T.A., Jelinski, M. & Olson, M.E. (2001). Giardiasis in dairy calves: Effects of fenbendazole treatment on intestinal structure and function. *International Journal for Parasitology*, 31:73-79.
- O'Handley & Olson (2006). Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *The veterinary clinics of North America: Food Animal practice*, 22:623–643.
- Oliveira-Arbex, A.P., David, E.B., Oliverira-Sequeira, T.C.G., Bittencourt, G.N. & Guimarães, S. (2016). Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission. *Epidemiology and Infection*, 144:1418-1428.
- Olson, M., Goh, J., Phillips, M. & McAllister, T. A. (1999). *Giardia* cyst and *Cryptosporidium parvum* oocyst survival in water, soil and cattle faeces. *Journal of Environment. Quality*, 28:1991–1996.
- Olson, M. E., O'Handley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A. & Thomson, R.C. (2004). Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitology*, 20:185–191.
- Ortega, Y.R. & Adam, R.D. (1997). *Giardia*: overview and update. *Clinical Infectious Disease*, 25:545–9.
- Ottoson, J., Hansen, A., Björlenius, B., Norder, H. & Stenström, T.A. (2006). Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. *Water Research*, 40:1449–1457.
- Pakianathan, M.R. & McMillan, A. (1999). Intestinal protozoa in homosexual men in Edinburgh. *International Journal of STD & AIDS*, 10:780-784.
- Pasupuleti, V., Escobedo, A.A., Deshpande, A., Thota, P., Roman, Y. & Hernandez, A.V. (2014). Efficacy of 5-nitroimidazoles for the treatment of Giardiasis: a systematic review of randomized controlled trials. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8:e2733.
- Plutzer, J., Ongerth, J. & Karanis, P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213:321–333
- Poxleitner, M.K., Carpenter, M.L., Mancuso, J.J., Wang, C-J.R., Dawson, S.C. & Cande, W.Z. (2008). Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science*, 319:1530–3.
- Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., Cacho, E., Clavel, A. & Causapé, A.C. (1996). Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeast Spain). *Veterinary Parasitology*, 66:139-146.
- Quihui-Cota, L., León-Trujillo, R., Astiazarán-García, H., Esparza-Romero, J., Robles, M. del R., Robles-Zepeda, R. E. & Sánchez-Escalante, J. (2014). Marked Anti-giardial activity of *Yucca baccata* extracts: A potential natural alternative for treating protozoan infections. *BioMed Research International*, 2014:823492.
- Raether, W. & Hänel, H. (2003). Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research*, 90:19-39.
- Rahimi-Esboei, B., Ebrahimzadeh, M. A., Gholami, Sh. & Falah-Omrani, V. (2013). Anti-Giardial activity of *Sambucus ebulus*. *European Review for Medical and Pharmacology Science*, 17:2047-50.

- Ralston, B.J., Cockwill, C., Guselle, N., Van Herk, F.H., McAllister, T.A., & Olson, M.E. (2003a). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium andersoni* and their effect on performance in feedlot beef calves. *Canadian Journal of Animal Sciences*, 83:153–159.
- Ralston, B.J., McAllister, T.A. & Olson, M.E. (2003b). Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Veterinary Parasitology*, 114:113–122.
- Rayan, P., Matthews, B., McDonnell, P.A. & Cock, I.E. (2015). *Terminalia ferdinandiana* extracts as inhibitors of *Giardia duodenalis* proliferation: a new treatment for Giardiasis. *Parasitology Research*, 114:2611–2620.
- Reiner, D. S., McCaffery, M. & Gillin, F. D. (1990). Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *European Journal of Cellular Biology*, 53:142–153.
- Rendtorff, R. C. (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II: *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *American Journal of Hygiene*, 60:327–38.
- Robertsson, L.J. (1996). Severe giardiasis and cryptosporidiosis in Scotland, UK. *Epidemiology and Infection*, 117:551-561.
- Robertson, L. & Gjerde, B. (2004). Effects of the Norwegian winter environment on *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Microbial Ecology*, 47:359–365.
- Robertson, L. J. (2009). *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: A review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. *Epidemiology and Infection*, 137:913-921.
- Rópolo, A. S. & Touz, M. C. (2010). A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. *The scientific world journal*, 10:2019-2031.
- Ruest, N., Faubert, G.M. & Couture, Y. (1998). Prevalence and geographical distribution of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in dairy farms in Quebec. *Canada Veterinary Journal*, 39:697–700.
- Ruest, N., Couture, Y., Faubert, G.M. & Girard, C. (1997). Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp.. *Veterinary Parasitology*, 69:177–186.
- Sahib, A. S., Mohammed, I. H., & Sloo, S. A. (2014). AntiGiardial effect of *Anethum graveolens* aqueous extract in children. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 3:109–112.
- Sagolla, M.S., Dawson, S.C., Mancuso, J.J. & Cande, W.Z. (2006). Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *Journal of Cellular Science*, 119:4889–4900.
- Santín, M., Dargatz, D. & Fayer, R. (2011). Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. *Veterinary parasitology*, 183:231-6.
- Sattar, S. (1999). *Giardia* Cyst and *Cryptosporidium* Oocyst survival in watersheds and factors affecting inactivation. AWWA Research Foundation, Ontario. *Ministry of Environment and Energy American Water Works Association*, 1 jan. 1999.
- Sauch, J. (1985). Use of immunofluorescence and phase-contrast microscopy for detection and identification of *Giardia* cysts in water samples. *Applied and environmental Microbiology*, 1434-1438.
- Schofield, P.J., Edwards, M.R. & Kranz, P. (1990). Glucose metabolism in *Giardia intestinalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45:39–47.

- Schofield, P.J., Edwards, M.R., Matthews, J. & Wilson, J.R. (1992). The pathway of arginine catabolism in *Giardia intestinalis*. *Molecular Biochemistry and Parasitology*, 51:29–3.
- Scott, K. G.-E., Logan, M. R., Klammer, G. M., Teoh, D. A., & Buret, A. G. (2000). Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: Role of T Lymphocytes and Interleukin-6. *Infection and Immunity*, 68:3412–3418.
- Shuval, H. (2003). Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. *Journal of Water & Health*, 1:53–64.
- Singh, K. D., Bhasin, D. K., Rana, S. V., Vaiphei, K., Katyral, R., Vinayak, V. K. & Singh, K. (2000). Effect of *Giardia lamblia* on duodenal disaccharidase levels in humans. *Tropical Gastroenterology*, 1:174–176.
- Siripattanapipong, S, Leelayoova, S., Mungthin, M., Thompson, R.C., Boontanom, P., Saksirisamphant, W. & Tan-Ariya, P. (2011). Determination of discriminatory power of genetic markers used for genotyping *Giardia duodenalis*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*, 42:764-771.
- SJV JO 20 SM 1501,1502
- Skeels, M.R., Sokolow, R., Hubbard, C. V. & Foster. (1986). Screening for coinfection with *Cryptosporidium* and *Giardia* in Oregon public health clinic patients. *American Journal of Public Health*, 76:270-273.
- Smith, H.V., Caccio, S.M., Tait, A., McLauchlin, J. & Thompson, R.C. (2006). Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in Parasitology*, 22:160–167.
- Smith, H. V., Cacciò, S. M., Cook, N., Nichols, R. A. B. & Tait, A. (2007). *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology*, 149:29-40.
- Smittskyddsinstitutet, Livsmedelsverket, Svenskt Vatten (2012). *Cryptosporidium* och *Giardia*, rekommendationer om åtgärder för att minska risken för vattenburen smitta.
- Soares, R. M., de Souza, S.L.P., Silveira, L.H., Funada, M.R., Richtzenhain, L.J. & Gennari, S.M. (2011). Genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* from exotic and wild animals kept in captivity in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 180:344–348.
- Spiller, R.C. (2007). Role of infection in irritable bowel syndrome. *Journal of Gastroenterology*, 17:41-7.
- Sprong, H., Caccio, S.M. & van der Giessen, J.W.B. (2009). On behalf of the ZOOPNET network and partners Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 3:e558.
- Steuart, R., O’Handley, R., Lipscombe, R., Lock, R. & Thompson, R. (2008). Alpha 2 giardin is an assemblage A-specific protein of human infective *Giardia duodenalis*. *Parasitology*, 135:1621-1627.
- Stojecki, K., Sroka, J., Karamon, J., Kusyk, P. & Cencek, T. (2014). Influence of selected stool concentration techniques on the effectiveness of PCR examination in *Giardia intestinalis* diagnostics. *Polish Journal of Veterinary Science*, 17:19-25.
- Sweeny, J.P., Ryan, U.M., Robertson, I.D. & Jacobson, C. (2011). *Cryptosporidium* and *Giardia* associated with reduced lamb carcass productivity. *Veterinary Parasitology*, 182:127-39.
- Tengku, S.A., Siti, N.A., Fatmah, M.S. & Norhayati, M. (2014). Molecular epidemiology of Giardiasis among Orang Asli in Malaysia: application of the triosephosphate isomerase gene. *BMC Infectious Disease*, 14:78.

- Thompson, R.C., Reynoldson, J.A. & Mendis, A.H. (1993). *Giardia* and giardiasis. *Advanced Parasitology*, 32:71–160.
- Thompson, R.C., Palmer, C.S. & O'Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Veterinary Journal*, 177:18-25.
- Tiranti, K., Larriestra, A., Vissio, C., Picco, N., Alustiza, F., Degioanni, A. & Vivas, A. (2011). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. *Brasilian Journal of verterinary parasitology*, 20:140-147.
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M. & Lucocq, J.M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*, 426:172–176.
- Trejo-Soto, P.J., Aguayo-Ortiz, R., Yépez-Mulia, L., Hernández-Campos, A., Medina-Franco, J.L. & Castillo, R. (2016). Insights into the structure and inhibition of *Giardia intestinalis* arginine deiminase: homology modeling, docking, and molecular dynamics studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 34:732-48.
- Uehlinger, F. D., Greenwood, S. J., O'Handley, R., McClure, J. T., Coklin, T., Dixon, B. R., & Barkema, H. W. (2011). Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in dairy and beef cattle in farms around Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 52:967–972.
- Virtala, A.M., Mechor, G.D., Gröhn, Y.T. & Erb, H.N. (1996). The effect of calthood diseases on growth of female dairy calves during the first 3 months of life in New York State. *Journal of Dairy Sciences*, 79:1040–1049.
- Watkins, R.R. & Eckmann, L. (2014). Treatment of giardiasis: current status and future directions. *Current Infectious Disease Reports*. 16:396.
- Wegayehu T., Karim, M.R., Erko, B., Zhang, L. & Tilahun, G. (2016) Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from calves in Oromia Special Zone, Central Ethiopia. *Infection, Genetics and Evolution*, 43:281 – 288.
- Wensaas, K.A., Langeland, N., Hanevik, K., Mørch, K., Eide, G.E. & Rortveit, G. (2012). Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 3 years after acute Giardiasis: historic cohort study. *Gut*, 61:214-9.
- Wolfe, M.S. (1992). Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 5:93–100.
- Xiao, L. (1994). *Giardia* infection in farm animals. *Parasitology today*, 11:436-8.
- Xiao, L. & Herd, R.P. (1994). Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology*, 55:257–262.
- Xiao, L., Saeed, K. & Herd, R.P. (1996). Efficacy of albendazole and fenbendazole against *Giardia* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 61:165–170.
- Yarahmadi, M., Fakhar, M., Ebrahimzadeh, M.A., Chabra, A & Rahimi-Esboei. B. (2016). The anti-Giardial effectiveness of fungal and commercial chitosan against *Giardia intestinalis* cysts in vitro. *Journal of Parasitological Disease*, 40:75-80.
- Zeyrek, D., Zeyrek, F., Cakmak, A. & Cekin, A. (2008) Association of *Helicobacter pylori* and giardiasis in children with recurrent abdominal pain. *Turkiye Parazitolojii Dergisi*. 32:4-7.
- Zimmerman, S. K. & Needham, C. A. (1995). Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Meriflour *Cryptosporidium*/*Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT *Giardia* EZ Microplate Assay for detection of *Giardia lamblia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1942-1943.