

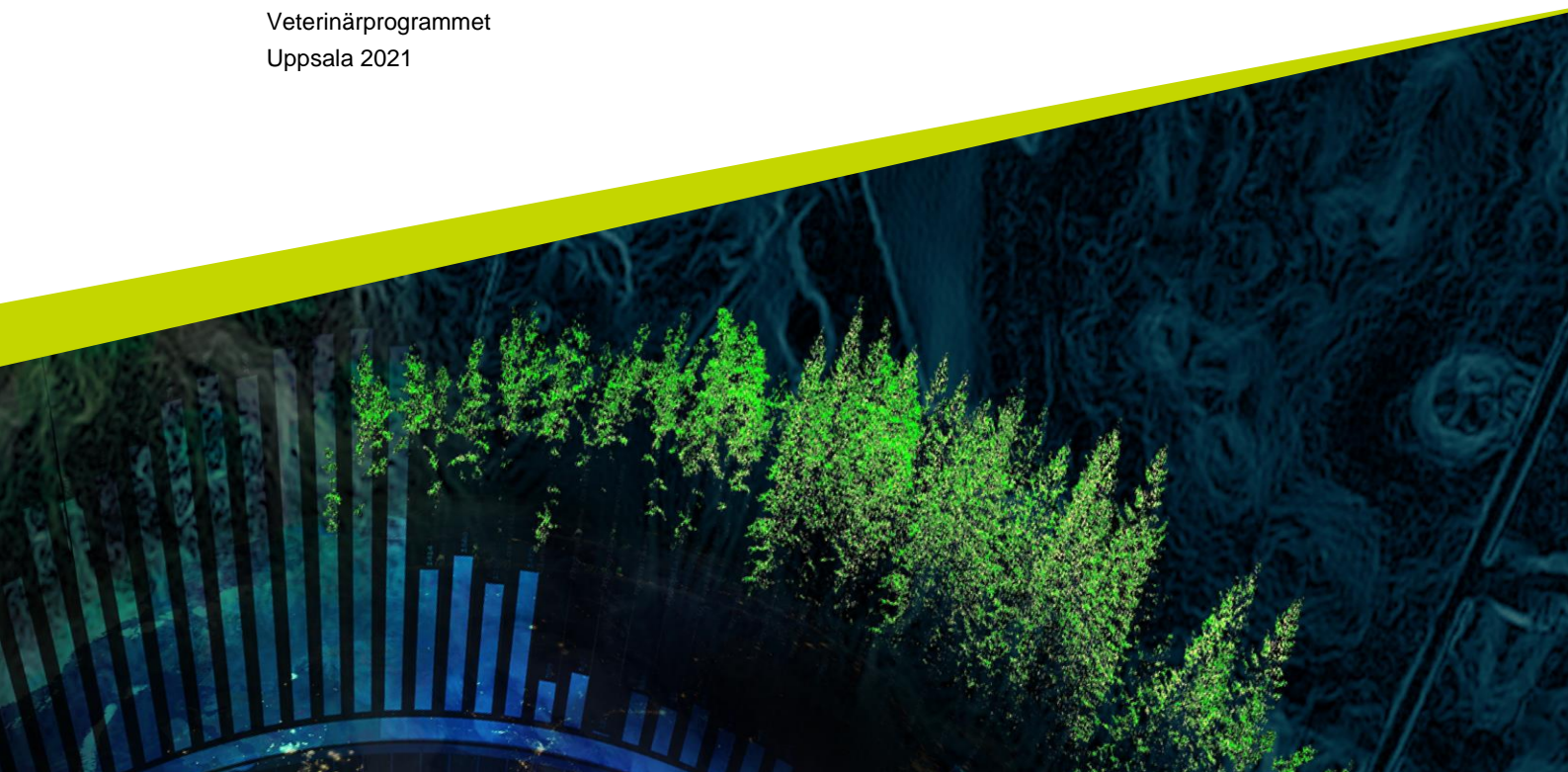


Diagnos och behandling av *Giardia duodenalis* i en naturligt infekterad hundkoloni

Diagnosis and treatment of Giardia duodenalis in a naturally infected dog colony

Julia Svensson

Examensarbete/Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2021



Diagnos och behandling av *Giardia duodenalis* i en naturligt infekterad hundkoloni

Diagnosis and treatment of Giardia duodenalis in a naturally infected dog colony.

Julia Svensson

| | |
|-------------------------------|---|
| Handledare: | Giulio Grandi, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap |
| Bitr. handledare: | Patricia Hedenqvist, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper |
| Bitr. handledare: | Eva Osterman-Lind, Statens veterinärmedicinska anstalt, Mikrobiologi |
| Examinator: | Johan Höglund, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap |
| Ersättare, examinator: | Eva Tyden, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap |

| | |
|------------------------------|---|
| Omfattning: | 30 hp |
| Nivå och fördjupning: | Avancerad nivå, A2E |
| Kurstitel: | Självständigt arbete i veterinärmedicin |
| Kurskod: | EX0869 |
| Program/utbildning: | Veterinärprogrammet |
| Kursansvarig inst.: | Institutionen för kliniska vetenskaper |

| | |
|-----------------------|---------|
| Utgivningsort: | Uppsala |
| Utgivningsår: | 2021 |

| | |
|-------------------|--|
| Nyckelord: | <i>Giardia</i> , hund, behandling, fenbendazol, metronidazol |
| Key words: | <i>Giardia</i> , dog, treatment, fenbendazole, metronidazole |

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

Giardia duodenalis är en flagellat som koloniserar främre tunntarmen och det är en vanlig parasit hos hundar över hela världen. Symptombilden vid giardiainfektion varierar då patogenesen för giardiasis är multifaktoriell och beror på faktorer hos både värdjuret och parasiten. *G. duodenalis* kan anses som en opportunistisk parasit som ge upphov till kronisk intermitterent diarré vid exempelvis stress och nedsatt immunförsvar. Idag finns inga godkända preparat för behandling av *Giardia* spp. hos hund. Läkemedelsverket rekommenderar dock behandling med fenbendazol (50 mg q24h) i tre-fem dagar eller metronidazol (25 mg/kg q12h) i fem-sju dagar. Studiens syfte var att diagnostisera och behandla *G. duodenalis* i en naturligt infekterad hundkoloni med olika behandlingsprotokoll samt att följa behandlingsresultatet under och/eller efter avslutad behandling.

Studien omfattade 28 vuxna beaglehundar som ägs av Sveriges lantbruksuniversitet (SLU, Ultuna, Uppsala), av vilka några uppvisade kronisk intermitterent diarré. När feces från samtliga hundarna analyserades visade 18/28 (64 %) förekomst av giardiacystor med zinksulfatflotation och immunofluorescens. Inga andra parasiter detekterades. Vidtagna åtgärder omfattade farmakologisk behandling, miljösanering och utökade hygienrutiner. I första behandlingsomgången behandlades hundarna med fenbendazol (50 mg/kg q24h) i tio dagar. I samband med saneringen av hundrummen och rastgårdarna, mitt under behandlingsperioden, schamponerades också hundarna. Resultatet följdes upp genom daglig provtagning av nio utvalda hundar under behandlingen och under de efterföljande elva dagarna. Under de tre sista dagarna av behandlingen var samtliga hundar fria från *G. duodenalis*, men redan första dagen efter avslutad behandling påvisades åter cystor i feces från tre hundar. Efter nio dagar påvisades cystor hos 8/9 hundar och behandlingen bedömdes misslyckad. Det finns flera anledningar som kan förklara ofullständig effekt av en läkemedelsbehandling, bland annat exempel en minskad känslighet eller resistens hos parasiten.

Vid andra behandlingen administrerades en kombination av fenbendazol (50 mg/kg q24h) och metronidazol (15 mg/kg q12h) i tio dagar. Liknande hygienåtgärder som tidigare vidtogs, men vid andra behandlingsomgången togs endast avföringsprover efter avslutad behandling. Samtliga nio utvalda hundar var negativa både två-fyra och sju dagar efter avslutad behandling vilket tolkades som ett lyckat behandlingsresultat. Fyra och elva veckor efter avslutad behandling upptäcktes dock återigen giardiacystor hos 5/26 hundar (19 %). Ett fåtal hundar hade troligtvis återinfekterades med cystor från miljön. Vid studiens slut var förekomsten av giardiapositiva hundar betydligt lägre än vid studiens start och hundarna var dessutom kliniskt bättre. Ytterligare behandling var därför inte aktuellt.

Denna studie visar hur svårt det kan vara att bli fri från *G. duodenalis* från en hundkoloni, bland annat på grund av att det är svårt att fullständigt avlägsna parasiten från miljön. Behandling med fenbendazol i kombination metronidazol visades ge ett bättre behandlingsresultat än vid enbart fenbendazol. Resultaten i denna studie tyder på att behandlingstiden kan behöva förlängas från tre-fem dagar som idag rekommenderas till sju-tio dagar, framför allt vid behandling av en grupp hundar. Kombinationsbehandling kan vara ett alternativ vid svårbehandlade infektioner eller vid behandling av en grupp hundar, men bör inte användas till enskilda individer som rutin på grund av risk för resistensutveckling. Symptomfria hundar ska inte behandlas rutinmässigt eftersom *G. duodenalis* kan betraktas som en opportunistisk parasit. Sammanfattningsvis är det svårt att eliminera *G. duodenalis* från en hundkoloni trots behandling med fenbendazol och metronidazol inklusive intensivt saneringsarbete. Orsaken kan bero på en bristande effekt av läkemedel, återinfektion eller båda två.

Nyckelord: Giardia, hund, behandling, fenbendazol, metronidazol, resistens

Abstract

Giardia duodenalis are flagellate protozoans that colonizes the upper small intestine and a common parasite among dogs around the world. Since the mechanisms for the pathogenesis for giardiasis is multifactorial, depending on both the host and parasite, the symptoms can vary a lot. Chronic intermittent diarrhea is a common clinical sign. However, a great amount of dogs are asymptomatic as well. There is no medical treatment on dogs for *G. duodenalis*, but fenbendazole (50 mg/kg q24h) for three-five days and metronidazole (25 mg/kg q12h) for five-seven days are recommended by the Swedish Medical Products Agency. The purpose of this study was to diagnose parasite occurrence, treat and monitor the efficacy of two treatments against *G. duodenalis* in a naturally infected dog colony. The occurrence of parasite was monitored under and after the first treatment but only after the second treatment.

28 adult dogs (beagles) owned by the Swedish University of Agricultural Sciences (SLU, Ultuna, Uppsala) were included in the study. Some of the dogs in the colony were suffering from chronic intermittent diarrhea and all of the dogs were therefore screened for *G. duodenalis* and other gastrointestinal parasites at the beginning of the study. 18/28 (64%) of the dogs showed occurrence of *G. duodenalis* with zinc sulfate flotation technique and immunofluorescence, but no other parasite was found. The trials included medical treatment and extensive hygiene measures. At the first treatment all dogs were treated with fenbendazole (50 mg/kg q24h) for ten days and in the middle of the treatment all rooms and outdoor areas were cleaned and the dogs were shampooed. Nine dogs were sampled daily throughout the treatment and during the following eleven days. During the last three days of treatment no cysts were detected, however the first day after treatment cysts were found in three of the dogs. Nine days after treatment 8/9 tested positive and treatment was therefore considered unsuccessful. There are many possible reasons why there is a lack of efficacy of a treatment, such as variability in drug susceptibility, resistance or immunosuppression etcetera.

All the dogs were treated with a combination of fenbendazole (50 mg/kg q 24h) and metronidazole (15 mg/kg q12h) for ten days at the second trial and similar hygiene measures were performed as before. The same nine dogs were tested twice shortly after the treatment and the result showed a successful treatment since no cysts were detected. However, both four and eleven weeks after the treatment cysts were detected in feces from 5/26 dogs (19%). Since the dogs initially were free from the parasite, they probably were re-infected from the environment. The prevalence was significantly lower after the second treatment than in the beginning of the study. All dogs were also clinically better at the end of the study and therefore no further treatment was started.

This study shows how challenging it is to eliminate *G. duodenalis* in a dog colony, especially from the environment. A combination of fenbendazole and metronidazole was shown to give a better result than fenbendazole alone. The results in this study indicates that some infections need longer treatment to eliminate *G. duodenalis* than three to five days as recommended. A longer treatment (e.g. seven to ten days) may be an option for treating dogs that are housed in groups. A combined treatment with metronidazol can be used in case of a lack of efficacy of fenbendazol. Asymptomatic dogs should not be treated because of the potential risk for resistance selection and moreover since *G. duodenalis* can be considered as an opportunist microorganism. In summary, even though a colony of dogs are treated with fenbendazol and metronidazol together with excessive hygiene measures, it is hard to completely eliminate *G. duodenalis* because of risk for re-infection and possibly due to lack of efficacy of drug.

Keywords: Giardia, dog, treatment, fenbendazole, metronidazole, resistance

Innehållsförteckning

| | |
|--|-----------|
| Tabellförteckning | 9 |
| Figurförteckning..... | 10 |
| Förkortningar..... | 11 |
| 1. Inledning | 13 |
| 1.1. Historik/Bakgrund | 13 |
| 1.2. Syfte..... | 14 |
| 2. Litteraturöversikt..... | 15 |
| 2.1. Nomenklatur | 15 |
| 2.2. Genotyp | 15 |
| 2.3. Livscykel | 16 |
| 2.4. Patogenes och patofysiologi | 18 |
| 2.5. Klinisk bild..... | 18 |
| 2.6. Zoonos..... | 19 |
| 2.7. Diagnostik | 19 |
| 2.7.1. Direktutstryk | 20 |
| 2.7.2. IFA | 20 |
| 2.7.3. Zinc sulfate centrifugal flotation technique, ZSCT, zinksulfatflotation | 21 |
| 2.7.4. PCR | 21 |
| 2.7.5. ELISA..... | 21 |
| 2.8. Behandling..... | 22 |
| 2.8.1. Tillgängliga läkemedel | 22 |
| 2.8.2. Miljöåtgärder | 23 |
| 2.8.3. Probiotika | 24 |
| 3. Material och Metod..... | 25 |
| 3.1. Litteratursökning | 25 |
| 3.2. Facilitet, djur, skötsel..... | 25 |
| 3.3. Provtagningsteknik | 25 |
| 3.4. Diagnostik | 26 |
| 3.4.1. IFA – Immunfluorescens | 26 |
| 3.4.2. Zinksulfatflotation, ZSCT | 27 |
| 3.5. Provtagningschema | 27 |
| 3.5.1. Pre-screening..... | 27 |
| 3.5.2. Screening..... | 28 |
| 3.5.3. Provtagning under behandling 1 och uppföljning efter behandling 1 | 28 |
| 3.5.4. Provtagning vid uppföljning efter behandling 2..... | 29 |
| 3.6. Behandlingsprotokoll samt hygienåtgärder | 30 |
| 3.6.1. Behandling 1 (FBZ)..... | 30 |
| 3.6.2. Uppföljning behandling 1 | 30 |
| 3.6.3. Behandling 2 (FBZ + MTZ) | 30 |
| 3.6.4. Uppföljning av behandling 2 | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Resultat | 33 |
| 4.1. Screening..... | 33 |
| 4.2. Behandling 1 + uppföljning | 34 |
| 4.3. Uppföljning efter 2a behandlingen..... | 36 |
| 4.3.1. Uppföljning 2-4 och 7 dagar..... | 36 |
| 4.3.2. Uppföljning efter 4 veckor..... | 36 |
| 4.3.3. Uppföljning efter 6-7 veckor..... | 37 |
| 4.3.4. Uppföljning efter 11 veckor | 37 |
| 4.4. Klinisk effekt | 39 |
| 4.4.1. Avföring under och efter behandling 1 | 39 |
| 4.4.2. Avföring efter behandling 2..... | 39 |
| 4.5. Översiktsbild av behandlingsresultatet | 40 |
| 5. Diskussion | 41 |
| 5.1. Tolkning av behandlingsresultatet med FBZ | 41 |
| 5.2. Tolkning av behandlingsresultatet med FBZ+MTZ | 42 |
| 5.3. Miljöåtgärder | 43 |
| 5.4. Övriga behandlingsalternativ | 44 |
| 5.5. Diagnostik och felkällor..... | 44 |
| 5.6. Resistens – en möjlig orsak till ofullständig effekt vid behandling..... | 45 |
| 5.7. Zoonos..... | 45 |
| Referenser..... | 47 |
| Populärvetenskaplig sammanfattning | 50 |
| Tack | 53 |

Tabellförteckning

| | |
|---|----|
| Tabell 1. Genotyper av <i>Giardia duodenalis</i> . Tabell modifierad från Thomson (2004) och Adam (2001). | 16 |
| Tabell 2. Direkt diagnostik: metoder. | 20 |
| Tabell 3. Datum för behandling 2, inkl. dagar för felaktig läkemedelsdos. | 31 |
| Tabell 4. Screening av samtliga 28 hundar med IFA och ZSCT avseende för samtliga gastrointestinala parasiter, inklusive <i>Giardia</i> | 33 |
| Tabell 5. Resultat IFA avseende <i>Giardia</i> vid dalig provtagning av 9 utvalda hundar under behandling (FBZ) och 11 dagar efteråt. | 34 |
| Tabell 6. Resultat IFA avseende <i>Giardia</i> vid provtagning av samma nio hundar som ovan (se tabell 5) efter behandling 2(FBZ+MTZ). | 36 |
| Tabell 7. Resultat IFA avseende <i>Giardia</i> vid provtagning av samtliga 26 hundar vid ett tillfälle fyra veckor efter behandling 2. | 36 |
| Tabell 8. Resultat IFA avseende <i>Giardia</i> vid provtagning av fem utvalda hundar (positiva på tabell 6) sex och sju veckor efter behandling 2. | 37 |
| Tabell 9. Resultat IFA avseende <i>Giardia</i> vid provtagning av samtliga 26 hundar tre dagar i följd 11 veckor efter avslutad behandling. | 37 |
| Tabell 10. Översiktsbild över behandlingsresultatet av båda behandlingarna. | 40 |

Figurförteckning

| | |
|---|----|
| Figur 1. <i>Giardia duodenalis</i> . Den infektiösa orörliga cystan till vänster i bild och den motila trofozoiten till höger. Illustration: CC: CDC/Alexander J. da Silva, PhD/Melanie Moser, 2002. | 15 |
| Figur 2. <i>Giardias</i> livscykel. Schematisk bild över <i>Giardias</i> livscykel, modifierad från figur 4 i studien av Thomson <i>et al.</i> (1993)..... | 17 |
| Figur 3. Positivt avföringsprov, giardiacystans utseende med IFA. Bildkälla: Författaren. | 27 |
| Figur 4. Tidslinje av tidpunkter för provtagningar innan första behandling. | 27 |
| Figur 5. Resultat från träckprovsanalyser före studiens start..... | 28 |
| Figur 6. Provtagningsstillfällen under behandling 1 (FBZ i 10 dagar) och vid uppföljning efter avslutad behandling. | 29 |
| Figur 7. Provtagningsstillfällen vid uppföljning av behandling 2 (FBZ+MTZ i tio dagar). | 29 |

Förkortningar

| | |
|-------|---|
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| FBZ | Fenbendazol |
| IFA | Immunofluorescens Assay |
| MTZ | Metronidazol |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| ZSCT | Zinksulfate Centrifugal Flotation Technique, zinksulfatflotation |

1. Inledning

1.1. Historik/Bakgrund

Protozon *Giardia* spp. är en encellig eukaryot mikroorganism med flageller som koloniserar främre tunntarmen (Lapage 1968; Adam 2001; Thompson 2004; Taylor *et al.* 2013). Den är en vanlig orsak till diarré hos flera djurslag inklusive hund och människa i stora delar av världen. *Giardia* upptäcktes första gången av Van Leeuwenhoek redan 1681 när han undersökte sin egen avföring under mikroskop (Dobell 1920), men beskrevs mer i detalj av Lambl 1859 som då benämnde mikroorganismen *Cercomonas intestinalis* (Adam 2001; Akuffo *et al.* 2003). Namnet har ändrats flera gånger sedan dess och *Giardia* kom på tal som släktnamn för första gången på 1880-talet. Det finns flera olika arter av *Giardia* och nomenklaturen kan vara förvirrande, vilket förklaras mer utförligt senare. Arten som infekterar hund och människa är *Giardia duodenalis*. Synonymt med *Giardia duodenalis* är artnamnen *Giardia intestinalis* och *Giardia lamblia* varav samtliga används i litteraturen och refererar till samma mikroorganism (Xiao & Fayer 2008). Vidare i texten kommer endast *G. duodenalis* eller *Giardia* att användas.

G. duodenalis är en vanligt förekommande endoparasit bland hundar i såväl hushåll som hundhem och försöksanläggningar, men ger nödvändigtvis inte alltid kliniska tecken (Bouzid *et al.* 2015; Uiterwijk *et al.* 2019). Parasiten kan ge upphov till en opportunistisk infektion som ger kliniska symptom vid predisponerande faktorer som plötsliga foderbyten eller stress (Läkemedelsverket 2014). Infektionen är sällan livshotande men kan ge allvarigare symptom på unga eller immunosupprimerade djur (Cheung *et al.* 2019). Emellertid är infektionen vanligt associerad till kronisk intermitterent diarré (Läkemedelsverket 2014) och förekommer oftare hos gruppållna hundar samt valpar och hundar yngre än ett år (Uiterwijk *et al.* 2019). I ett examensarbete i Veterinärmedicin 2008 visades att prevalensen bland friska valpar i Sverige är cirka 30 % (Florén 2008). Bouzid *et al.* (2014) visade senare i en metaanalys att den sammantagna prevalensen hos hund i världen, baserat på 125 studier, är cirka 15 %. Däremot belyste författarna att det fanns en stor heterogenitet bland studierna och att prevalensen varierade mycket beroende på vilken diagnostisk metod som använts, ålderskategorin hos hundarna, hundhållningen i studien samt geografisk plats.

Årligen rapporteras runt 1500 fall av giardiasis på människor i Sverige, dock har övervägande delen av dessa blivit smittade utomlands (Folkhälsomyndigheten, 2020). De inhemska fallen beror oftast på en cirkulerande smitta på förskolor eller i hemmen, men livsmedels- och vattenburen smitta förekommer också. Variationen

av kliniska tecken på människor är stor; allt från akut kortvarig diarré till kronisk diarré med tecken på nutritionsstörning (Thompson *et al.* 1993). Den kroniska infektionen kan potentiellt leda till vikt förlust och/eller hämmad tillväxt. Infektionen kan även vara latent.

Trots att *Giardia* upptäcktes för över 300 år sedan är det fortfarande mycket som är ovisst. 1979 rapporterade WHO tillsammans med FAO att *Giardia* potentiellt är zoonotiskt (WHO Expert Committee on Parasitic 1979), men fortfarande är dess zoonotiska natur inte helt klarlagd (Akuffo *et al.* 2003). Emellertid är det känt att hundar vanligen smittas av sina hundspecifika stammar (genotyp C & D) och människor av humanspecifika stammar (genotyp A & B) (Xiao & Fayer 2008). Hundar kan dock infekteras av genotyp A och B vilket innebär en potentiell zoonotisk risk.

Behandling av *Giardia* är ett högst aktuellt ämne och parasitologavdelningen på Statens veterinärmediciska anstalt (SVA, Uppsala) får ofta samtal från veterinärer och kennlar om rådfrågning angående behandling av parasiten (Grandi G., SVA, pers. medd. 2020-10-05). Att bli av med en giardiainfektion kan ibland vara komplicerat och på senare tid verkar svårbehandlade och återkommande infektioner ökat. I de fallen är det svårt att veta om det beror på återinfektion eller misslyckad behandling på grund av resistens. Det finns ännu inga läkemedel med indikation för behandling av giardiainfektion på djur i Sverige och det finns därför inte heller några exakta behandlingsprotokoll (FASS, 2020).

1.2. Syfte

Till följd av intermittent diarré i en koloni med 28 beaglar som ägs av Sveriges lantbruksuniversitet (SLU, Ultuna, Uppsala) togs samlingsprover från varje hundrum under våren 2020. Proverna analyserades på Statens veterinärmediciska anstalt (SVA, Uppsala). *Giardia duodenalis* upptäcktes i ett av proven vilket ledde till det här examensarbetet med individuell provtagning av hela gruppen för att veta vilka hundar som var infekterade samt för att utforma ett behandlingsprotokoll med syfte att eliminera smittan.

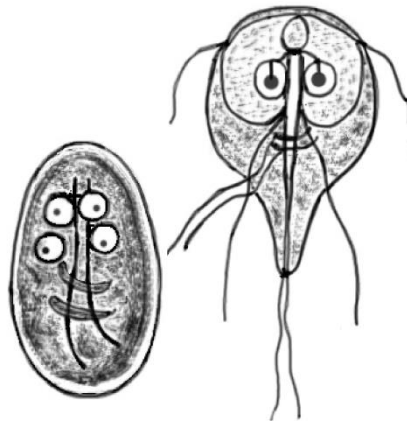
Studiens syfte var att studera resultatet av olika behandlingsprotokoll för att eliminera *G. duodenalis* hos en naturligt infekterad hundkoloni. Behandlingsprotokollen innefattade läkemedelsbehandling och hygienåtgärder. Inga tidigare studier har undersökt läkemedlets effekt genom daglig provtagning under behandlingen och därmed inte heller undersökt när och om parasiten elimineras. Med utgångspunkt i detta blev syftet med vår studie därför att studera effekten av fenbendazol (FBZ) under tio dagars pågående behandling samt under de efterföljande 14 dagarna. Till följd av ett misslyckat första försök så studerades därefter också en 10 dagars kombinationsbehandling med FBZ och metronidazol (MTZ).

2. Litteraturoversikt

2.1. Nomenklatur

Giardia spp. är en protozo med flera flageller och tillhör parasitklassen *Zoomastigophora* samt familjen *Diplomonadida* (Thompson 2004). *Giardia* finnas i två olika stadier vilka är trofozoit och cysta. Trofozoiten, den motila och vegetativa varianten av *Giardia*, är bilateralt symmetriskt päronformad och cirka 12-15 μm lång och 6-8 μm bred. Dorsalsidan är konvex och på ventralsidan finns en stor sugkopp med funktion att fästa till tarmväggen. Den har två cellkärnor, fyra par flageller samt ett par distinkta mediankroppar centralt vilket ger den det karaktäristiska utseendet av en glad gubbe i mikroskopet.

Cystan är det infektiösa, orörliga vilostadiet och den är oval till utseendet med en storlek på cirka 8-12 x 7-10 μm och innehåller fyra cellkärnor (Akuffo *et al.* 2003; Taylor *et al.* 2013).



Figur 1. *Giardia duodenalis*. Den infektiösa orörliga cystan till vänster i bild och den motila trofozoiten till höger. Illustration: CC: CDC/Alexander J. da Silva, PhD/Melanie Moser, 2002.

2.2. Genotyp

Inom släktet *Giardia* finns flera arter och genotyper som kan infektera flera olika djurslag inklusive hund och människa över hela världen (Thompson 2004). De olika giardiaarterna har morfologiskt delats upp i följande: *Giardia agilis* som infekterar

groddjur, *Giardia ardeae* och *Giardia psittaci* som infekterar fåglar, *Giardia muris* som infekterar gnagare samt *Giardia microti* som infekterar bisamråtta och sork. *Giardia duodenalis* är genotypen som infekterar många däggdjur och då bland annat hund och människa. Genom att detektera genetiska skillnader med Polymerase Chain Reaction (PCR) kan morfologiskt lika arter delas upp i ytterligare genotyper/assemblage. De olika genotyperna visar på vissa skillnader i värdspecificitet som ses i tabell 1 nedan. Genotyp A delas in i två subgenotyper, vilka är AI och AII. Genotyp AI och B har en zoonotisk potential och därav stort intresse. Hundar brukar smittas av genotyp C och D och på grund av detta betraktar man *G. duodenalis* endast delvis som en zoonos.

Tabell 1. Genotyper av *Giardia duodenalis*. Tabell modifierad från Thomson (2004) och Adam (2001).

| Genotyp/Assemblage | Värdjur där genotypen oftast påvisas |
|--------------------|---|
| A: AI & AII | AI: Människa, hund, katt, nöt, får, gris, häst marsvin AII: Människa |
| B | Människa, hund, chinchilla, bäver, råtta |
| C | Hund |
| D | Hund |
| E | Klövdjur: Nöt, get, gris, får & alpaka §klövdjur |
| F | Katt |
| G | Gnagare |

2.3. Livscykel

Giardias livscykel är enkel, direkt och innefattar endast två olika stadier, vilka är trofozoit samt cysta (Adam 2001). Infektion sker efter intag av cystor via vatten eller mat som kontaminerats, alternativt direkt via fekaloral kontakt. Prepatensperioden, det vill säga från intag av cysta tills att infektionen kan detekteras i träcken, är oftast mellan fyra och 16 dagar och patensperioden kan därefter pågå i flera veckor till månader (ESCCAP 2018). Cystorna är det infektiösa men vilande stadiet då de har en god överlevnad i den yttre miljön (Adam 2001). De kan överleva flera månader utanför värdjuret under våta och kalla förhållanden, men är däremot känsliga för torka och värme (Tangtrongsup & Scorza 2010). De är också känsliga för kalla temperaturer under fryspunkten (Saleh *et al.* 2016). Trofozoiterna, den vegetativa och motila formen, hittas i främre tunntarmen, men kan ibland åka med ut i träcken vid diarré (Conboy 1997; Tangtrongsup & Scorza 2010). Till skillnad från den cystan överlever trofozoiterna endast korta stunder i träcken utanför kroppen (Conboy 1997).

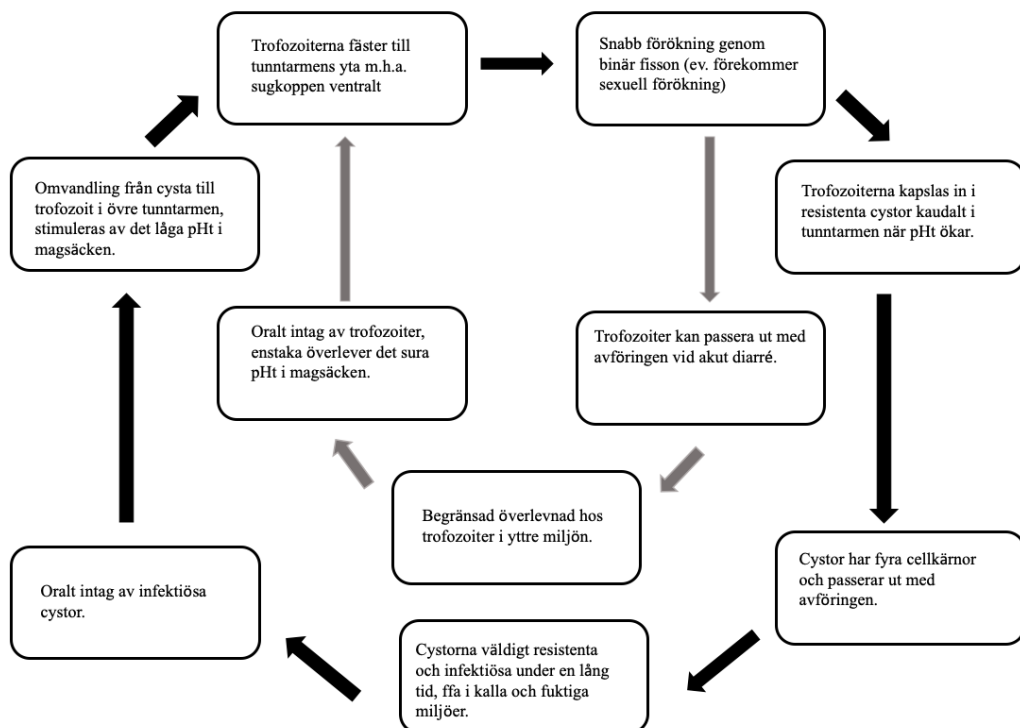
Cystan stimuleras att utvecklas till det vegetativa stadiet efter oralt intag på grund av magsäckens låga pH samt pankreatiska proteaser i duodenum (Thompson *et al.* 1993; Adam 2001). Processen är snabb (cirka tio minuter) och eftersom cystorna har fyra cellkärnor så har trofozoiterna lika många i början av sin utveckling. Fortsättningsvis mognar den ovala trofozoiten och genomgår cytokines inom 17-30 minuter, vilket slutligen ger totalt två trofozoiter från varje cysta. De två mogna

trofozoiterna kan röra sig fritt i tarmen, men koloniserar oftast duodenum och jejunum där de fäster till enterocyterna i mukosan med hjälp av dess sugkopp (Thompson *et al.* 1993; Adam 2001; Akuffo *et al.* 2003).

Trofozoiterna förökar sig asexuellt genom binär fission och det sker efter koloniseringen i tunntarmen (Raza *et al.* 2018). Det innebär att identiska celler bildas (Raza *et al.* 2018) och att eventuella genetiska variationerna beror på mutationer (Thompson *et al.* 1993). Emellertid finns det studier som tyder på att sexuell förökning kan förekomma, men att det krävs fler studier för att säkert veta (Cooper *et al.* 2007).

Vidare stimulerar gallsalter, fettsyror och ökat pH trofozoiten att återigen kapsla in sig för att utsöndras via feces (Adam 2001). Omvandlingen till cysta sker efter att trofozoiten genomgått nukleär replikation utan cytokines varför cystorna har fyra stycken cellkärnor. Omvandlingen till cysta är oftast klar i sista delen av ileum eller colon så att vid utsöndringen via träcken är de direkt infektiösa (Kirkpatrick 1987). Figur 2 nedan visar en översiktlig schematisk bild av livscykeln.

Intermittent släpper trofozoiter från tarmväggen och omvandlas till cysta, vilket är orsaken till att cystorna inte alltid behöver visas vid ett träckprov trots att individen är infekterad (Thompson *et al.* 1993).



Figur 2. Giardias livscykel. Schematisk bild över Giardias livscykel, modifierad från figur 4 i studien av Thomson *et al.* (1993).

2.4. Patogenes och patofysiologi

Trots att *Giardia* upptäcktes för över 300 hundra år sedan har utvecklingen för att förstå organismens biologi och patogenes gått långsamt (Akuffo *et al.* 2003). Det finns än idag oklarheter angående dess zoonotiska natur, förökning, värdspecificiteten samt taxonomi. Studier in vivo och in vitro visar att patogenesen beror på multifaktoriella mekanismer, men exakt hur är fortfarande inte helt klarlagt (Tangtrongsup & Scorza 2010). Patofysiologi beror både på parasiten och värdjuret, vilket kan förklara varför symptombilden och allvarlighetsgraden variera mycket (Tysnes *et al.* 2014). Stress, nutritionsförändringar, andra invasiva gastrointestinala parasiter eller behandling mot en annan infektion kan störa tarmens mikrobiom. En rubbad tarmflora främjar trofozoiten att få direktkontakt med enterocyterna och därmed gynna vidhäftning till tarmen. Förutom de värdspecifika faktorerna spelar också *Giardia*-typen en viktig roll ifall intag av cystor leder till en infektion med kliniska symptom eller inte (Uiterwijk *et al.* 2019). Skillnader hos parasiten kan bland annat vara infektionsdos, genotyp, produktion av proteolytiska enzymer och variantspecifika ytproteiner. Vanligtvis krävs en låg infektionsdos och intag av 10-100 cystor resulterar i en infektion (Akuffo *et al.* 2003).

Symptombilden varierar alltså beroende på värdjurets ålder, nutrition- och immunsstatus samt om det föreligger andra samtidiga parasitinfektioner i magtarmkanalen (Thompson 2004; Raza *et al.* 2018). Exempelvis kan unga djur som är exponerade för stress, hög djurtäthet eller andra miljöfaktorer leda till allvarligare sjukdom (Thompson 2004).

De patologiska förändringarna som kan ses i tunntarmen vid en infektion är villi-atrofi, krypthypertrofi och ökat antal intraepiteliala lymfocyter (Taylor *et al.* 2013). Trofozoiter kan ses mellan villi fästa till ytan av enterocyterna via deras konkava sugkopp. Ingen evidens finns för en intracellulär penetration vid giardiasis hos människor (Akuffo *et al.* 2003). Eftersom trofozoiterna inte tros penetrera epitelet så är patogenesen inte sannolikt en konsekvens av direkt cellskada (Tangtrongsup & Scorza 2010). Patogena effekter som setts vid giardiainfektion är många och varierande. Exempel på effekter av infektionen är en rubbning av den normala tarmfloran, inducering av Inflammatory Bowel Disease (IBD), inhibering av normal enzymfunktion hos enterocyterna troligen på grund av skadade mikrovillus, inducering av motilitetsproblem samt inducering av intestinal epitelial cellapoptos. Som resultat av detta kan *Giardia* orsaka diarré med malabsorption och hypersekretion som följd.

2.5. Klinisk bild

Den kliniska bilden varierar från asymptomatiska bärare utan tecken på diarré, till individer med kronisk intermitterent diarré med malabsorption och viktförlust (Akuffo *et al.* 2003; Uiterwijk *et al.* 2019). Scaramozzino *et al.* (2009) visade i sin studie att prevalensen för *Giardia* är vanligare på hundar yngre än ett år samt grupp-hållna hundar såsom på hundhem och kennlar. Hundar i alla åldrar kan dock drabbas (Xiao & Fayer 2008). Majoriteten av infekterade djur är asymptomatiska, upp till 60 % enligt vissa studier (Akuffo *et al.* 2003). Om infektionen ger diarré är denna oftast lös till vattning och har vanligen mukos på ytan (Tangtrongsup & Scorza

2010). Diarrén kan vara mycket illaluktande och steatorré kan förekomma. Infektionen ger sällan feber och hos immunokompetenta djur är diarrén oftast självläkande. Vid immunosuppression eller samtidig annan infektion kan symptomen förvärras. Hematologi samt biokemi är oftast normal hos djur med giardiasis, men eventuella förändringar på blodproven är ofta korrelerade till vätske- och elektrolytförlust i samband med diarrén. Förändringarna är således inte patognomona för sjukdomen. Vissa djur drabbas av allvarlig enterit med maldigestion och malabsorption till följd, vilket är ett resultat av värdjurets inflammatoriska respons på infektionen (Raza *et al.* 2018).

2.6. Zoonos

Som tidigare nämnt infekteras människor vanligtvis av genotyp A och B och hund av C och D (Xiao & Fayer 2008; Bowman & Lucio-Forster 2010). Hund kan dock också infekteras av genotyp A och B vilket innebär att det kan finnas risk för zoonotisk överföring. Hur stor risken är för zoonotisk transmission av *G. duodenalis* är dock fortfarande oklar (Rehbein *et al.* 2019). Flera studier menar att risken för zoonotisk spridning från hund till människa troligtvis är liten, men att den inte kan uteslutas då liknande genotyper har hittats hos både hund och människa (Xiao & Fayer 2008; Bowman & Lucio-Forster 2010; Rehbein *et al.* 2019). Risken för zoonotisk överföring ökar under förhållanden där människor bor tätt ihop, i nära anslutning till sina djur samt med sämre hygienstandard (Rehbein *et al.* 2019). Risken för överföring mellan husdjur och ägare bedöms alltså liten (Rehbein *et al.* 2019), men ökar för immunsupprimerade personer (Bowman & Lucio-Forster 2010). Fler epidemiologiska studier med fler fall behövs för att få en klarare bild av relevansen av zoonotisk giardiasis (Xiao & Fayer 2008; Rehbein *et al.* 2019). För att minska risken för spridning såväl till människa som andra djur är det viktigt med god hygien; plocka upp avföring, rengöra mat- och vattenskålar samt handtvätt m.m.

2.7. Diagnostik

Det finns flera metoder för att detektera *Giardia* och de direkta metoderna finns sammanställda i tabell 2 nedan. Genom direktutstryk kan trofozoiter visualiseras, medan cystor lättast detekteras via mikroskopering efter fekal flotation med eller utan centrifugeringen eller immunofluorescens (Tangtrongsup & Scorza 2010). *Giardia*-antigen kan detekteras via Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) och parasitens DNA kan påvisas genom *Giardia* DNA genom Polymerase Chain Reaction (PCR) assay. Testerna kan användas enskilt, eller kombineras för ett säkrare resultat. Infekterade individer utskiljer cystor sporadiskt och durationen mellan två toppar är generellt mellan två och sju dagar. Ett enskilt negativt test kan därför inte utesluta infektion.

Vilken metod som används beror oftast på vilka instrument som finns tillgängliga, personalens kompetens, tid och kostnad (Uchôa *et al.* 2018). Eftersom cystorna utsöndras intermittent och det kan vara ett lågt antal cystor i avföringen är

rekommendationerna generellt att träckprov tas från tre dagar i följd (Tysnes *et al.* 2014).

Tabell 2. Direkt diagnostik: metoder.

| Metod för att detektera: | Trofozoit | Cysta | Antigen | DNA |
|--------------------------|-----------|-------|---------|-----|
| Direktutstryk | X | X | - | - |
| Flotation | - | X | - | - |
| Immunofluorescens | - | X | - | - |
| ELISA | 1 | 1 | X | - |
| PCR | 2 | 2 | - | X |

1. parasitärt antigen (från cystor påvisas genom en ELISA-metod.

2. parasitär nukleinsyra (DNA) från cystor och trofozoiter kan påvisas med en PCR-metod.

2.7.1. Direktutstryk

Syftet med direktutstryk är att detektera trofozoiter vilka kan som tidigare nämnt följa med ut i avföringen vid diarré (Conboy 1997; Tangtrongsup & Scorza 2010). Till följd av den dåliga överlevnadsförmågan och eftersom trofozoiterna är lättast att detektera då de är levande och motila, så bör mikroskoperingen helst ske omedelbart, men maximum inom 20 minuter efter provtagning (Conboy 1997). Direktutstryket innebär att en liten mängd träck blandas med en droppe koksaltlösning på ett objektglas och ett täckglas läggs över för direktavläsning (Tangtrongsup & Scorza 2010). För avläsningens skull är det viktigt att lagret inte blir för tjockt. Ytskiktet av avföringen eller mukus är fördelaktigt att använda då *Giardia* oftast hittas där. Vid avläsningen med 100x förstoring har trofozoiterna vanligtvis en ”fallande löv” rörelse. Vid 400x förstoring blir strukturer såsom sugkoppen synliga. För att enklare detektera *Giardia* kan färg tillsättas, men då finns en risk att de dör, vilket försvårar avläsningen. Sensitiviteten och specificiteten är låg för direktutstryk (Tysnes *et al.* 2014) och denna metod används sällan i rutindiagnostiken.

2.7.2. IFA

Immunofluorescens (IFA) är en vanlig metod för att detektera cystor i träcken (Uehlinger *et al.* 2017). Metoden förenklar identifieringen av cystorna då monoklonala antikroppar fäster in vilka då lyser starkt grönt fluorescerande i fluorescensmikroskop. IFA är gold standard för att diagnostisera *Giardia* på många laboratorier då den har en hög sensitivitet och specificitet (Uehlinger *et al.* 2017; Pepe *et al.* 2019). Nackdelen är att den är tidskrävande då förberedelserna tar lång tid och att metoden kräver specialinstrument. Eftersom diagnosen både kan ställas med avseende på fluoreceininfärgning och morfologisktutseende ger metoden sällan falskt positivt testresultat (Tangtrongsup & Scorza 2010).

2.7.3. Zinc sulfate centrifugal flotation technique, ZSCT, zinksulfatflotation

Flotation med 33 % zinksulfat eller sockerlösning är bra metoder för att detektera *Giardia*-cystor och de har en högre sensitivitet än passiv flotation (Tangtrongsup & Scorza 2010). Eftersom sockerlösningen är hyperton så dras cytoplasman i cystorna till ena sidan vilket ger formen av en halvmåne, detta gör att många laboratorier rekommenderar användning zinksulfat. ZSCT går ut på att centrifugera en blandning av två gram feces med tio milliliter mättad lösning. Efter första centrifugeringen silas lösningen och centrifugeras igen med ett täckglas överst. Då flotationslösningen har en hög specifik vikt kommer cystorna flyta upp till toppen av röret vid täckglaset. Täckglaset placeras därefter på ett objektglas redo för avläsning i mikroskop. Preparaten bör läsas av inom 15-20 minuter eftersom att cystorna därefter kan kollapsa och bli svåra att identifiera. Förutom att detektera giardiacystor så kan flotationsmetoden även påvisa nematodägg, cestodägg samt koccidieocystor i träckproven, vilket gör att denna metod är mer kostnadseffektiv än ELISA och IFA (Pepe *et al.* 2019). Tysnes *et al.* (2014) anger att metoden både har hög sensitivitet och specificitet. Jäst, växtmaterial och debris i avföringen kan dock göra detektionen av *Giardia* svårare (Uehlinger *et al.* 2017).

2.7.4. PCR

Vid PCR amplifieras *Giardias* DNA från avföringen och metoden finns endast tillgänglig på vissa laboratorier (Tangtrongsup & Scorza 2010). Sekvensering av en PCR-produkt kan användas för att bestämma vilken så kallad genotyp eller assemblage som parasiten tillhör och därför om hundisolatet potentiellt kan vara zoonotiskt. Uehlinger *et al.* (2017) och Uchôa *et al.* (2018) anger att sensitiviteten för PCR är relativt låg, varpå det lämpar sig bättre för epidemiologiska studier och genotypning än för att ställa diagnos. PCR kan ha svårare att fånga upp lätta infektioner med låg cystutsöndring hos exempelvis symptomfria hundar. Vissa studier menar dock att PCR både har en hög sensitivitet och specificitet (Tysnes *et al.* 2014). Det kan bero på hur många genetiska locus i DNAt som genotypas och Tysnes *et al.* (2014) rekommenderar att typa för flera locus. I praktiken används inte PCR i rutindiagnostiken inom veterinärmedicin vilket delvis beror på de relativt höga kostnaderna.

2.7.5. ELISA

Det finns flera olika ELISA-tester ute på marknaden med syfte att detektera antigen tillhörande parasiten i avföringen (Tangtrongsup & Scorza 2010). SNAP *Giardia* Test är ett testkit från IDEXX Laboratories tillgängligt för både hund och katt. ELISA bör användas som ett kompletterande test för att komplettera osäkra fall, men bör inte ersätta mikroskoperingen. I produktbeskrivningen på IDEXXs hemsida rekommenderar tillverkaren att använda snabbtestet som ett supplement till exempelvis en flotationsteknik (IDEXX, 2020). Det är en snabb och smidig metod som kan detektera cystor trots låg utsöndring samt när endast antigen är närvarande (Uehlinger *et al.* 2017).

2.8. Behandling

2.8.1. Tillgängliga läkemedel

Det finns inga specifika preparat med indikation för behandling av *Giardia* hos hund i Sverige i dagsläget (Läkemedelsverket, 2014). Läkemedelsverket rekommenderar fenbendazol (FBZ) (50 mg/kg kroppsvikt q24 i 3-5 dagar) och humanpreparatet metronidazol (MTZ) (25 mg/kg kroppsvikt q12 i 5-7 dagar). Rekommendationerna baseras på litteratur och klinisk erfarenhet. Läkemedelsverket betonar vikten av god hygien och miljösanering samt schamponering av hunden i samband med behandlingen. ESCCAP, European Scientific Counsel Companion Animal Parasites, rekommenderar precis som Läkemedelsverket FBZ och MTZ enligt samma dos och behandlingstid (ESCCAP 2018). Behandlingen med FBZ kan upprepas två veckor efter avslutad behandling om symptomen kommer tillbaka.

Axilur® vet. är det enda läkemedlet som innehåller FBZ registrerat på hund i Sverige (FASS 2020a). Det har indikation för behandling av rundmask samt bandmask, men som ovan beskrivet inte för *Giardia*. FBZ är en bensimidazol och utövar sin antihelmintiska effekt genom att hämma glukosupptaget hos parasiten och därmed påverkar energiomsättningen. Läkemedlet har en bred säkerhetsmarginal, kan ges till unga djur och har låg toxicitet.

MTZ är det verksamma ämnet i humanpreparatet Flagyl® med indikation för amöba- och giardiainfektion på människa (FASS 2020b). MTZ är ett antibiotikum med effekt på såväl anaeroba bakterier och trikomonasinfektioner som amöbor. Det är ett nitroimidazolderivat som har hämmande effekt på anaeroba bakterier och protozoer genom att hämma nukleinsyrasyntesen och skada DNAt. Läkemedlet ges per oralt och absorberas nästan fullt ut. Det finns dock rapporterat både gastrointestinala biverkningar och centralnervösa effekter på hund (Läkemedelsverket 2014).

I en studie av Saleh *et al.* (2016) behandlades en hundkoloni med FBZ enligt ovan nämnda dosering fast en utökad behandlingstid på tio dagar. De såg lyckade resultat av behandlingen och 125 dagar efter studiens start var alla 34 hundar fria från *Giardia*. En hund som fortfarande hade persistent diarré (men negativt avföringsprov) efter behandlingen behandlas också med MTZ (30 mg/kg) en gång dagligen i sju dagar på grund av personalens oro. Före studiens start hade delar av hundkolonin blivit behandlade med FBZ i tre dagar och senare behandlades samtliga med MTZ i sju dagar, det vill säga en kortare behandlingstid, utan att smittan eliminerats.

Ytterligare ett avmaskningsmedel som ESCCAP rekommenderar är en kombination av febantel, pyrantel och prazikvantel (ESCCAP 2018). Det ska ges en gång dagligen i tre dagar och doseras enligt standardavmaskningsdosen (febantel 15 mg/kg, pyrantel 14,4 mg/kg och prazikvantel 5,0 mg/kg). Ett exempel på ett sådant kombinationspreparat är Drontal® Flavour Plus och det finns att tillgå på licens i många europeiska länder. Det är febantel som anses ha effekt mot *Giardia* då det metaboliseras till fenbendazol i levern (Cheung *et al.* 2019). Montoya *et al.* (2008) visade att Drontal® Flavour Plus enligt standarddos hade god effekt mot *Giardia*. De studerade både tredagars- samt femdagarsbehandling men kunde inte visa en signifikant skillnad med en längre behandlingstid. Hundarna kontrollerades dock bara elva dagar efter behandlingen. Giangaspero *et al.* (2002) visade också i sin studie att det europeiskt registrerade kombinationspreparatet Drontal Plus (Bayer)

var effektivt mot *Giardia*. Majoriteten var negativa efter behandlingen, men inte alla. Även i deras studie kontrollerades hundarna bara fram till 14 dagar efter behandling. Inga tecken på biverkningar av läkemedlet kunde påvisas.

ESCCAP (2018) skriver i sina riktlinjer att hundar med symptom och som visar förekomst av *Giardia* i träckprov ska behandlas, men rekommenderar inte att symptomfria hundar behandlas. Behandlingens främsta mål är att motverka kliniska symptom och inte att eliminera parasiten. I högriskmiljöer exempelvis kennlar som har problem med diarréer på valparna, eller för hundar i nära kontakt med barn eller immunsupprimerade rekommenderas alltid behandling oavsett.

2.8.2. Miljöåtgärder

För att eliminera en giardiainfektion räcker det inte enbart med behandling då cystorna är väldigt resistent i omgivande miljö. Flera studier betonar vikten av att sanera miljön samt att schamponera hundarna eftersom en vanlig orsak till kvarstående infektion efter behandling är återinfektion via cystor från omgivningen (Montoya *et al.* 2008; Fiechter *et al.* 2012; Saleh *et al.* 2016). På grund av hundars sociala beteende som att lukta och slicka varandra vid bakdelen samt koprofagi ökar risken för återinfektion från omgivningen (Tysnes *et al.* 2014). För att förhindra reinfektion och för att minska smittrycket är det viktigt med mekanisk rengöring av ytor, tvätt av textilier som hunden varit i kontakt med samt att avföring regelbundet plockas upp (Montoya *et al.* 2008; Fiechter *et al.* 2012; Saleh *et al.* 2016). Hur och när saneringen rekommenderas att utföras skiljer sig en del mellan olika studier, men ska utföras under eller i samband med behandlingen.

I studien av Fiechter *et al.* (2012) rengjordes ytorna med Chlorine-M-cresol som sedan spolades bort med varmt (80°C) högtrycksvatten två timmar senare. Rengöringen utfördes två dagar innan behandlingen med ronidazol (en typ av 5-nitroimidazol) startades. Hundarna schamponerades i studien med klorhexidinschampo dagen innan behandlingen påbörjades. Liknande procedur upprepades igen dag fem och sex in i behandlingen (det vill säga rengöring respektive schamponering).

I både studien av Saleh *et al.* (2016) och av Cheung *et al.* (2019) desinficerades ytorna med rengöringsmedel innehållande kvartära ammoniumföreningar, men dock under olika dagar i förhållande till läkemedelsbehandlingen. I studien av Saleh *et al.* (2016) utfördes saneringen dag fem i tiodagarsbehandlingen med FBZ, medan behandlingen i studien av Cheung *et al.* (2019) var en engångsdos av secrindazol (en typ av 5-nitroimidazol) och då utfördes saneringen tre dagar efter behandlingen. Dessvärre finns inga rengöringsmedel som säkert eliminerar *Giardia* och vissa studier menar att mekanisk rengöring med såpa och varmt vatten räcker för att reducera antalet cystor (Fiechter *et al.* 2012). Det är viktigt att rummen hinner torka upp ordentligt, då cystorna trivs i fuktiga miljöer (Fiechter *et al.* 2012; Saleh *et al.* 2016).

Eftersom att cystorna kan fastna och överleva en tid i hundarnas päls är en viktig del av eliminering av smittan att schamponera hundarna (Fiechter *et al.* 2012; Saleh *et al.* 2016). Tidpunkten för schamponeringen varierar mellan olika studier, men sker vanligen några dagar in i behandlingen, alternativt både före och under behandlingen. Det finns inte heller något schampo som säkert avdödar *Giardia* och i studierna har både klorhexidinschampo (Fiechter *et al.* 2012) och ”vanligt” hundschampo (Saleh *et al.* 2016) använts.

2.8.3. Probiotika

Administrering av probiotika innebär att ge levande mikroorganismer i en mängd som kan ha positiva hälsoeffekter på värdjuret (Fenimore *et al.* 2017). Det är ett vanligt komplement till den understödande behandlingen vid icke-specifika diarréer. Ett exempel på ett probiotikum som enligt flera studier har flera hälsofördelar är *Enterococcus faecium* SF68 (Benyacoub *et al.* 2003; Fenimore *et al.* 2017). Det bidrar till en bibehållen diversitet av bakterier i tarmens mikrobiom, ger en ökad IgA-koncentration i serum och avföring och kan eventuellt stärka immunförsvaret mot infektioner. Studier på människor har visat att *E. faecium* SF68 är effektivt mot såväl antibiotika-associerad som akut diarré (Benyacoub *et al.* 2005). Benyacoub *et al.* (2005) menar att *E. faecium* SF68 eventuellt kan förbättra behandlingen av *Giardia*. Deras studie på möss visade att *E. faecium* SF68 främjade ett starkare anti-*giardia*-specifikt immunförsvaret jämfört med kontrollgruppen som fick placebo i form av fosfatbuffrad saltlösning. Mössen som fick probiotikan hade högre IgA-nivåer i träcken och högre IgG-nivåer i serumet. Det resulterade i snabbare eliminering av levande trofozoiter och parasitantigen. I studien av Fenimore *et al.* (2017) fick hundar som behandlades för akut diarré i större utsträckning normal avföring när probiotika tillfördes till behandlingen jämfört med kontrollgruppen som fick placebo i form oral pasta med smakförstärkning. Samtliga hundar behandlades i studien med MTZ (25 mg/kg p.o., q12) i sju dagar, men endast hälften fick *E. faecium* SF68 (5×10^8 cfu/dos). Nio av hundarna i studien visade förekomst av *Giardia* före behandlingen. De två hundarna som behandlades med SF68 eliminerade *Giardia* och visade klinisk förbättring medan i placebogrupperna var 6/7 fortfarande positiva efter behandlingen och endast 3/7 blev kliniskt bättre. Resultaten i studien tyder på att probiotikan förbättrade läkemedlets effekt mot *Giardia* men det var inte statistiskt signifikant. I motsats till föregående studier sågs ingen skillnad på immunresponserna, cystutsöndringen eller antigenmängden under eller efter probiotikabehandlingen på hundar med giardiasis i studien av Simpson *et al.* (2009). De kroniskt infekterade hundarna behandlades enbart med probiotika utan annan antiparasitär behandling.

3. Material och Metod

3.1. Litteratursökning

Vid litteratursökningen användes bl.a. sökorden *Giardia*, dog, treatment, genotype, resistance och zoonosis. Ingen tidsbegränsning sattes vid sökningen, men strävade efter att använda nyare artiklar för studierna. Äldre källor användes bland annat till bakgrundsinformation. Databaser som användes var Web of Science, PubMed samt Google Scholar. Vidare hittades fler källor i bra och relevanta review-artiklar samt via funktionen relaterade artiklar till ämnet. Tre böcker användes till bakgrundsinformation.

3.2. Facilitet, djur, skötsel

Studien omfattade 28 beaglehundar som ägs av Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) och används för undervisning samt lindriga studier på universitetet. Studien påbörjades i mars 2020 och sträckte sig till november samma år. Under sommaren mellan behandlingsperioderna avlivades en hund på grund av sjukdom och hög ålder. Utöver det flyttade en hund under hösten vilket medförde att 26 hundar kvarstod tills studiens slut. Hundarna som är i ålder mellan två-elva år är uppdelade i åtta rum (tre till fyra per rum) och varje rum har separata rastgårdar (förutom rum ett och två som har en gemensam) som de har tillgång till under dagtid. Regelbundet går de ut på längre promenader med personal eller studenter. Den gemensamma korridoren passerar både hundar och personal genom och det finns ingen hygiengräns såsom skobyte mellan rummen. Rummen städas med vatten och såpa dagligen och filter tvättas i 60°C vid behov. Under hela perioden fortsatte undervisningen som vanligt och då blandades hundar från olika rum med varandra. På utegårdarna fanns initialt grus på marken samt en hundkoja med halm i. Avföring plockas dagligen upp från rastgården och inne i rummen.

3.3. Provtagningssteknik

Proverna togs genom att samla feces vid promenader eller rektalt plocka ut avföring med ett finger. En liten mängd vattenbaserat glidslem användes för att minska obehag för hundarna. Med hjälp av handsken på handen kunde avföringen förvaras

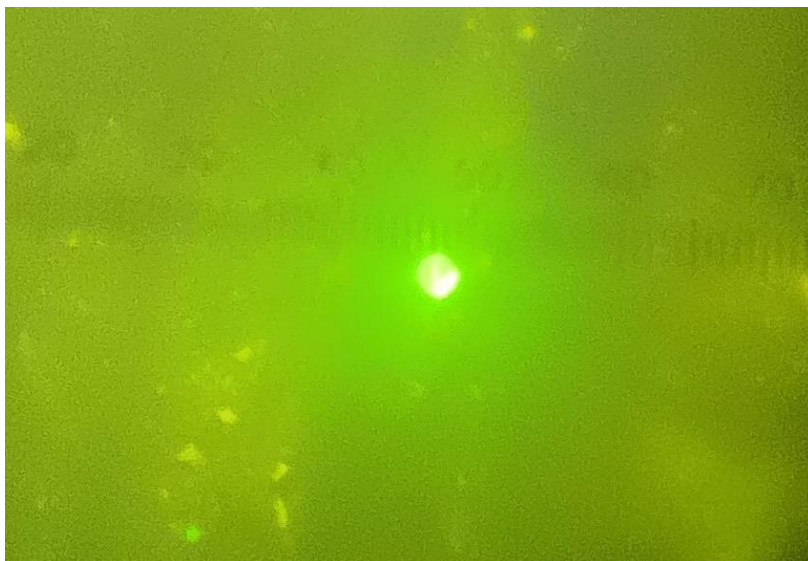
genom att vända ut och in på handsken, avlägsna överflödigt luft och försluta den med en knut. Proverna sparades i kylskåp fram till analys, som oftast utfördes samma eller nästkommande dag, men maximum efter en vecka. Eftersom hundarnas ändtarm svullnade lindrigt till måttligt av den dagliga provtagningen så alternerades provtagning med tops och finger från dag nio i behandling 1. Vid topsning fördes en bomullspinne in i rektum och ströks mot rektumväggen och avföringen. Direkt i anslutning till topsningen ströks avföringen ut på objektglaset enligt IFA-metoden (se 3.4 Diagnostik). För att utvärdera om topsning gav ett likvärdigt resultat som att använda fingret utfördes båda teknikerna första dagen med den nya metoden. Eftersom de gav samma resultat så kunde metoderna därefter alterneras.

3.4. Diagnostik

Samtlig diagnostik utfördes på SVA. Initialt utfördes diagnostiken under handledning av anställda på SVA, framför allt vid screeningen. Vidare kunde författaren preparera och analysera avföringsproverna självständigt med metoden IFA.

3.4.1. IFA – Immunfluorescens

IFA användes för att analysera samtliga prover då den metoden har en hög sensitivitet och specificitet samt är enklare att detektera cystorna jämfört med flotations-tekniken då de lyser starkt fluorescerande (Uehlinger *et al.* 2017). IFA är dessutom den rutinmässiga metoden som idag används på SVA för att detektera *Giardia*. Testet som användes var det kommersiella kittet ”Aqua-Glo Cryptosporidium/Giardia Direct” (Waterborne, Inc. New Orleans, LA, USA) och proven prepareras enligt instruktionerna. Avföring ströks ut på objektglasets alla brunnar och efter att det torkat fixerades proverna i metanol. Monoklonala antikroppar tillfördes till varje brunn för att sedan inkuberas i 37°C i en mörk fukt-kammare. Från och med det steget måste preparaten hållas i mörker då de monoklonala antikropparna är ljuskänsliga. Överflödiga antikroppar sköljdes av med PBS (fosfatbuffrad saltlösning) och när preparaten var torra så monterades de med glycerol och täckglas för att slutligen avläsas med 25x förstoring i fluorescensmikroskop. De monoklonala antikropparna fäster in till eventuella cystor i preparaten som då lyser starkt grönt fluorescerande vilket förenklar avläsningen. I denna studie räknades varje enskild cysta vid avläsningen för att få en uppskattning av cystutsöndringen i en skala från + till +++. Hur många cystor som finns vid avläsningen behöver dock inte alltid ge en rättvis bild av den aktuella cystutsöndringen då det beror på hur mycket cystor som finns i den lilla mängd avföring som stryks ut på glaset. När SVA utför IFA svarar de endast om det finns förekomst av *Giardia* (positivt) eller inte (negativt), därmed är det en kvalitativ analysmetod.



Figur 3. Positivt avföringsprov, giardiacystans utseende med IFA. Bildkälla: Författaren.

3.4.2. Zinksulfatflotation, ZSCT

Flotation med zinksulfat ($ZnSO_2$) användes vid screeningen av hela hundkolonin för att se om någon hund var infekterad med ytterligare parasiter. Genom flotations-tekniken kan man förutom giardiacystor även påvisa nematodägg, cestodägg samt koccidieocystor. Tekniken utfördes enligt SVA:s instruktioner och principen är att få ägg och oocystor att floterar i en 33 % zinksulfatlösning. Tack vare lösningens höga densitet (1,20) flyter cystor, oocystor och ägg upp till ytan där täckglaset är placerat. Täckglaset flyttas sedan till ett objektsglas som mikroskoperas. Analysen är kvalitativ inklusive en subjektiv mängdskattning.

Eftersom screeningen visade en total överensstämmelse mellan metoderna IFA och ZSCT så användes enbart IFA till resten av proverna av praktiska skäl.

3.5. Provtagningschema



Figur 4. Tidslinje av tidpunkter för provtagningar innan första behandling.

3.5.1. Pre-screening

I januari 2020, innan studiens start, togs totalt 13 träckprovsanalyser, varav 12 var samlingsprover med avföring från mellan ett till tre olika rum och ett individprov.

Avföringsproverna bestod av slumpmässigt utvald avföring från golvet i hundrummen. Proven analyserades av SVA och visade förekomst av *Giardia* sp. i ett samlingsprov (understruket med blå färg i figur 5) samt enstaka ägg av spolmask i två samlingsprover (understruket med orange färg i figur 5).

| Träckprovsanalys | | | |
|------------------|-----------|---|-----------|
| Rum 1,8,1 | Träckprov | Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) Parasitägg eller coccidier ej påvisade | Flotation |
| Rum 1,8,2 | Träckprov | Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) Parasitägg eller coccidier ej påvisade | Flotation |
| Rum 2-1 | Träckprov | Enstaka ägg av Spolmask (<i>Toxocara canis</i>) Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) | Flotation |
| Rum 2-2 | Träckprov | Enstaka ägg av Spolmask (<i>Toxocara canis</i>) Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) | Flotation |
| Rum 3 | Träckprov | Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) Parasitägg eller coccidier ej påvisade | Flotation |
| Rum 4-1 | Träckprov | Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) Parasitägg eller coccidier ej påvisade | Flotation |
| Rum 4-2 | Träckprov | Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) Parasitägg eller coccidier ej påvisade | Flotation |
| Doris 8397 rum 5 | Träckprov | Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) Parasitägg eller coccidier ej påvisade | Flotation |
| Rum 5-1 | Träckprov | Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) Parasitägg eller coccidier ej påvisade | Flotation |
| Rum 5-2 | Träckprov | Förekomst av Tarmprotozo (<i>Giardia</i> sp.) Parasitägg eller coccidier ej påvisade | Flotation |
| Rum 6-1 | Träckprov | Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) Parasitägg eller coccidier ej påvisade | Flotation |
| Rum 6-2 | Träckprov | Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) Parasitägg eller coccidier ej påvisade | Flotation |
| Rum 7 | Träckprov | Ingen förekomst av Tarmprotozo (Giardia sp.) Parasitägg eller coccidier ej påvisade | Flotation |

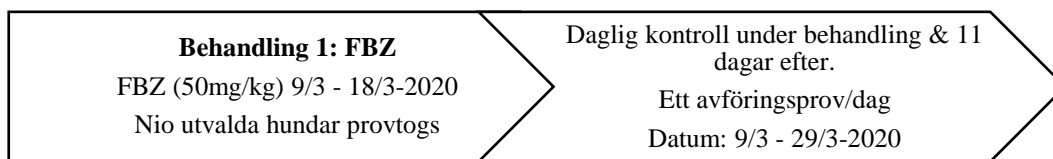
Figur 5. Resultat från träckprovsanalyser före studiens start.

3.5.2. Screening

Före behandling 1 screenades hela hundkolonin för samtliga gastrointestinala parasiter genom att plocka ut avföring ur rektum med ett finger. Provtagningen utfördes mellan 28/2-2020 och 1/3-2020, det vill säga tre dagar i följd. Provtagning flera dagar i följd minskar risken för negativa resultat trots infektion, då giardiacystor kan utsöndras intermittent (Tysnes *et al.* 2014). Avföringen från varje individ poolades och samlades i ett 50 ml-plaströr och förvarades i kylskåp tills det analyserades med ZSCT och IFA.

3.5.3. Provtagning under behandling 1 och uppföljning efter behandling 1.

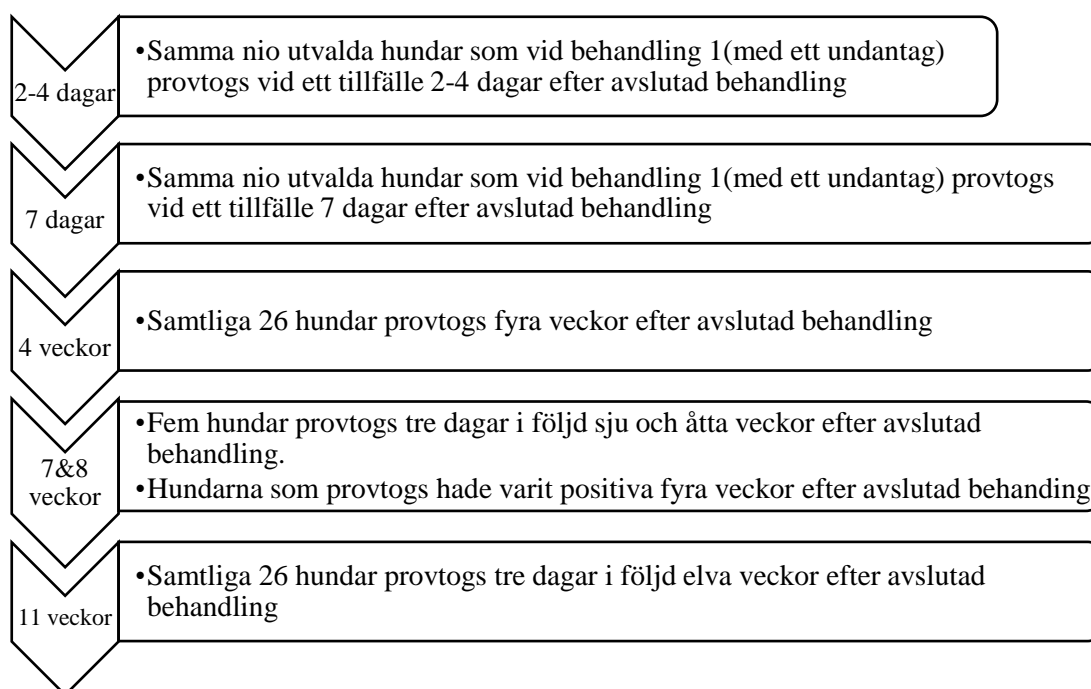
Strategiskt valdes nio hundar ut från kolonin för att följa utsöndringen av giardiacystor dagligen under och 14 dagar efter behandling 1 (se rubrik 3.6.2). Avföringsprover togs rektalt med ett finger och alternerades med topsning av avföringen i rektum från och med dag 9 i behandlingen. Proverna analyserades med IFA.



Figur 6. Provtagningsstillfällena under behandling 1 (FBZ i 10 dagar) och vid uppföljning efter avslutad behandling.

3.5.4. Provtagning vid uppföljning efter behandling 2

Samma nio hundar som vid behandling 1 (med undantag för en hund) valdes ut och provtogs två-fyra och sju dagar efter behandling 2 (se rubrik 3.6.4). Därefter provtogs samtliga 26 hundar fyra och elva veckor efter avslutad behandling. Därtill provtogs fem hundar även sju och åtta veckor efter avslutad behandling då de var positiva vid uppföljningen fyra veckor efter avslutad behandling. Slutligen provtogs samtliga 26 hundar tre dagar i följd elva veckor efter avslutad behandling. Avföringsproverna togs med ett finger rektalt. Proverna analyserades med IFA.



Figur 7. Provtagningsstillfällena vid uppföljning av behandling 2 (FBZ+MTZ i tio dagar).

3.6. Behandlingsprotokoll samt hygienåtgärder

3.6.1. Behandling 1 (FBZ)

Samtliga hundar behandlades med FBZ (Axilur vet, granulat 22 %) 50 mg/kg kroppsvikt en gång dagligen i tio dagar. Behandlingen påbörjades 9/3-2020 och avslutades 18/3-2020. FBZ doserades efter varje hunds vikt och granulatet blandades med fodret vid morgonutfodringen. Samtliga hundar fick rätt dos under hela behandlingen. Miljön sanerades genom mekanisk rengöring av ytor med vatten och såpa och all textil tvättades i 60°C dag fyra-fem i behandlingen. Inredning, golv samt en bit upp på väggen skrubbades och därefter stod rummen tomma tills det var helt torrt. Byggfläktar placerades i rummen för att påskynda torkningen. I rastgården plockades all avföring upp, halmen avlägsnades ifrån hundhuset som dammsögs rent. Schamponering med deShedding Ultra Premium, Furminator av samtliga hundarna genomfördes dag fem-sex i behandlingen.

3.6.2. Uppföljning behandling 1

Efter screeningen valdes nio hundar ut för att undersökas dagligen under behandlingen samt 11 dagar efter avslutad behandling. Urvalet baserades på resultatet från screeningen och för att få en bild av behandlingsresultatet i hela kolonin valdes en positiv hund per hundrum. Hundar som visade riklig förekomst av cystor vid screeningen valdes ut och två hundar i rum 5 då det var rummet som *Giardia* initialt detekterats före studien. I det enda rum där samtliga var negativa för *Giardia* vid screeningen valdes en hund ut slumpmässigt som kontroll. Provtagningen pågick från 9/3-20 till och med 29/3-30, det vill säga dagligen under behandlingen och de följande 11 dagarna. Samtliga prover analyserades med IFA.

3.6.3. Behandling 2 (FBZ + MTZ)

Samtliga hundar skulle behandlas med FBZ (Axilur vet, granulat 22 %) 50mg/kg en gång dagligen i tio dagar samt MTZ (Flagyl, 200 mg) cirka 15mg/kg (\pm 3mg/kg) två gånger dagligen i tio dagar. I behandlingsgrupp 1 behandlades nio hundar med FBZ och MTZ mellan 15/9-20 och 24/9-20. De resterande 17 hundarna, behandlingsgrupp 2, behandlades 19/9-20 till 28/9-20 (se tabell 3).

Till följd av felaktig dosräkning fick behandlingsgrupp 1 fyra gånger för hög FBZ-dos (200 mg/kg istället för 50 mg/kg) i fem dagar och behandlingsgrupp 2 i två dagar. FBZ tog på så sätt slut, så att samtliga hundar stod utan FBZ-giva en dag under behandlingen. Den uteblivna FBZ-dosen inföll dag sex för behandlingsgrupp 1 och dag tre för behandlingsgrupp 2. Därefter fick samtliga hundar 50 mg/kg FBZ en gång dagligen enligt plan för de kvarvarande dagarna. Alla hundarna fick MTZ enligt rätt dos under hela behandlingstiden.

Hundstallarna renoverades under sommaren och hundkolonin befann sig i andra lokaler under den perioden. Hundrummen totalrenoverades och rengjordes med vat-

ten och såpa före återflytt, vilket var dag fem-sex av behandlingen. Gruset i rastgårdarna avlägsnades och asfalten skrubbadades med såpa och vatten. Före tillbakaflytt till hunduset schamponerades hundarna.

Under sommaren ändrades dieten till ett fiberrikt torrfoder (Royal Canin, Gastrointestinal High fiber) förutom för enstaka hundar som behöver stå på Royal Canin Gastrointestinal moderate calorie.

Tabell 3. Datum för behandling 2, inkl. dagar för felaktig läkemedelsdos.

| Hund | Rum | Behandlingsgrupp | Antal dagar med felaktig FBZ-dos | Dag i behandling vid utebliven FBZ-giva |
|----------|-----|------------------|----------------------------------|---|
| Garbo | 1 | 2 | 2 | 3 |
| Maja | 1 | 2 | 2 | 3 |
| Zelda | 1 | 2 | 2 | 3 |
| Nessie | 2 | 1 | 5 | 6 |
| Maxi | 2 | 1 | 5 | 6 |
| Fröja | 2 | 1 | 5 | 6 |
| Humlan | 2 | 1 | 5 | 6 |
| Nejliska | 3 | 1 | 5 | 6 |
| Honung | 3 | 1 | 5 | 6 |
| Mynta | 3 | 1 | 5 | 6 |
| Ruffa | 3 | 1 | 5 | 6 |
| Etna | 4 | 1 | 5 | 6 |
| Tuva | 4 | 1 | 5 | 6 |
| Saga | 4 | - | - | - |
| Siri | 5 | 2 | 2 | 3 |
| Alma | 5 | 2 | 2 | 3 |
| Ebba | 5 | 2 | 2 | 3 |
| Doris | 5 | 2 | 2 | 3 |
| Mårten | 5 | 2 | 2 | 3 |
| Ramses | 6 | 2 | 2 | 3 |
| Frasse | 6 | 2 | 2 | 3 |
| Oskar | 6 | 2 | 2 | 3 |
| Watson | 7 | 2 | 2 | 3 |
| Harry | 7 | 2 | 2 | 3 |
| Dante | 7 | 2 | 2 | 3 |
| Elsa | 8 | 2 | 2 | 3 |
| Iris | 8 | 2 | 2 | 3 |
| Märta | 8 | 2 | 2 | 3 |

Behandlingsgrupp 1: 15/9-24/9 -2020

Behandlingsgrupp 2: 19/9-28/9-2020

3.6.4. Uppföljning av behandling 2

För att utvärdera behandlingsresultatet av en kombination av FBZ och MTZ provtogs samma nio hundar som vid behandling 1 vid två tillfällen, en gång två-fyra dagar efter avslutad behandling samt en gång sju dagar efter behandlingen (se figur

7). En hund som provtogs vid behandling 1 hade avlivats under sommaren och ersattes därför mot en slumpmässigt vald hund i samma rum.

Fyra veckor efter avslutad behandlingen provtogs samtliga 26 hundar vid ett tillfälle för att bedöma smittläget i hela hundkolonin. De hundarna som visade förekomst av *Giardia* vid uppföljningen fyra veckor efter avslutad behandling provtogs även sex och sju veckor efter avslutad behandling. Följdaktligen provtogs fem hundar genom avföringsprover från tre dagar i följd i syfte att kunna utföra molekylär karakterisering av parasiten. Alla proverna från samtliga provtagna individer inklusive samlingsprovet samlat sex veckor efter avslutad behandling poolades och analyserades tillsammans. Avföringsproverna sju veckor efter avslutad behandling poolades individmässigt.

Elva veckor efter avslutad behandling provtogs samtliga hundar tre dagar i följd. Proven analyserades med IFA och analyserades enskilt. Avföring från positiva hundar ska skickas till EU-RLP för molekylär analys. Resultatet av den molekylärbiologiska typningen hann inte bli klart under studiens gång.

4. Resultat

4.1. Screening

Tabell 4. Screening av samtliga 28 hundar med IFA och ZCST avseende för samtliga gastrointestinala parasiter, inklusive *Giardia*.

| Hund | Rum | IFA | ZCST |
|---------|-----|-----|------|
| Garbo | 1 | + | + |
| Maja | 1 | + | + |
| Zelda | 1 | + | + |
| Nessie | 2 | + | + |
| Maxi | 2 | N | N |
| Fröja | 2 | ++ | (+) |
| Humlan | 2 | + | + |
| Nejlika | 3 | + | (+) |
| Honung | 3 | + | (+) |
| Mynta | 3 | + | (+) |
| Ruffa | 3 | ++ | + |
| Etna | 4 | N | N |
| Tuva | 4 | N | N |
| Saga | 4 | ++ | + |
| Siri | 5 | +++ | +* |
| Alma | 5 | N | + |
| Ebba | 5 | N | N |
| Doris | 5 | +++ | + |
| Mårten | 6 | + | + |
| Ramses | 6 | N | N |
| Frasse | 6 | + | ? |
| Oskar | 6 | ++ | + |
| Watson | 7 | N | N |
| Harry | 7 | N | N |
| Dante | 7 | N | N |
| Elsa | 8 | ++ | + |
| Iris | 8 | + | + |
| Märta | 8 | N | N* |

IFA:

Hunden anses positiv för *Giardia* när en eller fler cystor detekteras

+ : 1-3cystor

++: 4-9 cystor

+++ : ≥ 10 cystor

N = Negativ, inga cystor kunde detekteras

ZCST

+: *Giardia* detekterats = positiv

(+): Preparatet svåravläst, troligen positivt

(*) Lite avföring

? Kunde inte bedöma provet

Hela kolonin screenades genom avföringsprov tre dagar i följd som blandades individuellt och analyserades. Resultatet vid screeningen visade att 18/28 (64 %) hundar var positiva för *Giardia*. Inga övriga gastrointestinala parasiter kunde detekteras med ZCST. Metoderna IF och ZCST gav helt likvärdiga resultat. Provresultat som skrivits in inom parentes eller frågetecken var svåra att läsa av och bedöma.

4.2. Behandling 1 + uppföljning

Tabell 5. Resultat IFA avseende *Giardia* vid daglig provtagning av 9 utvalda hundar under behandling (FBZ) och 11 dagar efteråt.

| FBZ, dag: | Garbo Rum 1 | Fröja Rum 2 | Ruffa Rum 3 | Saga Rum 4 | Siri Rum 5 | Doris Rum 5 | Oskar Rum 6 | Harry Rum 7 | Elsa Rum 8 |
|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 1 | + | N | N | N | ++ | ++ | + | N | N |
| 2 | N | N | ++ | N | N | N | N | N | N |
| 3 | N | N | ++ | N | N | N | N | N | N |
| 4 | N | N | ++ | N | N | N | N | N | N |
| 5 | N | N | +++ | + | N | N | N | N | N |
| 6 | N | N | + | N | N | N | N | N | N |
| 7 | N | +++ | + | N | N | N | N | N | N |
| 8 | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 9 | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 10 | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| | | | | | | | | | |
| Post FBZ: | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|----|-----|---|---|---|----|-----|----|---|-----|
| 1 | N | N | + | N | N | + | N | N | + |
| 2 | N | N | N | N | N | + | ++ | N | N |
| 3 | N | + | + | N | N | + | ++ | N | +++ |
| 4 | N | N | N | N | N | ++ | ++ | N | ++ |
| 5 | N | N | N | N | + | +++ | ++ | N | N |
| 6 | N | N | N | N | ++ | +++ | + | N | + |
| 7 | N | N | + | + | N | +++ | + | N | N |
| 8 | N | N | N | + | + | +++ | + | N | N |
| 9 | ++ | N | N | + | N | ++ | + | N | ++ |
| 10 | ++ | + | N | + | N | +++ | + | N | +++ |
| 11 | +++ | N | + | + | ++ | +++ | + | N | +++ |

Hunden anses positiv för Giardia när en eller fler cystor detekteras

+: Enstaka cystor (ca 1-3)

++: Måttligt med cystor (ca 4-9)

+++ : Rikligt med cystor (ca ≥ 10)

N= Negativ, inga cystor

Vit ruta= Provtagning med finger

Grå ruta = Provtagning med svabb

Streckad ruta= Provtagning med både svabb och finger

Samtliga hundar var negativa dag åtta till tio i behandlingen. Redan dagen efter behandlingens slut var tre hundar positiva igen. Dag nio efter avslutad behandling hade 8/9 hundar visat förekomst av *Giardia* efter avslutad behandling. Vi fullföljde inte den ursprungliga planen med provtagning 14 dagar efter behandlingen då majoriteten fortsatt var positiva och avslutades därför redan elva dagar efter avslutad behandling.

4.3. Uppföljning efter 2a behandlingen

4.3.1. Uppföljning 2-4 och 7 dagar

Tabell 6. Resultat IFA avseende *Giardia* vid provtagning av samma nio hundar som ovan (se tabell 5) efter behandling 2(FBZ+MTZ).

| Dagar | Garbo Rum 1 | Fröja Rum 2 | Ruffa Rum 3 | Etna Rum 4 | Siri Rum 5 | Doris Rum 5 | Oskar Rum 6 | Harry Rum 7 | Elsa Rum 8 |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 2-4 | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 7 | N | N | N | N | N | N | N | N | N |

N= Negativ, inga cystor

Resultatet efter behandling med FBZ+MTZ i tio dagar visade att samtliga hundarna var negativa både två till fyra och sju dagar efter behandlingen. Ingen av de provtagna hundarna visade alltså förekomst av *Giardia* vid det tillfället.

4.3.2. Uppföljning efter 4 veckor

Tabell 7. Resultat IFA avseende *Giardia* vid provtagning av samtliga 26 hundar vid ett tillfälle fyra veckor efter behandling 2.

| Hund | Rum | IFA | Hund | Rum | IFA |
|----------|-----|-----|--------|-----|-----|
| Garbo | 1 | ++ | Siri | 5 | N |
| Maja | 1 | + | Alma | 5 | N |
| Zelda | 1 | +++ | Ebba | 5 | N |
| Nessie | 2 | N | Doris | 5 | N |
| Maxi | 2 | N | Mårten | 6 | N |
| Fröja | 2 | N | Ramses | 6 | N |
| Humlan | 2 | - | Frasse | 6 | N |
| Nejliska | 3 | N | Oskar | 6 | N |
| Honung | 3 | N | Watson | 7 | N |
| Mynta | 3 | N | Harry | 7 | N |
| Ruffa | 3 | N | Dante | 7 | N |
| Etna | 4 | N | Elsa | 8 | +++ |
| Tuva | 4 | ++ | Iris | 8 | N |
| Saga | 4 | - | Märta | 8 | N |

Hunden anses positiv för *Giardia* när en eller fler cystor detekteras

+: Enstaka cystor (ca 1-3)

++: Måttligt med cystor (ca 4-9)

+++ : Rikligt med cystor (ca ≥ 10)

N= Negativ, inga cystor

Fyra veckor efter andra behandlingen med FBZ+MTZ i tio dagar visade resultatet att 5/26 (19 %) hundar återigen var positiva. Två av hundarna hade rikligt med cystor i provmaterialet.

4.3.3. Uppföljning efter 6-7 veckor

Tabell 8. Resultat IFA avseende *Giardia* vid provtagning av fem utvalda hundar (positiva på tabell 6) sex och sju veckor efter behandling 2.

| Veckor efter behandling | Garbo Rum 1 | Maja Rum 1 | Zelda Rum 1 | Tuva Rum 4 | Elsa Rum 8 | Samlingsprov |
|-------------------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|--------------|
| 6 v | | | | | | N |
| 7 v | N | N | N | N | N | |

Vid sex veckor poolades avföringen från tre dagar till ett prov från alla hundar. Vid sju veckor poolades avföringen från tre dagar för varje hund. Ingen förekomst av *Giardia* detekterades då hundarna som visade förekomst av *Giardia* fyra veckor efter behandling med FBZ+MTZ återigen negativa.

4.3.4. Uppföljning efter 11 veckor

Tabell 9. Resultat IFA avseende *Giardia* vid provtagning av samtliga 26 hundar tre dagar i följd 11 veckor efter avslutad behandling.

| Rum | Namn | IF 1 | IF 2 | IF 3 | Avföring |
|-----|----------|------|------|------|--------------------|
| 1 | Garbo | N | N | N | U.a. |
| 1 | Maja | + | N | + | U.a. |
| 1 | Zelda | N | N | N | U.a. |
| 2 | Nessie | N | N | N | Lösa korvar ibland |
| 2 | Maxi | N | N | N | U.a. |
| 2 | Fröja | N | N | N | U.a. |
| 3 | Mynta | N | N | + | U.a. |
| 3 | Nejliska | N | N | N | U.a. |
| 3 | Honung | N | N | N | U.a. |
| 3 | Märta | N | N | N | Lösa korvar ibland |
| 3 | Ruffa | N | N | + | U.a. |

| Rum | Namn | IF 1 | IF 2 | IF 3 | Avföring |
|-----|--------|------|------|------|------------------------------|
| 4 | Etna | N | N | N | U.a. |
| 4 | Tuva | N | N | - | U.a. |
| 5 | Doris | N | N | N | U.a. |
| 5 | Ebba | N | N | N | U.a. |
| 5 | Alma | N | N | N | U.a. |
| 5 | Siri | N | N | N | Lösa korvar ibland |
| 6 | Mårten | N | N | N | U.a. |
| 6 | Ramses | N | N | N | U.a. |
| 6 | Oskar | N | N | N | U.a. |
| 6 | Frasse | N | N | N | U.a. |
| 7 | Harry | N | N | N | Första avgång ua, sedan löst |
| 7 | Dante | N | - | N | Första avgång ua, sedan löst |
| 7 | Watson | + | + | N | Första avgång ua, sedan löst |
| 8 | Elsa | N | N | + | U.a. |
| 8 | Iris | N | N | N | U.a. |

+ = Visade förekomst av *Giardia*

N= Ingen förekomst av *Giardia*

11 veckor efter avslutad behandling med MTZ+FBZ var totalt 5/26 (19 %) hundar positiva för *Giardia*. Av de 76 proverna upptäcktes sju positiva prover. De med intermittent lösare avföring var negativa förutom en (Watson) och i övrigt var den kliniska bilden bättre. Resultatet liknar det fyra veckor efter avslutad behandling (se tabell 7) då också fem var positiva, men endast två (Maja och Elsa) var positiva vid båda tillfällena.

4.4. Klinisk effekt

4.4.1. Avföring under och efter behandling 1

Det fördes inget kontinuerligt protokoll över avföringen bland hundarna, men noterades då och då. Generellt ges en bild av att flera hundar hade lös till halvlös avföring både under och efter behandlingen. Det var inte någon klinisk förbättring av behandlingen med FBZ.

4.4.2. Avföring efter behandling 2

Generellt var avföringen mindre lös hos samtliga hundar. Enstaka hundar med tidigare kända gastrointestinala problem var fortfarande lite lösa ibland. I tabell 10 nedan finns en sammanställning med avföringsstatusen efter sista behandlingen. Som nämnt ovan (se stycke 4.3.4) var endast en hund (Watson) positiv som ibland hade lösare avföring.

4.5. Översiktsbild av behandlingsresultatet

Tabell 10. Översiktsbild över behandlingsresultatet av båda behandlingarna.

| Rum | Namn | Född | Kön | IF före FBZ | IF efter FBZ | IF efter MTZ+FBZ | Foder | Avföring |
|-----|----------|------|------------------------|-------------|--------------|------------------|---------------------|------------------------------|
| 1 | Garbo | 1704 | Tik | + | + | N | GI high fibre | U.a. |
| 1 | Maja | 1704 | Tik | + | - | + | GI high fibre | U.a. |
| 1 | Zelda | 1704 | Tik | + | - | N | GI high fibre | U.a. |
| 2 | Nessie | 0907 | Kastrerad tik | + | - | N | GI moderate calorie | Lösa korvar ibland |
| 2 | Maxi | 1008 | Tik | + | - | N | GI high fibre | U.a. |
| 2 | Fröja | 1712 | Tik | + | N | N | GI high fibre | U.a. |
| 3 | Mynta | 1009 | Tik | + | - | + | GI high fibre | U.a. |
| 3 | Nejliska | 1010 | Tik | + | - | N | GI high fibre | U.a. |
| 3 | Honung | 1010 | Tik | + | - | N | GI high fibre | U.a. |
| 3 | Märta | 1712 | Tik | N | - | N | GI moderate calorie | Lösa korvar ibland |
| 3 | Ruffa | 1712 | Tik | + | + | + | GI high fibre | U.a. |
| 4 | Etna | 1511 | Tik | N | - | N | GI high fibre | U.a. |
| 4 | Tuva | 1704 | Tik | N | - | N | GI high fibre | U.a. |
| 5 | Doris | 1711 | Tik | + | + | N | GI high fibre | U.a. |
| 5 | Ebba | 1711 | Tik | N | - | N | GI high fibre | U.a. |
| 5 | Alma | 1711 | Tik | N | - | N | GI high fibre | U.a. |
| 5 | Siri | 1712 | Tik | + | + | N | GI moderate calorie | Lösa korvar ibland |
| 6 | Mårten | 1010 | Kemiskt kastrerad hane | + | - | N | GI high fibre | U.a. |
| 6 | Ramses | 1302 | Kemiskt kastrerad hane | N | - | N | GI high fibre | U.a. |
| 6 | Oscar | 1804 | Hane | + | + | N | GI high fibre | U.a. |
| 6 | Frasse | 1804 | Hane | + | - | N | GI high fibre | U.a. |
| 7 | Harry | 1302 | Hane | N | N | N | GI high fibre | Första avgång ua, sedan löst |
| 7 | Dante | 1511 | Hane | N | - | N | GI high fibre | Första avgång ua, sedan löst |
| 7 | Watson | 1511 | Hane | N | - | + | GI high fibre | Första avgång ua, sedan löst |
| 8 | Elsa | 1704 | Tik | + | + | + | GI moderate calorie | U.a. |
| 8 | Iris | 1704 | Tik | + | - | N | GI high fibre | U.a. |

5. Diskussion

Behandling av *Giardia* med olika läkemedel i kombination med hygienåtgärder har studerats tidigare. Dock har man inte i några studier undersökt läkemedlets effekt genom daglig provtagning under behandlingen och därmed inte heller undersökt när och om parasiten elimineras. Med utgångspunkt i detta blev syftet med vår studie därför att studera effekten av FBZ under tio dagars pågående behandling samt under de efterföljande 14 dagarna. Den rekommenderade behandlingstiden är idag tre-fem dagar, men eftersom Saleh *et al.* (2016) visade goda behandlingsresultat av en tio dagars lång behandling på hundar under samma levnadsförhållanden som i denna studie så valde även vi att utöka behandlingstiden till tio dagar. Till följd av ett misslyckat första försök så studerades därefter en tio dagars kombinationsbehandling med FBZ och MTZ.

5.1. Tolkning av behandlingsresultatet med FBZ

Resultatet av den dagliga provtagningen visade att från dag åtta till tio i behandlingen var 9/9 hundar negativa för protozon, men redan dag ett efter avslutad behandling var 3/9 hundar åter positiva (se tabell 5). Eftersom majoriteten (8/9) visat förekomst av *Giardia* nio dagar efter avslutad behandling så fullföljdes inte den tänkta provtagningens längden (14 dagar efter avslutad behandling) då behandlingen ansågs misslyckad. Förutom att majoriteten av hundarna åter urskilde cystor så kunde vi inte se någon klinisk förbättring av första behandlingen. Att behandlingen inte var framgångsrik kan bero på otillräcklig effekt av FBZ på grund av varierande känslighet hos parasiten eller resistens, men det kan också röra sig om reinfektion eller en kombination av båda faktorerna. Det kan vidare bero på en bristande compliance, det vill säga att behandlingen inte har utförts enligt instruktioner, vilket kan leda till underdosering av läkemedlet (Argüello-García *et al.* 2020). Immunosuppression på grund av stress eller annan sjukdom kan också förklara återkommande cystutsöndring. Fietcher *et al.* (2012) anger dock i sin studie att reinfektion är en av de vanligaste orsakerna till misslyckad behandling.

Anledningen till den ofullständiga elimineringen av *Giardia* i vår studie vet vi inte säkert och orsaken kan dessutom variera mellan individerna. Det är inte troligt att hundarna som var positiva dag ett efter behandling återinfekterades, utan det berodde troligen på otillräcklig effekt av läkemedlet. Om det beror på en reducerad känslighet för läkemedlet vet vi inte säkert utan resistensbestämning. Prepatensperioden är normalt 4-16 dagar och cystor borde således inte utsöndras redan dagen efter behandlingen om den varit effektiv. För att säga att en behandling inte varit

effektiv måste avföring därför provtas inom fyra dagar efter avslutad behandling för att därefter kan reinfektion inte uteslutas.

För ett par av hundarna (Garbo och Siri) tycktes behandlingen ha varit effektiv då det hos dem inte påvisades några cystor från och med dag två i behandlingen till och med dag fem respektive nio efter avslutad behandling. Att cystor åter påvisades hos dessa hundarna kan tyda på en reinfektion, vilket inte var förvånande då övriga fortsatt positiva hundar troligen bidrog till återuppbyggnad av smittrycket. Inga cystor påvisades hos 5/9 hundar från dag två till och med hela efterföljande behandlingstid, men inte förrän på behandlingsperiodens sjunde dag var samtliga hundar negativa. Detta resultat kan tolkas som att FBZ hade full effekt mot *Giardia* först efter en veckas behandling. Resultatet i denna studie visar i enighet men andra liknande studier att hundar i grupp kan behöva en behandlingsperiod på upp mot sju-tio dagar istället för tre-fem dagar som rekommenderas.

5.2. Tolkning av behandlingsresultatet med FBZ+MTZ

Eftersom första behandlingen inte eliminerade *Giardia* från kolonin beslutades att behandla alla hundarna igen under sommaren i samband med en renovering av hundhuset. Behandlingen med FBZ kombinerades då med MTZ i tio dagar. Denna gång kontrollerades hundarna endast efter avslutad behandling och vi valde att provta samma nio hundar som vid första behandlingen. Vid andra behandlingen feldoserades FBZ under en kortare period vilket diskuteras i avsnitt 5.5.

Studiens resultat visade att samtliga nio hundar var negativa vid de två provtagningstillfällena strax efter att behandlingen hade avslutats (se tabell 6). Detta tyder på ett lyckat behandlingsresultat, men dock provtogs endast nio hundar vilket gör att man inte kan vara säker på att samtliga individer blev fria från *Giardia* under behandlingstiden. Fyra veckor efter avslutad behandling provtogs alla hundar i kolonin vid ett tillfälle och då var 5/26 åter positiva (se tabell 7). Resultaten visade att *G. duodenalis* återigen cirkulerade i hundkolonin och att ett antal hundar troligen hade återinfekterats. En ofullständig effekt av behandlingen kunde dock inte utslutas.

Uppföljande prover togs av de fem positiva hundarna sex och sju veckor efter avslutad behandling i syfte att skicka avföring för att molekylär analys. Förvånande nog var samtliga prover då återigen negativa (se tabell 8). Om det beror på intermittent utsöndring eller felaktig provtagningsteknik kan vi inte säkert veta. Vid provtagningen sex veckor efter behandling provtogs de fem hundarna tre dagar i följd, men all avföring poolades och analyserades som ett samlingsprov. Vid IFA används väldigt lite provtagningsmaterial och därmed finns det en risk att cystor inte fångas upp vid utstrykning av avföring med ett lågt cystantal. Vid provtagningen sju veckor efter behandlingen poolades tre dagars avföring individuellt. Om materialet inte blandats ordentligt så kan cystor ha missats även vid detta tillfälle. Resultaten vid provtagningen sex och sju veckor efter avslutad behandling berodde därför troligen på en låg förekomst av cystor, men vi kan inte säkert veta om infektionen läkt ut eller inte.

Vid det sista tillfället, elva veckor efter avslutad behandling undersöktes samtliga 26 hundar tre dagar i följd. Proverna analyserades enskilt för att undvika problemet som lyftes i texten ovan. Totalt hittades 7/76 positiva prov, fördelat på fem

olika hundar. *Giardia* hade vid det tillfället inte eliminerats, men hundarna var kliniskt bättre och prevalensen hade minskat till 19 % jämfört med 64 % vid studiens start.

Resultaten i denna studie tyder på att kombinationen av MTZ och FBZ hade en bättre effekt på giardiaurskiljningen och gav kliniskt friskare hundar än enbart FBZ. Det lyckade behandlingsresultatet kan dock även bero på andra faktorer som förändrades i samband med behandling nummer två och exempelvis byttes fodret till ett mer fiberrikt sådant. Tangtrongsup & Scorza (2010) anger att ett fiberrikt foder har en positiv effekt på tarmens mikrobiom hos hundar med kronisk diarré. En rubbad tarmflora främjar trofozoiternas möjlighet att kolonisera tarmen och ett fiberrikt foder kan därför försvåra vidhäftningen till enterocyterna. Detta är inte bevisat men det är en hypotes som kan förklara den kliniska förbättringen efter behandling nummer två. Tiden på året som behandlingen utfördes kan också påverka resultatet. Under första behandlingen i mars var vädret fuktigare och kallare än vid behandlingen som utfördes under sommaren. Den fuktiga och kalla miljön kan ha gynnat cystornas överlevnad. Vidare kan också de förbättrade förutsättningarna för en effektiv sanering vid behandlingsomgång två ha påverkat resultatet.

5.3. Miljöåtgärder

Saneringen och hygienåtgärderna var relativt lika under båda behandlingsomgångarna, men före och under delar av andra behandlingen var hundarna i andra rum nattetid, men hade samma rastgårdar. Mitt i andra behandlingen flyttade hundarna tillbaka till nyrenoverade rum som stått tomma under sommaren. Att lokalerna renoverats före sanering nummer två reducerade troligen *Giardia* från miljön mer effektivt än vid enbart sanering nummer ett. Gruset i rastgårdarna avlägsnades vid andra behandlingen vilket också möjliggjorde en bättre rengöring av utomhusmiljön. Dessvärre var betongplattorna i rastgårdarna ojämna och på vissa ställen ansamlades vatten, vilket är en gynnsam miljö för cystor. Något som försvårade möjligheten att minska smittrycket i denna studie var att hundarna inte var rumsrena, utan defekerade i rummen nattetid samt att de delade två större rastgårdar med gräs.

Hygienåtgärderna i denna studie var relativt lika dem i studien av Saleh *et al.* (2016), vilka inte heller inkluderade specifika skobyten. Deras hundar, liksom våra, användes dessutom i den normala undervisningsverksamheten under hela studiens gång. Betydligt striktare hygienåtgärder användes i studien av Fiechter *et al.* (2012). Deras saneringsprotokoll innefattade bland annat skobyten mellan varje rum, mindre tillgång till utomhusmiljöer samt sanering och schamponering två gånger under pågående behandlingsperiod. Förvånande nog lyckades Saleh *et al.* (2016) helt eliminera *Giardia* ur sin koloni, medan hundar återinfekterades i studien av Fiechter *et al.* (2012). Om det beror val av rengöringsmedel, årstid eller saneringsstrategi är svårt att bedöma. Möjligen hade rengöringsmedlet som Saleh *et al.* (2016) använde och som innehöll kvartära ammoniumföreningar en bättre effekt än klorin som användes i studien av Fiechter *et al.* (2012) och såpa som användes i vår studie.

Eftersom hundkolonin i vår studie återinfekterades, så har troligen *Giardia* överlevt i miljön trots både renovering och sanering. Möjligheterna för att totalt sanera utomhusmiljön var inte optimal och cystorna kan exempelvis ha överlevt om det

fanns kvarstående vatten efter regn på betongplattan. Emellertid är resultaten i denna studie ett tydligt bevis på hur svåra cystorna är att avdöda och i enighet med tidigare studier att reinfektion är en vanlig orsak till misslyckad behandling. För att fortsatt hålla smittrycket på en låg nivå behöver avföring plockas upp så fort som möjligt från utomhus- och inomhusmiljön. Vatten- och matskålar behöver diskas dagligen och vatten får inte bli stående på golven eller i utemiljön. Vid diarré-utbrott bör personalen använda specifika skor och kläder till varje rum samt alltid hålla en god handhygien. Ovan nämnda dagliga hygienåtgärder i kombination med en sanering i samband med behandling är alltid viktigt vid försök att eliminera en giardiainfektion. Särskilt viktigt är det för djur som hålls i grupp eller hos hundar med återkommande infektioner.

5.4. Övriga behandlingsalternativ

Tidigare har FBZ ansetts vara ett bra alternativ till behandling av hund med *Giardia*, men på senare tid har det framkommit ett antal fall där behandlingen inte varit lika framgångsrik. Det är dock ett säkert läkemedel och som även kan ges till valpar. MTZ och andra sidan är ett antibiotikum med större risk för biverkningar, men som potentiellt kan ha en bättre effekt mot *Giardia*. I denna studie kunde inga biverkningar ses av MTZ, men vår dosering var lägre än den som vanligtvis rekommenderas. FBZ i kombination med MTZ bör inte användas som rutinbehandling ur resistenssynpunkt, men kan vara tillämpligt hos hundar med återkommande infektioner eller på hundar i grupp. Ett fiberrikt foder och probiotika kan också tillföras som komplement till den medicinska behandlingen för att minska symptom. Dess inverkan på behandlingen och immunförsvaret finns det dock skilda meningar om. Det finns studier som visat att kombinationspreparat med febantel, pyrantel och prazikvantel är verksamt mot *Giardia* och preparat finns att tillgå på licens i Europa (Giangaspero *et al.* 2002; Montoya *et al.* 2008). Detta kombinationspreparat skulle därför tillämpas även i Sverige för behandling av giardiasis om FBZ och MTZ inte fungerar.

5.5. Diagnostik och felkällor

Alla proverna i denna studie analyserades med IFA, vilket är en enkel, lättlärd och tillförlitlig metod för att detektera cystor i avföringen. Metoden var fördelaktig i denna studie då den endast krävde en liten mängd avföring. Metoderna IFA och ZSCT gav helt likvärdiga resultat vid screeningen. För mig med lite tidigare erfarenhet upplevde IFA som en enklare metod för att detektera cystor eftersom de lyser starkt fluorescerande. Det positiva med ZSCT var dock att vi kunde utesluta förekomst av andra parasiter. I denna studie fanns det en risk för bias vid avläsningen av preparaten med ZSCT eftersom proverna redan hade analyserats med IFA. Vissa cystor hade ett lite annorlunda utseende än normalt, vilket gjorde vissa preparat var svåra att läsa av och gav osäkra resultat. Efter screeningen användes endast IFA vid analys av prover, detta på grund av praktiska skäl. Vidare har alltså ingen jämförelse av metoderna studerats.

I enlighet med tidigare kunskap visar denna studie hur viktigt det är med provmaterial från flera dagar i följd då parasiten utsöndras intermittent, vilket kan ses i tabell 5 och 9. Tas endast enstaka prover finns det en risk för negativt provresultat trots att hunden är infekterad. Vid ett lågt antal cystor i avföringen finns det en risk att cystorna missas om en stor mängd avföring blandas från en dag med mindre avföring från en annan dag i samma prov. Det är därför viktigt att försöka samla ungefär lika mycket avföring från varje dag och att vid analysen blanda provmaterialet noggrant.

Trots behandlingen med fyra gånger för hög FBZ-dos under några dagar sågs inga biverkningar, vilket bör bero på att FBZ har en mycket hög säkerhetsmarginal. Att hundarna sedan var utan FBZ en dag under behandlingen har troligtvis inte påverkat resultatet.

5.6. Resistens – en möjlig orsak till ofullständig effekt vid behandling

Att FBZ inte hade fullständig effekt mot *Giardia* vid första behandlingen kan bero på resistens hos parasiten. Idag finns inga studier om läkemedelsresistens hos *Giardia* på hund. Argüello-García *et al.* (2020) anger dock i sin studie att det förekommer resistens hos *Giardia* mot de vanligaste preparaten för behandling av *Giardia* hos människor (MTZ och albendazol, ABZ). ABZ är liksom FBZ en bensimidazol. Författarna anger att orsaken till utebliven effekt av behandlingen är multifaktoriell och beror både på värdfaktorer och parasitfaktorer. Parasitfaktorerna innefattar förutom resistens även reinfektion och hur känslig parasiten är mot läkemedlet. Vidare betonar de vikten av rätt användning läkemedlet. Resistens kan spridas vid felaktig dosering eller att behandlingen sätts in i onödan. Till följd av risken för resistens bör man därför inte behandla hundar utan kliniska symptom. Innan man säger att ett läkemedel inte är verksamt mot *Giardia* och tolkar det som resistens är det viktigt att utesluta övriga möjliga orsaker till utebliven effekt. Exempelvis måste miljön ha sanerats i samband med behandlingen för att undvika reinfektion. Om övriga möjliga orsaker till utebliven effekt uteslutits kan förändrad behandling i form av en högre dos alternativt en längre behandlingstid vara effektivt och bör provas. Det finns ett behov av studier på hund som undersöker om det föreligger en verklig resistens mot FBZ, men eftersom *Giardia* är svårödlade är sådana studier dessvärre praktiskt svåra att utföra.

5.7. Zoonos

Som tidigare diskuterats är risken för överföring mellan människor och djur låg vid god hygienstandard, men eftersom hundarna i denna studie dagligen är i nära kontakt med djurskötare och studenter så skickades ändå prover för molekylärbiologisk typning. Vid studiens slut hade vi inte fått svar på typningen och kunde således inte avfärda risken för smitta helt och hållet.

Slutsats

Giardiasis är en svårbehandlad infektion och framför allt utmanande när större grupper av djur hålls tillsammans. I denna studie var behandling med FBZ i tio dagar inte verksamt mot parasiten, men det är dock oklart om det beror på verklig resistens eller andra orsaker som nämns i diskussionen ovan. Studien visade även att behandling med FBZ i kombination med MTZ hade en bättre effekt på *Giardia* jämfört med enbart FBZ och att behandling med FBZ kan behöva vara upp mot sju-tio dagar för att ha full effekt hos en hel grupp hundar.

Sammanfattningsvis kan det vara svårt att eliminera *Giardia* hos hundar som lever i grupp, men med rätt behandling och utökade hygienrutiner så kan prevalensen minska och smittan dämpas till en sådan nivå att hundarna är kliniskt friska. Kombinationsbehandling eller användning av tillgängliga kombinationspreparat kan vara ett alternativ vid svårbehandlade fall av sjukdomen eller hundar i grupp. Därtill kan ett fiberrikt foder och probiotika administreras som komplement till den medicinska behandlingen för att minska symptom och det vore intressant att studera deras effekt även i framtida studier. Behandling ska inte utföras på friska hundar som utsöndrar parasiten eftersom den är att betrakta som en opportunistisk parasit och då det vidare kan leda till resistensutveckling. Symptom kan framkallas av exempelvis miljöförändringar, immunosuppression, stress, foderbyte eller annan orsak som påverkar tarmmikrobiomet och först när infektionen ger upphov till kliniska tecken så ska behandling sättas in.

Referenser

- Adam, R.D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 14 (3), ss. 447–475
- Akuffo, H., Linder, E., Ljungström, I. & Wahlgren, M. (2003). *Parasites of colder climates*. 1st. uppl. GB: Taylor & Francis.
- Argüello-García, R., Leitsch, D., Skinner-Adams, T. & Ortega-Pierres, M.G. (2020). Chapter Six - Drug resistance in *Giardia*: Mechanisms and alternative treatments for *Giardiasis*. I: Ortega-Pierres, M.G. (red.) *Advances in Parasitology*. Academic Press, ss. 201–282.
- Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G.L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R.E., Schiffrin, E.J. & von der Weid, T. (2003). Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *The Journal of Nutrition*, vol. 133 (4), ss. 1158–1162
- Benyacoub, J., Pérez, P.F., Rochat, F., Saudan, K.Y., Reuteler, G., Antille, N., Humen, M., De Antoni, G.L., Cavadini, C., Blum, S. & Schiffrin, E.J. (2005). *Enterococcus faecium* SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. *The Journal of Nutrition*, vol. 135 (5), ss. 1171–1176
- Bouزيد, M., Halai, K., Jeffreys, D. & Hunter, P.R. (2015). The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Veterinary Parasitology*, vol. 207 (3–4), ss. 181–202
- Bowman, D.D. & Lucio-Forster, A. (2010). Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. *Experimental Parasitology*, vol. 124 (1), ss. 121–127 (*Cryptosporidium* and other waterborne protozoa)
- Cheung, W., Russo, C., Maher, S., Malik, R. & Šlapeta, J. (2019). Successful use of secnidazole to manage a giardiasis outbreak in a shelter. *Veterinary Parasitology*, vol. 274, s. 108911
- Conboy, G. (1997). *Giardia*. *The Canadian Veterinary Journal*, vol. 38 (4), ss. 245–247
- Cooper, M.A., Adam, R.D., Worobey, M. & Sterling, C.R. (2007). Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Current Biology*, vol. 17 (22), ss. 1984–1988
- Dobell, C. (1920). The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, vol. 13 (Sect Hist Med), ss. 1–15
- ESCCAP (2018). *Guidelines | GL6: Control of Intestinal Protozoa in Dogs and Cats*. Tillgänglig: <https://www.esccap.org/guidelines/gl6/> [2020-10-14]
- FASS (2020a) Axilur® vet. - FASS Djurläkemedel. Tillgänglig: <https://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=19780414000039> [2020-11-10]

- FASS (2020b) Flagyl® - FASS Vårdpersonal. Tillgänglig: <https://www.fass.se/LIF/product?userType=0&nplId=19631231000064> [2020-11-10]
- Fenimore, A., Martin, L. & Lappin, M.R. (2017). Evaluation of metronidazole with and without *Enterococcus faecium* SF68 in shelter dogs With diarrhea. *Topics in Companion Animal Medicine*, vol. 32 (3), ss. 100–103 (SI: Oral disease and Gastroenterology: Focus on Probiotics)
- Fiechter, R., Deplazes, P. & Schnyder, M. (2012). Control of *Giardia* infections with ronidazole and intensive hygiene management in a dog kennel. *Veterinary Parasitology*, vol. 187 (1–2), ss. 93–98
- Florén, A. (2008). *Förekomst av Giardia i symtomfria valpkullar*. (Examensarbete 2008:36) Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet. Tillgänglig: <https://stud.epsilon.slu.se/11429/> [2020-10-20]
- Folkhälsomyndigheten (2020). *Sjukdomsinformation om giardiainfektion*. Tillgänglig: <http://www.folkhalsomyndigheten.se/smittykydd-beredskap/smittsamma-sjukdomar/giardiainfektion>
- Giangaspero, A., Traldi, G., Paoletti, B., Traversa, D. & Bianciardi, P. (2002). Efficacy of pyrantel embonate, febantel and praziquantel against *Giardia* species in naturally infected adult dogs. *The Veterinary Record*, vol. 150 (6), ss. 184–186
- IDEXX (2020) *SNAP Giardia Test. Find and treat more Giardia cases* Tillgänglig: <https://www.idexx.se/sv/veterinary/snap-tests/snap-giardia-test/> [2020-11-26]
- Kirkpatrick, C.E. (1987). Giardiasis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, vol. 17 (6), ss. 1377–1387
- Lapage, G. (1968). *Veterinary Parasitology*. 2nd. uppl. Edinburgh and London: Oliver & Boyd.
- Läkemedelsverket (2014-11). *Läkemedel vid ekto- och endoparasitinfektioner hos hund och katt – behandlingsrekommendation* | Läkemedelsverket / Swedish Medical Products Agency. Tillgänglig: </sv/behandling-och-forskrivning/behandlingsrekommendationer/lakemedel-vid-ekto--och-endoparasitinfektioner-hos-hund-och-katt--behandlingsrekommendation> [2020-10-08]
- Montoya, A., Dado, D., Mateo, M., Espinosa, C. & Miró, G. (2008). Efficacy of Drontal® Flavour Plus (50 mg praziquantel, 144 mg pyrantel embonate, 150 mg febantel per tablet) against *Giardia* spp in naturally infected dogs. *Parasitology Research*, vol. 103 (5), ss. 1141–1144
- Pepe, P., Ianniello, D., Alves, L.C., Morgoglione, M.E., Maurelli, M.P., Bosco, A., Cringoli, G. & Rinaldi, L. (2019). Comparative cost-effectiveness of immunoassays and FLOTAC for diagnosing *Giardia* spp. infection in dogs. *Parasites & Vectors*, vol. 12 (1), s. 158
- Raza, A., Rand, J., Qamar, A.G., Jabbar, A. & Kopp, S. (2018). Gastrointestinal parasites in shelter dogs: occurrence, pathology, treatment and risk to shelter workers. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, vol. 8 (7). DOI: <https://doi.org/10.3390/ani8070108>
- Rehbein, S., Klotz, C., Ignatius, R., Müller, E., Aebischer, A. & Kohn, B. (2019). *Giardia duodenalis* in small animals and their owners in Germany: A pilot study. *Zoonoses and Public Health*, vol. 66 (1), ss. 117–124
- Saleh, M.N., Gilley, A.D., Byrnes, M.K. & Zajac, A.M. (2016). Development and evaluation of a protocol for control of *Giardia duodenalis* in a colony of group-housed dogs

- at a veterinary medical college. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 249 (6), ss. 644–649 American Veterinary Medical Association.
- Štrkolcová, G., Maďar, M., Hinney, B., Goldová, M., Mojžišová, J. & Halánová, M. (2015). Dog's genotype of *Giardia duodenalis* in human: first evidence in Europe. *Acta Parasitologica*, vol. 60 (4), ss. 796–799
- Tangtrongsup, S. & Scorza, V. (2010). Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp infections in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, vol. 25 (3), ss. 155–162 (Protozoal Diseases in Small Animals)
- Taylor, M.A., Coop, R.L. & Wall, R.L. (2013). *Veterinary Parasitology*. 3rd Edition. Wiley.
- Thompson, R.C.A. (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology*, vol. 126 (1), ss. 15–35 (Waterborne Zoonotic Parasites)
- Thompson, R.C.A., Reynoldson, J.A. & Mendis, A.H.W. (1993). *Giardia* and Giardiasis. I: Baker, J.R. & Muller, R. (red.) *Advances in Parasitology*. Academic Press, ss. 71–160
- Tysnes, K.R., Skancke, E. & Robertson, L.J. (2014). Subclinical *Giardia* in dogs: a veterinary conundrum relevant to human infection. *Trends in Parasitology*, vol. 30 (11), ss. 520–527
- Uchôa, F.F. de M., Sudré, A.P., Campos, S.D.E. & Almosny, N.R.P. (2018). Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 145, ss. 73–78
- Uehlinger, F.D., Naqvi, S.A., Greenwood, S.J., McClure, J.T., Conboy, G., O'Handley, R. & Barkema, H.W. (2017). Comparison of five diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in fecal samples from young dogs. *Veterinary Parasitology*, vol. 244, ss. 91–96
- Uiterwijk, M., Nijse, R., Kooyman, F.N.J., Wagenaar, J.A., Mughini-Gras, L. & Ploeger, H.W. (2019). Host factors associated with *Giardia duodenalis* infection in dogs across multiple diagnostic tests. *Parasites & Vectors*, vol. 12. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3810-3>
- WHO Expert Committee on Parasitic W.E.C. on P. & World Health Organisation (1979). *Parasitic zoonoses : report of a WHO expert committee, with the participation of FAO [meeting held in Geneva from 14 to 20 November 1978]*. World Health Organization. Tillgänglig: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41353> [2020-11-09]
- Xiao, L. & Fayer, R. (2008). Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, vol. 38 (11), ss. 1239–1255

Populärvetenskaplig sammanfattning

Bakgrund

Giardia duodenalis (synonymt med *G. intestinalis* och *G. lamblia*) är en encellig parasit som lever och förökar sig i främre tunntarmen. *G. duodenalis* är en vanlig parasit hos hund och cirka 15 % av alla hundar i världen bär på parasiten. Hos valpar samt hos gruppållna hundar är prevalensen högre och en svensk studie visade att runt 30 % av symptomfria valpar i Sverige bär på parasiten. Många hundar som bär på parasiten visar inga symptom alls, men infektionen kan vid bland annat försämrat immunförsvar på grund av annan infektion eller stress och nutritionsförändringar bryta ut och ge upphov till diarré. Vid symptom ger vanligtvis infektionen en långvarig diarré som kommer och går, men kan i vissa även ge symptom i form av akut diarré. I allvarliga fall kan diarrén leda till viktminskning.

Giardia duodenalis delas upp i s.k. genotyper eller assemblage vilka baseras på molekylärbiologiska skillnader i DNAt. Hund infekteras vanligtvis av genotyp C och D medan människa vanligtvis infekteras av genotyp A och B (se tabell 1). Hund kan dock också infekteras av genotyp A och B, vilket innebär att de finns en risk för smitta mellan hund och människa. Hur stor denna risk är vet vi fortfarande inte, men studier tyder på att det är relativt ovanligt under de levnadsförhållanden och den hygienstandard som vi har i Sverige.

Giardia finns i två stadier: ett rörligt stadium som kallas för trofozoit och ett orörligt som kallas för cysta. Trofozoiterna finns i tarmen där de fäster till cellerna i tarmslemhinnan och förökas. Dess påverkan på tarmväggen och tarmfloran kan ge upphov till diarré. Trofozoiterna överlever endast en kort stund utanför kroppen, så när trofozoiten släpper från tarmväggen och den passerar vidare i tarmen kapslar de in sig och bildar en cysta. Cystan är det smittsamma stadiet och de är väldigt tåliga. I våta och kalla miljöer kan de överleva flera månader utanför kroppen. Om cystan kommer in i kroppen igen via munnen så utvecklas den återigen till trofozoit. Ett kortfattat flödesschema av livscykeln ses på figur 1.

För att diagnostisera *Giardia* behövs avföringsprov från flera dagar i följd (vanligtvis tre) då cystorna inte alltid finns i avföringen trots infektion. Det finns flera sätt att finna *Giardia* i avföringsprov, men en vanlig metod som används på Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA, Uppsala) och som använts i denna studie är immunofluorescens (IFA).

Det finns idag ingen given behandling av *Giardia* på hund i Sverige, men Läke-medelsverket rekommenderar att behandla hundar som visar symptom på *Giardia* och som har samtidiga positiva avföringsprover med fenbendazol 50 mg/kg en gång dagligen i tre-fem dagar. De rekommenderar även läkemedlet metronidazol 25 mg/kg kroppsvikt två gånger dagligen i fem-sju dagar. Metronidazol används för att behandla *Giardia*-infektion på människor. Fenbendazol är ett säkert läkemedel

och kan ges till valpar, medan metronidazol medför större risk för biverkningar. Probiotika och ett fiberrikt foder kan enligt vissa studier vara ett bra komplement till behandlingen för att minska kliniska symptom. Eftersom cystorna är väldigt tåliga i miljön och kan överleva flera månader utanför kroppen så finns det en stor risk att hundarna återinfekteras. Sanering bör därför ske i samband med behandling och det innebär att mekaniskt skrubba golv, diska mat- och vattenskålar, tvätta textilier och regelbundet plocka upp avföring. Eftersom cystorna kan fastna i pälsen så bör hunden också schamponeras under behandlingen.

Studieupplägg och resultat

Studien omfattade 28 vuxna beaglehundar som ägs av Sveriges lantbruksuniversitet (SLU, Ultuna, Uppsala), av vilka några få uppvisade återkommande långvarig diarré. Avföringsproverna som togs visade förekomst av *G. duodenalis* i ett av hundrummen. Syftet med studien var att studera resultatet av läkemedelsbehandling i kombination med intensiva hygienåtgärder hos en naturligt infekterad hundpopulation. I början av denna studie kontrollerades samtliga hundar för alla mag-tarmparasiter genom en metod som heter zinksulfatflotation. Då upptäcktes *Giardia* hos 18/28 (64 %) hundar men inga andra parasiter hittades.

Alla hundar behandlades med fenbendazol (50 mg/kg en gång dagligen) i tio dagar och miljön sanerades och hundarna schamponerades mitt i behandlingen. Nio utvalda hundar provtogs dagligen under hela behandlingen samt elva dagar efteråt. Resultatet visade att 9/9 hundar var negativa dag åtta-tio i behandlingen, men dagen efter avslutad behandling var två hundar positiva igen. Nio dagar efter avslutad behandling hade 8/9 hundar testats positivt igen och behandlingen ansågs misslyckad. Resultaten visade att fenbendazol inte hade fullständig effekt mot *Giardia* på hela gruppen, vilket ledde till en återuppbyggnad av smittrycket. Ett antal hundar hade dessutom fortfarande återkommande diarré efter avslutad behandling.

Eftersom första behandlingen misslyckades utfördes en andra behandlingsomgång flera månader senare. Då behandlades samtliga hundar med fenbendazol (50 mg/kg en gång dagligen) i kombination med metronidazol (15 mg/kg två gånger dagligen) i tio dagar. Liknande hygienåtgärder som vid första behandlingen utfördes. Under sommaren ändrades hundarnas foder till ett mer fiberrikt sådant och gruset i rastgårdarna hade avlägsnats för att förenkla rengöring. Samma nio utvalda hundar provtogs vid två tillfällen strax efter avslutad behandling och resultatet visade på ett lyckat behandlingsresultat då ingen förekomst av *Giardia* hittades i avföringen. Samtliga hundar provtogs fyra veckor respektive elva veckor efter avslutad behandling vid ett tillfälle. Resultaten visade att 5/26 (19 %) hundar återigen var positiva för *Giardia*. Efter andra behandlingen var dock samtliga hundar kliniskt bättre då de hade mindre lös avföring. *Giardia* lyckades inte elimineras från gruppen men prevalensen hade minskat drastiskt.

Diskussion och slutsats

Denna studie visade hur svårt det kan vara att fullständigt bli av med *Giardia*, framför allt hos hundar som lever i en grupp. Studiens resultat visade att fenbendazol inte hade fullständig effekt när det gavs enligt den rekommenderade dosen trots en förlängd behandlingstid. Inte förrän på behandlingsperiodens sjunde dag var alla

hundar negativa. Det innebär att dagens rekommendation på tre-fem dagars behandling kan vara för kort. Resultatet i denna studie visar i enighet med andra liknande studier att hundar i grupp och svårbehandlade fall kan behöva en behandlingsperiod på sju-tio dagar. Efter första behandlingsomgången hade några hundar positiva avföringsprover direkt efter avslutad behandling och blev troligen aldrig helt fria från parasiten trots behandling. Efter den första behandlingsomgången kvarstod dessutom problemet med återkommande diarréer. Att fenbendazol inte var tillräckligt effektivt mot *Giardia* kan bero på flera orsaker hos värdjuret såsom försämrat immunförsvar, att kroppen inte tar hand om läkemedlet på ett normalt sätt samt felaktig läkemedelsdos. Det kan också bero på att parasiten har minskad känslighet för läkemedlet eller är resistent. Vilket som var orsaken i vår studie kan vi inte säkert veta. Vid andra behandlingen när fenbendazol användes i kombination med metronidazol i 10 dagar sågs däremot en klinisk förbättring på samtliga hundar. Det bekräftades också med negativa avföringsprover. Att infektionen sedan kom tillbaka berodde i det fallet troligen på en återsmitta från miljön. Detta bevisar att det kan vara svårt att bli av med de smittspridande cystorna trots intensivt saneringsarbete. Före studien var 64 % av hundarna positiva för *Giardia* och vid våra sista provtagningar var 19 % av hundarna positiva för *Giardia*. Den cirkulerande smittan hade således minskat men inte helt försvunnit.

Sammanfattningsvis är det som nämnt svårt att bli av med *Giardia*, framför allt hos hundar som lever i grupp. Med rätt behandling och hygienåtgärder kan dock smittan dämpas till en sådan nivå att hundarna blir kliniskt friska. Behandling ska inte utföras på hundar som inte visar några symptom trots att de har positiva avföringsprover eftersom *Giardia* anses kunna finnas i magtarmkanalen utan att orsaka problem. Vid annan sjukdom, stress, foderbyte eller annan orsak som påverkar immunförsvaret eller den normala tarmfloran kan infektionen bryta ut och ge kliniska tecken och då ska behandling återigen sättas in.

Tack

Jag först och främst rikta ett stort tack till mina handledare Giulio Grandi, Patricia Hedenqvist och Eva Osterman-Lind, som har uppmuntrat mig och varit otroligt hjälpsamma under arbetets gång med både den praktiska och den skriftliga delen. Särskilt vill jag tacka Patricia som har styrt upp behandling av hundar och samordnat sanering av hundstallarna samt assisterat mig vid provtagning. Sedan vill jag tacka personalen på SLU för all hjälp vid provtagningen och det fantastiska arbetet bakom behandling av hundar och sanering av lokaler. Jag vill tacka SVA som har tillhandahållit material och instrument till analyserna. Slutligen vill jag också tacka personalen på SVA som har tagit sig tid att stötta mig vid analysering av prover och i synnerhet Debora Perissinotto.