

Jussi Taskinen

***Giardia* ja *Cryptosporidiumin* havaitseminen
lehtivihanneksista**

Opinnäytetyö

Kevät 2016

SeAMK Elintarvike ja maatalous

Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

SeAMK 

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: SeAMK Elintarvike ja maatalous

Tutkinto-ohjelma: Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Yleinen elintarviketekniikka

Tekijä: Jussi Taskinen

Työn nimi: *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* havaitseminen lehtivihanneksista

Ohjaaja: Matti-Pekka Pasto

Vuosi: 2016

Sivumäärä: 38

Liitteiden lukumäärä: 0

Opinnäytetyön aiheena oli menetelmä *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* havaitsemisesta lehtivihanneksista. Opinnäytetyön toimeksiantajana oli Helsingissä sijaitseva laboratorio Metropolilab Oy, jonka sisäinen menetelmä *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* havaitsemisesta haluttiin optimoida ja validoida. Opinnäytetyön lähtökohdiana oli standardi ISO 18744: Microbiology of the food chain – Detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh leafy green vegetables and berry fruits.

Optimointi suoritettiin tutkimalla analyysin kriittisiä vaiheita ja muuttamalla sen yksityiskohtia, jolloin analyysin saantoa saatiin parannettua. Validointi suoritettiin tutkimalla menetelmän toimivuutta validointisuureiden avulla, eli tekemällä testauksia menetelmän heikkouksien selvittämiseksi.

Opinnäytetyön tuloksena menetelmä saatiin optimoitua, mikä lisäsi sen luotettavuutta. Optimoinnin pohjalta kirjoitettiin uusi työohje. Menetelmän validointi lehtivihanneksille todettiin onnistuneeksi validointisuureiden tulosten perusteella.

Avainsanat: *Giardia*, *Cryptosporidium*, validointi

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Faculty: School of Food and agriculture

Degree programme: Biotechnology and food processing

Specialisation: Food Technology

Author: Jussi Taskinen

Title of thesis: Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fresh leafy green vegetables

Supervisor: Matti-Pekka Pasto

Year: 2016

Number of pages: 38

Number of appendices: 0

The subject of this thesis was the method of detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in leafy green vegetables. The principal of this thesis was a laboratory situated in Helsinki called MetropoliLab Oy, whose internal method of detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* needed to be optimized and validated. The basis for this thesis was the ISO standard ISO 18744: Microbiology of the food chain – Detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh leafy green vegetables and berry fruits.

The optimization was performed by studying the critical stages of the analysis and by changing its details in order to improve its recovery efficiencies. The validation was performed by inspecting the functionality of the method using validation attributes, or in other words by performing a series of tests in order to find out the method's weaknesses.

As a result of this thesis, the method was optimized; which increased its dependability. A new working instruction was written based on the optimization. The validation of the new method for leafy green vegetables was found to be effective based on the results of a series of tests.

Keywords: *Giardia*, *Cryptosporidium*, validation

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ.....	4
Kuvio- ja taulukkoluetelo.....	6
Käytetyt termit ja lyhenteet	7
1 JOHDANTO	8
2 <i>GIARDIA</i>	9
2.1 <i>Giardia</i> -alkueläin	9
2.2 <i>Giardian</i> elinkierto	10
2.3 <i>Giardia</i> elintarvikkeissa	10
2.4 Giardiaasi.....	11
3 <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	13
3.1 <i>Cryptosporidium</i> -alkueläin	13
3.2 <i>Cryptosporidiumin</i> elinkierto.....	14
3.3 <i>Cryptosporidium</i> elintarvikkeissa.....	15
3.4 Kryptosporidioosi	16
4 ALKUELÄINTEN MÄÄRITYSMENETELMÄT	17
4.1 IMS	17
4.2 PCR	18
5 MENETELMÄN ULKOINEN LAADUNVARMENNUS	20
6 MIKROBIOLOGISEN MENETELMÄN VALIDOINTI	22
6.1 Validointi	22
6.2 Mikrobiologisiin menetelmiin liittyvä epävarmuus.....	22
6.3 Validointiin liittyviä suureita	23
7 TYÖN SUORITUS.....	25
7.1 Menetelmän optimointi.....	25
7.2 Menetelmän validointi	26
7.2.1 Oikeellisuus	26
7.2.2 Täsmällisyys	28

7.2.3 Määrittäysraja	30
7.2.4 Spesifisyys	30
7.2.5 Lineaarisuus	30
7.2.6 Laskennan toistotarkkuus	32
8 JOHTOPÄÄTÖKSET	34
LÄHTEET	36

Kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuvio 1. <i>Giardia</i> lineaarisuus.	32
Kuvio 2. <i>Cryptosporidiumin</i> lineaarisuus.	32
Taulukko 1. <i>Giardia</i> -lajit ja niiden isännät.	9
Taulukko 2. <i>Cryptosporidium</i> -lajit ja niiden isännät.....	13
Taulukko 3. Virhepositiivisuus ja virhenegatiivisuus.....	28
Taulukko 4. Toistettavuus.	29
Taulukko 5. Uusittavuus.....	29
Taulukko 6. Määritysraja.	30
Taulukko 7. Lineaarisuus.	31
Taulukko 8. Laskennan toistotarkkuus.	33

Käytetyt termit ja lyhenteet

DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
FITC	Fluorescein isothiocyanate
IMS	Immunomagneettinen separaatio
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymeraasiketjureaktio

1 JOHDANTO

Giardia ja *Cryptosporidium* ovat loiseläimiä joita esiintyy kaikkialla maailmassa, erityisesti vesistöissä. Suolistoon päästessään ne aiheuttavat ihmisille ja eläimille suolistosairauksia. *G. duodenalis* (synonyymeja *G. lamblia* ja *G. intestinalis*) aiheuttaa ihmiselle giardiaasin ja *C. hominis* ja *C. parvum* kryptosporidioosin. Alkueläimillä on kaksi muotoa. Suolistossa ne esiintyvät infektiota aiheuttavassa muodossa ja sen ulkopuolella ympäristössä jopa useita kuukausia kestävässä (oo)kystamuodossa. (Evira 2010, 136–149.)

MetropoliLab Oy on Helsingissä sijaitseva Helsingin, Espoon, Vantaan ja Kauniaisien omistama laboratorioalan yritys, jonka asiakkaina on virastoja, yrityksiä ja yksityishenkilöitä. Laboratorion palveluihin kuuluvat elintarvike-, vesi- ja ympäristöanalyysit. Näytteitä tutkitaan mikrobiologisesti, kemiallisesti ja fysikaalisesti. Tavanomaisten mikrobiologisten analyysien lisäksi laboratorio suorittaa myös erikoisanalytiikkaa, kuten *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* havaitsemista elintarvike- ja vesinäytteistä. Analyysi on käytössä Suomessa kahdessa laboratoriossa ja Pohjoismaissa yhteensä vain muutamassa (Jacobsson 2014, 7).

Elintarvikenäytteistä suoritettavan kyseisten alkueläinten analyysin saantoa haluttiin parantaa, ja referenssimenetelmäksi vaihtaa uusi, kansainvälinen ISO 18744 -standardi. Saannon parantamiseksi menetelmä optimoitiin, eli sen heikkoudet selvitettiin ja korjattiin, ja kriittiset vaiheet otettiin huomioon. Muutokset kirjattiin ylösuuteen työohjeeseen. Uuden, päivitetyn työohjeen avulla suoritettiin validointi, joka kertoi menetelmän toimivuudesta. Validoinnissa menetelmää arvioitiin suureiden avulla, joita olivat muun muassa oikeellisuus, lineaarisuus ja spesifisyys. Suureiden testaamiseksi järjestettiin kokeita, joiden tuloksia verrattiin kirjallisuudesta saattuihin lähteisiin.

Opinnäytetyö koostuu teoriaosuudesta ja käytännön osuudesta. Teoriaosuudessa esitellään alkueläimet, niiden elinkierto, elintarvikkeiden rooli alkueläinten leviämisessä ja niiden aiheuttamat taudit. Lisäksi kerrotaan alkueläinten erilaisista määrittämismenetelmistä, pätevyyskokeesta johon MetropoliLab osallistuu, ja validoinnin teoriasta. Käytännön osuudessa kerrotaan suoritettujen optimoinnin ja validoinnin vaiheista.

2 GIARDIA

2.1 *Giardia*-alkueläin

Giardia on suolistoloinen, jota esiintyy kaikissa maanosissa, erityisesti kuumilla subtrooppisilla ja trooppisilla alueilla. *Giardia* leviää isännän ulosteeseen erittyvien kystien avulla. Ihmiselle *Giardia* aiheuttaa taudin nimeltä giardiaasi. Alkueläintä esiintyy sekä ihmisten että eläinten suolistoissa ja sitä on eristetty yhteensä 40 eri eläinlajista. (Evira 2010, 149.) *Giardia*-lajit jaotellaan niiden tartuttavien isäntien mukaan. Ainoastaan *G. duodenalis* ja *G. enterica* tarttuvat ihmiseen (Taulukko 1).

Taulukko 1. *Giardia*-lajit ja niiden isännät (Lujan & Svärd 2011).

Laji	Isäntä
<i>G. duodenalis</i> (synonyymeja <i>G. lamblia</i> ja <i>G. intestinalis</i>)	Ihmiset, kädelliset, koirat, kissat, jyrsijät, karja
<i>G. agilis</i>	Sammakkoeläimet
<i>G. muris</i>	Jyrsijät
<i>G. ardeae</i>	Linnut
<i>G. psittaci</i>	Linnut
<i>G. microti</i>	Jyrsijät
<i>G. enterica</i>	Ihmiset, kädelliset, koirat
<i>G. canis</i>	Koirat
<i>G. cati</i>	Kissat
<i>G. bovis</i>	Karja, sorkkaeläimet
<i>G. simondi</i>	Rotat

Giardian löysi ensimmäistä kertaa Antonie van Leeuwenhoek vuonna 1681. Alkueläimelle annettiin nimi *Giardia lamblia* vuonna 1915 kunnioittaen tutkijoita Vilem Dusan Lambl ja Alfred Giard. Vaikka *Giardia* oli ensimmäinen löydetty alkueläin, sen rooli patogeenisenä organismina tunnustettiin vasta 1970-luvulla suurien epidemioiden takia. (Nazer 2016a.)

G. duodenalis esiintyy kahtena eri muotona: vegetatiivisena trofotsoittimuotona ja kystana. Trofotsoiitit ovat pisaran muotoisia ja kooltaan 9–20 µm x 5–15 µm. Niillä on kaksi tumaa, kahdeksan flagellaa ja tarttumalevy, joilla ne tarttuvat isännän ohutsuolen limakalvoon. Kystat ovat ovaalin muotoisia ja kooltaan 8–18 µm x 7–10 µm. (Robertson 2013, 2.) Kystan ulkokuori kestää hyvin ympäristöä ja sen on osoitettu selviävän kuukausia kosteissa olosuhteissa. Kystat selviävät vedessä paremmin matalassa lämpötilassa. Ne voivat selvitä 77 päivää 8 °C:ssa mutta vain neljä päivää 37 °C:ssa. Kystat inaktivoituvat lämmitettäessä 10 minuutiksi 60–70 °C:een, jäädytettäessä, desinfektiossa tai suodatuksessa. (Ministry for Primary Industries 2001, 1.)

2.2 *Giardian* elinkierto

Giardian elinkierto tapahtuu trofotsoiitti- ja kystavaiheen avulla. Tartunta tapahtuu, kun ruoansulatusjärjestelmään joutuu kystia ulosteen, tai saastuneen ruoan tai veden välityksellä. Ohutsuolessa tapahtuu ekskystaatio, jolloin jokainen kysta tuottaa kaksi trofotsoiittia. Trofotsoiitit lisääntyvät suvuttomasti jakautumalla, ja kiinnittyvät ohutsuolen limakalvoon. Trofotsoiitit muuttuvat kystamuotoon siirtyessään eteenpäin suolistossa ja erittyvät ulosteen mukana ulos. (Robertson 2013, 2.)

2.3 *Giardia* elintarvikkeissa

Ruoan avulla levinneitä *Giardia*-epidemioita on perusteellisesti dokumentoitu vain yhdeksän kappaletta, ja ne vaikuttivat noin 200 ihmiseen. Dokumenteissa on selvitetty välittäjäelintarvikkeet, kontaminaation lähteet ja tapausten lukumäärät. Lisäksi 16 epidemiaa on listattu rekisteriin, jota ylläpitää Center for Disease Control and Prevention (CDC). Rekisterin tapauksissa välittäjäelintarvikkeita ei ole listattu,

eikä tapauksia ole vertaisarvioitu tieteellisesti. Dokumentoitujen ja CDC:n rekisterin epidemioiden perusteella voidaan huomata, että hyvin monenlaiset elintarvikkeet voivat toimia giardiaasin välittäjäelintarvikkeina. (Robertson 2013, 13.)

Koska kystat inaktivoituvat lämpökäsittelyssä ja kuivauksen aikana, välittäjäelintarvikkeina toimivat usein elintarvikkeet, jotka ovat kosteita, tai nautitaan raakana tai kevyesti kypsennettyinä. Todennäköisimpinä välittäjäelintarvikkeina pidetään vihanneksia, hedelmiä, simpukoita ja maitotuotteita. Välittäjäelintarvikkeina on todettu toimineen myös vähemmän ilmeisiä elintarvikkeita, kuten lammasteitto ja jouluvanukas. Ruoan käsittelijää voidaan pitää todennäköisimpänä ruoan saastuttajana, mutta ruoka voi saastua milloin tahansa viljelyn ja nauttimisen aikana. (Robertson 2013, 14–16.) Ruoka saattaa saastua tartunnan kantajan ulosteesta huonoissa hygieniaoiloissa, tai saastuneen kastelu-, huuhtelu- tai talousveden välityksellä. Ihminen voi saada tartunnan syömällä elintarvikkeita, jotka ovat saastuneet, tai juomalla saastunutta juomavettä. Ihminen voi myös saada suoran tartunnan kantajan ulosteesta huonon käsihygienian seurauksena. Tartunta leviää erittäin tehokkaasti ulosteen välityksellä, sillä tartuntakykyisiä kystia voi olla ulosteessa 1 000 000–900 000 000 kpl/g. (Evira 2010, 151–152.)

Riskikohdat elintarvikkeen valmistuksen ja nauttimisen välillä kontaminaation kannalta ovat alkutuotanto, teurastus, prosessointi ja ruoanvalmistus. Muut vaiheet, kuten pakkaaminen, varastointi, kuljetus ja vähittäismyynti, eivät sisällä huomattavaa kontaminaatoriskiä. Alkutuotannossa riskiä voidaan vähentää puhdistamalla talousvedeksi tarkoitettu raakavesi riittävästi ja huomioimalla puhdistamolietteen ja lietevalmisteiden käyttöön liittyvät riskit. Teurastuksessa ja prosessoinnissa tulee kiinnittää huomiota veden laatuun. Ruoanvalmistuksessa kontaminaatoriskiä pienennetään hyvällä käsihygienialla, puhtaan veden käytöllä ja estämällä ristisaastuminen. (Evira 2010, 152.)

2.4 Giardiaasi

G. duodenalis -alkueläintä esiintyy maailmanlaajuisesti, ja se on tunnetuin ihmisissä elävä suolistoparasiitti. Giardiaasitapauksia tulee ilmi vuosittain 250 miljoonaa. Giardiaasi on yleinen erityisesti kehitysmaissa, joissa jopa 70 % kouluikäisistä

saattaa sairastaa sitä. (Robertson 2013, 2.) Ihminen saa tartunnan useimmiten talousveden tai elintarvikkejään välityksellä. USA:ssa on arvioitu, että noin 60 % *giardian* aiheuttamista tartunnoista on vesivälitteisiä. Myös saastunut ruoka levittää tautia, jolloin tartunnan lähde on ollut ruoan valmistaja, joka on kantanut oireetonta giardiaasia. (Evira 2010, 151.) Terveystieteiden tutkimuskeskuksen (THL) mukaan Suomessa vuosina 1995–2015 esiintyi 221–427 giardiaasitapausta vuositteittäin (THL 2016).

Giardiaasin oireet ilmenevät 1–75 vuorokauden kuluttua tartunnan saamisesta, yleensä noin 6–15 vuorokaudessa. Kystia erittyy ulosteeseen noin 12–19 vuorokauden kuluttua tartunnan saamisesta. Giardiaasin voi saada hyvin pienestä määrästä kystia, jopa alle kymmenestä. (Evira 2010, 150.) Oireita ovat ripuli, ilmavaihdot, vatsakrampit, pahoinvointi, oksentelu ja nestehukka. Vähemmän yleisiä oireita ovat kutiseva iho, ihottuma ja silmien ja nivelien turvotus. Giardiaasi saattaa aiheuttaa painonlaskua ja rasvan, laktoosin, A-vitamiinin ja B₁₂-vitamiinin imeytymishäiriöitä. Giardiaasi saattaa kroonistua, oireiden palatessa päivien tai viikkojen jälkeen. Lapsilla vakava giardiaasi voi hidastaa fyysistä ja henkistä kasvua ja aiheuttaa aliravitsemusta. (CDC 2015.)

Giardiaasia hoidetaan antibiooteilla. Metronidatsoli on USA:ssa käytetyin antibiootti, joka toimii 85–90 prosentin tehokkuudella. USA:n ulkopuolella käytetyin antibiootti on tinidatsoli, jonka uskotaan aiheuttavan vähemmän sivuvaikutuksia, ja joka toimii 90 prosentin tehokkuudella. (Escobedo ym. 2016, Nazerin 2016b mukaan.) Neste- ja elektrolyyttitasapainon ylläpitäminen on tärkeää varsinkin tapauksissa, joissa potilaalla on vakava ripuli. Suurella osalla potilaista on laktoosi-intoleranssin oireita, jolloin laktoosittoman ruokavalion noudattaminen useiden kuukausien ajan saattaa auttaa. 20–40 % potilaista sairastaa laktoosi-intoleranssia giardiaasin poistumisen jälkeen. (Farthing 1996, Nazerin 2016c mukaan.)

3 CRYPTOSPORIDIUM

3.1 *Cryptosporidium*-alkueläin

Cryptosporidium on yksisoluinen alkueläin, joka aiheuttaa ihmiselle ripulitaudin, kryptosporidioosin. Alkueläin leviää tartunnan saaneen ihmisen tai eläimen ulosteeseen erittyvien ookystien avulla. Tartunnan saa useimmiten ookystien saastuttamasta juomavedestä, mutta tartunnan voi saada myös saastuneesta ruoasta, eläinten ulosteista tai tartuntaa kantavasta henkilöstä. *Cryptosporidium*-lajeja tunnetaan kymmeniä, joista *C. parvum* ja *C. hominis* aiheuttavat yli 90 % ihmisten kryptosporidiooseista. (Evira 2010, 136.)

Cryptosporidium-lajit jaotellaan isäntälajin, infekti alueen ja ookystan mittojen mukaan. Tällä hetkellä on olemassa 16 virallista *Cryptosporidium*-lajia (Taulukko 2), ja yli 33 genotyyppiä, joita ei ole vielä lajiteltu. (Smith ym. 2007, 31.)

Taulukko 2. *Cryptosporidium*-lajit ja niiden isännät (Smith ym. 2007).

Laji	Isäntä
<i>C. hominis</i>	Ihmiset
<i>C. parvum</i>	Karja, ihmiset
<i>C. muris</i>	Jyrsijät
<i>C. suis</i>	Siat
<i>C. felis</i>	Kissat
<i>C. canis</i>	Koirat
<i>C. meleagridis</i>	Kalkkunat, ihmiset
<i>C. wrairi</i>	Marsut
<i>C. bovis</i>	Karja

<i>C. andersoni</i>	Karja
<i>C. baileyi</i>	Siipikarja
<i>C. galli</i>	Peipot, kanat
<i>C. serpentis</i>	Liskot, käärmeet
<i>C. saurophilus</i>	Liskot
<i>C. scophthalmi</i>	Kalat
<i>C. molnari</i>	Kalat

Cryptosporidiumin ookysta on halkaisijaltaan noin 3–5,5 µm ja muodoltaan pyöreä tai hieman ovaalin muotoinen. Ookystalla on kolme tai neljä kuorikerrosta, jotka suojaavat sitä ympäristöltä. Sisin kerros koostuu glykoproteiineista, jotka antavat vahvuutta ja joustavuutta. Kuorten paksuus on noin 50 nm. Ookystan sisällä on neljä sporotsoiittia, jotka tartuttavat isännän. (Robertson 2014, 5.)

3.2 *Cryptosporidiumin* elinkierto

Tartunta tapahtuu, kun ihmisen ruoansulatusjärjestelmään joutuu ookystia veden, ruoan tai ulosteen välityksellä. Elimistössä tapahtuu ekskystaatio, jolloin ookystasta vapautuu sporotsoiitteja, jotka loisivat ruoansulatusjärjestelmän epiteelisoluissa. *Cryptosporidium* lisääntyy suvuttomasti, jolloin loisen lukumäärä kasvaa suolistossa. Suvuttoman lisääntymisen jälkeen loinen lisääntyy suvullisesti tuottaen paksuseinäisiä ookystia, jotka erittyvät kehon ulkopuolelle ulosteen mukana tartuttaakseen muita eliöitä, ja ohutseinäisiä ookystia, jotka jatkavat suvutonta ja suvullista lisääntymistä isännän sisällä. (CDC 2010.)

3.3 *Cryptosporidium* elintarvikkeissa

Cryptosporidium-ookystat säilyvät infektiivisinä vedessä paremmin kuin elintarvikkeissa ookystien suosiessa kosteita ja viileitä olosuhteita. Tämän takia veden kautta leviävät kryptosporidioosiepidemiat ovat todennäköisempiä ja tartuttavat suurempia määriä ihmisiä. Veden kautta leviävien epidemioiden havaitsemiseksi ja estämiseksi onkin suunnattu enemmän voimavaroja kuin elintarvikkeiden kautta leviävien. Vuonna 2006 julkaistu International Organization for Standardization (ISO) -standardi ja 1999 julkaistu US EPA -standardi käsittelevät *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-(oo)kystien eristämistä ja tunnistamista vesinäytteistä. Vastaava standardi julkaistiin elintarvikenäytteille vasta vuonna 2016, mikä todistaa että veden kautta leviäviin kryptosporidioosiepidemioihin suhtaudutaan vakavammin ja niitä pidetään suurempana terveysriskinä. (Robertson 2014, 14.)

Koska *Cryptosporidium*-ookystat inaktivoituvat kuivuessaan tai lämpökäsittelyssä, luonnostaan kosteat, raakana tai kevyesti lämmitettyinä nautitut elintarvikkeet toimivat todennäköisimmin infektion välikappaleina. Tällaisia elintarvikkeita ovat esimerkiksi kasvikset ja hedelmät. (Robertson 2014, 21.) Puhtaan veden käyttö elintarvikkeiden jalostuksessa on tärkeää kontaminaatoriskin pienentämiseksi. Esimerkiksi 250 gramman valmissalaattipakkaus saattaa pidättää 2 % huuhteluvedestä CFA:n tutkimuksen mukaan. Mikäli käytetty vesi on kontaminaatorajan sisäpuolella (yksi ookysta 10 litrassa vettä), teoriassa 0,05 % pakkauksista sisältää yhden ookystan. (Smith ym. 2007, 5.)

Marraskuussa 2008 tuli ilmi ensimmäinen Suomessa tapahtunut elintarvikkeen kautta levinnyt *Cryptosporidium*-epidemia, kun 72 ihmistä sairastui kryptosporidioosiin. Henkilöt olivat syöneet samassa ruokalassa ja heidän oireensa viittasivat kryptosporidioosiin. Käytetyistä elintarvikkeista otettiin näytteet ja niistä tutkittiin useita bakteereja, hiivoja, homeita ja alkueläimiä, mutta näytteet olivat negatiivisia. Myös muutamien sairastuneiden ulostenäytteet tutkittiin. Neljä näytettä kahdestatoista sisälsivät *Cryptosporidiumia*, ja yksi näyte vastasi 100 prosentin tarkkuudella *Cryptosporidium parvumia* PCR-menetelmällä tutkittaessa. Välittäjäelintarviketta ei saatu selville, mutta välittäjäelintarvikkeeksi epäiltiin salaattisekoitusta, jota ei ollut otettu huomioon ruokalan omavalvonnassa. Sekoitus sisälsi salaatteja viidestä Euroopan maasta. (Pönkä ym. 2009, 1–2.)

3.4 Kryptosporidioosi

Kryptosporidioosin tyypillisin oire on vesiripuli, johon voi liittyä vatsakrampeja, nestehukkaa, pahoinvointia, oksentelua, kuumetta ja painonlaskua. Tartunta voi esiintyä myös oireettomana. Oireet alkavat yleensä 2–10 vuorokauden kuluttua tartunnasta. Oireet kestävät yleensä 1–2 viikkoa, mutta voivat kestää jopa yli neljä viikkoa. Joillakin ihmisillä oireet saattavat palata toipumisen jälkeen 30 vuorokauden sisällä. Ihmisillä, joilla on heikko immuunipuolustus, infektio saattaa vaikuttaa ohutsuolen lisäksi muihin ruoansulatusjärjestelmän osiin ja hengitystiehen, ja saattaa aiheuttaa vakavia, kroonisia ja joissakin tapauksissa tappavia sairauksia. (CDC 2015.) Ookystia erittyy ulosteen mukana päivittäin 10^8 – 10^{10} kappaletta (Ministry for Primary Industries 2010). Infektiivinen annos on 10–1000 ookystaa (Evira 2010, 136).

Suomessa vuosina 1995–2015 esiintyi 4–50 kryptosporidioositapausta vuosittain (THL 2016). Mikäli lääkäri havaitsee kryptosporidioositapauksen, hänellä ei ole velvollisuutta ilmoittaa löydöksestä THL:een, mutta laboratorioilla on. Koska kryptosporidioosia tutkitaan ripulipotilaiden ulosteista vain erikseen pyydettyä, tapauksen todellinen lukumäärä on oletettavasti suurempi. (Evira 2010, 137.)

Ruokavalion muutos, alkueläimiä tuhoava lääkitys ja oireiden helpottaminen auttavat kryptosporidioosiin. Ripulista ja painonhäviöstä johtuva vakava aliravitsemus estetään laktoosittomalla ruokavaliolla, joka sisältää paljon sinkkiä ja glutamiinia. Nestetasapainon ylläpitäminen on tärkeää vakavasta ripulista kärsivillä potilailla. Nitazoxanide-lääke lyhentää ripulin kestoa ja aliravittujen lasten kuolleisuusriskiä. Parasiitteja tuhoavien lääkkeiden vaikutus AIDS-potilaiden kryptosporidioosiin on ollut vähäistä. (Cabada 2015.)

4 ALKUELÄINTEN MÄÄRITYSMENETELMÄT

4.1 IMS

Standardimenetelmiä alkueläinten (oo)kystien havainnointiin vesinäytteistä on ollut olemassa jo vuosia, ja elintarvikenäytteille tarkoitettu standardi ISO 18744 julkaistiin vuonna 2016. Standardissa käydään läpi *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* havainnointi elintarvikkeista. Elintarvikenäytteet eroavat vesinäytteistä siten, että elintarvikenäytteiden konsentroidinnissa ei voida käyttää suodatusta. Näytteen konsentroidinnissa tulee käyttää uuttoa, jotta (oo)kystat saadaan talteen. Tämä tarkoittaa, että näytemäärä on paljon pienempi kuin vesinäytteissä ja että tuotteen fyysinen ja biokemiallinen luonne vaikuttavat uuttoon. (Robertson 2013, 19.)

Ensimmäinen IMS-tekniikkaa käyttävä analyysi *Cryptosporidium*-ookystille tuli markkinoille 1994 ja *Giardia*-kystille 1995. Vaikka monet valmistajat ovat kehittäneet omia IMS-tekniikoita, yksi valmistaja hallitsee markkinoita. Tämä saattaa johtua menetelmän kehittämisen haasteellisuudesta, mutta IMS-tekniikka pysyy edelleen erittäin kalliina menetelmänä. Vaikka jotkin laboratoriot ovat poistaneet tekniikan laskeakseen kustannuksiaan, suurimmalle osalle laboratorioista IMS-tekniikka on nostanut saantoprosentteja tekniikan luontaisen selektiivisen konsentraation takia. (Robertson 2013, 20.)

IMS-tekniikan pääpiirteet näytteen konsentroidinnin jälkeen ovat mahdollisten (oo)kystien erottelu uutteesta spesifisien antibody-reagenssien avulla, jotka on kiinnitetty magneettisiin kuuliin. Erottelu tapahtuu puskuroidussa väliaineessa, jotta kiinnittyminen tapahtuisi mahdollisimman hyvin. Kun (oo)kystat ovat kiinnittyneet antibody-reagensseihin, (oo)kysta-kuulakompleksi erotetaan muusta näytteestä magneetin avulla. (Oo)kystat irrotetaan kuulista ravistamalla ja käyttämällä hapan-ta nestettä. Kystat kiinnitetään aukkolevyille ja kuulat poistetaan. Paljon häiritseviä pienhiukkasia sisältävä näyte saattaa vaatia ylimääräisen pesuvaiheen, jonka jälkeen kystat kiinnitetään samalle tai uudelle aukkolevyille. Näyte värjätään fluo-resoivilla alkueläinspesifisillä vasta-aineilla, jolloin (oo)kystien kuori on nähtävissä mikroskoopin FITC-suodattimella. Näyte värjätään myös DAPI:lla, jolloin

(oo)kystien sisällä olevat tumat näkyvät mikroskoopin UV-suodattimella. (ISO 2013, 7.)

Värjätyt (oo)kystat havaitaan mikroskoopilla, jossa on FITC- ja DAPI-suodatin. Aukkolevy käydään järjestelmällisesti läpi sivu- tai pystysuunnassa käyttämällä FITC- suodatinta, jolloin (oo)kystat näkyvät kirkkaan vihreinä. Havainto varmistetaan tarkastamalla (oo)kysta DAPI-suodattimella, jolloin (oo)kystan sisällä olevat tumat näkyvät sinisinä. DAPI haalistuu nopeasti UV-valossa, joten sitä on käytettävä lyhyitä aikoja kerrallaan. Varmistetut (oo)kystat lasketaan ja ilmoitetaan muodossa lkm/näytemäärä. (ISO 2013, 9.)

4.2 PCR

PCR-tekniikan etu on sen kyky havaita *Cryptosporidiumin* ja *Giardian* suku-, laji- ja genotyyppispesifisiä nukleinihappoja (Rimhanen-Finne 2006, 28). Kyseisen tekniikan vaiheet ovat (oo)kystien rikkominen trofotsoiittien ja sporotsoiittien paljastamiseksi, DNA:n erottaminen, DNA:n monistaminen polymeerasiketjureaktiolla, DNA:n analysointi ja tulosten tutkinta (Environment Agency 2010, 79).

PCR-tekniikan käyttö on harvinaisempaa *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-näytteitä analysoitaessa kuin IMS-tekniikan käyttö niin vesi- kuin elintarvikenäytteiden kohdalla. Jopa ISO 18744 -standardi suosittelee IMS-tekniikkaa *Giardian* ja *Cryptosporidiumin* havaitsemiseen. PCR ei ole vielä mennyt IMS:n edelle, vaikka IMS vaatii kalliin fluoresenssimikroskoopin PCR:n välineisiin verrattuna, joiden hinta on laskemassa. Laboratorioissa PCR-tekniikkaa käytetään erilaisten patogeenien, mukaan lukien *Giardian*, havaitsemiseen ulostenäytteistä. Kyseisissä näytteissä patogeenien lukumäärä on suuri verrattuna ympäristönäytteisiin, esimerkiksi vesi-, tai elintarvikenäytteisiin. Lisäksi tekniikalla on mahdotonta havaita inaktivoituneita (oo)kystia eli (oo)kystia, jotka eivät sisällä nukleusta. Vaikka inaktivoituneet (oo)kystat eivät ole vaarallisia, niiden löytäminen osoittaa että tutkittava materiaali on kontaminoitunut, ja saattaa sisältää myös elinkykyisiä (oo)kystia. (Robertson 2013, 20.)

PCR-tekniikkaa ensisijaisena havainnointimenetelmänä käyttäviä tutkimuksia on suoritettu. Eräessä tutkimuksessa verrattiin PCR-, IMS- ja virtausytometriatekniikoita lehtisalaatista uutettujen *Giardia*-kystien havainnoinnissa. Tutkimuksessa kävi ilmi, että IMS ja virtausytometria tuottivat yhdenmukaisia tuloksia, mutta PCR epäonnistui usein. (Keserue ym. 2012, Robertsonin 2013, 21 mukaan). Toisessa tutkimuksessa tarkkailtiin muun muassa *Giardian* määriä pakatuissa vihanneksissa. PCR-menetelmällä positiivisiksi havaitut näytteet tutkittiin myös IMS-menetelmällä, mutta tutkimuksessa ei otettu huomioon että jotkin näytteet olisivat voineet olla positiivisia IMS-menetelmällä, mutta eivät PCR-menetelmällä. PCR-menetelmällä negatiivisen tuloksen antaneet näytteet olisi voitu tutkia IMS-menetelmällä. (Dixon ym. 2013, Robertsonin 2013, 21 mukaan.)

5 MENETELMÄN ULKOINEN LAADUNVARMENNUS

Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) on vuonna 1990 perustettu englantilainen akkreditoitu laboratorioalan yritys, joka tuottaa asiakkailleen mikrobiologisten ja kemiallisten menetelmien pätevyyden testausta. Yritys toimittaa asiakkailleen pätevyyskoenäytteitä, referenssimateriaaleja ja elintarvike- tai ympäristönäytteitä laadunvarmennus- tai harjoitustarkoituksiin. Pätevyyden testaus antaa luottamusta laboratorioiden menetelmiin ja henkilökuntaan sekä auttaa saamaan ja ylläpitämään standardeja. (FAPAS 2014, 5.)

Keväällä 2014 FAPAS suoritti pätevyyskokeen, johon osallistui 28 laboratoriota. Testauksen tarkoituksena oli testata osallistuvien laboratorioiden kykyä havaita ja tunnistaa *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-(oo)kystat laboratorioiden omilla käytössä olevilla menetelmillä, ja vertailla eri laboratorioiden tuloksia. Testaus suoritettiin selvittämällä *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-(oo)kystien lukumäärät näytteistä, joiden tarkat (oo)kystamäärät oli tiedossa. Laboratoriot saivat tietoonsa kaikkien osallistujien tulokset, mutta eivät nimiä. (FAPAS 2014, 5.)

FAPAS lähetti osallistujille kaksi suspensiota ja yhden suodatinnäytteen. Suspensio A oli konsentroitua hanavettä PBS:ssa, tilavuudeltaan 1 ml. Suspensio kiinnitettiin ilman konsentroitua kuoppalevyille ja siitä laskettiin *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-(oo)kystat laboratorion menetelmällä. Suspensio B oli konsentroitunut näyte PBS:ssa, tilavuudeltaan 1 ml, joka laimennettiin 10 litraan ja konsentroitui laboratorion menetelmällä. Myös suspensiosta B laskettiin (oo)kystalukumäärät. Suodatinnäyte oli Genera Filta-Max™-suodatin, joka käsiteltiin standardin The Microbiology of Drinking Water – Part 14 – Methods for the isolation, identification and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts mukaan. (FAPAS 2014, 5.)

Laboratoriot käsitelivät näytteet ja tulokset lähetettiin takaisin. Laboratorioita pyydettiin myös kertomaan käyttämänsä menetelmät ja niiden yksityiskohdat, esimerkiksi värjäykseen käytetyn kitin merkit, sentrifugointinopeudet ja analyysimetodit. Tulokset koottiin taulukoihin, joista kävi ilmi saannot, konsentraatio- ja tutkimuspäivämäärät, menetelmät ja reagenssit. Näin laboratoriot saivat vertailla tuloksiaan muiden osallistujien tuloksiin, ja saivat käsityksen siitä, kuinka erilainen heidän

käyttämänsä metodi oli. FAPAS sai tärkeää tietoa valmistamiensa näytteiden laadusta. (FAPAS 2014, 5.)

MetropoliLabin tulokset olivat suspensio A:n kohdalla hyvät *Cryptosporidiumin* osalta, mutta ei *Giardian* osalta. *Cryptosporidium*-ookystamäärä oli lähellä keskiarvoa, kun osallistujien tulokset oli skaalattu muotoon keskiarvo/10 µl. *Giardia*-kystamäärä oli keskiarvoa pienempi. Suspensio B:n kohdalla saantoprosentti oli molempien alkueläinten osalta noin 50 %. Muiden laboratorioden tuloksiin verrattuna näytteistä saadut saannot olivat keskivertoa paremmat. Menetelmien yksityiskohtia tarkasteltaessa huomattiin, että suurin osa laboratorioista käytti samoja reagensseja, kuten erotteluun käytettävää Dynal IMS-kittiä ja värjäykseen käytettäviä fluoresoivia antibody-reagensseja. Myös muut MetropoliLabin käyttämän menetelmän yksityiskohdat, kuten sentrifugointiaika, vastasivat muiden laboratorioden käytäntöjä. Tämä oli odotettavaa, sillä suurin osa luultavasti pohjasi menetelmänsä saatavilla oleviin ISO 15553:2006- tai 1623.1-standardeihin. Pätevyyskokeen tulosten perusteella saatiin lähtökohta menetelmän optimointia varten. (FAPAS 2014, 9–12.)

6 MIKROBIOLOGISEN MENETELMÄN VALIDOINTI

6.1 Validointi

Ennen kuin uusi menetelmä otetaan käyttöön laboratoriossa, se tulee validoida asianmukaisesti. Validointi tarkoittaa menetelmän kelpoisuuden ja luotettavuuden osoittamista. Tarkoituksena on tuottaa vertailuarvoja mitattaville suureille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Koska mikrobiologisten menetelmien validoimiseksi ei ole toistaiseksi olemassa kansainvälisesti hyväksytyjä ohjeita tai kriteerejä validointitulosten arvioimiseksi, validoinnissa pyritään toistaiseksi hankkimaan tuntumaa menetelmässä esiintyviin epävarmuustekijöihin ja mahdollisesti kuvaamaan niitä numeerisesti. (Evira 1997, 1.)

Validoitava menetelmä ja sen käyttötarkoitus vaikuttavat siihen, minkälaiset vaatimukset validoinnille asetetaan. Menetelmän kehittäjä suorittaa normaalisti täydellisen kattavan validoinnin, joka edellyttää laboratorioden välisiä tutkimuksia. Laboratoriossa validointi liittyy usein kansainvälisten standardimenetelmien ja muiden käytössä olevien, kuten laboratorion sisäisten menetelmien käyttöönottoon. Siksi validointi voidaan tehdä suppeahkona, dokumentoituna suorituksena, jonka tarkoituksena on osoittaa, että laboratorio hallitsee menetelmän. Jos laboratorio kehittää kokonaan uuden menetelmän, validointi tulee suorittaa täydellisesti. (Evira 1997, 1.)

6.2 Mikrobiologisiin menetelmiin liittyvä epävarmuus

Kemialliset ja mikrobiologiset analyysit eroavat toisistaan monin tavoin. Kemiallisessa analyysissä analyytti pyritään erottamaan matriisista esimerkiksi liuottamalla. Jos analyyttiä joudutaan laimentamaan, se tehdään erottelun jälkeen. Analyytin pitoisuus on usein suuri, joten satunnainen hajonta ei pääse vaikuttamaan tuloksiin kemiallisessa analyysissä. (Evira 1997, 2.)

Mikrobiologisessa analyysissä suorittajien työskentelyerot vaikuttavat tulosten eroavaisuuksiin, esimerkiksi menetelmän suorittaminen ja pesäkkeiden tulkinta

voivat vaihdella henkilöstä toiseen. Näytteen analysointia häiritsevät muut mikrobit, materiaalit ja taustat. Analyytti erotellaan vasta kasvatusalustalla. Menetelmän spesifisyyteen vaikuttaa alustan koostumus, kasvatusolosuhteet ja mikrobikannan ominaisuudet. Mikrobiologiassa tutkittavan näytteen pitoisuus tulee laimentaa kvantatiivista määrittystä varten tasolle, jossa yksittäisten solujen muodostamat pesäkkeet ovat laskettavissa. Täsmällisesti oikean tuloksen määrittäminen on mahdotonta, sillä mikrobit ovat elävää materiaalia ja niiden pitoisuus muuttuu jatkuvasti. Oikeana tuloksena pidetään useiden toistojen antaman keskiarvotuloksen ja hyväksytyn arvon lähekkäisyyttä. Hyväksyttynä arvona pidetään arvoa, joka on määritetty sertifioituilla referenssimateriaaleilla. (Evira 1997, 2–4.)

ISO 18744 -standardin mukainen menetelmä ei vastaa perinteistä mikrobiologista menetelmää, jossa tutkittava mikrobi kasvatetaan kasvatusalustalla. Alkueläimiä ei voida viljellä laboratorio-olosuhteissa, vaan jokainen näyte vastaa näytteenoton hetkellä olevaa pitoisuutta. Koska lisää tuloksia haluttaessa uudelleenviljely on mahdotonta, rinnakkaisnäytteiden ottaminen on tärkeää. Menetelmän avulla ei myöskään voida arvioida kystien elinkykyisyyttä tai infektiivisyyttä. Menetelmän pitkä suoritus aika tekee siitä vaivalloisen, ja IMS:n ja värjäyksien vaatiman käsityön tarkkuus voi vaikuttaa tuloksiin merkittävästi. (ISO 2013, 1.)

6.3 Validointiin liittyviä suureita

Validoinnissa käytetyt suureet valittiin Eviran julkaisusta Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Tulosten avulla tarkasteltiin seuraavanlaisia suureita: suhteellinen oikeellisuus, virhepositiivisuus ja -negatiivisuus, toistettavuus, uusittavuus, määrittäysraja, spesifisyys, lineaarisuus ja laskennan toistotarkkuus.

Oikeellisuus. Suhteellinen oikeellisuus tarkoittaa referenssimenetelmän ja validoitavan menetelmän antamien tulosten vastaavuutta ja lähekkäisyyttä tutkittaessa samoja näytteitä. Oikeellisuutta tutkitaan myös virhepositiivisuuden ja virhenegatiivisuuden avulla. Validoitavan menetelmän positiivinen tulos on virhepositiivinen, mikäli siirrostettu näyte ei sisällä tutkittavaa parasiittia. Negatiivinen tulos on virhenegatiivinen silloin, kun siirrostettu näyte sisältää tutkittavaa parasiittia. (Evira 1997, 7–8.)

Täsmällisyys. Tulosten täsmällisyyttä kuvaavat toistettavuus ja uusittavuus. Toistettavuus tarkoittaa peräkkäisten toistojen antamien tulosten lähekkäisyyttä. Analyysi tulee suorittaa samalla menetelmällä, samojen henkilöiden toimesta lyhyellä aikavälillä ja mahdollisimman samoissa olosuhteissa. Uusittavuus tarkoittaa yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyyttä eri henkilöiden tutkiessa identtisiä näytteitä. (Evira 1997, 8.)

Määritysraja. Määritysraja on alhaisin tietyissä rajoissa vaihteleva alkueläinpitoisuus, joka pystytään kvantitatiivisesti määrittämään validoitavalla menetelmällä. (Evira 1997, 10.)

Spesifisyys. Spesifisyys tarkoittaa kvantitatiivisen menetelmän kykyä havaita tutkittava parasiitti näytteessä olevien häiritsevien tekijöiden vaikutuksesta huolimatta. (Evira 1997, 10.)

Lineaarisuus. Lineaarisuus kuvaa kvantitatiivisen menetelmän kykyä tuottaa tuloksia, jotka ovat suoraan verrannollisia näytteen pitoisuuteen. Pitoisuuden muutos saa aikaan suhteessa yhtä suuren muutoksen tuloksissa. (Evira 1997, 10.)

Laskennan toistotarkkuus. Laskennan toistotarkkuus kuvaa positiivisiksi todettujen (oo)kystien laskentatulosten hajontaa usean henkilön välillä. (Evira 1997, 7.)

7 TYÖN SUORITUS

7.1 Menetelmän optimointi

Optimoinnin tarkoituksena oli saada menetelmä mahdollisimman tehokkaaksi ennen validoinnin aloittamista. Menetelmän yksityiskohtia muutettiin muista standardeista saatujen variaatioiden pohjalta, ja toimivat muutokset otettiin käyttöön. Aihetta käsittelee Yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston EPA:n dokumentti Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA (EPA 2012, 1). Dokumentissa käsitellään *Cryptosporidiumin* ja *Giardian* havaitsemista vesinäytteistä käyttäen konsentraatiota, immunomagneettista separaatiota ja immunofluoresenssimikroskopiaa. Toinen vastaava standardi on ISO 15553, jossa käsitellään *Cryptosporidiumin* ja *Giardian* havaitsemista vesinäytteistä samalla periaatteella.

Saantoon vaikutti negatiivisesti ylimääräisen glysiinin käyttö huuhteluvaiheessa, joka lisäksi pidensi analyysiaikaa. Mikäli huuhteluvaiheessa käytettiin Stomacher-pussia, jossa ei ollut suodatinta, analyysin seuraavaan vaiheeseen pääsi liian paljon häiritseviä partikkeleita. Liian lyhyt sentrifugointiaika tai liian nopea sentrifugointi jättivät pelletin epämääräisen kokoiseksi, jolloin supernatanttia poistettaessa (oo)kystia poistui myös. Supernatanttia poistettaessa tuli kiinnittää huomiota siihen, ettei pellettiä koskettu pipetin kärjellä. Immunomagneettisessa separaatioissa käytettyjen reagenssien oikeat määrät ja lämpötilat olivat tärkeitä. Värjäyksen aikana (oo)kystia saattoi poistua liian voimakkaan pipetöinnin seurauksena. Värjäyksen lopussa lasilevyn päälle lisättävän peitinlasin huono sijoitus saattoi aiheuttaa (oo)kystien siirtymisen lasilta pois. Mikroskopoinnin aikana käytettävää UV-valosuodatinta tuli välttää DAPI-värin haalistumisen välttämiseksi.

Saantoon vaikutti positiivisesti näytteen hellä käsittely huuhteluvaiheessa, jolloin analyysin seuraavaan vaiheeseen ei päässyt häiritseviä partikkeleita ja sentrifugoinnissa jäljelle jäävä pelletti oli mahdollisimman pieni. Huuhteluvaiheessa tuli saada mahdollisimman paljon glysiiniä ja sitä kautta (oo)kystia talteen, joten huuhteluun lisättiin ylimääräinen pesu 50 millilitralla glysiiniä. Sopiva sentrifugointiaika ja -voimakkuus varmistivat sen, että putkien pohjalle jäi kiinteä pelletti. Sentrifugointiaikaa pidennettiin testauksen perusteella. Korkein saanto ja pienin mikrosko-

pointia häiritsevä tausta saatiin käyttämällä Cellabsin valmistamia *Cryptosporidium* Cel - ja *Giardia* Cel -fluoresoivia värejä. Immunomagneettisessa separaatiossa korostui huolellisuus, sillä huolellinen putkien vortekointi ja pipetointi varmisti mahdollisimman monien (oo)kystien päätyminen kuoppalevyille. Huolellinen mikroskopointi ja laaja kokemus mikroskopoinnista vaikuttivat niin, ettei häiritsevä tausta vaikeuttanut (oo)kystien huomaamista. Analyysin rajoittaminen yhteen päivään varmisti sen, että DAPI- ja FITC-värit eivät haalistuneet. Saantoon vaikutti huomattavasti käsin tehtävien tarkkojen analyysivaiheiden, kuten pipetoinnin optimointi. Lisäksi korostui näytteen oikea esikäsittely, jolloin varmistettiin (oo)kystien siirtyminen seuraavaan vaiheeseen ja häiritsevän taustan poistuminen.

7.2 Menetelmän validointi

Validoinnin tarkoituksena oli kokeellisesti osoittaa, että laboratorio hallitsee menetelmän käytön ja siihen liittyvät ongelmakohdat. Ensisijaiset testattavat matriisit olivat tarkoituksenmukaiseksi arvioidut näytetyypit, esimerkiksi salaattit. Matriiseina pyrittiin käyttämään mahdollisimman samanlaisia jääsalaattinäytteitä.

Menetelmän validoinnissa käytettiin referenssimateriaalina kaupallisia BTF:n valmistamia EasySeed-ampulleja, jotka sisältävät 99 *Cryptosporidium parvum* -ookystaa ja 100 *Giardia lamblia* -kystaa yhdessä millilitrassa saliiniliuosta. Kystat oli inaktivoitu gammasäteilyllä joten niitä oli turvallista käsitellä. (BTF 2014). Iso-Britannian Drinking Water Inspectorate ja Yhdysvaltojen Environmental Protection Agency ovat hyväksyneet EasySeed-ampullit *Giardia* ja *Cryptosporidiumin* havaitsemisen testaukseen (BTF 2016). Näytematriisina käytettiin jääsalaattia, sillä se vastasi ISO 18744 -standardin määritelmää lehtivihanneksesta (ISO 2013, 2).

7.2.1 Oikeellisuus

Koska tutkittava menetelmä oli hyvin lähellä referenssimenetelmää ja eroja tehtiin vain saannon parantamiseksi eikä menetelmään lisätty tai siitä poistettu merkittäviä vaiheita, tutkittavan menetelmän ja referenssimenetelmän tulokset vastasivat toisiaan. Vertaamalla saantoja ampullin teoreettiseen kystamäärään ja ISO 18744

-standardin liitteenä olleeseen saantotaulukkoon voitiin arvioida oikeellisuutta. Liitteessä oli viherkasvien saantoprosentteja, jotka vaihtelivat *Cryptosporidiumille* välillä 3–62 % ja *Giardialle* 17–65 % (ISO 2013, 20). Tulokset erosivat toisistaan vain korkeampina saantoprosentteina validoitavaa menetelmää käytettäessä, mihin työssä pyrittiin.

Virhepositiivisuutta ja -negatiivisuutta tutkittiin lisäämällä viiteen näytteeseen EasySeed-ampulli ja viiteen näytteeseen steriiliä vettä. Analyysin suorittaja ei tiennyt, mitkä näytteistä sisälsivät (oo)kystia. Virhepositiivisuus laskettiin kaavalla

$$FP \% = \frac{FP}{NN + FP}$$

jossa FP oli virhepositiivisten tulosten lukumäärä ja NN negatiivisten tulosten lukumäärä (Evira 1997, 28). Virhenegatiivisuus laskettiin kaavalla

$$FN \% = \frac{FN}{PP + FN}$$

jossa FN oli virhenegatiivisten tulosten lukumäärä ja PP positiivisten tulosten lukumäärä (Evira 1997, 28). Virhepositiivisuus ja -negatiivisuus olivat *Giardialle* 0 % ja *Cryptosporidiumille* 0 % (Taulukko 3).

Taulukko 3. Virhepositiivisuus ja virhenegatiivisuus.

Näyte	<i>Giardia</i>		<i>Cryptosporidium</i>	
	Lisätty	Laskettu	Lisätty	Laskettu
Salaatti 1	100	55	100	64
Salaatti 2	100	41	100	50
Salaatti 3	0	0	0	0
Salaatti 4	0	0	0	0
Salaatti 5	100	38	100	58
Salaatti 6	0	0	0	0
Salaatti 7	0	0	0	0
Salaatti 8	0	0	0	0
Salaatti 9	100	52	100	75
Salaatti 10	100	50	100	63
FP % = FP/(NN+FP)		FP % = FP/(NN+FP)		
0		0		
FN % = FN/(PP+FN)		FN % = FN/(PP+FN)		
0		0		

7.2.2 Täsmällisyys

Täsmällisyys piti sisällään kaksi tutkittavaa suuretta: toistettavuuden ja uusittavuuden. Toistettavuutta tutkittiin suorittamalla analyysi kahden peräkkäisen päivän aikana 10 kertaa. Testaus tehtiin yhden henkilön toimesta, ja analyysi pyrittiin suorittamaan joka kerta mahdollisimman samalla tavalla. Tulosten avulla laskettiin keskihajonta käyttäen kaavaa

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

jossa x_i oli tuloksen logaritmi, \bar{x} logaritmien keskiarvo ja n tulosten lukumäärä (Takkinen 2002, 22). *Giardia* osalta keskihajonta oli 0,048 ja *Cryptosporidiumin* osalta 0,026 (Taulukko 4). Molemmat tulokset olivat hyväksyttäviä, sillä keskihajonta oli alle 0,15 (Takkinen 2002, 22).

Taulukko 4. Toistettavuus.

Näyte	<i>Giardia</i>		<i>Cryptosporidium</i>	
	lkm	log ₁₀	lkm	log ₁₀
Salaatti 1	59	1,77	71	1,85
Salaatti 2	60	1,78	68	1,83
Salaatti 3	52	1,72	64	1,81
Salaatti 4	54	1,73	70	1,85
Salaatti 5	49	1,69	75	1,88
Salaatti 6	60	1,78	73	1,86
Salaatti 7	60	1,78	69	1,84
Salaatti 8	43	1,63	71	1,85
Salaatti 9	51	1,71	62	1,79
Salaatti 10	50	1,70	66	1,82
ka	53,8	1,73	68,9	1,84
s	0,048		0,026	

Uusittavuutta tutkittiin suorittamalla analyysi kahden henkilön toimesta samana päivänä. Menetelmän luonteen vuoksi henkilökohtaisilla työskentelytavoilla oli suuri vaikutus tuloksiin, vaikka menetelmä pyrittiin suorittamaan täsmälleen samalla tavalla. Tulosten arvioinnissa käytettiin keskihajontaa, joka laskettiin kaavalla

$$s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}$$

jossa d oli tulosten logaritmien erotus ja n tulosten lukumäärä (Takkinen 2002, 23). *Giardialle* saatiin arvo 0,11 ja *Cryptosporidiumille* arvo 0,11 (Taulukko 5). Tulokset olivat hyväksyttäviä, sillä keskihajonta oli alle 0,25 (Takkinen 2002, 23).

Taulukko 5. Uusittavuus.

Näyte	<i>Giardia</i>				<i>Cryptosporidium</i>			
	lkm, JT	log ₁₀ , JT	lkm, TT	log ₁₀ , TT	lkm, JT	log ₁₀ , JT	lkm, TT	log ₁₀ , TT
Salaatti 1	36	1,56	34	1,53	47	1,67	41	1,61
Salaatti 2	17	1,23	9	0,95	51	1,71	34	1,53
Salaatti 3	20	1,30	15	1,18	51	1,71	30	1,48
Salaatti 4	35	1,54	30	1,48	54	1,73	47	1,67
s	0,11				0,11			

7.2.3 Määritysraja

Optimointivaiheessa huomattiin, että alle 20 kystan saantoja pystyttiin laskemaan näytteistä. Kolmeen näytteeseen lisättiin 20, 10 ja 5 kystaa. Koska *Giardia*-kystia löytyi vain 10 kystaa sisältävistä näytteistä, *Giardian* havaitsemisen määritysrajaksi todettiin 10 kystaa/näyte. *Cryptosporidium*-ookystia löytyi myös 5 kystaa sisältävistä näytteistä, joten *Cryptosporidiumin* havaitsemisen määritysrajaksi valittiin 5 kystaa/näyte. Alkueläinten pienten infektiivisten annosten takia on hyvä, että näytteistä voidaan havaita pieniä määriä alkueläimiä. (Taulukko 6.)

Taulukko 6. Määritysraja.

Näyte	<i>Giardia</i>		<i>Cryptosporidium</i>	
	Lisätty	Laskettu	Lisätty	Laskettu
Salaatti 1	20	4	20	10
Salaatti 2	10	2	10	5
Salaatti 3	5	0	5	2

7.2.4 Spesifisyys

Menetelmä on äärimmäisen spesifinen *Giardialle* ja *Cryptosporidiumille* kahden vaiheen vuoksi. IMS:n aikana kystat kiinnittyvät helmiin, jotka on päällystetty anti-*Giardia*- ja anti-*Cryptosporidium*-vasta-aineilla. Värjäyksen aikana aukkolevylle lisätään fluorisoivaa monoklonaalista FITC-väriainetta, joka värjää vain *Giardia*-kystat ja *Cryptosporidium*-ookystat. Helmien valmistaja antaa tuotteelleen 100 prosentin spesifisyyden (Thermo Fisher Scientific 2015, 2). Värien valmistaja antaa myös tuotteelleen 100 prosentin spesifisyyden (Cellabs 2012, 1). Kahden äärimmäisen spesifisen reagenssin avulla varmistetaan, että mikroskopoidessa vain *Giardia* ja *Cryptosporidium* havaitaan.

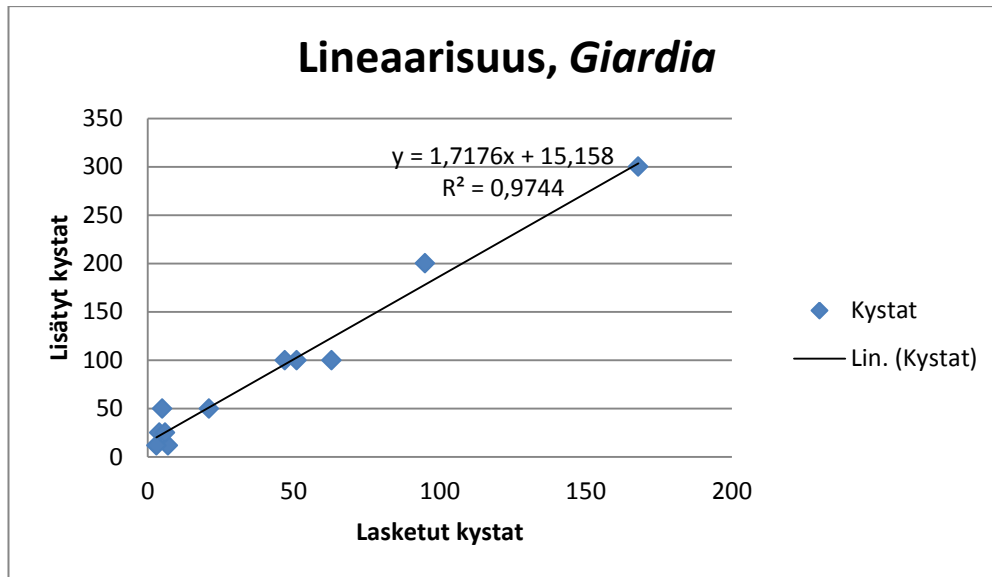
7.2.5 Lineaarisuus

Lineaarisuuden testaamista varten valmistettiin liuos, johon suspensoitiin kaksi EasySeed-ampullia. Liuoksesta lisättiin neljään näytteeseen nestemääriä, jotka

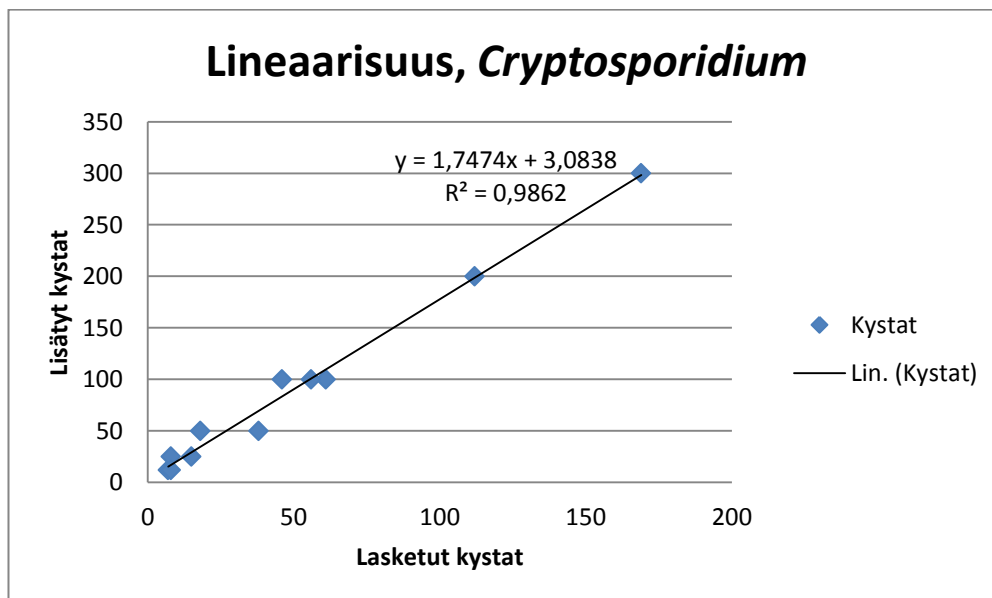
sisälsivät laskennallisesti 100, 50, 25 ja 12 kystaa. Tulokset olivat arveluttavia pienillä pitoisuuksilla, joten suoritettiin uusi koe, jossa näytteisiin lisättiin 300, 200 ja 100 kystaa. Tulokset koottiin yhteen. (Taulukko 7). Tulosten pohjalta tehtiin regressiosuorat *Giardialle* (Kuvio 1) ja *Cryptosporidiumille* (Kuvio 2). Regressiosuorien perusteella voidaan sanoa, että koska korrelaatiokertoimen neliö on molempien saantojen kohdalla hyvin lähellä yhtä, muuttujat eli saannot ovat erittäin riippuvaisia toisistaan (Weber State University 2007, 9). Lineaarisuus oli parempi suurilla pitoisuuksilla, mutta todelliset näytteiden sisältämän kystamäärät ovat luultavasti pieniä, kuten pätevyyskoe näytteiden sisältämät kystamäärät.

Taulukko 7. Lineaarisuus.

Näyte	<i>Giardia</i>		<i>Cryptosporidium</i>	
	Lisätty	Laskettu	Lisätty	Laskettu
Salaatti 1	100	51	100	61
Salaatti 2	50	21	50	38
Salaatti 3	25	4	25	15
Salaatti 4	12	7	12	7
Salaatti 5	100	63	100	46
Salaatti 6	50	5	50	18
Salaatti 7	25	6	25	8
Salaatti 8	12	3	12	8
Salaatti 9	300	168	300	169
Salaatti 10	200	95	200	112
Salaatti 11	100	47	100	56



Kuvio 1. *Giardia*n lineaarisuus.



Kuvio 2. *Cryptosporidium*n lineaarisuus.

7.2.6 Laskennan toistotarkkuus

Laskennan toistotarkkuutta arvioitiin laskemalla rinnakkain validointiin käytettyjen testausten tulokset. Arvioinnissa käytettiin keskihajonnan kaavaa

$$s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}$$

jossa d oli tulosten logaritmien erotus ja n tulosten lukumäärä (Takkinen 2002, 23).

Keskihajonta oli *Giardialle* 0,11 ja *Cryptosporidiumille* 0,12 (Taulukko 8). Tulos oli hyväksyttävä, koska keskihajonta oli alle 0,25 (Takkinen 2002, 23).

Taulukko 8. Laskennan toistotarkkuus.

Näyte	<i>Giardia</i>				<i>Cryptosporidium</i>			
	lkm, JT	log ₁₀ , JT	lkm, TT	log ₁₀ , TT	lkm, JT	log ₁₀ , JT	lkm, TT	log ₁₀ , TT
Salaatti 1	61	1,79	62	1,79	51	1,71	55	1,74
Salaatti 2	38	1,58	33	1,52	21	1,32	20	1,30
Salaatti 3	15	1,18	10	1,00	4	0,60	7	0,85
Salaatti 4	7	0,85	4	0,60	7	0,85	6	0,78
Salaatti 5	46	1,66	57	1,76	63	1,80	66	1,82
Salaatti 6	18	1,26	11	1,04	5	0,70	6	0,78
Salaatti 7	8	0,90	5	0,70	6	0,78	8	0,90
Salaatti 8	8	0,90	4	0,60	3	0,48	2	0,30
Salaatti 9	47	1,67	41	1,61	36	1,56	34	1,53
Salaatti 10	51	1,71	34	1,53	17	1,23	9	0,95
Salaatti 11	51	1,71	30	1,48	20	1,30	15	1,18
Salaatti 12	54	1,73	47	1,67	35	1,54	30	1,48
Salaatti 13	10	1,00	10	1,00	4	0,60	2	0,30
Salaatti 14	5	0,70	5	0,70	2	0,30	1	0,00
Salaatti 15	2	0,30	2	0,30	0	-	0	-
s	0,11				0,12			

8 JOHTOPÄÄTÖKSET

MetropoliLabin menetelmäohje, joka käsitteli *Giardia*- ja *Cryptosporidium*-alkueläinten määrittystä vesi- ja elintarvikenäytteistä IMS- ja mikroskopointimenetelmällä, sisälsi yleistä tietoa alkueläimistä, käytettävät näytetyypit, menetelmän periaatteen, käytettävät reagenssit, välineet, työn suorituksen ja työturvallisuus-toimenpiteet. Kyseessä oli sisäinen menetelmä, joka perustui Environment Agencyn julkaisuun *The Microbiology of Drinking Water (2010) - Part 14 - Methods for the isolation, identification and enumeration of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts*. Menetelmäohje erosi hieman ISO 18744 -standardista. Poikkeuksilla oli pyritty saamaan menetelmä sopimaan paremmin laboratorion laitteistoon ja tarpeisiin.

Optimoinnin ja validoinnin jälkeen referenssimenetelmänä toimi ISO 18744 -standardi. Validointi suoritettiin lehtivihanneksille, mutta validointia voidaan laajentaa tulevaisuudessa koskemaan muitakin elintarvikkeita. Vanhan menetelmäohjeen pohjalta kirjoitettiin uusi menetelmäohje, joka sisälsi optimoinnin aikana positiivisiksi havaitut muutokset. Menetelmäohjeesta pyrittiin saamaan mahdollisimman selkeä niin, että analyysiin perehtymätönkin pystyy suorittamaan sen. Vaikka optimoinnin avulla saatiin parannettua saantoa, korkean saantoprosentin saaminen voi olla kokemattomalle suorittajalle hankalaa. Menetelmän fyysinen suorittaminen vaatii rutiinia, jotta tekijä osaa kiinnittää huomiota tarkkuutta vaativiin vaiheisiin. Työn tavoitteisiin kirjatun optimoinnin tavoitteisiin päästiin sekä validointi onnistui, sillä validoinnissa tutkittujen suureiden tulokset olivat kirjallisuuslähteisiin verrattuna hyväksyttäviä.

Menetelmä on käytössä MetropoliLabissa, mutta analyysiä ei teetetä suuria määriä. Vain kahdella laboratoriollla Suomessa on käytössä menetelmä, jolla voidaan havaita *Giardia* ja *Cryptosporidiumia* elintarvikkeista. MetropoliLabissa analyysi suoritetaan muutamia kertoja vuodessa, kun näytteinä toimivat pätevyyskoenäytteet, asiakkaiden näytteet tai ruokamyrkytyspäilynäytteet. Vaikka analyysiä ei teetetä suuria määriä, henkilökunnan osaamisen ja menetelmän ylläpitäminen on tärkeää esimerkiksi ruokamyrkytys-epidemioiden lähteiden selvittämisessä.

Veden avulla leviävät giardiaasi ja kryptosporidioosi ovat yleisempiä kuin elintarvikkeiden avulla leviävät, mikä näkyy raportoitujen tapauksien määrässä. Raportoitujen elintarvikkeiden avulla leviävien tapausten korkea määrä Pohjoismaissa muihin maihin verrattuna voidaan selittää paremmalla valvonnalla ja raportoinnilla (Robertson 2014, 21). Kehitysmaissa tauteja todetaan harvoin niiden endeemisten luonteiden ja muiden vastaavanlaisia taudinkuvia aiheuttavien, tunnetumpien tautien takia. Monissa maissa ei ole raportointijärjestelmää, ja niissä joissa on, tautien määrä on oletettavasti aliraportoitu. Syynä voi olla tietämättömyys taudista ja oireista, jolloin tauti jää diagnosoimatta.

Tulevaisuuden haasteena elintarvikkeiden mikrobiologisen laadun valvonnassa on globalisaatio. Lisääntyvä ruoan tuonti ja vienti entistä pidempiä matkoja lisää ruoan käsittelyä ja kasvattaa kontaminaatoriskejä. Kehitysmaista tuotavat eksoottiset ja huonosti käsitellyt ruoat, joiden jäljitettävyyden ja valvonta eivät toimi, voivat sisältää (oo)kystia. Globalisaatio vaikuttaa elintarvikkeiden lisäksi ihmisiin. Giardiaasi ja kryptosporidioosi voivat levitä ihmisten mukana, jotka liikkuvat kausityön tai matkustelun takia.

Ruoan välityksellä leviävän giardiaasin ja kryptosporidioosin ymmärtämiseksi valmistetaan standardisoituja menetelmiä alkueläinten havaitsemiseksi erilaisista elintarvikkeista. Tulevaisuudessa tarvitaan lisäksi menetelmiä alkueläinten infektiivisyyden ja elinkykyisyyden selvittämiseen ja (oo)kystien inaktivoimiseen. Kattavin tapa ruoan välityksellä leviävän giardiaasin ja kryptosporidioosin torjumiseksi on riittävä riskianalyysi ja valvonta.

LÄHTEET

- BTF. 2014. EasySeed™: Certificate of Analysis. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 24.2.2016]. Saatavana: http://btfbio.com/wp-content/uploads/2013/11/EasySeedCG_B504.pdf
- BTF. 2016. EasySeed™. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 24.2.2016]. Saatavana: <http://btfbio.com/products/easyseed/>
- Cabada, M. M. 18.8.2015. Cryptosporidiosis Treatment & Management. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 24.2.2016]. Saatavana: <http://emedicine.medscape.com/article/215490-treatment#showall>
- CDC. 2.11.2010. Parasites – *Cryptosporidium*: Biology. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 10.2.2016]. Saatavana: <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>
- CDC. 20.8.2015. Parasites – *Cryptosporidium*: Illness & Symptoms. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 9.2.2016]. Saatavana: <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/illness.html>
- CDC. 21.7.2015. Parasites – *Giardia*: Illness & Symptoms. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 10.2.2016]. Saatavana: <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/illness.html>
- Cellabs. 2012. Crypto/Giardia Cel. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 2.4.2016]. Saatavana: <http://www.cellabs.com.au/files/LR2v13.pdf>
- Dixon, B., Parrington, L., Cook, A., Pollari, F., Farber, J. 2013. Detection of *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in ready-to-eat packaged leafy greens in Ontario, Canada. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 2.4.2016]. Saatavana PubMed-palvelusta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Escobedo, A. A., Ballesteros, J., Gonzalez-Fraile, E., Almirall, P. 2016. A meta-analysis of the efficacy of albendazole compared with tinidazole as treatments for *Giardia* infections in children. *Acta Tropica* 153 (120), 7.
- Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 1997. Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Valvonta 13/1997.
- Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2010. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat. Eviran julkaisuja 1/2010.
- Environment Agency. 2010. The Microbiology of Drinking Water (2010) - Part 14 - Methods for the isolation, identification and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts.

- FAPAS. 2014. LEAP® Scheme Report PARA42: Potable Water March-April 2014.
- Farthing, M. J. 1996. Giardiasis. *Gastroenterology Clinics of North America* 25 (3), 493–515.
- ISO. 2013. ISO/FDIS 18744: Microbiology of the food chain – Detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh leafy green vegetables and berry fruits.
- Jacobsson, K. 2014. NMKL Technical Report No. 4, 2014: Report on Nordic workshop on *Cryptosporidium* and *Giardia* in water and on vegetables/berries, Uppsala 26-27/9-13. [Verkkójulkaisu]. [Viitattu 3.5.2016]. Saatavana: <http://www.nmkl.org/dokumenter/publikasjoner/TechnRep/ReportNo4CryptosporidiumGiardia.pdf>
- Keserue, H. A., Fuchslin, H. P., Wittwer, M., Nguyen-Viet, H., Nguyen, T. T., Surinkul, N., Koottatep, T., Schürch, N., Egli, T. 2012. Comparison of rapid methods for detection of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. (oo)cysts using transportable instrumentation in a field deployment. [Verkkójulkaisu]. [Viitattu 2.4.2016]. Saatavana PubMed-palvelusta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Lujan, H. D. & Svärd, S. 2011. *Giardia: A Model Organism*. Springer.
- MetropoliLab. 2011. Menetelmäohje: *Cryptosporidium*- ja *Giardia*-alkueläinten määrittäminen vesi- ja elintarvikenäytteistä IMS- ja mikroskopointimenetelmällä.
- Ministry for Primary Industries. 2010. *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. [Verkkójulkaisu]. [Viitattu 10.2.2016]. Saatavana: http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Cryptosporidium_Parvum-Parasite_That.htm
- Ministry for Primary Industries. 2001. *Giardia intestinalis*. [Verkkójulkaisu]. [Viitattu 10.2.2016]. Saatavana: http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Giardia_Intestinalis-Protozoan_Parasite.htm
- Nazer, H. 15.2.2016a. Giardiasis. [Verkkosivusto]. [Viitattu 24.2.2016]. Saatavana: <http://emedicine.medscape.com/article/176718-overview>
- Nazer, H. 15.2.2016b. Giardiasis Medication. [Verkkosivusto]. [Viitattu 24.2.2016]. Saatavana: <http://emedicine.medscape.com/article/176718-medication>
- Nazer, H. 15.2.2016c. Giardiasis Treatment & Management. [Verkkosivusto]. [Viitattu 24.2.2016]. Saatavana: <http://emedicine.medscape.com/article/176718-treatment>

- Pönkä, A., Kotilainen, H., Rimhanen-Finne, R., Hokkanen, P., Länninen, M. L., Kaarna, A., Meri, T., Kuusi, M. 16.7.2009. A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki, November 2008. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 24.2.2016]. Saatavana: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/ee/v14n28/art19269.pdf>
- Rimhanen-Finne, R. 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection in environmental and faecal samples.
- Robertson, L. 2013. *Giardia* as a Foodborne Pathogen. Lontoo: Springer.
- Robertson, L. 2014. *Cryptosporidium* as a Foodborne Pathogen. Lontoo: Springer.
- Smith, H. V., Cacciò, S. M., Cook, N., Nichols, R. A. B., Tait, A. 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology* (149), 29–40.
- Takkinen, J. 2002. Laboratorioeläinlääkäreiden XIII neuvottelu- ja koulutuspäivät.
- Thermo Fisher Scientific. 2015. Dynabeads GC Combo Kit. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 24.2.2016]. Saatavana: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/DynabeadsGCCCombo_man.pdf
- THL. 6.2.2016. Giardiaasi. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 9.2.2016]. Saatavana: https://sampo.thl.fi/sampo_prod/cgi-bin/cognos.cgi?b_action=powerPlayService&ui.action=run&TARGET=%2Fcontent%2Ffolder%5B%40name%3D%27amor_prod%27%5D%2Ffolder%5B%40name%3D%27ttr%27%5D%2Fpackage%5B%40name%3D%27amor_ttr_shp_1280_fi_prod%27%5D
- THL. 6.2.2016. Kryptosporidioosi. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 9.2.2016]. Saatavana: https://sampo.thl.fi/sampo_prod/cgi-bin/cognos.cgi?b_action=powerPlayService&ui.action=run&TARGET=%2Fcontent%2Ffolder%5B%40name%3D%27amor_prod%27%5D%2Ffolder%5B%40name%3D%27ttr%27%5D%2Fpackage%5B%40name%3D%27amor_ttr_shp_1270_fi_prod%27%5D
- United States Environmental Protection Agency EPA. 2012. Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 3.4.2016]. Saatavana: <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100J7G4.PDF?Dockey=P100J7G4.PDF>
- Weber State University. 2007. Correlation and Linear Regression. [Ppt-esitys]. [Viitattu 2.4.2016]. Vaatii käyttöoikeuden.