

IONIMOBILITEETISPEKTROMETRIAN KÄYTTÖ C. DIFFICILEN DIAGNOSTIIKASSA

Anni Ilonen ja Henrietta Virta
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Kirurgian apulaisprofessori Oksalan tutkimusryhmä
Maaliskuu 2016

Sisällysluettelo

1. JOHDANTO	1
2. KIRJALLISUUSKATSAUS	2
2.1 Clostridium difficile –infektiot	2
2.1.1 Clostridium difficile –bakteeri	3
2.1.2 Esiintyvyys ja riskiryhmät	4
2.1.3 Kliininen kuva	5
2.1.4 Hoito	6
2.1.5 Ennaltaehkäisy	7
2.2 Clostridium difficile –diagnostiikka	7
2.2.1 Perinteiset menetelmät ja nykysuositus	8
2.2.2 Koirien ja ihmisten hajuaisti diagnostikassa	10
2.2.3 Haihtuvat orgaaniset yhdisteet	11
2.2.4 Elektroniset nenät	12
3. MATERIAALIT JA METODIT	15
3.1 Aineisto	15
3.2 ChemPro 100i –eNose	16
3.3 Tilastolliset menetelmät	16
4. TULOKSET	17
5. POHDINTA	19
VIITTEET	21

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö
Kirurgian apulaisprofessori Oksalan tutkimusryhmä

Ilonen Anni & Virta Henrietta: Ionimobilitteettispektrometrian käyttö *C. difficile* -
diagnoosissa.

Kirjallinen työ, 23 s.

Ohjaajat: kirurgian apulaisprofessori Niku Oksala, LT Antti Roine ja LL Taavi Saviauk

Maaliskuu 2016

Avainsanat: elektroninen nenä, eNose, VOC, haju, haistaminen, ulostenäyte

Johdanto: *Clostridium difficile* on pääasiallinen antibioottihoitoihin liittyvän ripulin aiheuttaja sekä tavallisin sairaalaperäisen ripulin aiheuttaja. Viimeisten vuosien aikana *C. difficile* -infektioiden esiintyvyys on ollut kasvussa. Tämän tutkimuksen tavoitteena on selvittää, onko elektronisesta nenästä (ChemPro 100i, Environics Inc., Mikkeli, Suomi, jatkossa tekstissä eNose) hyötyä *Clostridium difficile* -tunnistamisessa ja diagnoosissa uloste-
viljelynäytteistä.

Materiaalit ja menetelmät:

Yhteensä 80 uloste-
viljelynäytettä, joista 30 oli viljelypositiivisia ja 50 oli viljelynegatiivisia, analysoitiin eNose-laitteistoa käyttäen. Näytteistä 25 oli toksiini B -positiivisia. Leave-one-out -ristiinvalidoinnilla ja 5-kertaisella ristiinvalidoinnilla laskettiin menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys *C. difficile* -diagnoosissa.

Tulokset:

Testissä 1 verrattiin toksiini-positiivisia ja toksiini-negatiivisia näytteitä toisiinsa. Mikäli toksiinia ei oltu testattu, kyseiset näytteet jätettiin pois testiryhmästä. LOOCV:lla saatiin 52 %:n sensitiivisyys (95 % CI 31-72 %) ja 90 %:n spesifisyys (95 % CI 76-97 %). 5-kertaisella ristiinvalidoinnilla saatiin tulokseksi 48 %:n sensitiivisyys (95 % CI 28-69 %) ja 95 %:n spesifisyys (95 % CI 83-99 %).

Testissä 2 verrattiin viljelypositiivisia ja viljelynegatiivisia riippumatta toksiinimäärityksen tuloksesta. LOOCV:lla saatiin 50 %:n sensitiivisyys (95 % CI 29-71 %) ja 94 %:n spesifisyys (95 % CI 83-99%) - 5-kertaisella ristiinvalidoinnilla puolestaan saatiin 54 %:n sensitiivisyys (95 % CI 33-74 %) ja 94 %:n spesifisyys (95 % CI 83-99 %).

Pohdinta:

Tutkimuksemme perusteella eNose-laitteiston käytöstä voisi olla hyötyä *C. difficile* -diagnoosissa nopeammassa diagnoosissa. Lisätutkimuksia kuitenkin tarvitaan, sillä vaikka eNose kykeneekin korkealla spesifisyydellä haistamaan *C. difficile* -
näytteen, jää kyseisen menetelmän sensitiivisyys ainakin käyttämällämme laitteistolla matalaksi.

1. JOHDANTO

Clostridium difficile on grampositiivinen anaerobinen sauvabakteeri, joka tuottaa itiöitä. (Hedman K. et al. 2011) *C. difficile* eristettiin ulosteista ensimmäisen kerran vuonna 1935 terveen lapsen ulosteesta. Nimi valittiin kuvaamaan sen viljelyn ja eristämisen hankaluutta. Vasta vuonna 1978 ymmärrettiin, että *C. difficile* on taudinaiheuttaja ihmiskehossa ja tärkein patogeeni antibioottiripulin aiheuttajana. (Heinlen L. et al. 2010) Se on pääasiallisesti antibioottihoitoihin liittyvän ripulin aiheuttaja sekä tavallisin sairaalaperäisen ripulin aiheuttaja. Viimeisten vuosien aikana *C. difficile* -infektioiden esiintyvyys on ollut kasvussa. Lisäksi taudinkuva on vaikeutunut ja kuolleisuus on lisääntynyt myös Suomessa. (Hedman K. et al. 2011)

Sairaalahoitossa olevat potilaat kolonisoituvat herkästi *C. difficile* -bakteerilla ja osalle potilaista kehittyy oireinen ripulitauti. Suurimmassa riskissä ovat yli 65-vuotiaat ja immuunipuutteiset henkilöt. Taudinkuva vaihtelee suuresti aina lievästä ripulista jopa henkeä uhkaavan pseudomembranoottiseen koliittiin, johon voi liittyä vakavia komplikaatioita. (Hedman K. et al. 2011)

Ei kuitenkaan ole täysin tarkkaa tietoa, miksi *C. difficile* toisinaan aiheuttaa oireisen taudin. Infektion syntyyn vaaditaan *C. difficile* -kolonisaatio sekä suolen normaaliflooran häiriintyminen, esimerkiksi juuri antibioottilääkityksen vaikutuksesta. *C. difficile* itsessään ei ole invasiivinen. Toksiinin tuotantoa pidetään tärkeänä osatekijänä ripulitaudin patogeenisyydessä. Lisäksi tunnetaan eräitä riskitekijöitä, joihin kuuluvat muun muassa pitkään jatkunut tai useamman antibiootin käyttö, korkea ikä, protonipumppuinhibiittorien käyttö sekä pitkät sairaalahoitajaksot. (Bagdasarian N. et al. 2015)

Clostridium difficile -infektion diagnostiikka on pitkään perustunut bakteeriviljelyyn ja toksiiniantigeenin osoitukseen ulosteesta. Geenimonistustekniikat, kuten PCR, toksiinigeenien osoittamiseen ulosteesta ovat kehittyneet huomattavasti ja niiden käyttö on yleistymässä. (THL)

Useita eri menetelmiä *C. difficile*en tunnistamiseen on jo kehitelty. Markkinoilla on menetelmiä, joissa yksin tai erilaisina kombinaatioina pyritään tunnistamaan bakteeri, sen geenit, antigeenit tai toksiinit. Kyseiset testaukset vaativat lähes poikkeuksetta laboratorioolosuhteet. (Bomers MK et al. 2015) Kultaisena standardina *C. difficile* -infektion toteamiseksi on pidetty toksiinia tuottavan *C. difficile* kannan osoitusta ulosteesta yhdessä paksusuolen histopatologisen pseudomembranoottisen koliitin kanssa kliinisesti oireisella potilaalla. (Brecher SM et al. 2013)

Tarve testeihin lähtee kliinisestä *C. difficile* -infektion epäilystä. Aikaa kuluu näytteiden laboratorioon kuljettamisessa ja niiden tutkimisessa. Kyseiset tekijät voivat viivästyttää oikeanlaisen hoidon aloitusta keskimäärin 5,6 päivällä. Odotusaikana taudin leviämisen riski on suuri. Ideaalitalanne olisi, että *C. difficile* kyettäisiin tunnistamaan suoraan ulosteesta. (Bomers MK et al. 2015)

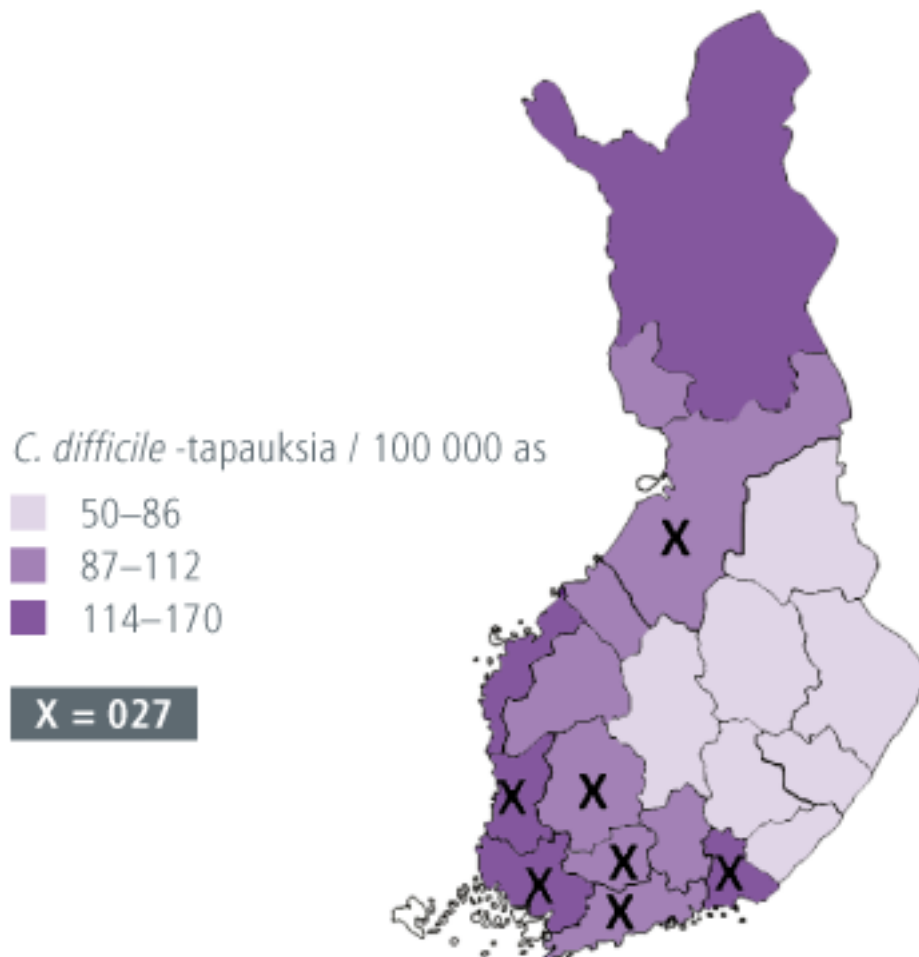
2. KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Clostridium difficile -infektiot

Vuoden 2014 aikana Suomessa tartuntatautirekisteriin ilmoitettiin 5725 *C. difficile* -tapaus. Viimeisen viiden vuoden aikana ilmoitetuissa tapausmäärissä ei ole juurikaan tapahtunut muutoksia. Sairaanhoidopiirien välillä on kuitenkin edelleen havaittavissa huomattavia eroavaisuuksia *C. difficile*en ilmaantuvuudessa. Mahdollisina selittävinä tekijöinä on pidetty eroavaisuuksia diagnostisissa menetelmissä, näytteenottoaktiivisuudessa ja torjuntatoiminnoissa. (THL)

Infektiot lisäävät potilaiden terveydenhuoltokustannuksia pidentyneen sairaalahoitoajan, uudelleen sairaalahoitoon päätyminen, laboratoriokokeiden sekä lääkitysten myötä. Yhdysvaltalais tutkimuksissa lisäkulojen arvioidaan olevan 2871-4846 USD per primaari-infektio ja 13655-18067 USD per uusiutunut infektio. *C. difficile* -infektioista arvioidaan aiheutuvan Yhdysvalloissa 433-797 miljoonan USD:n kulut vuosittain. Korkeiden kustannusten vuoksi infektioiden estämiseen ja kontrollointiin käytettävät lisäresurssit ovat taloudellisesti kannattavia. (Ghantaji SS et al. 2010)

Kuvassa 1 on esitetty *C. difficile* keskimääräinen vuosittainen ilmaantuvuus (tapauksia / 100 000 as) sairaanhoitopiireittäin v. 2008-2011. Seitsemän sairaanhoitopiiriä, joissa ribotyyppejä 027 todettiin, on merkitty rastilla. (Kanerva M. et al. 2014)



KUVA 1. *C. difficile* keskimääräinen vuosittainen ilmaantuvuus (tapauksia / 100 000 as) sairaanhoitopiireittäin v. 2008-2011. (Kanerva M. et al. 2014)

2.1.1 *Clostridium difficile* -bakteeri

C. difficile on anaerobinen, itiöitä muodostava grampositiivinen sauvabakteeri, jota löytyy pääasiassa maaperästä sekä pienellä osalla ihmisistä suoliston normaalista bakteerifloorasta. Bakteeri leviää ulosteen välityksellä ja itiöt selviytyvät pitkän aikaa kuivilla pinnoilla. Kolonisoidut potilaat saattavat jäädä oireettomiksi kantajiksi. Mikäli suoliston normaalifloora on häiriintynyt antibiootti- tai PPI-lääkityksen vuoksi, *C. difficile* todennäköisesti lisääntyy nopeasti. (Kenneley IL et al. 2014)

Infektio edellyttää suolistossa *C. difficile* -bakteereja sekä suolen mikrobikannan häiriötä. Bakteeri ei ole invasiivinen, joten patogeneesin kannalta keskeistä on toksiinin tuottaminen. Toksiininegatiiviset kannat eivät aiheuta kliinistä ripulia. (Bagdasarian N. et al. 2015) *C. difficile* muodostaa toksiineja A ja B. (Kachrimanidou M. et al. 2011) Toksiinit häiritsevät suolen epiteelin yhtenäisyyttä aiheuttaen inflammatoristen välittäjäaineiden kuten IL-8 vapautumista. Tämä aiheuttaa tulehdusreaktion suolen limakalvolla, tulehduseritteen ja nesteiden erittymistä johtaen ripuliin sekä epiteelin nekroosia. (Bagdasarian N. et al. 2015) Tutkimuksissa on osoitettu, että toksiini B on jopa 10 kertaa potentimpi tuhoamaan paksusuolen epiteeliseinämää kuin toksiini A. (Heinlen L et al. 2010)

Vaikka toksiinin tuotto on tärkeä osa *C. difficile* n taudinaiheuttamiskykyä, myös muita asioita tulee tapahtua ennen kuin toksiinin tuotto edes mahdollistuu. Ensimmäiseksi itiöiden tulee itää ja tämän on huomattu tapahtuvan, kun ne saavuttavat tietyn sijainnin ruoansulatuskanavassa. Itiöt kestävät korkeita lämpötiloja, uv-säteilyä, vahvoja kemikaaleja sekä antibiootteja. Tästä johtuen antibiooteille resistentit itiöt voivat säilyä ruoansulatuskanavassa hyvinkin pitkiä aikoja aiheuttaen myöhemmin mahdollisen taudin uudelleen puhkeamisen hoidosta ja hädöstä huolimatta. (Heinlen L et al. 2010)

2.1.2 Esiintyvyys ja riskiryhmät

C. difficile n esiintyminen on lisääntynyt runsaasti viimeisten vuosikymmenien aikana. 3-5 % terveestä aikuisväestöstä kantaa ulosteissaan *C. difficile* ä (Kachrimanidou M. et al. 2011) ja 60-80 %:n terveiden vastasyntyneiden suolistosta on löydettävissä *C. difficile* aina 12-18 kuukauden ikään asti, jolloin normaalifloora suolistossa alkaa kehittyä. (Heinlen L et al. 2010)

Sairaalahoidossa olevista potilaista noin 25-30 % on *C. difficile* n oireettomia kantajia. (Kachrimanidou M. et al. 2011) Oireeton kantajuus ei lisää riskiä oireiseen infektiin vaan voi jopa suojata myöhemmin oireisen infektiin kehittymiseltä. (Bagdasarian N. et al. 2015) *C. difficile* on pääasiallinen sairaala-alkuisen ripulin aiheuttaja Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa. *C. difficile* -varastoina toimivat potilaat, terveydenhuollon työntekijät sekä kontaminoitunut sairaalaympäristö. Sairaalaympäristön ulkopuolella terveessä väestössä *C. difficile* -bakteerilla kolonisoituneita on vain 2-3 %, mutta myös sairaalan ulkopuolisten

tartuntojen määrä on nousussa. Sairaalan ulkopuolella erilaisia lähteitä *C. difficile* -bakteerille ovat muun muassa maaperä, vesi, lemmikkieläimet, lihat ja vihannekset. (Heinlen L et al. 2010)

Bakteerikolonisaation tai -infektion saa 50 % potilaista jotka ovat yli neljä viikkoa sairaalassa verrattuna 13 %:iin potilaista joiden sairaalahoito kestää korkeintaan kaksi viikkoa. (Kenneley IL et al. 2014) Lähes kaikkien antibioottien on havaittu aiheuttavan *C. difficile* -ripulia, mutta suurimman riskin aiheuttavat klindamysiini ja laajakirjoiset kefalosporiinit. (Kachrimanidou M. et al. 2011) Fluorokinoloni-ryhmä on yhdistetty BI/NAP1/027 -kannan lisääntyneeseen riskiin. (Bagdasarian N. et al. 2015) Hoidon kesto ja useamman antibiootin kombinointi kasvattavat riskiä sairastua. Muita tunnettuja riskitekijöitä ovat yli 65 vuoden ikä, protonipumppuinhibiittorien käyttö, immunosuppressantit kuten metotreksaatti, tulehdukselliset suolistosairaudet sekä sairaalahoito ylipäänsä. (Kachrimanidou M. et al. 2011) Uusiutuva infektio on yleisempi iäkkäillä potilailla, potilailla joilla on oheissairastavuutta ja vakavan primaari-infektion sairastaneilla. (Bagdasarian N. et al. 2015) Myös happosalpaajien käytön on havaittu liittyvän taudin uusiutumisen riskiin. (Heinlen L et al. 2010)

2.1.3 Kliininen kuva

C. difficile -infektion taudinkuva vaihtelee oireettomasta kantajuudesta ja lievästä ripulista aina henkeä uhkaaviin pseudomembranoottiseen koliittiin ja toksiseen megakooloniin. (Bomers MK et al. 2015) Tauti voi alkaa pelkällä vetisellä ripulilla ja edetä oireiltaan hankalampiin tautimuotoihin. (Heinlen L et al. 2010) Oireet voivat alkaa antibiootihoidon aikana tai vasta useita viikkoja sen jälkeen. (Kenneley IL et al. 2014) Ripuli usein loppuu, kun antibioottihoito päästään lopettamaan. Pienelle osalle kehittyy vakavia komplikaatioita. On tärkeää huomata, että vakavassa *C. difficile* -infektiossa ripuli saattaa puuttua kokonaan paralyyttisen ileuksen vuoksi. (Kachrimanidou M. et al. 2011)

Yleisin infektion kliininen ilmentymä on koliitti ilman pseudomembranoottista muodostusta, jolloin taudinkuvaan liittyy usein yleisoireita kuten kuumetta, pahoinvointia ja laihtumista. Pseudomembranoottinen koliitti on systeemisairaus, johon liittyy vatsan alueen kipua ja arkuutta, kuumetta sekä vaikea ripuli, joka voi olla myös veristä. Lisäksi leukosytoosi ja hypoalbuminemia ovat tavallisia. (Kachrimanidou M. et al. 2011) Toksinen megakoolon on vakava komplikaatio, johon liittyy vatsan laajenemista koolonin dilatoituessa, vatsakipua,

ripulia, kuumetta, oliguriaa, takypneaa ja leukosytoosia. Sen ilmaantuvuus on 0,4-3 %. Fulminantissa tai vakavassa komplisoituneessa tapauksessa suolen inflammatoriset leesiot sekä pseudomembraanin muodostuminen paksusuolella voivat johtaa suolen puhkeamiseen, sepsikseen, sokkiin ja jopa kuolemaan. (Kenneley IL et al. 2014)

C. difficileen liittyvän kuolleisuuden on arvioitu olevan 6,9 % kaikista tapauksista. (Butler M. et al. 2011) Yleistyneen tulehduksen oireiston infektio on huonoennusteinen ja kuolleisuus siihen on suurempi. Ei tarkkaan tiedetä, ketkä potilaista sairastuvat vaikeaan taudinkuvaan ja miksi toisilla potilailla tauti etenee nopeasti hyvinkin hankalaksi ja toisilla vasta pidemmän ajan kuluessa, jos lainkaan. (Heinlen L. et al. 2010) 3-8 % C. difficile -infektioista kehittyi fulminantiksi muodoksi ja tällaiseen infektio-tyyppiin liittyy yli 35 %:n kuolemanriski. (Mäkelä J. et al. 2013)

2.1.4 Hoito

Potilaan olemassaoleva antibioottilääkitys tulee lopettaa mikäli mahdollista. Näin toimimalla 20 %:lla potilaista oireet häviävät muutaman vuorokauden kuluessa. (Kenneley IL et al. 2014) On osoitettu, että lievää C. difficile -infektiota sairastavilla potilailla parantuneiden osuus ei merkittävästi eroa metronidatsolilla (90 %) ja vankomysiinillä (98 %) hoidettujen ryhmien välillä. Vakavaa infektiota sairastavilla potilailla parantuneiden osuus sen sijaan on parempi vankomysiinillä (97 %) kuin metronidatsolilla (76 %) hoidetussa ryhmässä. (Brecher SM et al. 2013) Vankomysiinin etu on, ettei sitä metaboloida maksassa vaan se erittyy ulosteeseen muuttumattomana saavuttaen korkean pitoisuuden paksusuolella. (Kenneley IL et al. 2014)

Suomalaisten hoitosuosituksen mukaan lievässä taudinkuvassa ensisijainen lääke on metronidatsoli 400 mg kolme kertaa vuorokaudessa suun kautta 10 vuorokauden ajan. Oraalinen annostelutapa on parenteraalista huomattavasti tehokkaampi. Vaikeassa taudinkuvassa tai mikäli metronidatsolille ei saada vastetta 72 tunnin kuluessa, aloitetaan vankomysiini 125 mg neljä kertaa vuorokaudessa suun kautta 10 vuorokauden ajaksi. Komplisoituneessa taudinkuvassa hoito aloitetaan peroraalisen vankomysiinin (125–250 mg × 4) ja suonensisäisen metronidatsolin (500 mg × 3) yhdistelmällä. Nestehoito toteutetaan ripulin vaikeusasteen ja potilaan yleistilan mukaan. Probioottien tehosta ei ole luotettavaa näyttöä, mutta ne voivat estää primaari-infektioita sekä uusiutuvia episodeja. (Laine J. 2013) Komplisoituneissa tilanteissa saatetaan tarvita operatiivista hoitoa.

Vakavissa komplikaatioissa ainoa vaihtoehto on totaali tai osittainen kolektomia. (Brecher SM et al. 2013, Kenneley IL et al. 2014)

Hyvästä hoidosta huolimatta 20 %:lla ensimmäistä kertaa sairastuneista tauti uusii. Lisäksi taudin uusiutuessa kahdesti, 60 % saa myöhemmin vielä uuden taudin.

Useimmiten tauti uusii 1-3 viikon kuluessa ensimmäisestä tartunnasta. (Kachrimanidou M. et al. 2011) Suomalalaisten hoitosuosituksen mukaan ensimmäinen relapsi hoidetaan joko metronidatsolilla 400 mg kolme kertaa päivässä suun kautta 10 vuorokauden ajan tai vankomysiinillä 125 mg neljä kertaa päivässä suun kautta 10 vuorokauden ajan. Uusien relapsien ilmaantuessa käytetään peroraalista vankomysiiniä pitkä kuuri hitaasti pienenevin annoksina. Ulosteensiirto on tehokas toistuvasti uusiutuvien *C. difficile* -infektioiden hoitomuoto. Fidaksomysiini on uusi, tehokas lääke uusiutuneen infektion hoitoon, mutta toistaiseksi sen käyttöä rajoittaa korkea hinta. (Laine J. 2013)

2.1.5 Ennaltaehkäisy

Ennaltaehkäisyn kannalta ensiarvoisen tärkeää on antibioottien harkittu ja asianmukainen käyttö. Antibioottiryhmien välillä on eroja *C. difficile* -infektoriskin suhteen. Infektion leviämisen estämiseksi tulee noudattaa ehdottoman hyvää käsihygieniaa. Käsien pesu vedellä ja saippualla on erittäin tärkeää, koska alkoholipohjaisten käsihuuhteiden käyttö ei tuhoa itiöitä. Infektoituneet potilaat tulee sijoittaa yhden hengen huoneisiin tai muiden positiivisten potilaiden kanssa samaan huoneeseen. Probioottien käyttö saattaa auttaa terveen suolen bakteerikannan säilymistä kilpailevasti inhiboimalla patogeenien liikakasvua. (Kenneley IL et al. 2014) Pintojen puhtaana pitäminen klooripitoisilla puhdistusaineilla ja hanskojen sekä suojavaatteiden käyttö infektoituneita potilaita hoidettaessa on tärkeää. (Kachrimanidou M. et al. 2011) Rokotuksia *C. difficile*ä vastaan tutkitaan jatkuvasti. (Heinlen L. et al. 2010)

2.2 Clostridium difficile -diagnostiikka

Yhdysvaltalaisen suosituksen mukaan *C. difficile* -infektion diagnoosi edellyttää a) todettua ripulia eli vähintään 3 löysää ulostetta 24 tunnissa tai radiologista löydöstä ileuksesta tai toksisesta megakoolonista sekä b) positiivista ulostetestiä toksigeenisestä *C. difficile*stä tai sen toksiineista tai kolonoskooppista/ histopatologista näyttöä pseudomembranoottisesta

koliitista. (Bagdasarian N. et al. 2015) Suomessa diagnoosi käytännössä perustuu C.difficilen osoittamiseen potilaan ripuliulosteesta. (Laine J. 2013)

Indikaationa testaamiseen on aina kliininen epäily C. difficile -infektiosta. Useita eri menetelmiä C. difficilen tunnistamiseen on kehitelty. Markkinoilla on menetelmiä, joissa yksin tai erilaisina kombinaatioina pyritään tunnistamaan bakteeri, sen geenit, antigeenit tai toksiinit. Kyseiset testaukset vaativat lähes poikkeuksetta laboratorio- olosuhteet. Aikaa kuluu näytteiden laboratorioon kuljettamisessa ja niiden tutkimisessa. Tämä viivästyttää oikeanlaisen hoidon aloitusta keskimäärin 5,6 päivällä. Odotusaikana taudin leviämisen riski on suuri. (Bomers MK et al. 2015)

On tärkeää testata ainoastaan kliinisesti oireisia potilaita, sillä laboratoriotestit eivät kykene erottamaan oireetonta kolonisaatiota oireisesta infektiosta. C. difficile -infektiosta toipuvat potilaat voivat jäädä bakteerin kantajiksi ja levittää itiöitä. Oireiden lievittymisen jälkeen ei tule koettaa varmistaa parantumista laboratoriotesteillä. Mikäli oireet eivät lieydy asianmukaisen hoidon myötä tai ripuli palaa hoidon loputtua, on aiheellista ottaa testit uudelleen. (Brecher SM et al. 2013)

2.2.1 Perinteiset menetelmät ja nykysuositus

Kultainen standardi toksigeenisen C. difficilen osoitukseen ulosteesta on toksigeeninen viljely. Sen etuja ovat korkea herkkyys (67-100 %) ja tarkkuus (85-100 %). Toksigeeninen viljely on kuitenkin liian hidas kliiniseen käyttöön - lopullisen tuloksen saamiseen kuluu 4-7 vuorokautta. Menetelmä edellyttää myös erityisiä välineitä sekä koulutettua henkilökuntaa. (Bagdasarian N. et al. 2015, Kenneley IL et al. 2014)

Arviolta puolet C. difficile -tapauksista aiheuttaa suolistossa näkyviä muutoksia eli pseudomembranoottisia muutoksia. Ensisijaisena seulovana testinä on esitetty glutamaattidehydrogenaasin (GDH) tunnistamista ulosteista. GDH on soluseinämän proteiini, jota tuotetaan runsaasti enemmän kuin toksiineja. Kyseinen testi on nopea, sensitiivinen ja sillä on hyvä negatiivinen ennustearvo ja sitä voidaankin käyttää seulomaan jatkotutkimuksia tarvitsevia. Toisaalta tutkimuksen spesifisyys on vain 50 %:n luokkaa ja vääriä positiivisia tuloksia voivat aiheuttaa esimerkiksi suoliston muut bakteerit sekä toksiineja tuottamaton C. difficile. (Heinlen L. et al. 2010) Testillä ei voida myöskään

erottaa toksiiniposiitivisia ja -negatiivisia kantoja toisistaan. Testin herkkyys vaihtelee 75 %:sta 90 %:iin. (Brecher SM et al. 2013)

Entsyymi-immunoanalyysi (EIA) toksiineille A/B oli pitkään johtava menetelmä, mutta nykyään sitä ei pidetä tarpeeksi herkkänä (sensitiivisyys noin 60 %) käytettäväksi yksinään. Menetelmän suurimmat hyödyt ovat sen nopeus, halpuus ja helppokäyttöisyys. Entsyymi-immunoanalyysia (EIA) glutamaatti- dehydrogenaasille voidaan käyttää seulontatestinä *C. difficile* havaitsemiseksi. Testi on nopea, mutta luotettavuudeltaan vaihteleva eikä erottele toksiinia tuottavia ja tuottamattomia kantoja. (Bagdasarian N. et al. 2015, Brecher SM et al. 2013) Diagnostisista pikatesteistä nukleinihappo-osoitustesti (NAAT) on hyvin spesifinen ja sensitiivinen toksigeenisen *C. difficile* osoituksessa mutta kalliimpi kuin EIA-menetelmä. (Bagdasarian N. et al. 2015)

Kaksivaiheinen yhdistelmämenetelmä entsyymi-immunoanalyysi glutamaatti- dehydrogenaasille ja toksiineille A/B on ollut saatavilla vuodesta 2007. Siinä tulokset ovat hyväksyttäviä mikäli molemmat testit ovat positiivisia tai negatiivisia. Jos tulokset ovat ristiriitaiset, suoritetaan kolmas testi - yleensä molekulaarinen tai soluviljely. Tämä algoritmi syrjäytti useissa laboratorioissa pelkän toksiini A/B -osoituksen, mutta vaatii edelleen kahdesta kolmeen vaihetta lopulliseen tulokseen pääsemiseksi. (Brecher SM et al. 2013)

Nopeampaan diagnosointiin paras suorituskyky on monivaiheisilla algoritmeilla. SHEA (society for healthcare epidemiology of america) ja IDSA (infectious diseases society of america) suosittelevat kaksivaiheista testausta, jossa ensin suoritetaan glutamaattidehydrogenaasin osoitus ja positiivisen tuloksen jälkeen toksiinin osoitus esimerkiksi PCR-tekniikalla. (Kenneley IL et al. 2014) Molekulaariset analyysit tulivat saataville USA:ssa vuonna 2010. Nykyään FDA:n (Food and Drug Administration) hyväksymät testit perustuvat PCR-menetelmällä toksiini B -geenin tai *tcdC*-geenin osoitukseen tai isotermiseen toksiini A/B -geenin osoitukseen. Nämä testit ovat nopeita ja sensitiivisiä, mutta niiden saatavuus voi olla käyttöä rajoittava tekijä. (Bagdasarian N. et al. 2015, Brecher SM et al. 2013)

Suomessakin on PCR-menetelmien kehittymisen myötä uudistettu laboratorioiden tutkimuskäytäntöjä. Pirkanmaalla Fimlab siirtyi marraskuussa 2014 *C. difficile* - bakteeriviljelystä ja toksiiniantigeenin suorasta osoituksesta ulosteesta F-CldTHNho-

tutkimukseen eli PCR-tekniikalla *C. difficile* -toksiini A- ja -B -geenien suoraan osoittamiseen ulosteesta. Kyseinen geenimonistusmenetelmä on sensitiivisyydeltään ja spesifisyydeltään viljelyn kanssa samaa luokkaa ja lisäksi tulokset saadaan jo vuorokauden kuluessa, viimeistään seuraavana arkipäivänä. HUSlab siirtyi marraskuussa 2015 PCR-tekniikalla *C. difficile* -toksiini B -geenin (tcdB) osoittamiseen suoraan ulostenäytteestä. (Fimlab Ohjekirja, HUSLAB Tutkimusohjekirja)

2.2.2 Koirien ja ihmisten hajuaisti diagnostiikassa

Haisteleamiseen koulutettujen koirien käytöstä on saatu lupaavia tuloksia *C. difficile* diagnosoinnissa ulostenäytteistä. Koira tunnisti oikein 12/14 *C. difficile* tapausta, jolloin sensitiivisyydeksi saatiin 86 % (luottamusväli 95 %, CI 56-97 %). Koira ei kuitenkaan jokaisella kerralla tunnistanut kaikkia positiivisia oikein. Tutkimusryhmä päätyi johtopäätökseen, että oireiden vaihtelevuus saattaa liittyä bakteeri- ja toksiinikuormaan. Negatiivisista koira tunnisti oikein 346/357, jolloin spesifisyydeksi saatiin 97 % (luottamusväli 95 %, CI 94-98 %). Yhdestätoista koiran väärin positiiviseksi merkitsemästä kahdelle (18 %:lle) kehittyi kolmen kuukauden seuranta-ajan kuluessa *C. difficile* -infektio. Vastaava määrä negatiivisten ryhmässä oli 12/346 (3,5 %). Kyseinen tutkimus ei ainakaan vielä ole johtanut nopeampaan diagnostiikkaan tai hoitoon. (Bomers MK et al. 2014)

Kahdessa tutkimuksessa on todettu hoitajien kykenevän diagnosoimaan *C. difficile* -infektion hyvällä tarkkuudella ulosteen hajun perusteella. (Burdette SD et al. 2007, Johansen A. et al. 2002) Näiden tulosten luotettavuutta heikentää se, etteivät hoitajat olleet sokkoutettuja potilaiden ja ulosteiden ominaisuuksien suhteen. Tämän vuoksi ei voida sanoa, että ulosteen haju olisi ollut ainoa tekijä arvioon vaikuttamassa. (Rao K. et al. 2013)

Sama koeasetelma on suoritettu myös kontrolloiduissa laboratorio-olosuhteissa. Tällöin laboratorio valitsi satunnaisesti viisi positiivista ja viisi negatiivista kaksivaiheisesti *C. difficile* -toksiinitestattua ulostenäytettä, joita 18 hoitajaa ohjeistettiin haistamaan ja sitten ilmoittamaan oliko kyseessä CDTOX-positiivinen näyte. Hoitajilta kysyttiin myös työkokemuksesta sekä luottavaisuudestaan positiivisen näytteen tunnistamiseen. Oikeiden vastausten mediaani oli 45 % ja vaihteluväli 40 %:sta 80 %:iin. Työkokemus tai itsevarmuus eivät korreloineet tuloksiin. Kontrolloiduissa laboratorio-olosuhteissa hoitajat

eivät kyenneet identifioimaan ulostenäytteistä *C. difficile*ä hajun perusteella. (Rao K. et al. 2013)

2.2.3 Haihtuvat orgaaniset yhdisteet

VOC eli volatile organic compound tarkoittaa mikro-organismien tuottamaa haihtuvaa orgaanista yhdistettä. Mikro-organismit tuottavat useita haihtuvia orgaanisia yhdisteitä. Tämä on osoitettu tutkimuksissa, joissa kaasun analysointiin on käytetty kaasukromatografiaa yksin tai yhdistettynä massaspektrometriaan. Toistaiseksi tämäntyyppinen analyysi on vaatinut kalliita analyttisiä välineitä, niiden käyttö erikoisosaamista ja koko prosessi runsaasti aikaa. (Turner AP et al. 2004)

Ihmisen kyky haistaa hajuja riippuu nenässä sijaitsevien hajuaistimuksia havaitsevien solujen kyvystä tunnistaa kaasumuotoisia komponentteja ja haihtuvia orgaanisia yhdisteitä (volatile organic compound eli VOC). Potilaat ja terveydenhuollon ammattilaiset ovat havainneet ulosteen haisevan tavanomaisesta poikkeavalta suolistosairauden aikana. Tämän perusteella haihtuvien orgaanisten yhdisteiden identifiointi ulosteesta tarjoaa potentiaalisen mahdollisuuden kehittää nopea diagnosointimenetelmä suolistosairauksille. (Garner CE et al. 2007) *C. difficile* -bakteerilla sanotaan olevan ominaislaatuinen hajunsa, jota on kuvailtu muun muassa hevosen lannaksi. Kyseisen hajun koostumusta on tutkittu ja tutkimuksia suoritettu muun muassa eristämällä kaasuja ulostenäytteistä ja tämän jälkeen analysoimalla kaasuja massaspektrometrilla ja kaasukromatografilla. Ulosteen, jossa tiedetään kasvavan *C. difficile* -bakteeri, on havaittu tuottavan hajuja, joissa on vähemmän rasvahappoja, estereitä ja rikkiä ja sen sijaan enemmän butanolia ja furaania. (Bomers MK et al. 2015)

Ihmisellä on lähes koko elämänsä ajan pysyvä paksusuolen bakteerikanta. Ulosteista identifioidut bakteerit ovat samoja suurimmalla osalla aikuisista. Tiedetään, että akuutissa gastroenteriitissä suoliston mikrofloora muuttuu nopeasti, sillä patogeeneit usein syrjäyttävät normaaliflooraa. Tämän vuoksi voidaan olettaa, että myös VOC-profiili muuttuu potilaan sairastuessa esimerkiksi gastroenteriittiin. (Garner CE et al. 2007)

On havaittu, että terveiden ihmisten ulosteiden VOC-profiileissa ei juurikaan ole keskenään eroavaisuuksia. Terveiden ihmisten ulostenäytteissä havaitut merkittävimmät VOC-ryhmät olivat 4-metyylifenoli, indoli, 3-metyyli-indoli sekä limoneeni. *C. difficile* -

infektiopotilaiden ulosteissa on todistettu esiintyvän uniikkeja haihtuvia orgaanisia yhdisteitä. *C. difficile*n aiheuttamaan ripuliin sairastuneiden VOC-profiili koostui 5-metyyli-2-furaanikarboksaldehydista yhdessä mittaamattomissa olevan 3-metyyli-indolin kanssa. VOC-profiileja on tutkittu myös muissa bakteerien aiheuttamista ripuleissa ja myös eri bakteerien aiheuttamissa ripuleissa on eroja VOC-profiileissa. Eroavaisuus esimerkiksi *C. difficile*n ja *E. coli*n välillä selittyy laajakirjoisten antibiottihoitojen jälkeen aiheutuvana *E. coli*n vähenemisenä suolessa ja *C. difficile*n runsaana lisääntymisenä. Tällaisessa tilanteessa metyyli-indolin tuotanto vähenee, mikä yhdessä sen tiedon kanssa, että *C. difficile* ei tuota indolia tryptofaanista, selittää *C. difficile* -bakteerille ominaisen VOC-profiilin. (Probert CS et al. 2004)

VOC-datan diskriminanttitulosten on osoitettu erottelevan 100 %:n tarkkuudella oireettomien, haavaista paksusuolentulehdusta sairastavien, kampylobakteeri-infektiota sairastavien sekä *C. difficile* -infektiota sairastavien potilaiden ulostenäytteet. Tutkimuksessa ulostenäytteet kerättiin lasipulloihin, joita vesihauteessa mikrouuttamalla saatiin haihtuvat orgaaniset yhdisteet tutkittaviksi kaasukromatografilla ja massaspektrometrilla. Yhdisteet ja niiden prosenttiosuudet selvittämällä saatiin tilastollisilla menetelmillä eroteltua terveet sekä eri sairausryhmät toisistaan. Haihtuvien yhdisteiden kokonaisuudet eri sairauksissa ovat merkittävästi erilaiset. Usein samoja VOC:ja löytyy monilta ihmisiltä ja pysyvä suoliston bakteerifloora luo yleisiä yhdisteitä riippumatta mm. mahdollisista ruokavalion muutoksista. Sairailta potilailta löytyy monia myös oireettomilta löytyviä yhdisteitä, mutta VOC-määrät huomattavasti pienemmät. Tämä johtuu bakteerien vähentämisestä biodiversiteetistä ja sekundaaristen metaboliittien määrästä sekä ripulinaikaisesta lyhentyneestä läpikulkuajasta, joka aiheuttaa biosynteesin vähentymistä. (Garner CE et al. 2007)

2.2.4 Elektroniset keinonenet

Ensimmäinen malli älykkästä, elektronisesta kaasua sensoroivasta laitteesta kehitettiin vuonna 1982 (Persaud and Dodd). (Rao K. et al. 2013) Viime vuosina on tapahtunut huomattavan nopeaa kehitystä sensoriteknologiassa sekä keinoälymenetelmissä. On kehitetty useita elektronisia neniä, jotka kaikki perustuvat haihtuvan kaasun kulkeutumiseen sensoreille, sensorien sähkönjohtavuuteen sekä sensoreiden signaalien datan analysointiin. (Turner AP et al. 2004) Nykypäivän tutkijoiden tavoitteena on kehittää kemikaaleja havaitsevia laitteita kohti monitoimisia, energiatehokkaita ja kannettavia

laitteita. Yleensä kyseiset laitteet perustuvat elektrokemiallisiin sensoreihin, optisiin tai elektrokemiallisiin sensoreihin, akustisiin pinta-aaltosensoreihin tai metallioksidivastussensoreihin. Uudempiin tekniikoihin kuuluu mm. ionimobiliteettispektrometria. (Turner AP et al. 2004, Utriainen M. et al. 2003)

In vitro on osoitettu olevan mahdollista erottaa toisistaan anaerobiset bakteerit *H. pylori*, *E. coli* ja *Enterococcus* näiden tuottamien terpeenien, trimetyyliamiinien ja ketonien määrien perusteella. Onnistuneesti on erotettu toisistaan myös anaerobiset *Clostridium* ja *Bacteroides fragilis* tuottamiensa isobutyliamiinin, etikkahapon ja voihiapon määrittämisellä. Virtsatieinfektiot ja tuberkuloosi on identifioitu 90-99 %:n tarkkuudella. Silmäinfektioita aiheuttavat kuusi bakteeria (*E. coli*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* sekä *Streptococcus pneumoniae*) eriteltiin onnistuneesti 98 %:n tarkkuudella kuuteen ryhmään käyttäen kannettavaa elektronista nenää. (Turner AP et al. 2004) Kaasua sensoroimalla on tunnistettu sieniä (Keshri G. et al. 1998) sekä bakteereja (Gardner J. et al. 1998) ja erotettu *Helicobacter pylori* muista gastroesofagusalueen isolaateista (Pavlou A. et al. 2000).

MonoNose -laite hyödyntää reaaliaikaista VOC-tyyppien tunnistamista ja niiden muodostamien aktiivisten hajuprofiilien yhdistämistä aiemmin mitattuihin ja entuudestaan tunnettuihin vertailuarvoihin. Menetelmä toimii samalla tavalla kuin ihmisen oma hajuntunnistus. Kyseisellä laitteistolla on tutkittu useampia merkittäviä bakteerilajikkeita: *C. difficile*stä tutkittiin kannat AN59 ja AN63. Tutkijat käyttivät useita erilaisia kasvualustoja parhaan kasvun saavuttamiseksi. Lajikkeet voitiin mittausten perusteella jakaa kahteen erilaiseen ryhmään: ryhmään, jossa oli havaittavissa voimakkaat signaalit eli mahdollisesti runsaasti VOC-tuotantoa sekä ryhmään, jossa signaali pysyi matalana koko mittauksen ajan. *C. difficile* kuului runsaasti signaalia aiheuttavien ryhmään. *C. difficile* -näytteitä oli tutkimuksessa neljä kappaletta, joista MonoNose tunnisti kaikki oikein. Tulokset ovat lupaavia, mutta näytteiden määrä oli todella pieni. (Bruins M. et al. 2009)

FAIMS (field-asymmetric ion mobility spectrometry) on kannettava massaspektrometri, joka kykenee mittaamaan nopeasti ja tehokkaasti kaasumuodossa olevien seoksien koostumuksen. Laitteiston toiminta perustuu sen kykyyn analysoida seoksista erilaisia molekyylejä vertailemalla niiden liikkuvuutta sähkökentässä. Liikkuvuuteen vaikuttaa molekyylin koko ja massa. Laitteisto käyttää aaltoilevaa sähkökenttää ja muodostaa näytteistä tietynlaisen kemiallisen sormenjäljen, jonka perusteella näyte voidaan tunnistaa

positiiviseksi tai negatiiviseksi. Laitteiston etuja ovat sen kyky toimia huoneenlämpötilassa ja ilman erityisiä kantajakaasuja ja että sensorien kertakalibrointi usein riittää. Lisäksi testi on nopea, kestoltaan vain kymmenisen minuuttia, se on mahdollista toteuttaa osastolla eikä sen käyttöön ei tarvita paineilman, puhtaiden lasimaljojen ja veden lisäksi juuri muita tarvikkeita. Laitteisto on myös suhteellisen kompaktin kokoinen. (Bomers MK et al. 2015)

Tutkimustulokset osoittavat, että FAIMS-analyysillä voidaan hyvällä tarkkuudella erotella ulostenäytteet *C. difficile* -positiivisiin ja -negatiivisiin näytteisiin. Heikkoutena tutkimuksessa olivat näytteiden keräyksestä analyysiin kuluneet melko pitkät, lähes 14 vuorokauden säilytysajat. Ei voida täydellä varmuudella tietää, kuinka paljon VOC-profiilit muuttuivat näiden säilytysvuorokausien aikana. Tulokset myös selkeästi osoittivat, että mitä nopeammin keräyksestä näyte analysoitiin, sitä suuremmalla todennäköisyydellä FAIMS tunnisti näytteen oikein. (Bomers MK et al. 2015)

Oleellista kaikkien näiden laitteiden käyttökelpoisuuden kannalta on näytteen oikea formaatti optimaalisen haihtuvien yhdisteiden ja sensoreiden vuorovaikutuksen saavuttamiseksi. Tämän vuoksi kosteus, lämpötila ja näytteen koko tulee olla standardoitu. Lisäksi sensoreiden tuottaman datan tulee olla nopeasti analysoitavissa tarkoituksenmukaisten ja käyttökelpoisten tulosten tuottamiseksi. Nykyään on mahdollista kerätä data etänä ja sitten kehittyneiden it-sovellusten, satelliittiyhteyksien sekä internet-pohjaisten tietojärjestelmien avulla analysoida se nopeasti saaden tulokset nopeasti. Tulevaisuudessa teknisten sovellusten kehitys sekä etäohjatun datan hankinta ja keskitetty prosessointi mahdollistavat keinonenä-tekniikan yleistymisen. (Turner AP et al. 2004) Näiden laitteistojen heikkouksia ovat toistaiseksi kallis hinta, sensorien säännöllinen kalibroinnin tarve sekä vaatimus kasvualustan bakteerikasvusta. (Bomers MK et al. 2015)

3. MATERIAALIT JA METODIT

3.1 Aineisto

Tarkoituksenamme oli kerätä yhteensä 100 kappaletta ulostebakeeriviljelynäytteitä. Ulostenäytteet tulivat testattaviksi Fimlabin laboratorioon Tampereen yliopistollisesta sairaalasta sekä Kanta-Hämeen keskussairaalaan. Tutkimus oli ennalta suunniteltu ja prospektiivinen. Alkuperäisenä tavoitteenamme oli saada kerätyksi yhteensä 50 viljelypositiivista ja 50 viljelynegatiivista näytettä. Näytteet kerättiin anonyymisti, eikä käytössä ollut potilaiden sairauskertomustietoja. Informaatio näytteiden viljelypositiivisuudesta tai -negatiivisuudesta sekä toksiinipositiivisuudesta tai -negatiivisuudesta saatiin Fimlabin tietokannasta.

Näytteitä saatiin lopulta kerätyksi yhteensä 80, joista viljelypositiivisia oli 30 kappaletta ja viljelynegatiivisia 50 kappaletta. Toksiini B:tä tuottavaa kantaa oli yhteensä 25 näytteessä. Viljelyt suoritettiin laboratorioissa aina maanantaisin ja keskiviikkoisin. Mittaukset suoritimme tiistaisin ja torstaisin 5/2014-10/2014 välisenä aikana. Mitattavaksi kelpasivat näytteet, jotka viljeltiin aikaisintaan kolme päivää ennen mittauksia.

Näytteet analysoitiin eNose -laitteistoa (ChemPro 100i, Environics Inc., Mikkeli, Suomi) käyttäen. Laitteen toiminta perustuu ionimobilitetispektrometriaan (IMS). Jokaisen näytteen mittausajaksi sovittiin seitsemän minuuttia. Näytteiden välissä mitattiin kansi auki pelkkää ilmaa neljän minuutin ajan ja tämän jälkeen tyhjää petrialjaa neljän minuutin ajan kontaminaation välttämiseksi. Kyseiset mittausajat on havaittu sopiviksi aiempien eNosella tehtyjen tutkimusten perusteella. Näytteiden vaihtoajat kirjattiin ylös Excel- taulukkoon ja kyseistä dataa verrattiin myöhemmin laitteiston mittausaineiston perusteella muodostamaan lokiin. Kyseistä lokia käytettiin myöhemmin myös kun suoritettiin tarvittavat tilastolliset analyysit.

Suunnitelmanamme oli tehdä kaksi testiä. Ensimmäisessä verrattiin toksiinipositiivisia näytteitä toksiini-negatiivisiin näytteisiin. Toisessa testissä verrattiin C. difficile - viljelypositiivisia näytteitä viljelynegatiivisiin näytteisiin.

3.2 ChemPro 100i -eNose

Näytteiden analysoinnissa käytettiin kaupallisesti saatavilla olevaa eNose ChemPro 100i -laitteistoa, joka koostuu pienikokoisesta ionimobiliteettispektrometrinä (IMS) ja kuudesta puolijohdattavasta metallioksidisensorista (MOS). Kyseessä on pieni ja kompakti IMS-detektori (IMCell). Laitteisto on läpivirtausjärjestelmä, joka koostuu sisäänottoaukosta, suodattimesta, IMCell- ja MOS-komponenteista, ilmapumpusta, virtausensorista sekä kosteusensorista ja ulosvirtausaukosta. Lisäksi laitteistoon kuuluu säteilylähde Am-241 5.92 MHz sekä lämmittävä elementti, joka pitää IMCellin jatkuvasti tasaisessa lämpötilassa 30-45°C. Kantajakaasuna käytetään huoneilmaa, joka taustahälyn poistamiseksi virtaa ensin aktiivisen hiilisuodattimen läpi ja vasta tämän jälkeen mittausensorille. IMCell tuottaa ionimobiliteettikuvion, jota käytetään kemikaalien identifiointiin. IMCell-komponentin yhdistäminen MOS-kaasusensoriin parantaa edelleen laitteiston kykyä tunnistaa kemikaaleja. Järjestelmän sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä on mahdollista räätälöidä, sillä IMCell-laitteen virtaus ja elektronisen kentän asetukset sekä MOS-kaasusensorin lämpötila ja vastuksen resistanssi ovat muunneltavissa. Laitteisto esitellään yksityiskohtaisemmin Utraisen ym. (2003) artikkelissa, jonka tulosten mukaan IMCell- ja MOS-komponenttien, lämpötila- ja kosteusensoreiden sekä asianmukaisen hahmontunnistusalgoritmin yhdistelmä on erinomainen tekniikka toksisten kemikaalien tunnistukseen. (Roine A. et al. 2014a, 2014b, Utrainen M. et al. 2003)

Tutkimuksessamme ChemPro 100i -laitteiston virtaus asetettiin 1,30 l/min ja sensorin lämpötila oli keskimäärin 31,5 astetta. Lämpölevy oli säädetty 37 asteeseen. Tarkoitusta varten valmistetulla kannella näyte peitettiin ja sen avulla saatiin yhdistettyä mittauslaitteisto petrimaljalla olevan näytteen yläpuoliseen ilmaan. Kannen tiivistämiseksi käytettiin tavallista kumilenkkiä. Mittausten aikana kantta ei puhdistettu ja käytössämme oli vain yksi kansi.

3.3 Tilastolliset menetelmät

Aineistosta tehtiin kaksi erillistä testiä leave-one-out ristiinvalidoinnilla sekä 5-kertaisella ristiinvalidoinnilla. Ensimmäisessä testissä verrattiin toksiinipositiivisia ja toksiini-negatiivisia. Mikäli toksiinia ei oltu testattu, kyseiset näytteet jätettiin pois

testiryhmästä. Toisessa testissä verrattiin viljelypositiivisia ja viljelynegatiivisia riippumatta toksiinimäärityksen tuloksesta.

Leave-one-out ristiinvalidoinnilla (LOOCV) testataan mallin toimivuutta ja yleistettävyyttä. Kyseinen menetelmä sopii hyvin pienille datajoukoille, jolloin kukin näyte jätetään vuorollaan testidataksi. Menetelmässä aineistosta poistetaan yksi havainto kerrallaan ja tämän jälkeen testataan kuinka hyvin jäljelle jäänyt aineisto ennustaa tämän yksittäisen havainnon tulosta.

5-kertainen ristiinvalidointi vastaa menetelmänä leave-one-out ristiinvalidointia, mutta kyseisessä menetelmässä aineisto jaetaan viiteen joukkoon ja yksi joukoista jätetään kerrallaan testidataksi. Näin vältetään saamasta liian optimistisia tuloksia.

4. TULOKSET

Leave-one-out ristiinvalidointi testi 1:lle antoi tulokseksi 52 %:n sensitiivisyyden (95 % CI 31-72 %) ja spesifisyydeksi 90 % (95 % CI 76-97 %). Kaikkiaan 25:stä toksiiniposiitivisesta näytteestä 13 näytettä luokiteltiin positiiviseksi ja 12 negatiiviseksi. Edelleen 39:stä toksiininegatiivisesta näytteestä 35 näytettä luokiteltiin negatiiviseksi ja vain 4 positiiviseksi. Lisäksi 5-kertainen ristiinvalidointi antoi tulokseksi 48 %:n sensitiivisyyden (95 % CI 28-69 %) ja spesifisyydeksi 95 % (95 % CI 83-99 %). 25:stä toksiiniposiitivisesta näytteestä 12 näytettä luokiteltiin positiiviseksi ja 13 puolestaan negatiiviseksi. 39:stä toksiininegatiivisesta näytteestä 37 luokiteltiin oikein negatiiviseksi ja 2 vääräksi positiiviseksi.

Testi 2:lle leave-one-out ristiinvalidointi antoi 50 %:n sensitiivisyyden (95 % CI 29-71 %) ja 94 %:n spesifisyyden (95 % CI 83-99 %). Kaikkiaan 12 näytettä 24:stä viljelypositiivisesta näytteestä luokiteltiin positiiviseksi ja 12 negatiiviseksi. 50:stä negatiivisesta näytteestä 47 luokiteltiin negatiiviseksi ja 3 positiiviseksi. 5-kertainen ristiinvalidointi antoi sensitiivisyydeksi 54 % (95 % CI 33-74 %) ja spesifisyydeksi 94 % (95 % CI 83-99 %). 13

näytettä 24:stä viljelypositiivisesta näytteestä luokiteltiin oikein positiiviseksi ja 11 luokiteltiin negatiiviseksi. 50 viljelynegatiivisesta näytteestä 47 luokiteltiin oikein negatiiviseksi ja 3 vääriksi positiivisiksi.

Informaatio näytteiden viljelypositiivisuudesta tai -negatiivisuudesta tai siitä, oliko kyseessä toksiini B:tä tuottava kanta vai ei saatiin Fimlabin tietokannoista. Aineistolle suoritettiin kaksi testiä. Ensimmäisessä verrattiin toksiini B positiivisia kantoja toksiini B:tä tuottamattomiin kantoihin. Toksiiniposiivisuus saatiin joko suoraan ulostenäytteestä tai viljelynäytteestä. Yhteensä 64 näytettä sisällytettiin tähän testiin. Näytteistä 39 oli toksiini-negatiivisia ja 25 toksiini-positiivisia.

Taulukko 1. LOOCV testi 1.

<i>TESTI 1</i>	<i>Toksiini-negatiiviset (eNose)</i>	<i>Toksiini-positiiviset (eNose)</i>
<i>Todelliset negatiiviset</i>	35	4
<i>Todelliset positiiviset</i>	12	13
	<i>Spesifisyys 0.8974</i>	<i>Sensitiivisyys 0.5200</i>

Taulukko 2. 5-kertainen ristiinvalidointi (eräs ajo, aina satunnainen) testi 1.

<i>TESTI 1</i>	<i>Toksiini-negatiiviset (eNose)</i>	<i>Toksiini-positiiviset (eNose)</i>
<i>Todelliset negatiiviset</i>	37	2
<i>Todelliset positiiviset</i>	12	12
	<i>Spesifisyys 0.9487</i>	<i>Sensitiivisyys 0.4800</i>

Toisessa testissä verrattiin näytteitä, joissa kasvoi *C. difficile* riippumatta toksiinin erityksestä ja niitä, joissa *C. difficile* ei kasvanut. Kliinisesti toksiinia tuottamattomat kannat eivät aiheuta oireista ripulia, mutta kyseinen testi tehtiin, jotta nähtiin kykeneekö laite tunnistamaan *C. difficile*n. Yhteensä 74 näytettä kelpuutettiin mukaan kyseiseen vertailuun. Näytteistä 50 oli viljely-negatiivisia ja 24 viljely-positiivisia.

Taulukko 3. LOOCV testi 2.

<i>TESTI 2</i>	<i>Viljelynegatiiviset (eNose)</i>	<i>Viljelypositiiviset (eNose)</i>
<i>Todelliset negatiiviset</i>	47	3
<i>Todelliset positiiviset</i>	12	12
	<i>Spesifisyys 0.9400</i>	<i>Sensitiivisyys 0.5000</i>

Taulukko 4. 5-kertainen ristiinvalidointi (eräs ajo, aina satunnainen) testi 2.

TESTI 2	Viljelynegatiiviset (eNose)	Viljelypositiiviset (eNose)
Todelliset negatiiviset	47	3
Todelliset positiiviset	11	13
	Spesifisyys 0.9400	Sensitiivisyys 0.5417

5. POHDINTA

Tutkimuksemme tärkein tulos on eNosen kyky haistaa korkealla spesifisyydellä *C. difficile* -bakteerin toksinia tuottavat ja toksinia tuottamattomat kannat. Sen sijaan eNosen sensitiivisyys jää heikoksi. Yhtenä virhelähteenä voidaan varmasti pitää eri ribotyypin selkeästi erilaisia VOC-profiileja. Luultavasti *C. difficile* VOC profiili ei koostu vain yhdenlaisesta hajusta vaan on ennemminkin kombinaatio useammasta profiilista. Aiemmissa tutkimuksissa myös näytteiden keräyksen ja analysoinnin välisen ajan on mahdollisesti ajateltu liittyvän muuttuviin VOC-profiileihin. Kannettavalla massaspektrometrilla on havaittu, että mitä nopeammin keräyksestä näyte analysoitiin,

sitä suuremmalla todennäköisyydellä kyseisessä tutkimuksessa käytetty laitteisto (FAIMS) tunnisti näytteen oikein. (Bomers MK et al. 2015)

Omassa tutkimuksessamme näytteet kuitenkin analysoitiin alle 3:n päivän kuluessa keräyksestä ja viljelystä, joten tämä ei ainakaan täysin selitä heikkoa herkkyttä. Aiemmissa tutkimuksissa väärin negatiivisten tulosten mahdollisena selityksenä on pidetty muun muassa sitä, että ulosteissa olisi läsnä sellainen *C. difficile* -kanta, jota ei viljelemällä saatu tunnistettua. Yhtenä selittävänä tekijänä on pidetty ulosteen vähäistä bakteerimäärää. Tämä ongelma olisi mahdollisesti saatu ratkaistua toistonäytteillä. (Putsathit P. et al. 2015). Kyseiset seikat voivat osaltaan selittää heikkoa sensitiivisyyttä myös tutkimuksessamme. Lisäksi mahdollisena erottelukyvyn heikkoutta selittävänä tekijänä tulee myös pohtia viljelymaljojen perushajun vaikutusta eNosen kykyyn tunnistaa *C. difficile*.

Etuna tutkimuksessamme oli jo edellä mainittu näytteiden nopea analysointi keräyksen jälkeen. Kannettava laitteisto on kompaktin kokoinen ja helposti siirrettävissä. Laitteistolla näytteiden mittaaminen ei vaadi erityistä koulutusta eikä lukuisia työntekijöitä. Potilaista ei ollut käytettävissä mitään taustatietoja kuten sairauskertomustekstejä, mitä voidaan pitää tutkimuksemme heikkoutena. Laitteiston tuottaman datan analysointi vaatii toistaiseksi vahvaa erityisosaamista. Ongelmana tutkimuksessamme on toksiinipositivisten näytteiden melko pieni määrä.

Ryhmämme aiemmissa eNosella toteutetuissa tutkimuksissa on saatu eri laitteistolla parempia herkkyysarvoja, mutta tällöin spesifisyys on jäänyt heikommaksi. Muun muassa eturauhasyöpää koskevissa tutkimuksissa eNosen sensitiivisyydeksi on leave-one-out ristiinvalidoinnilla saatu 78 %, spesifisyyden jäädessä 67 %:iin. (Roine A. et al. 2014a)

eNose on luotu kvalitatiiviseen, ei kvantitatiiviseen tutkimukseen. Kyseinen ominaisuus mahdollistaa sen, että eNose kykenee analysoimaan monimutkaisia sekoituksia, joita herkemmillä menetelmillä olisi mahdotonta analysoida (esim kaasukromatografi-massaspektrometri) ilman esivalmisteluja.

Kannettavan mittauslaitteiston etuna on se tuoma helppous näytteiden analysoinnissa : näytteitä ei enää tarvitse kuljettaa osastolta laboratorioihin. Lisäksi kyseinen laitteisto on

kestävä ja lujatekoinen, mikä mahdollistaisi sen käytön myös kehittyvissä maissa. (Roine A. et al. 2014b)

VIITTEET

Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. Diagnosis and treatment of clostridium difficile in adults: A systematic review. JAMA. 2015; 313:398-408.

Bomers MK, Menke FP, Savage RS, et al. Rapid, accurate, and on-site detection of *C. difficile* in stool samples. Am J Gastroenterol. 2015; 110:588-594.

Bomers MK, van Agtmael MA, Luik H, Vandenbroucke-Grauls CM, Smulders YM. A detection dog to identify patients with clostridium difficile infection during a hospital outbreak. J Infect. 2014; 69:456-461.

Brecher SM, Novak-Weekley SM, Nagy E. Laboratory diagnosis of clostridium difficile infections: There is light at the end of the colon. Clin Infect Dis. 2013; 57:1175-1181.

Bruins M, Bos A, Petit PL, et al. Device-independent, real-time identification of bacterial pathogens with a metal oxide-based olfactory sensor. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28:775-780.

Burdette SD, Bernstein JM. Does the nose know? the odiferous diagnosis of clostridium difficile-associated diarrhea. Clin Infect Dis. 2007; 44:1142.

Butler M, Bliss D, Drekonja D, et al. Effectiveness of Early Diagnosis, Prevention, and Treatment of *Clostridium difficile* Infection. AHRQ, 2011.

Fimlab laboratoriot Oy. Ohjekirja <http://www.fimlab.fi/sivu.tmpl?sivu_id=32> viitattu 19.3.2016.

Gardner JW, Craven M, Dow C, Hines EL. The prediction of bacteria type and culture growth phase by an electronic nose with a multi-layer perceptron network. Meas Sci Technol. 1998; 9:120-127.

Garner CE, Smith S, de Lacy Costello B, et al. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. The FASEB Journal. 2007; 21:1675-1688.

Ghantaji SS, Sail K, Lairson DR, DuPont HL, Garey KW. Economic healthcare costs of clostridium difficile infection: A systematic review. J Hosp Infect. 2010; 74:309-318.

Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P, Järvinen A, Meri S, Vaara M. Clostridium-lajit. In: Rautio M (ed). Mikrobiologia. 1.-2. ed. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2011:233-236.

Heinlen L, Ballard JD. Clostridium difficile infection. Am J Med Sci. 2010; 340:247-252.

HUSLAB. Tutkimusohjekirja <<http://huslab.fi/ohjekirja/>> viitattu 19.3.2016.

- Johansen A, Vasishta S, Edison P, Hosein I. Clostridium difficile associated diarrhoea: How good are nurses at identifying the disease?. Age Ageing. 2002; 31:487-488.
- Kachrimanidou M, Malisiovas N. Clostridium difficile infection: A comprehensive review. Crit Rev Microbiol. 2011; 37:178-187.
- Kanerva M, Lyytikäinen O. Fluorokinolonien käyttö voi vaikuttaa Clostridium difficileen yleisyyteen <http://sic.fimea.fi/3_2014/fluorokinolonien_kaytto_voi_vaikuttaa>. Accessed 3/2014. Fimea, Sic! viitattu 19.3.2016.
- Kenneley IL. Clostridium difficile infection is on the rise. Am J Nurs. 2014; 114:62-67.
- Keshri G, Magan N, Voysey P. Use of an electronic nose for the early detection and differentiation between spoilage fungi. Lett Appl Microbiol. 1998; 27:261-264.
- Laine J. Lääkäriin käsikirja: Clostridium difficile -ripuli <http://www.terveysportti.fi/helios.uta.fi/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00235&p_haku=clostridium>. Accessed 12/22. 2013 viitattu 19.3.2016.
- Martinson JN, Broadaway S, Lohman E, et al. Evaluation of portability and cost of a fluorescent PCR ribotyping protocol for clostridium difficile epidemiology. J Clin Microbiol. 2015; 53:1192-1197.
- Mäkelä J, Takala H, Klintrup K, Syrjälä H, Rautio T. Fulminantin Clostridium difficileen aiheuttama koliitti - milloin kirurginen hoito on aiheellinen ? Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 2013;129(16):1681-5.
- Pavlou A, Turner AP, Magan N. Recognition of anaerobic bacterial isolates in vitro using electronic nose technology. Lett Appl Microbiol. 2002; 35:366-369.
- Pavlou AK, Magan N, Sharp D, Brown J, Barr H, Turner AP. An intelligent rapid odour recognition model in discrimination of helicobacter pylori and other gastroesophageal isolates in vitro. Biosens Bioelectron. 2000; 15:333-342.
- Probert CS, Jones PR, Ratcliffe NM. A novel method for rapidly diagnosing the causes of diarrhoea. Gut. 2004; 53:58-61.
- Putsathit P, Morgan J, Bradford D, Engelhardt N, Riley TV. Evaluation of the BD max cdiff assay for the detection of toxigenic clostridium difficile in human stool specimens. Pathology. 2015; 47:165-168.
- Rao K, Berland D, Young C, Walk ST, Newton DW. The nose knows not: Poor predictive value of stool sample odor for detection of clostridium difficile. Clin Infect Dis. 2013; 56:615-616.
- Roine A, Veskimäe E, Tuokko A, et al. Detection of prostate cancer by an electronic nose: A proof of principle study. J Urol. 2014a; 192:230-234.
- Roine A, Saviauk T, Kumpulainen P, et al. Rapid and accurate detection of urinary pathogens by mobile IMS-based electronic nose: A proof-of-principle study. PLoS

ONE [Electronic Resource]. 2014b; 9:e114279.

THL. *Costridium difficile* löydökset 2014

<<https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/seuranta-ja-epidemiati/tartuntatautirekisteri/tartuntataudit-suomessa-vuosiraportit/tautien-esiintyvyyys-2014/clostridium-difficile-esiintyvyyys-2014>>. 2015 viitattu 19.3.2016.

Turner AP, Magan N. Electronic noses and disease diagnostics. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2:161-166.

Utriainen M, Kärpänoja E, Paakkanen H. Combining miniaturized ion mobility spectrometer and metal oxide gas sensor for the fast detection of toxic chemical vapors. *Sensors Actuators B: Chem.* 2003; 93:17-24.