



Heli Mathur

*Dientamoeba fragilis* -alkueläinten  
ameebavärjäys formaliinikiinnitetyistä  
ulostenäytteistä

HUSLAB parasitologian yksikkö

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Bioanalyttikko AMK  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Opinnäytetyö  
20.10.2011

§Tekijä Otsikko	Heli Mathur <i>Dientamoeba fragilis</i> -alkueläimen ameebavärjäys formaliinikiinnitetystä ulostenäytteestä
Sivumäärä Aika	28 sivua + 2 liitettä 20.10.2011
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikka
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	erikoislaboratoriohoitaja Elisabet Tyyni yliopettaja Riitta Lumme
<p><i>Dientamoeba fragilis</i> on siimaeliöihin kuuluva suolistoparasiitti, joka aiheuttaa vaihtelevia suolisto-oireita, tyypillisimmillään ripulia ja vatsakipua. <i>D. fragiliksen</i> leviämistapa on tuntematon ja kystamuotoa ei toistaiseksi ole löydetty. <i>D. fragilis</i> diagnostiikka perustuukin trofosoiittien nopeaan kiinnitykseen kestokiinnitteellä ja ameebavärjäykseen. Tämän työn tarkoituksena oli selvittää voiko <i>Dientamoeba fragilista</i> diagnosoida luotettavasti formaliinikiinnitetystä ulostenäytteestä.</p> <p>Tein opinnäytetyöni HUSLABin parasitologian yksikköön (Haartmaninkatu 3, Helsinki). 2000-luvun alkupuolella laboratorioissa oli huomattu, että <i>D. fragilikseen</i> viittaavia rakenteita voi havaita myös formaliinikiinnitetystä ulostenäytteistä. Vuodesta 2007 lähtien lähettäjälle on kommentoitu näiden rakenteiden esiintymistä suositellen samalla uuden näytteen lähettämistä ameebavärjäystä varten. Aineistona käytin laboratorioon tulleita formaliinikiinnitettyjä ulostenäytteitä (n=50), joihin oli lisätty kommentti <i>D. fragilis</i> -epäilystä. Vertailumateriaalina käytin samasta potilaasta myöhemmin laboratorioon tulleita kestokiinnitettyjä ulostenäytteitä, joille oli tehty ameebavärjäys.</p> <p>Tämän työn perusteella <i>D. fragilista</i> on mahdollista diagnosoida suhteellisen luotettavasti (herkkyys 76,1 %) formaliinikiinnitetystä ulostenäytteestä inkuboimalla näytettä ensin Eco-Fix®-kiinnitteessä. Runsaissa <i>D. fragilis</i> löydöksissä herkkyys oli hieman parempi (78,8%). Tässä opinnäytetyössä esitelty menetelmä nopeuttaisi ja helpottaisi <i>D. fragiliksen</i> diagnostiikkaa. Menetelmä voisi toimia jatkotutkimuksena, mikäli formaliinikiinnitetystä ulostenäytteessä havaitaan dientan kaltaisia rakenteita. Potilaan ei tarvitsisi toimittaa uutta näytettä ja hoito voitaisiin aloittaa heti.</p> <p><i>D. fragilis</i> diagnostiikassa PCR on kaikkein herkin menetelmä, mutta myös kallein. Mikroskopiointi on halvin ja samalla silmäyksellä voidaan havaita myös muita suoliston parasiitteja. Tämän menetelmän käyttöönotto vaatii vielä useamman ulostenäytteen analysointia ja trikromivärjäyksen optimointia.</p>	
Avainsanat	<i>Dientamoeba fragilis</i> , ameebavärjäys, kestokiinnite, EcoFix®

Author Title	Heli Mathur Identification of <i>Dientamoeba fragilis</i> from Formalin-Fixed Trichrome-Stained Stool Samples
Number of Pages Date	28 + 2 appendices 20 October 2011
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Elisabet Tyyni Riitta Lumme

*Dientamoeba fragilis* is a trichomonad parasite found in the gastrointestinal tract of humans. It causes variable symptoms mainly diarrhoea and abdominal pain, for app. 60% of infected patients. The life cycle is unknown, and to date no cyst stage have been isolated. Therefore, diagnosis is based on permanent fixation and trichrome staining of trophozoites of *D. fragilis*, whereas most other pathogenic parasites are diagnosed from formalin fixed stool samples after simple iodine-stain. Thus, for the diagnosis of *D. fragilis*, patients need to provide another sample, which delays the diagnosis is not cost-effective and is more troublesome. The purpose of my study was to examine, whether *D. fragilis* could be diagnosed from formalin-fixed stool samples.

My study was conducted at HUSLAB Parasitology Unit (Helsinki, Finland). The laboratory personnel of the unit had earlier detected *D. fragilis* -type structures from formalin fixed stool samples and in 2007, thus began to recommend permanent staining as a follow-up to rule out *D. fragilis* infection. As a result it is possible to recognize *D. fragilis* for an experienced microscopist, since amount of positive findings based on commenting has risen in the laboratory markedly.

I, together with the laboratory personnel, analyzed 50 formalin fixed samples that were commented on having *D. fragilis* like structures by the HUSLAB personnel. The samples were stained and microscoped and the results gained were compared with the results from the permanent fixed trichrome stained samples from the same patients.

I found that it was possible to detect *D. fragilis* from the formalin-fixed stool samples after the trichrome stain with a sensitivity of 76,1%. If *D. fragilis* was abundant in the samples, the sensitivity was higher (78,8%). Hence, this method could be used to analyze *D. fragilis* from formalin fixed samples without a need for permanent fixation. The method needed experienced microscopists and was maybe best suitable for abundant samples, though.

The most sensitive method to date for diagnosis of *D. fragilis* is PCR, especially real-time PCR, but it is also the most expensive. Microscopy is still the most cost-effective method available. Also with microscope many parasites can be detected at the same time, unlike with PCR, which detects only one parasite at a time. This study was made with 48 stool samples. Before this method could be made commercial, it is needed to increase the sample amount and continue optimizing trichrome staining.

Keywords	<i>Dientamoeba fragilis</i> , trichrome staining, formalin fixation
----------	---

## Sisällys

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>Dientamoeba fragilis</i></b>	<b>2</b>
2.1	Esiintyvyys	3
2.2	Tartuntatie ja kiertokulku	5
2.3	Oireet ja hoito	6
<b>3</b>	<b><i>D. fragiliksen</i> laboriodiagnostiikka</b>	<b>7</b>
3.1	Parasiitinäytteen preanalyttiset tekijät ja säilyvyys	8
3.2	Värjäys ja mikroskopointi	9
3.3	Molekyyligeneettiset menetelmät	11
3.4	Viljely	13
3.5	Serologiset menetelmät	14
<b>4</b>	<b>Opinnäytetyön tarkoitus ja menetelmät</b>	<b>15</b>
4.1	Ensimmäinen vaihe: Esikäsittelyn valinta	15
4.2	Toinen vaihe: Menetelmän testaus	16
<b>5</b>	<b>Tulokset</b>	<b>17</b>
5.1	Ensimmäisen vaiheen tulokset: eri esikäsittelyjen vertailu	17
5.2	Toisen vaiheen tulokset: <i>D. fragiliksen</i> diagnosointi formaliinikiinnitetystä ulostenäytteestä	19
5.3	Opinnäytetyön luotettavuuden arviointi	21
<b>6</b>	<b>Pohdinta</b>	<b>22</b>
	<b>Kirjallisuutta</b>	<b>25</b>

Liitteet	Liite 1. Parasiitinäytteen kiinnitteitä
	Liite 2. Trikromivärjäys

## 1 Johdanto

*Dientamoeba fragilis* on siimaeliöihin kuuluva suolistoparasiitti, jota löytyy maailmanlaajuisesti. *D. fragilis* aiheuttaa vaihtelevia suolisto-oireita, tyypillisimmillään ripulia ja vatsakipua. Pitkittyneenä infektio voi johtaa jopa ärtyneen paksusuolen syndroomaan (Stark – van Hal – Marriott – Ellis – Harkness 2007: 11). *D. fragilixen* esiintyvyys on kasvanut viime vuosina huomattavasti, osittain diagnostisten menetelmien parantuessa, mutta myös yleisen tietoisuuden lisääntyessä klinikoiden keskuudessa. HUSLABin parasitologian yksikön (Haartmaninkatu 3, Helsinki) ameebavärjäyksistä suurin osa on nykyään *D. fragilis* –infektioiden poissulkua.

Suoliston parasiittidiagnostiikka tehdään pääsääntöisesti formaliinikiinnitetystä ulostenäytteestä (F -Para-O), josta voidaan mikroskopoiden havaita esimerkiksi madon munia ja kystia. *D. fragilixella* ei tällä hetkellä tunneta kystamuotoa, ainoastaan trofotsoittimuoto (Johnson – Windsor – Clark 2004: 553). Trofotsoiitit hajoavat herkästi suoliston ulkopuolella, joten näyte täytyy joko analysoida heti tai kiinnittää kestokiinnitteellä. Kestokiinnitetyt näytelasit värjätään ameebavärjäyksellä (F -AmebVr) ja analysoidaan valomikroskoopilla. Tämä menetelmä on hyvin yleinen ja käytössä esimerkiksi HUSLABin parasitologian yksikössä. Muita *D. fragilixen* diagnostisia menetelmiä ovat viljely ja PCR. Serologiset menetelmät ovat vasta kehittelyasteella. PCR on menetelmistä sensitiivisin ja spesifisin, mutta myös kallein.

HUSLABin parasitologian yksikössä huomattiin, että *D. fragilikseen* viittaavia rakenteita voi havaita myös formaliinikiinnitetystä ulostenäytteestä. Vuodesta 2007 lähtien on lähettäjälle kommentoitu näiden rakenteiden esiintymistä suositellen samalla ulostenäytettä ameebavärjäystä varten. Tällä opinnäytetyöllä pyrittiin selvittämään, voiko *Dientamoeba fragilista* diagnosoida formaliinikiinnitetystä ulostenäytteestä. Ajatuksena on, että potilaan kerran antamaa ulostenäytettä voitaisiin käyttää myös *D. fragilixen* diagnostiikkaan, eikä hänen tarvitsisi toimittaa uutta näytettä laboratorioon eri kiinnitteellä.

## 2 *Dientamoeba fragilis*

"...We propose therefore the new name *Dientamoeba fragilis* for our amoeba, but we can discuss the question of nomenclature most conveniently after we have described the organism itself. This, therefore, we shall now do" (Jepps – Dobell 1918).

Näillä sanoilla Margaret Jepps ja Clifford Dobell nimesivät *Dientamoeba fragilixen* vuonna 1918. Ensimmäiset merkinnät *D. fragilixesta* tehtiin jo vuonna 1909, mutta tällöin sitä ei tunnustettu uudeksi alkueläimeksi. Useamman vuoden ajan *D. fragilixista* pidettiin apatogeenina, mutta vasta 2000-luvun puolella alettiin toteuttaa periaatetta, että "jos on oireita ja ne poistuvat lääkityksellä, se on patogeeni". Nykyään *D. fragilixis* on luokitellaan patogeeniksi, joka löydettyäessä hoidetaan pois lääkityksellä. (Johnson ym. 2004: 553.)

*D. fragilixis* on suolistossa elävä alkueläin, joka aiheuttaa laihtumista, väsymystä ja vaihtelevia suolisto-oireita (ripulia, vatsakipuja, oksentelua, ilmavaivoja). Akuutissa infektiossa oireet voivat olla rajuja, mutta pitkittyneissä tulehduksissa oireet voivat ilmetä lievempänä ja jaksottain. Osa infektoituneista voi olla lähes oireettomia. *D. fragilixista* pidettiin alkujaan virheellisesti ameebana (heimoon *Entamoebidae* kuuluvana). Tutkimustekniikoiden parantuaessa ja erityisesti elektronimikroskopian myötä *D. fragilixisella* todettiin olevan paljon yhtäläisyyksiä siipikarjalle patogeenisen *Histomonas meleagridixen* (*Tricomonanida*) kanssa, joka kuuluu siimaeliöihin. *Dientamoeba fragilixis* on siis nimestään huolimatta siimaeliö.

*D. fragilixiselta* ei ole toistaiseksi löydetty kystamuotoa, vaan ainoastaan trofotsoittimuoto (jakaantuva, lisääntymiskykyinen alkueläimen muoto). *D. fragilixis* on pyöreä, yleensä halkaisijaltaan 5-15 µm, mutta koko voi vaihdella jopa 4-40 µm väliltä. Sillä on yleensä (60-80 %) 1-2 tumaa. Tumat ovat tyypillisimmillään fragmentoituneita eli niiden tumakalvo ei ole tasainen. Solulima on rakeinen. Joissakin tapauksissa voi nähdä hennon valejalan, mutta se on harvinaisempaa (kuvio 1). (Meri 2008: 205.)



Kuvio 1. *D. fragilixis* (n 10µm), trikromivärjäys, 100x suurennos

## 2.1 Esiintyvyys

*D. fragiliksen* yleisyys vaihtelee maailmanlaajuisesti suuresti. Osittain siksi, että diagnosointiin on käytetty eri menetelmiä, joten yleisyyslukujen vertailu on hankalaa. Lukujen uskotaan olevan, vieläkin ilmoitettua suurempia tarkkojen diagnostisten menetelmien puuttuessa: *D. fragilista* on pidetty patogeenina vasta muutamia vuosia, joten monissa maissa ei ole saatavilla luotettavia diagnoosimenetelmiä tai osaavia mikroskooppia (Girginkardesler – Özgür – Kilimcioglu - Ülgen 2008: 73; Stensvold – Arendrup – Mølbak – Nielsen 2007: 839). Lisäksi *D. fragiliksen* ajoittainen erittyminen ulosteeseen mutkistaa lukujen vertailua: nostamalla näytteiden määrää yhdestä kolmeen on saatu ameebavärijäys-menetelmän herkkyyttä parannettua 30 % (Hiatt – Markell – Ng 1995: 36). Alla olevassa taulukossa on kerätty muutamia tutkimuksia, joissa käy ilmi *D. fragiliksen* esiintyvyys (taulukko 1).

Taulukko 1. *D. fragiliksen* esiintyvyys eri maissa tehdyissä tutkimuksissa

Maa	n	<i>D. fragilis</i> Positiivinen	Menetelmä
Alankomaat <sup>1</sup>	397 oireellista	31%	PCR
		17%	mikroskopointi
Pakistan <sup>2</sup>	171 oireellista	4%	PCR
		4%	mikroskopointi
		4%	Viljely
		0%	PCR
Alankomaat <sup>3</sup>	220 oireellista	0,6%	mikroskopointi
		1,3%	Viljely
		23%	mikroskopointi
Turkki <sup>4</sup>	313 oireellista	10%	mikroskopointi
Australia <sup>5</sup>	6750 oireellista	0,9%	Mikroskopointi (positiivisten löydösten varmistus PCR:llä)
Alankomaat <sup>6</sup>	462 oireellista	10%	mikroskopointi
Australia <sup>7</sup>	200 oireellista	25%	mikroskopointi
		24%	PCR
		25%	reaaliaikainen PCR
Espanja <sup>8</sup>	8313 oireellista	1,6%	mikroskopointi
Brittein saaret <sup>9</sup>	964 oireellista	16%	mikroskopointi
Italia <sup>10</sup>	1503 oireellista	0,6%	mikroskopointi
Tanska <sup>11</sup>	103 oireellista	12%	mikroskopointi

<sup>1</sup> Bruijnesteijn – Wallinga – Ruijs – Bruins – Verweij 2009: 869-874

<sup>2</sup> Yakoob ym. 2010: 679-684

<sup>3</sup> Gijssbers – Benninga – Büller 2011: 1651-2227

<sup>4</sup> Girginkardesler – Özgür – Kilimcioglu – Ülge 2008: 72-75

<sup>5</sup> Stark – Beebe – Marriott – Ellis – Harkness 2005b: 2718-2723

<sup>6</sup> Van Gool – Weijts – Lommerse – Mank 2003: 258-290

<sup>7</sup> Stark – Beebe – Marriott – Ellis – Harkness 2006: 232-235

<sup>8</sup> González-Moreno – Domingo – Teixidor – Gracenea 2011: 87-93

<sup>9</sup> Jackson – Jackson 2009: 182-184

<sup>10</sup> Guidetti – Ricci – Vecchia 2010:154-161

<sup>11</sup> Stensvold – Arendrup – Molbak – Nielsen 2007: 816-842

Kuten taulukosta näkyy esiintyvyyys vaihtelee suuresti (0-31%). Suurin osa tutkimuksista on tehty suolisto-oireellisilta potilailta. Sukupuolen, iän tai vuodenajan ei ole todettu vaikuttavan *D. fragiliksen* esiintyvyyteen (González-Moreno – Domingo – Teixidor – Gracenea 2011: 90; Stark – Beebe – Marriott – Ellis – Harkness 2005b: 2719).

HUSLABin parasitologian yksikössä huomattiin, että *D. fragilikseen* viittaavia rakenteita voi havaita myös formaliinikiinnitetystä ulostenäytteestä (F –Para-O), josta muu suoliston parasiittidiagnostiikka pääsääntöisesti tehdään (Tyyni – Jokiranta – Meri 2010). Vuodesta 2007 lähtien on alettu kommentoida lähettäjälle näiden rakenteiden esiintymistä suositellen samalla ulostenäytettä ameebavärjäystä varten. Yleisen *D. fragilis* tietoisuuden kasvaessa klinikoiden keskuudessa sekä tämän kommentoinnin myötä positiivisten *D. fragilis* –näytteiden määrä on kasvanut huomattavasti (taulukko 2).

Taulukko 2. *D. fragilis* –positiivisten näytteiden määrä HUSLABin parasitologian yksikössä vuosina 1999 - 2011.

Vuosi	Kpl	<i>D. fragilis</i> - löydösten osuus ameebavärjäys pyynnöistä
1999	6	4 %
2000	3	2 %
2001	5	3 %
2002	4	2 %
2003	4	2 %
2004	1	1 %
2005	4	3 %
2006	0	0 %
2007	23	9 %
2008	62	9 %
2009	118	13 %
2010	215	17 %
2011*	144	26 %

\* tammikuu-huhtikuu

Vuosina 1999-2006 *D. fragilis* -positiivisten näytteiden osuus kaikista ameebavärjäyksistä vaihteli 0-4 % välillä. Vuodesta 2007 alkaen positiivisten löydösten määrä on lisääntynyt voimakkaasti (9-26 %). Myös näytemäärät (AmebVr-pyyntöt) ovat kasva-



neet ja usein indikaationa on *D. fragilixen* poissulku. Vuonna 2010 *D. fragilis* -positiivisten tapausten määrä (215 kpl) ylitti ensimmäistä kertaa *G. lamblia* -positiivisten tapausten määrän (160 kpl).

## 2.2 Tartuntatie ja kiertokulku

*D. fragilixen* tartuntatie on toistaiseksi tuntematon. Myöskään kystamuotoa ei ole löydetty (Ash 2007: 77). *D. fragilixelta* tunnetaan ainoastaan trofotsoittimuoto, joka kuolee nopeasti elimistön ulkopuolella, joten suora tarttuminen ihmisestä ihmiseen vaikuttaa joidenkin tutkijoiden mielestä epätodennäköiseltä (Barratt – Harkness - Marriott – Ellis – Stark 2011: 1). Muutama tutkijaryhmä on ehdottanut, että tarttuminen tapahtuisi loismatojen munien välityksellä, esimerkiksi kihomadon välityksellä (Girginkardesler ym. 2008: 72). Ajatus matovektorista on saanut alkunsa jo vuonna 1940, kun *D. fragilixen* lähisukulaisen, *Histomonas meleagridixen*, tiedettiin leviävän siipikarjan keskuudessa *Heterakis gallinarum* –suolinkaisen välityksellä. Kihomadon osuutta *D. fragilixen* leviämiseen ei ole kuitenkaan pystytty todistamaan (Barratt ym. 2011: 1).

*D. fragilixen* kiertokulku on tuntematon. Tiedetään, että syöttämällä ihmiselle eläviä trofotsoitteja (1940) ne kuolevat todennäköisesti mahalaukun happojen vaikutuksesta. Trofotsoiitit elävät vain 6-24 tuntia elimistön ulkopuolella ja keitetty vesi tappaa ne. Lisäksi *D. fragilis* ei kasva huoneenlämmössä *in vitro*. Kaikki nämä viittaisivat siihen, että *Dientamoeba* ei ole vapaana, esim. juomavedessä, elävä organismi. (Barratt ym. 2011: 3.)

Useat tutkimusryhmät ovat tutkineet *D. fragilixen* esiintymistä eri eläimillä ja sitä onkin löytenyt muun muassa apinoista, gorilloista, lampaista ja sioista. Infektoituneilla gorilloilla on jopa todettu olevan ärtyneen paksusuolentulehdukseen viittavia oireita. *D. fragilis* kasvaa *in vitro* parhaiten 41-42°C:ssa, joka on lähempänä lintujen kuin ihmisen ruumiinlämpötilaa. (Barratt ym. 2011: 11.) On siis hyvinkin mahdollista, että eläimillä on osuus *D. fragilixen* kiertokulussa.

Stressitilanteissa monet trikomonakset muodostavat pseudokystia, jossa trofotsoiitit muodostavat pyöreitä rakenteita ja flagellat vetäytyvät solun sisään. Tänä aikana tummat ja muut soluorganellit jakautuvat muodostaen jättikokoisen monitumaisen solun. Tila muistuttaa kystamuotoa, mutta solun seinämä ei ole kystankaltainen ja tila on reversiibeli. Kun olosuhteet palautuvat normaaleiksi, jättisolusta kuroutuu flagellallisia

trofotsoiitteja. Pseudokystat ovat yksi trikomonasten olomuodoista ja niiden on todettu tarttuvan isäntäsolun pintaan paremmin kuin normaalin trofotsoiittimuodon. *D. fragilis* kuuluu *Trichomonadidea*-heimoon, joten on mahdollista, että myös *D. fragiliksellä* on tartuttava pseudokystamuoto. (Barratt ym. 2011: 10.)

HUSLABin parasitologian yksikössä on huomattu, että jos perheessä on yhdellä *D. fragilis* -infektio, löytyy se helposti myös muiltakin perheenjäseniltä. Tämä taas viittaisi infektoiviin trofotsoiittimuotoihin, jotka leviävät suoraan ihmisestä ihmiseen.

Niin kauan kun *D. fragiliksen* kiertokulku ja tartuntatapa on tuntematon, on infektioiden ehkäisy äärimmäisen hankalaa. Toistaiseksi on keskitytty kehittämään sensitiivisempiä ja spesifisempiä diagnostisia menetelmiä, unohtamatta kuitenkaan perustutkimusta.

### 2.3 Oireet ja hoito

*D. fragiliksen* aiheuttamiin suolisto-oireisiin kuuluvat useimmiten ripuli ja vatsakivut. Muita oireita ovat vatsakrampit, pahoinvointi, oksennus, lievä kuume ja yleinen väsymys. Joillakin infektoituneilla henkilöillä on esiintynyt myös urtikariaa, tulehtuneita sappiteitä ja kutinaa (Johnson ym. 2004: 558). Oireet voivat esiintyä jaksoittaisesti ja pitkittyä sekä kroonistua. Kroonisissa infektioissa oireet voivat ilmetä yhdestä kuukaudesta jopa kahteen vuoteen. *D. fragiliksen* aiheuttamat oireet muistuttavat kovasti ärtyneen paksusuolen syndrooman oireita, joten on mahdollista, että osalla potilaista on väärä diagnoosi (Stark ym. 2007: 14).

Parasiitit ovat ihmisen solun tavoin eukaryootteja. Tämä vaikeuttaa tehokkaiden ja turvallisten hoitojen löytämistä. Tarkoitus on tuhota parasiitti ilman, että isännän elimistö vahingoittuu. *D. fragilis* on suolistoparasiitti, joka tarkoittaa, että hoitona voidaan käyttää suuriakin annoksina sellaisia lääkkeitä, jotka eivät imeydy suolistosta muualle elimistöön (Siikamäki – Jokiranta – Meri 2011). Useiden parasiittilääkkeiden vaikutusmekanismi on tuntematon ja niillä voi olla voimakkaita sivuvaikutuksia kuten urtikariaa, kutinaa, pahoinvointia, vatsakipuja ja ripulia. *D. fragiliksen* hoidossa käytetään yleensä jodokinolia, paromomysiiniä, metronidatsolia, doksisykliiniä tai tetrasykliiniä. (Garcia 2007: 722-756.) Ornidatsoli on metronidatsolin johdannainen, jonka on todettu olevan tehokkaampi *D. fragiliksen* häätämiseen (93 % teho vs. 70 % teho) (Kurt – Girginkardeşler– Balcioğlu – Özbilgin – Ok 2008: 603).

Suomessa ensisijainen lääke on paromomysiini ja tarvittaessa lisäksi doksisykliini ja metronidatsoli (Jääskeläinen 2011). Paromomysiiniä pidetään turvallisimpana vaihtoehtona raskaana oleville ja lapsille, sillä se imeytyy heikosti suolistosta elimistöön ja on tehokas (80 % teho). Sivuvaikutuksia on hyvin harvoin. (Vandenberg - Souayah – Mouchet – Dediste – van Gool 2007: 90.)

Uusien lääkkeiden kehittäminen on hankalaa johtuen *D. fragilixen* vaativista viljelyolosuhteista: viljely vaatii apubakteerin (esimerkiksi *E. colin*), joten on mahdotonta sanoa tuhoaako lääkeaine *D. fragilixen* vai sitä ylläpitävän bakteerin. Myös rokotetutkimus on vasta alkuvaiheessa johtuen osittain siitä, että suurin osa sairastuneista on asuu köyhissä maissa, jolloin lääketehaat eivät saa rahallista vastinetta investoiduille tutkimusrahoilleen. (Garcia 2007: 718; Johnson ym. 2004: 562.)

### **3 *D. fragilixen* laboratoriodiagnostiikka**

Luotettava suolistoparasiitin diagnostiikka vaatii mahdollisimman elävän, ehjän ja tuoreen ulostenäytteen saamista. Vaikka useat parasiitit ovat hankalasti häädetävissä elimistöstä, ovat ne yllättävän herkkiä elimistön ulkopuolella lämpötilan ja ympäristön aiheuttamiin morfologisiin muutoksiin.

*D. fragilixen* diagnostiikka on perinteisesti tehty kestokiinnitetystä ulostenäytteestä mikroskopoimalla värjättyjä laseja. Muita diagnostisia menetelmiä ovat PCR (erityisesti reaaliaikainen PCR), viljely ja serologiset menetelmät. Serologiset menetelmät ovat vielä kehitteillä, mutta lupaavia tuloksia on jo saatu (Chan – Ming – Mackenzie 1993; Johnson ym. 2004: 565).

Yleisin ja kirjallisuudessa eniten mainittu menetelmä *D. fragilixen* diagnostiikassa on kestokiinnitetyn ulostenäytteen värjäys ja mikroskopointi valomikroskoopilla (Stark ym. 2010b: 411). Se on helppo toteuttaa ja hinta on edullinen (3,50 \$). Menetelmän sensitiivisyys riippuu lähinnä näytteen tuoreudesta ja siitä, kuinka kokenutta henkilöstö on mikroskopoinnissa. PCR (15 \$) ja reaaliaikainen PCR (27 \$) ovat hinnastaan huolimatta yleistymässä (Stark ym. 2010b: 413). Ne ovat erittäin spesifisiä ja sensitiivisiä menetelmiä. Kaikki laboratoriot eivät kuitenkaan voi ylläpitää kallista menetelmää ja lisäksi ulostenäytteen tulee olla tuoretta, joten logistiset ongelmat voivat olla esteenä.

### 3.1 Parasiittinäytteen preanalyttiset tekijät ja säilyvyys

Preanalyttisistä tekijöistä tulee ottaa tuoreuden lisäksi huomioon potilaan lääkitys. Antibiootit häiritsevät parasiittien havaitsemista ulosteesta, sillä antibakteeristen lääkkeiden käyttö vaikuttaa suoliston normaaliflooraan, joka on usean parasiitin ravintoa (Garcia 2007: 762). Ulostenäyte täytyy ottaa ennen lääkityksen aloittamista luotettavan tuloksen saamiseksi.

Mikä on sopiva määrä ulostenäytteitä, jotta mahdollinen parasiitti saadaan diagnosoidua? Joissakin tapauksissa oireellisesta potilaasta riittäisi vain yksi ulostenäyte, varsinkin sellaisille parasiiteille, joille on olemassa herkkä PCR tai immunologinen menetelmä (esimerkiksi ekinokokki, *Entamoeba histolytica*, *Giardia*, *Cryptosporidium* spp.). Toisaalta suositellaan otettavaksi vähintään kolme eri päivänä otettua näytettä, koska maidon munien ja erityisesti alkueläinten kystien ja *D. fragilis* –trofotsoiittien erittyminen on jaksottaista. Joissakin tapauksessa kolmena eri päivänä otetut näytteet voidaan yhdistää yhdeksi sekoitusnäytteeksi. Käytännöt vaihtelevat maiden, rahavarojen, käytännöllisyyden ja potilaan oireiden mukaan. Suomessa suositellaan otettavaksi 2-3 erillistä ulostenäytettä parin päivän välein. (Garcia 2007: 763-764; Siikamäki – Kyrönseppä – Jokiranta 2002: 1245; Hiatt ym. 1995: 36-38.)

Mikäli halutaan tutkia parasiittien liikkuvia trofotsoiitteja, näytteen tulee olla tuoretta. Trofotsoiittimuoto on parasiitin liikkuva, jakaantumiskykyinen ja ravintoa ottava muoto, joka hajoaa helposti elimistön ulkopuolella tunnistamattomaksi. Puolikiinteä uloste säilyy ilman kiinnitystä analyysikelpoisena vain yhden tunnin ja kiinteä 24 tuntia (Garcia 2007: 767). Harvoissa laboratorioissa ulosteen tutkiminen 30 minuutin kuluttua näytteen antamisesta on mahdollista, joten useimmiten käytetään kiinnitteitä, esimerkiksi formaliinia, MIF:iä (tiomerosal-iodine-formalin), SAF:ia (sodium-acetate-acetic acid-formalin), Schaudinnin liuosta tai PVA:ta (polyvinyylialkoholi). Kiinnitteet eroavat hiukan käyttöominaisuuksiltaan, joten sopivaa kiinnitettä valitessa tulee ottaa huomioon tutkittava parasiitti ja sille tehtävät tutkimukset (liite 1). Ulostenäytteen kiinnitteitä voidaan kuitenkin käyttää vain värjäys- ja mikroskopointimenetelmiin. PCR- ja viljelymenetelmät tarvitsevat tuoreen, kiinnittämättömän näytteen. Myös jääkappisäilytys heikentää PCR:n ja viljelyn sensitiivisyyttä (Stark – Beebe – Marriott – Ellis – Harkness 2005a: 61). Näytteen preanalyttisistä tekijöistä huomionarvoista on se, että valittu

esikäsitteily (kiinnitetty vs. tuore näyte) vaikuttaa suoraan käytettäviin diagnostisiin menetelmiin ja sitä kautta parasiitin löytymiseen ulosteesta.

Kiinnitteitä on olemassa erilaisia, sekä kaupallisia että itse tehtäviä. Jokainen laboratorio valitsee menetelmilleen sopivan kiinnitteen. Myös työturvallisuus- ja jäteongelmat on otettava huomioon kiinnitettä valittaessa: monet kiinnitteistä sisältävät myrkyllisiä ainesosia, jotka täytyy hävittää asianmukaisesti.

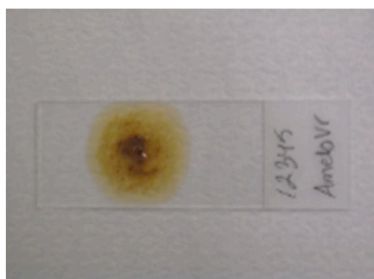
### 3.2 Värjäys ja mikroskopointi

*D. fragiliksella* ei tunneta kystamuotoa, joten sen diagnosointi perustuu trofotsoiitti-muotojen löytymiseen ulosteesta (Stark ym. 2010a: 614). Trofotsoiitit ovat herkkiä ympäristön muutoksille (lämpötila ja aerobinen ympäristö), joten ulostenäyte täytyy kiinnittää mahdollisimman nopeasti ulostamisen jälkeen (Garcia 2007: 767).

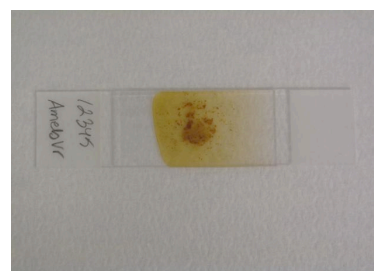
*D. fragilis* -diagnostiikassa on kiinnitteenä käytetty aikaisemmin PARA-PAK<sup>®</sup> -kiinnitettä, joka on nykyään poistumassa käytöstä sen sisältämän elohopean takia. Tilalle on tullut EcoFix<sup>®</sup>-kiinnite (kuvio 2), jota voidaan käyttää myös muiden suolistoparasiittien, kuten *Entamoeba histolytica/disparin*, *Balantidium colin* ja *Giardia lamblian* diagnostiikassa. Molemmissa kiinnitteissä tehoaineena on polyvinyylialkoholi eli PVA. Näytteen tulisi kiinnittyä vähintään 30 minuuttia ennen näytteen prosessoimista objektilasille (Garcia 2007: 799). Ensin kestokiinnitetty näyte sekoitetaan hyvin ja sen jälkeen pipetoidaan pisara näytettä lasille (kuvio 3). Näyte levitetään lasille toisen objektilasin avulla (kuvio 4).



Kuvio 2. Ecofix<sup>®</sup>- ja PARA-PAK<sup>®</sup>-purkit ulostenäytettä varten



Kuvio 3. Näytepisara lasilla.

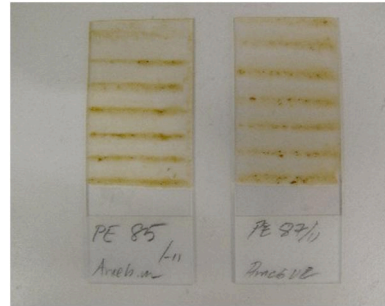


Kuvio 4. Näytepisaran levitys lasille toisella objektilasilla.

Seuraavaksi näyte viivoitetaan objektilasin avulla, jolloin saadaan lasille erivahvuisia näytekohtia (kuvio 5). Lopuksi objektilasien annetaan kuivua huoneenlämmössä vähintään kaksi tuntia ennen värjäystä (kuvio 6). Yleensä tehdään joko jodi-trikromivärjäys tai rauta-hematoksyleenivärjäys.



Kuvio 5. Näytteen viivoittaminen, jotta saadaan erivahvuisia kohtia näytettä lasille



Kuvio 6. Valmiit kuivat lasit ennen värjäystä.

Trikromivärjäys on helppo ja nopea värjäys, jolla saadaan tasainen väri alkueläimille, hiivoille, ihmisen soluille (valkosolut, punasolut) ja artefaktoille. Värjäykseen kuluu aikaa alle tunti. Kiinnitteenä voidaan käyttää Schaudinn- tai EcoFix<sup>®</sup>-kiinnitettä (Garcia 2007: 802). HUSLABin parasitologian yksikössä (Haartmaninkatu, Helsinki) käytetään jodi-trikromivärjäystä EcoFix<sup>®</sup>-kiinnitetyille ulostenäytteille, joista tutkitaan *Giardia lamblia*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica/dispar* ja *Balantidium coli* (ameebavärjäys, -AmebVr KL 4088).

Trikromivärjäystä edeltää usein jodi-alkoholikäsittely (liite 2), jonka tarkoituksena on poistaa näytteestä kiinnitteen mukana tullut elohopeakloridi korvaamalla elohopea jodilla. Sitä seuraavan alkoholisarjan tarkoitus on poistaa näytteestä jodi ennen varsinaista trikromivärjäystä. (Garcia 2007: 803.) EcoFix<sup>®</sup>-kiinnite sisältää vain vähän elohopeakloridia, joten EcoFix<sup>®</sup>-kiinnitetyistä ulostenäytteistä voi jättää jodikäsittelyn pois ja siirtyä suoraan trikromivärjäykseen, jolloin värjäysaika vähenee puoleen tuntiin (Mathur 2011).

Trikromiväri värjää alkueläinten sytoplasman sinisen vihreäksi, joskus näytteen pH:sta johtuen jopa punertavaksi. Alkueläinten kystat ovat yleensä hieman punertavia. Sytoplasmat värjäytyvät harmahtavan sinivihreiksi tai punertaviksi. Happpalkoholin tehtävä on poistaa ylimääräistä väriä lasilta. Sitä seuraava alkoholikäsitteily on taas huuhtelua

varten. Alkoholisarjan lopun tehtävä on poistaa vesi objektilaseilta. (Garcia 2007: 802-803.) Ksyleenin tarkoitus on aktivoida liima-aine peitinlasien kiinnitystä varten.

Toinen kirjallisuudessa usein esiintyvä värjäys *D. fragiliksen* diagnostiikassa on rauta-hematoksyliinivärjäys. Värjäys voidaan tehdä Schaudinn-, PVA-, SAF- tai EcoFix®-kiinnitetyille ulostenäytteille. Alkueläinten trofotsoiitit värjäytyvät sinisen harmaiksi, joskus jopa mustan sävyiseksi. Taustaväri on vaalean harmaa tai sinertävä tarjoten hieman värikontrastia tummempiin alkueläimiin verrattuna. (Garcia 2007: 807-811.)

Sekä trikromivärjätty että rauta-hematoksyleenivärjätty lasit analysoidaan valomikroskoopilla. Mikroskopoinnissa käytetään 10x kuivaobjektiivia näytteen yleisilmeen tarkasteluun ja 50-100x immersioöljyobjektiivia tarkempaan rakenteiden analysointiin. Jokaiselta lasilta tutkitaan n. 300 näkökenttää. Mikroskopoidessa voidaan havaita lasilta alkueläinten kystien tai trofotsoiittien lisäksi puna- tai valkosoluja, eosinofiilejä, hiivoja, kasvien siemeniä, siitepölyä tai kuituja. (Garcia 2007: 783.)

### 3.3 Molekyylogeneettiset menetelmät

Molekyylogeneettisistä menetelmistä PCR-tekniikat tarjoavat tällä hetkellä lupaavimpia näkymiä diagnosoida *D. fragilis*. PCR on muihin menetelmiin verrattuna tarkin ja herkin. (Stark ym. 2006: 235; Stark ym. 2010b: 411).

Ribosomi on solun yksikkö, jossa proteiineja valmistetaan aminohapoista lähetti RNA:n ohjeiden mukaisesti. Ribosomi koostuu pienestä ja suuresta alayksiköstä, joiden entsyymaattisena osana toimii ribosomaalinen RNA (rRNA). rRNA ei siis toimi informaation välittäjänä, vaan sillä on toiminnallinen tehtävä proteiinisynteesissä. RNA:ta pidetään maailman ensimmäisenä polymeerinä, elävän eliön esiasteena. (Solunetti 2006.) rRNA:ta koodaava DNA onkin ihanne kohde diagnostisissa ja taksonomisissa PCR-menetelmissä, sillä ribosomaalinen DNA (rDNA) löytyy kaikilta eliöiltä, se on hyvin konservatiivista ja samalla sillä on selviä lajien välisiä eroja. (Stark ym. 2005a: 58.)

Vuonna 1996 *D. fragiliksen* SSU (small subunit) rRNA:n geeni, SSU rDNA, sekvensoitiin (kanta Bi/pa; ATCC 30948) (Johnson ym. 2004: 554). Ensimmäiset PCR alukkeet kohdistettiin koko geenialueelle tai isolle alueelle SSU rDNA:ta ja niiden koko vaihteli (1700, 887 tai 662 bp). Menetelmän herkkyyks kärsii, mikäli monistetaan suuria geenifragmentteja. Reaaliaikaista PCR:ää varten on kehitelty alukkeet pienelle, 98 bp:n, kokoi-

selle geenialueelle, joka koodaa 5.8S rRNA:ta. Muun muassa tämän johdosta reaaliaikaisen PCR:n sensitiivisyyden on todettu olevan parempi kuin perinteisen PCR:n agarosigeeleineen. (Verweij ym. 2007: 401.)

Eräässä tutkimuksessa käytettiin reaaliaikaisessa PCR:ssä alukkeita, jotka tuottivat pieniä 77bp:n geenifragmentteja. Nämä tuottivat DNA-monisteita myös *Trichomonas vaginalis* ja *T. fetus* SSU rRNA:n geenialueista. Tämä vahvistaa olettamusta, että *D. fragilis* todellakin on *Trichomonaksen* lähisukulainen. *D. fragilis* diagnostisoinnin kannalta tämä ristireaktio ei ole täysin alukkeita poissulkeva, sillä *T. vaginalista* ja *T. fetusta* ei esiinny ihmisen ulosteessa. (Stark ym. 2006: 235.)

Koska reaaliaikainen PCR on äärimmäisen sensitiivinen menetelmä, ei *D. fragiliksen* taipumus erittyä ulosteeseen jaksoittaisesti ole diagnostiikassa yhtä häiritsevä tekijä kun esimerkiksi mikroskopoinnissa. Sen sijaan DNA:n eristys ylipäättään ulostenäytteestä on haaste, sillä ulosteen mukana kulkeutuu DNA:ta ruokavaliosta (kasvikunnan ja eläinkunnan tuotteita) sekä suuri määrä bakteerien DNA-materiaalia. Lisäksi geenisekvenssin monistuksessa voi tapahtua inhibitiota epäpuhtauksien johdosta. Mikäli halutaan kehittää spesifinen ja sensitiivinen molekyylogeneettinen menetelmä, täytyy kaikki nämä seikat ottaa huomioon ja optimoida menetelmä mahdollisimman luotettavaksi. (Stark ym. 2006: 235; Stark ym. 2010b; 415; Verwij ym. 2007: 403.)

Uusin mahdollisuus *D. fragiliksen* molekyylogeneettisissä diagnostisissa menetelmissä on Multiplex Tandem Real-Time PCR, jossa samanaikaisesti voidaan määrittää *Cryptosporidium* spp., *D. fragilis*, *Entamoeba histolytica* ja *Giardia lamblia*. Nämä neljä parasiittia ovat yleisimmät ihmiselle ripulia aiheuttavista alkueläimistä. (Stark ym. 2011: 257.) Tutkimuksessa saatiin 100 % sensitiivisyys ja spesifisyys, kun menetelmää verrattiin reaaliaikaisella PCR:llä ja mikroskopoimalla tutkittuihin näytteisiin (n=472) (Stark ym. 2011; 260). Hinnaksi menetelmälle muodostui vain 12 \$/potilasnäyte, joka tekee ainoastaan 3 \$/tutkittava parasiitti. Hinta sekä menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys tekee menetelmästä erittäin houkuttelevan vaihtoehdon *D. fragiliksen* diagnostiikkaan. (Stark ym. 2011; 261.)

Yhteistä kaikille molekyylogeneettisille menetelmille on se, että näytteen tulee olla tuore ja kiinnittämätön ulostenäyte. Joissakin tutkimuksissa jääkaappisäilytys heikentää sensitiivisyyttä. SAF-kiinnitteen ja formaliinin on todettu inhiboivan PCR amplifikaatiota



joko niin, että formaliini aiheuttaa DNA fragmentoitumista tai että DNA ristireagoi proteiinien kanssa. (Stark ym. 2005a: 60-61.)

### 3.4 Viljely

Clifford Dobell oli ensimmäinen, joka onnistui vuonna 1940 viljelemään ja eristämään *Dientamoeba fragiliksen* (Barrat ym. 2010: 1867). Rikastusviljely tehdään tuoreesta ulosteesta ravintoalustalle, jossa on ulostenäytteen ja ravintoaineiden lisäksi mikrobi-flooraa (niin sanottu xenic culture). Bakterikasvustoa tarvitaan *D. fragiliksen* ravinnoksi. Lisäksi viljelyalustaan on usein lisätty riisitärkkelystä bakterikasvuston hiilihidraattilähteeksi ja antibiootteja (penisilliini, erytromysiini ja streptomysiini) hillitsemään gram-positiivisten bakteerien kasvua (Johnson ym. 2004: 566). Toistaiseksi ei ole onnistuttu löytämään *D. fragilikse*lle spesifistä, bakteeritonta kasvualustaa (axenic culture), jossa organismi kasvaisi. (Barrat ym. 2010: 1867; Johnson ym. 2004: 566).

Rikastusviljelyyn voidaan käyttää muun muassa muunneltua BD elatusainetta, Loefflerin elatusainetta, TYGM-9 -nestettä, Trichoselia, Robinsonin elatusainetta, *Tritrichomonas foetus* -elatusainetta tai Medium 199:ää. Sawangjaroen tutkimusryhmän mukaan paras rikastusalusta on muunneltu BD (Boeck ja Drobohlav) elatusaine, jossa kiinteään elatusaineen päällä on toinen, nestemäinen elatusaine (Barrat ym. 2010: 1874). Barratin ja muiden (2010) tekemän tutkimuksen mukaan paras elatusaine on Loefflerin rikastusalusta, joka sisältää muun muassa hevosen kuuma-inaktivoitua seerumia, glukoosia, ravintonestettä ja riisitärkkelystä (Barrat ym. 2010: 1874).

Parhaat viljelyolosuhteet *D. fragilikse*lle ovat mikroaerofiilinen ympäristö (noin 6 % O<sub>2</sub>), +42 °C lämpötila ja gram-negatiivinen sauvabakterikasvusto. *D. fragilis*-trofotsoiitit tarvitsevat eläviä bakteereita ravinnokseen. *E. coli* on yleisimmin käytetty bakteeri *D. fragilis* viljelyissä (Barrat ym. 2010: 1876-1877). Tuore, kiinnittämätön ulostenäyte tulee lähettää huoneenlämmössä mahdollisimman nopeasti analysoivaan laboratorioon. Yli 10h jääkaappisäilytys heikentää huomattavasti elävien trofotsoiittien säilymistä (Stark ym. 2010b: 415). Optimaaliset viljelyolosuhteet selittävät osittain sen, miksi *D. fragiliksen* trofotsoiitit kärsivät helposti kuljetuksen aikana ja tarvitsevat oman kiinnitteen värjäystä varten.

### 3.5 Serologiset menetelmät

Alkueläimet aiheuttavat elimistössä immunologisen vasteen, joten serologisia tunnistusmenetelmiä on kehitelty joillekin parasiiteille. Alkueläininfektioissa eliö jakautuu elimistössä aiheuttaen jatkuvan antigeenien tarjonnan immuunipuolustukselle. Tämä on sopivaa serologisia määrytyksiä ajatellen. Toisaalta vasta-aineiden löytyminen elimistöstä ei erottele jo sairastettua infektiota meneillään olevasta, joten parasiittien diagnostiikassa muut tunnistusmenetelmät voivat olla hoidon kannalta mielekkäämpiä (Garcia 2007: 592).

Tällä hetkellä ei ole olemassa spesifisiä immunologisia menetelmiä *D. fragilis* infektioiden diagnostiikkaan (Johnson ym. 2004: 565). Francis Chanin ryhmä kehitti vuonna 1993 epäsuoran fluoresenssivasta-aine –menetelmän (IFA), jossa *D. fragilis* (kanta ATCC 30948, mukana *Klebsiella pneumoniae* ja *Bacteroides vulgatus*) pystyttiin tunnistamaan 7:ssä tapauksessa 9:stä. Ryhmä onnistui tuottamaan kanissa monoklonaalista vasta-ainetta *D. fragilista* vastaan hoitamalla kania antibiooteilla klebsiellaa ja bakteroidesta vastaan. (Chan ym. 1993: 1710-1711). Toistaiseksi ei ole onnistuttu kasvatamaan *D. fragilista* puhtaasti ilman bakteerikasvustoa (axenic culture), joten monoklonaalisen vasta-aineen tuotto kaupallisten kittien käyttöön on ongelmallista. Lisäksi esimerkiksi American Type Culture Collectionilla ei enää ole saatavilla *D. fragilis* –kanta tutkijoiden käyttöön (Barrat ym. 2010: 1867).

Serologisten menetelmien tulokset vaativat usein asiantuntevaa tulkintaa. Tietyn vasta-aineen löytyminen kertoo infektiosta mutta ei taudista. Vasta-aineet voivat pysyä elimistössä pitkiäkin aikoja taudin jälkeen. Myös endeemisillä alueilla seropositiivisuus voi pysyä pitkään korkealla tasolla aikaisemmin sairastetun taudin johdosta. Vääriä negatiivisia tuloksia voi tulla immunosuppressiivisilla potilailla (HIV, diabeetikot, elinsiirtopotilaat). Vastauksia tulkitessaan hoitava lääkäri tarvitseekin potilaan esitietojen lisäksi menetelmän viitearvot, sensitiivisyyden ja spesifisyyden, jotka kaikki ovat menetelmä – ja parasiittikohtaisia. (Bruschi – Castagna 2004).

Vuonna 1996 Chanin ryhmä tunnisti laboratorioissa 39kDa immunogeenisen *D. fragiliksen* proteiinin (Chan ym. 1996). Vielä ei tiedetä, mikä tämä proteiini on, mutta sillä voi olla merkitystä *D. fragiliksen* patogeneesissä ja sillä voi myös olla immunopuolustusta aktivoivia ominaisuuksia (Johnson ym. 2004: 565).

## 4 Opinnäytetyön tarkoitus ja menetelmät

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, voiko formaliini-kiinnitetystä ulostenäytteestä diagnosoida *Dientamoeba fragiliksen* käyttäen menetelmänä trikromivärystä ja mikroskopointia. Työssä on kaksi vaihetta, joilla pyritään vastaamaan kysymyksiin:

1. Mikä on sopivin esikäsittely formaliinikiinnitetylle ulostenäytteelle *D. fragilis* -diagnostiikkaa varten?
 

Esikäsittelyt:

  - a) Ei esikäsittelyä
  - b) Kiinnitys EcoFix<sup>®</sup>-kiinnitteellä objektilasilla
  - c) Kiinnitys EcoFix<sup>®</sup>-kiinnitteellä putkessa
  
2. Kuinka luotettavasti *D. fragilis* voidaan löytää formaliinikiinnitetystä ulostenäytteestä esikäsittelyn ja ameebaväryksen jälkeen?

Opinnäytetyö tehtiin HUSLABin parasitologian yksikköön (Haartmaninkatu 3, Helsinki) ajalla heinäkuu 2010 – kesäkuu 2011. Opinnäytetyön työelämäohjaajana toimi parasitologian yksikön erikoislaboratoriohoitaja Elisabet Tyyni ja tutkimusmentorina FT Taru Meri Helsingin Yliopistolta. Parasitologian yksikön kokeneet laboratoriohoitajat analysoivat minun lisäksi sokkoutetut objektilasit. Opinnäytetyön opettajaohjaajana toimi yliopettaja Riitta Lumme (Metropolia Ammattikorkeakoulu).

Aineistona käytettiin HUSLABin parasitologian yksikköön tulleita formaliinikiinnitettyjä ulostenäytteitä, joissa havaittiin *D. fragiliksen* näköisiä rakenteita ja joiden vastauksiin lisättiin kommentti *D. fragilis* –epäilystä sekä samasta potilaasta myöhemmin laboratorioon tulleita EcoFix<sup>®</sup>-kiinnitettyä ulostenäytteitä, joille oli tehty ameebaväryys. Esikäsitteltyjen näytteiden mikroskopointituloksia verrattiin EcoFix<sup>®</sup>-kiinnitettyyn näytteeseen.

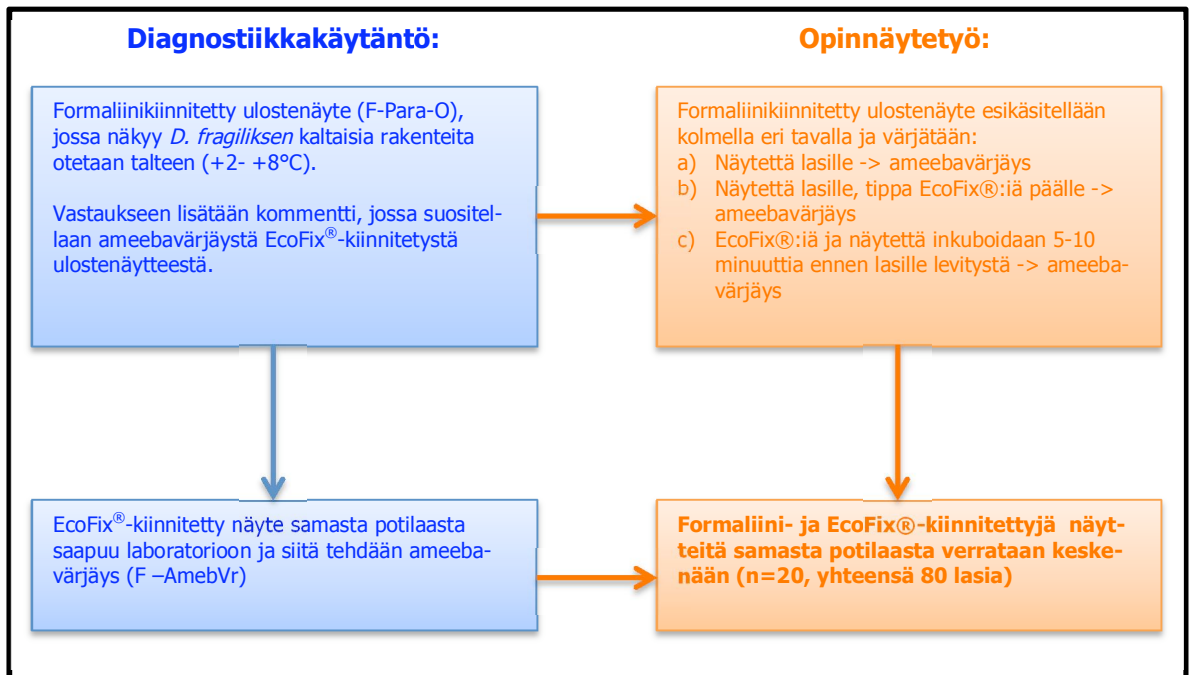
### 4.1 Ensimmäinen vaihe: Esikäsittelyn valinta

Parasitologian yksikön henkilökunta talletti (+4°C) kaikki formaliinikiinnitettyt ulostenäytteet, joissa havaittiin *D. fragiliksen* kaltaisia rakenteita. Näytteet jaettiin satunnaisesti kolmeen ryhmään (n=20) ja käsiteltiin seuraavasti:

- a) Formaliinikiinnitettyä ulostetta objektilasille, lasin kuivatus ja ameebaväryys
- b) Formaliinikiinnitettyä ulostetta objektilasille, päälle tippa EcoFix<sup>®</sup>-kiinnitettä, lasien kuivatus ja ameebaväryys

- c) Formaliini-kiinnitettyä ulostetta inkuboidaan 5-10 minuuttia EcoFix<sup>®</sup>-kiinnitteen kanssa, levitetään objektilasille, kuivatus ja ameebavärjäys

Seuraavaksi odotin, että *D. fragilis* -kommentoiduista näytteistä saapui EcoFix<sup>®</sup>-kiinnitetty ulostenäyte, joka prosessoitiin ja analysoitiin laboratorion normaalin ohjeistuksen mukaan (kuvio 7). Ameebavärjäystä käytetään suoliston ja kudosten ameebainfektioiden diagnostiikassa, ja siinä etsitään *Entamoeba histolytica/disparia*, *Balantidium colia*, *Giardia lamblia* ja *Dientamoeba fragilista*.

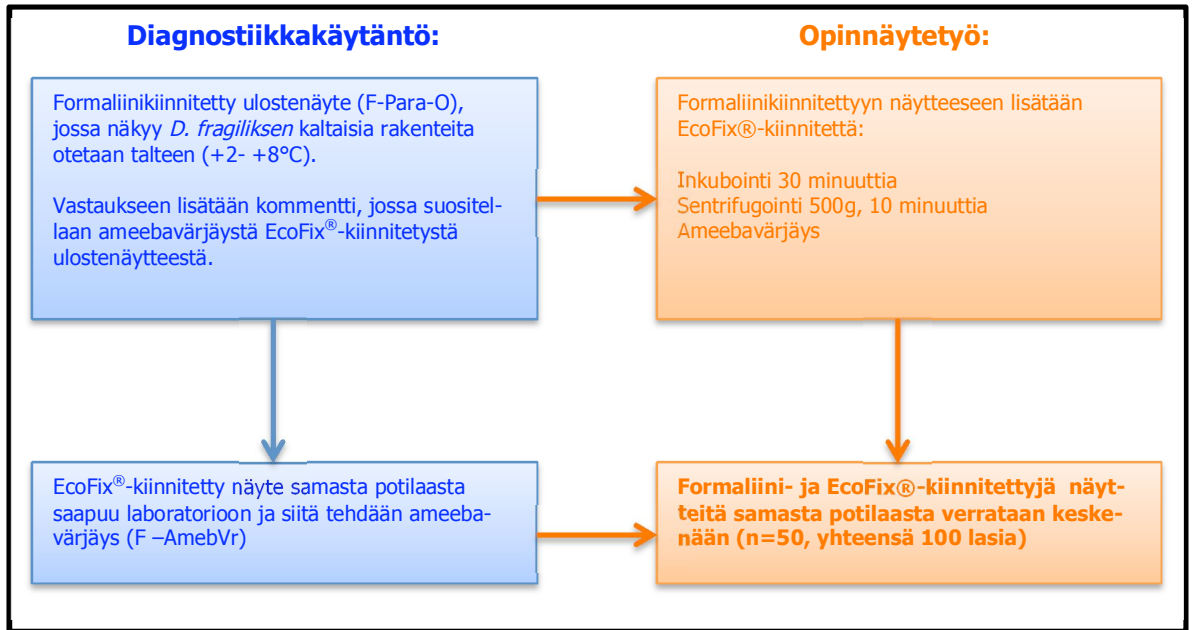


Kuvio 7. Opinnäytetyön ensimmäinen vaihe: esikäsitelyn valinta

Lasit sokkoutettiin ja kolme mikroskopiijaa analysoi ne. Analyysikaavakkeeseen kirjattiin ylös tulos (neg, +, ++ tai +++) ja näytteitä voitiin myös vapaasti kommentoida (yleisilmettä, värjäystä, artefaktoja ja niin edelleen).

#### 4.2 Toinen vaihe: Menetelmän testaus

Tutkimusta jatkettiin 50 potilasnäytteelle kolmen mikroskopiijan arvioimalla parhaimmalla esikäsitely-menetelmällä. Lasit sokkoutettiin ja analysoitiin (kaksi mikroskopiijaa). Tuloksia verrattiin käytössä olevan ameebavärjäyksen tuloksiin. (kuvio 8). Näytteistä kirjattiin ylös tulos (neg, +, ++ tai +++) ja morfologia (koko, rakeisuus ja tumien lukumäärä). Vertailussa käytettiin PASW-ohjelmaa.



Kuvio 8. Opinnäytetyön toinen vaihe: menetelmän testaus

## 5 Tulokset

*D. fragilixen* määrä ilmaistiin laboratoriossa olevan ohjeistuksen mukaisesti (HUSLAB työohje 2007):

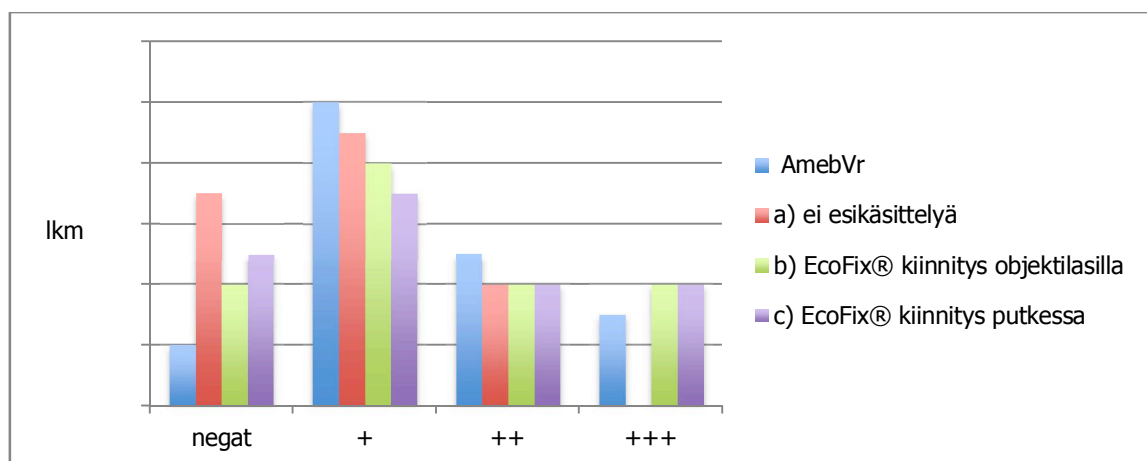
+	niukka löydös	kymmenessä näkökentässä alle 2 trofotsoiittia tai koko lasilla alle 10 trofotsoiittia
++	kohtalainen löydös	kymmenessä näkökentässä 3-9 trofotsoiittia tai koko lasilla 11-100 trofotsoiittia
+++	runsas löydös	kymmenessä näkökentässä yli 10 trofotsoiittia tai koko lasilla yli 100 trofotsoiittia

Tulokset kirjattiin ylös analyysikaavakkeelle, josta ne siirrettiin PASW-ohjelmaan tilastollista tulkintaa varten. Ensimmäisen vaiheen tilastolliseen tulkintaan käytettiin ainoastaan Excel-ohjelmaa.

### 5.1 Ensimmäisen vaiheen tulokset: eri esikäsittelyjen vertailu

Ensimmäisessä vaiheessa analysoitiin 20 potilaan näytteet. Jokaisen potilaan formaliniinikiinnitetty näyte oli esikäsitelty kolmella eri tavalla (testilasit a-c) ja näiden näytteiden tuloksia verrattiin ameebaväryslaseilta (AmebVr) saatuihin tuloksiin. Yhteensä laseja oli analysoitavana 80 kappaletta.

Alla olevasta kuviosta (kuvio 9) näkyy *D. fragiliksen* määrä testilaseilla (esikäsittelyt a-c) ja ameebavärjäyslaseilla (AmebVr). Ei-esikäsittely näyte (ryhmä a) tuotti eniten negatiivisia tuloksia ja runsaita löydöksiä ei raportoitu lainkaan. EcoFix®-lisäyksellä (esikäsittelyt b ja c) löysimme jopa enemmän runsaita löydöksiä kuin perinteisiltä ameebavärjäyslaseilta. Toisaalta formaliini kiinnitetty näyte oli konsentroitua, toisin kuin EcoFix®-kiinnitetty näyte, mikä voi myös selittää runsauden.



Kuvio 9. Opinnäytetyön ensimmäisen vaiheen tulokset.

Eniten kommentteja (15/20 kpl, 75 %) onnistuneesta värjäyksestä annettiin perinteiselle ameebavärjäyslaseille (AmebVr). Onnistuneeksi värjäykseksi laskettiin kaikki ne kommentit, joissa oli maininta ok, hyvä, erinomainen, aika hyvä ja hieno tai muuta vastaavaa. EcoFix®-kiinnitteellä inkuboidut lasit (esikäsittely c) mainittiin neljä kertaa onnistuneena (4/20 kpl, 20 %). Huonoin vaihtoehto eri esikäsittelyistä oli käsittely a, jossa ei käytetty lainkaan EcoFixiä® (ei yhtään kommenttia onnistuneesta värjäyksestä). Esikäsittely b mainittiin kerran (1/20 kpl, 5 %) onnistuneena. Tulosten perusteella EcoFix®-inkubaatio (esikäsittely c) ennen *Dientamoeba fragiliksen* trikromivärjäystä on paras vaihtoehto havainnoida *D. fragilis* verrattaessa kolmea testattua esikäsittelymenetelmää keskenään.

Tulosten ja kommenttien perusteella opinnäytetyön toiseen vaiheeseen valittiin esikäsittelyksi EcoFix®-inkubaatio, jossa inkubaatiovaihe pidennettiin 30 minuuttiin. EcoFix®-kiinnitetty lasit (AmebVr) näyttivät värjäytyvän parhaiten, joten inkubaatioaikaa pidennettiin 10 minuutista 30 minuuttiin. Myös ameebavärjäys-ohjeistuksessa suositellaan vähintään 30 minuutin kiinnittämistä ennen värjäystä (Garcia 2007: 799). Osa ensimmäisen vaiheen lasista oli kovin niukkoja, joten näytteet sentrifugoitiin ja kiinnite pipetoitiin pois ennen näytteen levittämistä lasille. Osa näytteistä oli jopa pari kuukautta vanhoja, mikä on voinut vaikuttaa lasien värjäytyvyyteen (hailakoita ja punerta-

via laseja, tumat eivät näy selvästi). Toiseen vaiheeseen käytettiin vain enintään viikon vanhoja näytteitä.

## 5.2 Toisen vaiheen tulokset: *D. fragiliksen* diagnosointi formaliinikiinnitetystä uloste-näytteestä

Toiseen vaiheeseen käytimme viittäkymmentä potilasnäytettä, joista lopputarkasteluun otimme neljäkymmentäkahdeksan potilasnäytettä. Näytteille tehtiin ameebavärjäys formaliinikiinnitetystä ulostenäytteestä ja vertailuparina käytettiin myöhemmin laboratorion tullutta näytettä, josta oli pyydetty ja tehty ameebavärjäys (F- AmebVr) laboratorion työohjeen mukaan (n=96, 48 paria). Lasit olivat sokkoutettu.

Alla olevasta taulukosta (taulukko 3) näkyy potilaalle vastattujen F- AmebVr *D. fragilis* tulosten jakauma, joita vastaan tutkimuslasien tuloksia on verrattu.

Taulukko 3. Ameebavärjäyslasien frekvenssit

Tulos	AmebVr (kpl)	%
neg	25	52,1 %
+	8	16,7 %
++	5	10,4 %
+++	10	20,8 %
<b>Yht.</b>	48	100 %

Laseista 23 kpl (47,9 %) oli positiivisia ja 25 kpl (52,1 %) negatiivisia. Suurin osa positiivista näytteistä oli runsaita löydöksiä ja seuraavaksi eniten oli niukkoja löydöksiä. Alla olevaan taulukkoon on koottu eri analysoijien tulokset, josta käy ilmi positiivisten ja negatiivisten vastausten jakauma (taulukko 4).

Taulukko 4. Toisen vaiheen testilasien tulokset: positiivisten ja negatiivisten tulosten jakauma

	posit		negat		Yht.
	kpl	%	kpl	%	
<b>AmebVr</b>	23	47,9 %	25	52,1 %	48
<b>Analysoija 1</b>	29	60,4 %	19	39,6 %	48
<b>Analysoija 2</b>	32	66,7 %	16	33,3 %	48

AmebVr = asiakkaalle vastattu tulos

Analysoija 1 ja 2 =testilasien tulokset

Ylimmällä rivillä on perinteisellä ameebavärjäys-menetelmällä saatu tulos, joka on vastattu asiakkaalle. Ulostenäyte testilaseilla ja ameebavärjäys-laseilla on samasta potilaasta, mutta näytteet olivat otettu eri päivinä. Positiivisia tuloksia oli hiukan enemmän, kuin mitä vertailulaseilla oli (47,9 vs. 60,4-66,7 %).

Alla olevin taulukoihin on koottu kahden eri analysoijan testilasien tulokset suhteessa ameebavärjäyslasien tuloksiin (taulukot 5 ja 6).

Taulukko 5. Testilasien posit/negat jakauma, analysoija 1 (n=48)

Analysoija 1			AmebVr -lasit		Yhteensä
			negat (25 kpl)	posit (23 kpl)	
<b>Testilasi</b>	<b>negat</b>	kpl	13	6	19
		% AmebVr lasista	52,0 %	26,1 %	39,6 %
	<b>posit</b>	kpl	12	17	29
		% AmebVr lasista	48,0 %	73,9 %	60,4 %
Yhteensä	kpl	25	23	48	
	% AmebVr lasista	100,0 %	100,0 %	100,0 %	

Analysoija 1 löysi 17 kpl (73,9 %) 23:sta *D. fragilis* -positiivisesta lasista. Kuudessa positiivisessa lasissa testilasi oli negatiivinen (26,1 %). Toisaalta taas 12 tapauksessa negatiivinen AmebVr-lasi (48,0 %) oli testilaseissa positiivinen. Hausenin (2007) mukaan sensitiivisyys on niiden testattujen näytteiden osuus, jotka testi tunnistaa positiivisiksi kaikista niistä, jotka tosiasiallisesti ovat positiivisia. Spesifisyys taas on testin negatiivisiksi tunnistamien osuus kaikista negatiivisista. Analysoija 1:n sensitiivisyys on 73,9 % ja spesifisyys 52,0 %. Väärien positiivisten näytteiden osuus on 48,0 % ja väärien negatiivisten osuus on 26,1 %.

Taulukko 6. Testilasien posit/negat jakauma, analysoija 2 (n=48)

Analysoija 2			AmebVr -lasit		Yhteensä
			negat (25 kpl)	posit (23 kpl)	
<b>Testilasi</b>	<b>negat</b>	kpl	11	5	16
		% AmebVr lasista	44,0 %	21,7 %	33,3 %
	<b>posit</b>	kpl	14	18	32
		% AmebVr lasista	56,0 %	78,3 %	66,7 %
Yhteensä	kpl	25	23	48	
	% AmebVr lasista	100,0 %	100,0 %	100,0 %	



Analysoija 2 löysi 18 kpl (78,3 %) 23:sta *D. fragilis* -positiivisesta lasista. Viidessä positiivisessa lasissa testilasi oli negatiivinen (21,7 %). Toisaalta taas 14 tapauksessa negatiivinen AmebVr-lasi (56,0 %) oli testilaseissa positiivinen. Analysoija 2:n sensitiivisyys on 78,3 % ja spesifisyys 44,0 %. Väärien positiivisten näytteiden osuus on 56,0 % ja väärien negatiivisten osuus on 21,7 %.

Menetelmän kannalta on oleellista tietää, kuinka monta AmebVr-positiivista näytettä löysimme testilaseilta eli mikä on menetelmämme herkkyys ja riittääkö se luotettavaan *D. fragiliksen* diagnosointiin. Yhdistämällä tulokset, saimme menetelmän sensitiivisyydeksi 76,1 %, spesifisyydeksi 48,0 %, väärien positiivisten näytteiden osuudeksi 52,0 % ja väärien negatiivisten osuudeksi 23,9 % (taulukko 7).

Taulukko 7. *D. fragilis* -diagnostiikan herkkyys ja tarkkuus formaliiniinnitetyistä ulostenäytteistä.

		AmebVr	
		negat (25 kpl)	posit (23 kpl)
Formaliiniinnitetyin ulostenäytteen amebavärjäys	negat	48,0 %	23,9 %
	posit	52,0 %	76,1 %

Ne lasit, joissa löydös oli niukka (+), sensitiivisyys oli keksimäärien 75,0 %. Runsaissa löydöksissä (++) ja (+++) menetelmän sensitiivisyys oli keskimäärin 78,8 %. Opinnäytetyöni perusteella formaliiniinnitetyistä ja amebavärjätystä ulostenäytteistä voidaan mikroskopoiden diagnosoida 76,1 % herkkyydellä *D. fragilis*. Runsaista ja kohtalaisen runsaista näytteistä löydetään 78,8 % *D. fragilis* -positiivisista näytteistä.

### 5.3 Opinnäytetyön luotettavuuden arviointi

Tutkimuksen luotettavuus tarkoittaa mittauksen kykyä olla antamatta sattumanvaraisia tuloksia ja että tulokset ovat toistettavissa (Vilka 2005: 161). Tässä opinnäytetyössä käytettiin menetelmänä mikroskopointia, jossa luotetaan ihmissilmän tarkkuuteen ja toistettavuuteen. Mikäli mittaus suoritettaisiin laitteella, toistettavuus olisi todennäköisesti parempi. Tässä työssä esitelty menetelmä edellyttääkin kokeneita mikroskopioijia ja tarpeeksi suurta otosta. Ammattikorkeakoulun opinnäytetyön puitteissa otos ja mikroskopioijien luotettavuus olivat riittäviä. Mikäli menetelmä haluttaisiin ottaa rutiinikäyttöön, vaatisi se suurempaa otosta ja useamman mikroskopioijan käyttöä.

Opinnäytetyössä käytetty tutkimusaineisto koostui vertailupareista, jossa saman potilaan näytteitä vertailtiin keskenään. Näytteenottopäivät olivat eri ja potilaan mahdollisesti käyttämästä lääkityksestä tai hoidosta ei ollut tietoa. Lisäksi *D. fragiliksen* tiedetään erittyvän ulosteeseen jaksottaisesti. Nämä mahdolliset virhelähteet voitaisiin poistaa käyttämällä tuoreulostenäytettä, josta valmistettaisiin samana päivänä testilasit ja vertailulasit. Toisaalta 50 otoksen suuruudella saadaan jo suuntaa antavia tuloksia, joiden avulla mahdollisia jatkotutkimuksia voi suunnitella.

Näytelasien valmistus oli vakioitu: inkubaatiot ja värjäykset teki aina sama henkilö ja ajat mitattiin sekuntikellolla. Tämän osalta opinnäytetyön luotettavuus oli hyvä.

Ensimmäisen vaiheen analyysikaavakkeen suunnittelu oli tehty hätäisesti. Kaavakkeessa oli ainoastaan kaksi muuttujaa (määrä ja kommentit). Kommentit vastattiin avoimena kysymyksenä. Toisessa vaiheessa muuttujia oli enemmän (määrä, koko, sytoplasman rakeisuus ja tumien lukumäärä). Kommenttikohtaa lukuun ottamatta kysymykset olivat monivalintakysymyksiä. Tilastollinen tarkastelu oli näin helpompaa.

Kaiken kaikkiaan opinnäytetyön tekemisessä noudatettiin eettisiä periaatteita ja luotettavuus oli resurssien puitteissa riittävä.

## 6 Pohdinta

*Dientamoeba fragilis* on maailmanlaajuisesti esiintyvä suolistoparasiitti, joka tunnistettiin jo vuonna 1918, mutta kesti usea vuosikymmen ennen kuin se luokiteltiin patogeeniksi. Nykytiedon mukaan *D. fragilis* on patogeeni, joka aiheuttaa 20-60:lle % vaihtelevia suolisto-oireita, muun muassa ripulia ja vatsakrampeja. (Johnson – Windsor – Clark 2004: 553-563; Meri – Jokiranta 2011.)

*D. fragilis* on nimensä mukaisesti herkästi elimistön ulkopuolella hajoava siimaeliö, jolla tunnetaan toistaiseksi vain trofotsoittimuoto. Sen kiertokulku on tuntematon. Suurin osa parasiittidiagnostiikasta tehdään formaliinikiinnitetystä ulostenäytteestä, mutta koska *D. fragiliksellä* ei tunneta kystamuotoa, perustuu sen diagnostiikka trofotsoittimuotojen löytymiseen kestokiinnitetystä ulostenäytteestä. (Stark ym. 2010b: 614.)

HUSLABin parasitologian yksikössä *D. fragilixen* esiintyvyys on kasvanut viimeisen viiden vuoden aikana. Vuonna 2007 9 % ameebavärjäys-pyyntöistä oli *D. fragilis* -positiivisia. Vuonna 2010 luku oli melkein kaksinkertaistunut (17 %) ja vuoden 2011 ensimmäisellä kolmanneksella jo 26 % ameebavärjäyksistä oli *D. fragilis* -positiivisia. Positiivisten näytteiden nopea kasvu johtuu kommenteista, joita laboratoriohenkilökunta alkoi laittaa parasiittivastauksiin (F –Para-O) nähtyään mikroskoopissa *D. fragilixen* kaltaisia rakenteita.

Tämän työn perusteella *D. fragilista* on mahdollista diagnostisoida suhteellisen luotettavasti (herkkyys 76 %) myös formaliinikiinnitetyistä ulostenäytteestä inkuboimalla näytettä ensin EcoFix®-kiinnitteessä. Menetelmän onnistumisen edellytys on kokeneet mikroskopioijat. Ensimmäisessä vaiheessa osa formaliinikiinnitetyistä näytteistä oli usean kuukauden vanhoja, mikä selvästi heikensi tuloksia. Toiseen vaiheeseen käytettiin enintään viikon vanhoja näytteitä, jolloin testilasit ja ameebavärjäyslasit olivat paremmin verrattavissa keskenään. Mikäli tässä opinnäytetyössä esitelty menetelmä otettaisiin käyttöön, edellyttäisi se mahdollisimman tuoreiden ulostenäytteiden käyttöä. Menetelmä saattaa soveltua jopa sellaisenaan runsaiden positiivisten *D. fragilis* -löydösten diagnostisointiin asiaan perehtyneessä laboratorioissa kokeneiden mikroskopioijien suorittamana.

Viimeisimpien tutkimusten mukaan PCR, ja erityisesti reaaliaikainen PCR, on *D. fragilis* diagnostiikassa kaikkein herkin menetelmä. Se on samalla myös kallis ja vaativa menetelmä ylläpitää. (Stark ym. 2010a: 411; Stark ym. 2005a:57; Verweij ym. 2007:403.) Tästä johtuen perinteinen värjäys ja mikroskopointi on monissa maissa käytössä, eikä todennäköisesti ole poistumassa vielä vähään aikaan. Vaikka uusien ja tehokkaampien menetelmien kehittäminen on tärkeää laboriodiagnostiikassa, se ei saa poissulkea vanhojen menetelmien parantamista ja kehittelyä. PCR:llä analysoidaan vain yhtä parasiittia, kun taas mikroskopoiden pystytään tutkimaan yhdestä näytteestä lähes kaikki parasiitit. Toisaalta: ensimmäisiä multiplex tandem real-time PCR:iä on jo kokeiltu useiden parasiittien samanaikaiseen diagnostiikkaan (*Cryptosporidium spp.*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia intestinalis*) erittäin lupaavin tuloksin. (Stark ym. 2011.)

Tämä opinnäytetyö on ollut esivaihe mahdollisen uuden menetelmän kehittämisessä. Näytteitä kannattaisi tutkia lisää ja ottaa mukaan useampi analysoija, jolloin saataisiin minimoitua erot mikroskopioijien välillä. Lisäksi ameebavärjäystä kannattaisi vielä opti-

moida tätä tarkoitusta varten. Yleinen piirre testilaseilla oli poikkeuksellinen punaisuus, joka voi johtua kiinnitetyn näytteen eri pH-arvoista ja mikä vaikeutti mikroskopointia.

Tässä työssä vertailtiin keskenään ulostenäytteitä, jotka olivat samasta potilaasta mutta otettu eri ajankohtina: laboratorioon tuli ensin formaliiniinnitetty ulostenäyte ja myöhemmin kestokiinnitetty näyte. *D. fragilixen* erittyminen ulosteeseen on kuitenkin jaksottaista, jolloin saman potilaan näytteiden erot löydöksissä voivat johtua myös tästä. Tutkimuksellisesti tarkoituksenmukaisinta olisi saada potilaasta tuoreulostenäyte, joka jaettaisiin heti lähetävässä yksikössä kahteen eri kiinnitteeseen. Tällä tavalla saataisiin poissuljettua yksi merkittävä virhelähde.

Tässä opinnäytetyössä esitelty menetelmä nopeuttaisi ja helpottaisi *D. fragilis* diagnostiikkaa niissä laboratorioissa, joissa on käytössä mikroskooppinen menetelmä. Menetelmää voitaisiin käyttää suoraan jatkotutkimuksena, mikäli formaliiniinnitetyssä ulostenäytteessä havaitaan *D. fragilixen* kaltaisia rakenteita. Diagnostiikka nopeutuisi huomattavasti, eikä potilaan tarvitsisi toimittaa uutta näytettä laboratorioon. Tämä mahdollistaisi hoidon aloittamisen nopeammin, saattaisi ehkäistä parasiitin leviämistä ja olisi kansantaloudellisesti edullista.

## Kirjallisuutta

- Ash, Orihel 2007. Atlas of Human Parasitology 5th edition. Singapore: ASCP Press.
- Barratt, Joel – Banik, G. R. – Harkness, John – Marriott, Deborah – Ellis, John – Stark, Damien 2010. Newly defined conditions for the in vitro cultivation and cryo-preservation of *Dientamoeba fragilis*: new techniques set to fast track molecular studies on this organism. Parasitology 137: 1867-1878.
- Barrat, Joel – Harkness, John – Marriott, Deborah – Ellis, John – Stark, Damien 2011. The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis*: the need to investigate current hypotheses on transmission. Review article. Parasitology: 1-16.
- Bruijnesteijn van Coppennaet, L. E. S. – Wallinga, J. A. – Ruijs, G. J. H. M – Bruins, M. J. - Verweij, J. J 2009. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. European Society of Clinical Microbiology and Infectious diseases 15: 869-874.
- Bruschi, F. – Castagna, B. 2004. Serodiagnosis of parasitic infections. Englanninkielinen abstrakti. Parassitologia 46 (1-2): 141-144.
- Chan, Francis – Ming, Xu Huan – Mackenzie, Andrew 1993. Application of Indirect Immunofluorescence to Detection of *Dientamoeba fragilis* Trophozoites in Fecal Specimens. Journal of Clinical Microbiology 31(7): 1710-1714.
- Chan, F. – Steward, N. – Guan, M. – Robb, I. – Fuite, L. – Chan, I. – Diaz-Mitoma, F. – King, J – MacDonald, N. – Mackenzie, A 1996. Prevalence of *Dientamoeba fragilis* in children and recognition of a 39-kDa immunodominant protein antigen of the organism. Abstrakti. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious diseases 15(12): 950-954.
- Garcia, Lynne 2007: Diagnostic Medical Parasitology 5th edition. Washington D.C: ASM Press.
- Gijsbers, CFM – Benninga, MA – Büller, HA 2011. Clinical and laboratory findings in 220 children with recurrent abdominal pain. Acta Paediatrica, accepted article; doi: 10.1111/j. 1651-2227.2011.02179.x
- Girginkardesler, Nogay – Özgür, Kurt – Kilimcioglu, Alia – Ülgen, Ok Z. 2008. Transmission of *Dientamoeba fragilis*: Evaluation of the role of *Enterobius vermicularis*. Parasitology International 57: 72-75.
- González-Moreno, Olga – Domingo, Laia – Teixidor, Jaume – Gracenea, Mercedes 2011. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. Parasitology Research 108(1): 87-93
- Van Gool, T. – Weijts, R. – Lommerse, E. – Mank, T.G 2003. Triple faeces test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. European Society of Clinical Microbiology and Infectious diseases 22: 258-290.

- Guidetti, Carlotta – Ricci, Lidia – Vecchia, Luigi 2010. Prevalenza delle parassitosi intestinali a Reggio Emilia e provincia nel corso del 2009. *Le infezioni in Medicina* 3: 154-161
- Hausen, Hannu 2007. Sensitiivisyys ja spesifisyys. Terveysportti. Päivitetty 27.3.2007. <[http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/tod/koti?p\\_artikkeli=tod30091&p\\_haku=sensitiivisyys](http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/tod/koti?p_artikkeli=tod30091&p_haku=sensitiivisyys)>. Luettu 14.10.2011.
- Hiatt, Robert – Markell, Edward – Ng, Ernest 1995. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53(1): 36-39.
- HUSLAB työohje Ameeba, värjäys. Versio 5.11.2007. Helsinki.
- Jackson, Schuster – Jackson, R.S. 2009. Prevalence of *Dientamoeba fragilis* among patients consulting complementary medicine practitioners in the British Isles. Abstract. *Journal of Clinical Pathology* 62(2): 182-184.
- Jepps, Margaret – Dobell, Clifford 1918. *Dientamoeba fragilis* n. g., sp., a new intestinal amoeba from man. *Parasitology* 10: 352-367.
- Johnson, Eugene – Windsor, Jeffrey – Clark, Graham 2004. Emerging from obscurity: Biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clinical Microbiology Reviews* July 17(3): 553-570
- Jääskeläinen, Iiro 2011. Uudet ja vanhat suoliston parasiittitaudit – tunnetko *Dientamoeba fragilis* infektion? Luentosarja ja haastattelu 19.1.2011. Meilahden sairaala, Helsinki: HUS.
- Kurt, Ö. – Girginkardeşler, N. – Balcioglu – Özbilgin, A. – Ok, Ü.Z. 2008. A comparison of metronidazole and single-dose ornidazole for the treatment of dientamoebiasis. *Clinical Microbiology and Infection* 14: 601-604.
- Mathur, Heli 2011. *Dientamoeba fragiliksen* trikromivärjäys ilman jodikäsittelyä. Innovaatioprojekti. Helsinki: Metropolia Ammattikorkeakoulu. Sosiaali- ja terveysala. Bioanalytiikan koulutusohjelma.
- Meri, Taru 2008. Suoliston parasiitti *Dientamoeba fragilis*. *Moodi* 5: 205-208
- Meri, Taru – Jokiranta, Sakari 2011. Yleisin patogeeninen suoliston parasiittilöydös Suomessa *Dientamoeba fragilis*? *Moodi*. Artikkelikäsikirjoitus.
- Solunetti 2006. Nukleiinihapot. Solunetti. Kuopion Yliopisto. Kari Törrönen. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/rrna/2/>>. Luettu 2.3.2011
- Stark, D – Beebe, N. – Marriott, D – Ellis, J. – Harkness, J. 2005a. Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *International Journal of Parasitology* 35: 57-62.
- Stark, D – Beebe, N. – Marriott, D – Ellis, J. – Harkness, J. 2005b. Prospective study of the prevalence, genotypin, and clinical relevance of *Dientamoeba fragilis* infections in an Australian population. *Journal of Clinical Microbiology* 43(6): 2718-2723.

- Stark, D. - Beebe, N. – Marriott, D. – Ellis, J. – Harkness, J. 2006. Evaluation of Three Diagnostic methods, Including Real-Time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 44(1): 232-235.
- Stark, Damien – van Hal, S. – Marriott, Deborah – Ellis, John – Harkness, John 2007. Irritable bowel syndrome: A review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *International Journal for Parasitology* 37: 11-20.
- Stark, Damien – Barratt, Joel – Roberts, Tamalee – Marriot, Deborah – Harkness, John – Ellis, John 2010a: A Review of Clinical Presentation of Dientamoebiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82(4). 614-619.
- Stark, Damien – Barratt, Joel – Roberts, Tamalee – Marriot, Deborah – Harkness, John – Ellis, John 2010b: Comparison of microscopy, two xenic culture techniques, conventional and real-time PCR for detection of *Dientamoeba fragilis* in clinical stool samples. *European Journal of Clinical Microbiology and infectious diseases* 29: 411-416.
- Stark, D. – Al-Qassab, S. E. – Barratt, J. – Stanley, K. – Roberts, T. – Marriott, D. – Harkness, J. – Ellis, J. T. 2011. Evaluation of multiplex tandem Real-Time PCR for detection of *Cryptosporidium spp.*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *Journal of Clinical Microbiology* 49(1): 257-262.
- Stensvold, C.R. – Arendrup, M.C. – Molbak, K. – Nielsen, H.V 2007. The prevalence of *Dientamoeba fragilis* in patients with suspected enteroparasitic disease in a metropolitan area in Denmark. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI*, 13: 816-842
- Siikamäki, Heli - Kyrönseppä, Hannu – Jokiranta, Sakari 2002. Suoliston parasiitti-infektiot. *Duodecim* 118: 1235-1247.
- Siikamäki, Heli – Jokiranta, Sakari – Meri, Seppo 2011. Parasiittilääkkeet. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): *Infektiosairaudet*. Jyväskylä: Kustannus Oy Duodecim. 218-231.
- Siikamäki, Heli – Jokiranta, Sakari – Meri, Seppo 2010. Alkueläimet. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): *Mikrobiologia*. Jyväskylä: Kustannus Oy Duodecim. 338-381.
- Stensvold, C. R. – Arendrup, M. C. – Mølbak, K. Nielsen, H. V. 2007. The prevalence of *Dientamoeba fragilis* in patients with suspected enteroparasitic disease in metropolitan area in Denmark. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13: 816-842.
- Tyyni, Elisabet – Jokiranta, Sakari – Meri, Taru 2010. Identification of *Dientamoeba fragilis* from formalin-fixed iodine-stained stool samples. Kongressiabstracti. IFBLS Congress 2010. Nairobi, Kenya.

Vandenberg, Olivier – Souayah, Hichem – Mouchet, Françoise – Dediste, Anne – van Gool, Tom 2007. Treatment of *Dientamoeba fragilis* infection with paromomycin. The Pediatric Infectious Disease Journal 26(1): 88-90.

Verweij, Jaco – Mulder, Bert – Poell, Bregje – van Middelkoop, Dorien – Brienen, Eric - Lieshout, Lisette 2007. Real-Time PCR for detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples. Molecular and Cellular Probes 21: 400-404.

Vilkka, Hanna 2005. Tutki ja Kehitä. Keuruu: Tammi.

Yakoob, Javed – Wasim, Jafri – Asim Beg, Mohammad – Abbas, Zaigham – Naz, Shagufta – Islam, Mohammad – Khna, Rustam 2010. *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. Parasitology Research 107: 679-684.



## Parasiittinäytteen kiinnitteitä

KIINNITE	KÄYTTÖ	HYÖDYT	HAITAT
<b>Formaliini</b>	5% formaliini; alkueläinten kystat  10% formaliini; madon munat ja toukat	- Kaupalliseen tuotteeseen lisätty puskuria (0,9% NaCl) morfologian säilyttämiseksi.  - Sopii konsentroiintiin  - Hyvä yleiskiinnite	- Voidaan tehdä vain natiivilaseja.
<b>MIF</b> (tiomerosal-iodine- formalin)	Sopii monille ulosteen parasiiteille	- Helppo valmistaa ja hyvä säilyvyys.  - Kiinnittää ja myös osittain hieman värjää.	- Sisältää myrkyllistä elohopeaa.
<b>SAF</b> (sodium-acetate- acetic acid-formalin)	Sopii madon munille ja toukille, alkueläimille (trofotsoiitit ja kystat) sekä itiöeläimille	- Ei sisällä elohopeaa - Sopii Giardian ja Cryptosporidiumin immunoanalyyseihin.	- Tarttuu lasille huonosti: suositellaan käytettäväksi albumiinilla käsiteltyjä laseja - Ei niin terävä morfologia kuin esim HgCl-fiksatiivissa
<b>Schaudinnin liuos</b>	Tuoreet ulostenäytteet suoliston limakalvoilta	- Erityisen hyvä kiinnite alkueläinten trofotsoiiteille ja kystille	- Ei suositella käytettäväksi konsentroiduille näytteille  - Sisältää elohopeaa (HgCl)
<b>PVA</b> (polyvinyl alcohol)	PVA ei ole kiinnite vaan muovihartsin jonka avulla näyte tarttuu lasille  Käytetään yhdessä mm Schaudinnin kiinnitteen kanssa	- PVA:n avulla uloste+kiinnite tarttuu objektilasille hyvin  - Sopii erityisesti kestovärjäksiin  - Alkueläinten trofotsoiitit ja kystat säilyvät PVA:ssa useita kuukausia	- Sisältää elohopeaa (Schaudinnin liuos)  - Tiettyjen alkueläinten (mm. <i>Giardia</i> ja <i>Trichuris</i> ) morfologia huonompi kuin esim formaliini-kiinnitteessä
<b>Modifioitu PVA</b>	Alkueläinten trofotsoiiteille ja kystille	- Kiinnite, jota voidaan käyttää kestovärjäksiin  - Ei sisällä elohopeaa (tilalla sinkkiä tai kuparia valmistajasta riippuen)	- Alkueläinten värjäytyminen ei ole tasaista; välillä hyvä, välillä huonoja - Morfologia joissakin tapauksissa heikko
<b>Single-Vial Collection System</b> Esim ECOFIX™	Ameebavärjäksiin	- Kiinnite soveltuu sekä konsentroiintiin että kestovärjäksiin (vrt two- vial systeemi, jossa erikseen esim formaliini konsentroiintiin ja PVA kestovärjäksiin)  - Ei sisällä elohopeaa	- Muiden alkueläinten morfologia huonompi kuin muilla kiinnitteillä  - Värjäytyminen vaihtelee  - ei välttämättä sovellu konsentroiintiin, immunoanalyyseihin tai kestovärjäksiin (riippuu valmistajan tuotteesta)

(Garcia 2007: 768-773.)

## Jodialkoholikäsitteily ja trikromivärjäys

<b>JODIALKOHOLI-KÄSITTELY JA TRIKROMIVÄRJÄYS (HUSLAB)</b>	
70% alkoholi	5 min
Jodi-alkoholi <sup>1</sup>	5 min
70% alkoholi	5 min
70% alkoholi	5 min
Trikromi-väri <sup>2</sup>	10 min
90% happoalkoholi <sup>3</sup>	3 sek
Abs. alkoholi	2 sek
Abs. alkoholi	5 min
Abs. alkoholi	5 min
Ksyleeni	5 min
Ksyleeni	5 min
<b>Aikaa yhteensä</b>	<b>50 min</b>

<sup>1</sup> Jodi-alkoholi tehdään lisäämällä 70% alkoholiin jodikiteitä, kunnes saadaan vahvan teen tai portviinin värinen ruskea liuos.

<sup>2</sup> Trikromivärissä on Chromotrope 2R ja Light Green SF –värejä, fosfotungstihappoa, jääetikkaa ja tislattua vettä

<sup>3</sup> Haploalkoholissa absoluuttista alkoholia, tislattua vettä ja jääetikkaa.

(Garcia 2007:802.)