

Anni Ikonen ja Maijastiina Kontio

ILLUMIGENESTA GENOMERAAN

Clostridium difficile – analyysimenetelmien vertailu

ILLUMIGENESTA GENOMERAAN

Clostridium difficile – analyysimenetelmien vertailu

Anni Ikonen
Majastiina Kontio
Opinnäytetyö
Syksy 2016
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijät: Anni Ikonen ja Maijastiina Kontio

Opinnäytetyön nimi: Illumigenestä GenomEraan: *Clostridium difficile* –
analyysimenetelmien vertailu

Työn ohjaaja: Yhteistyölaboratorion sairaalamikrobiologi. Ohjaavat opettajat Mika Paldanius ja Irja Parkkinen.

Työn valmistumislukukausi- ja vuosi: Syksy 2016

Sivumäärä: 38

Clostridium difficile on itiöitä muodostava suolistobakteeri, jonka jotkin kannat tuottavat toksineja. Yleisimmät toksini muodot ovat A ja B. *C. difficile* aiheuttamia tauteja esiintyy maailmanlaajuisesti ja ne aiheuttavat vaikeita epidemioita. Vuonna 2014 Terveystieteiden tutkimuskeskus ilmoitti, että toksiinipositiivisia tapauksia löydettiin noin 5000 kappaletta. *C. difficile* aiheuttamien tautitapausten määrä on pysynyt tasaisena, vaikka niiden määrä on laskenut viimeiset viisi vuotta. Ensisijaisena hoitona tautitapauksissa käytetään antibioottikuurin lopettamista tai vaihtamista toiseen. Tauti voi olla joissain tapauksissa hengenvaarallinen.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää kahden *C. difficile* analyysimenetelmän herkkyyttä ja tarkkuutta mikrobiologian laboratoriossa. Menetelmiä verrattiin toisiinsa 147 kappaleella kliinisiä näytteitä

*C. difficile*n diagnosointi perustuu kliiniseen kuvaan, ulostenäytteen toksiinien/toksiinigeenien osoitukseen tai viljelyyn. Vertailimme kahta nukleiinihappomenetelmää: Illumigenea ja GenomEraa. Illumigenessä käytetään LAMP-tekniikkaan, jossa DNA:n monistus tapahtuu vakiolämpötilassa. GenomEra on PCR-tekniikkaan perustuva DNA:n monistusmenetelmä.

Tuloksemme osoittivat, että molemmat menetelmät olivat spesifisiä ja herkkiä *C. difficile* mittaamiseen.

Avainsanat: antibioottiripuli, toksini, infektio, *Clostridium difficile*

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Author: Anni Ikonen ja Maijastiina Kontio

Title of thesis: From Illumigene to GenomEra: Comparison between two *Clostridium difficile* methods

Supervisors: Clinical microbiologist from the collaborative microbiology laboratory and teachers Mika Paldanius and Irja Parkkinen from OUAS.

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2016 Number of pages: 38

Clostridium difficile is a spore-forming intestinal bacterium which generates toxins. *C. difficile* infections cause serious epidemics worldwide. The CDI can lead to death. National Institute for Health and Welfare informed about 5000 toxin positive cases in 2014. The number has remained even for last five years.

The purpose of the dissertation was to study spesify and sensitivity of two *C. difficile* analyzemethods.

Clostridium difficile laboratory diagnostics are based on a clinical picture. We became acquainted with the Illumigene and GenomEra methods. Both methods are based on the nucleic acid methods. Illumigene replaced GenomEra in the microbiology laboratory. Functionality was examined from the point of view of the research results.

The main results were that both methods were highly specific and sensitive for measuring *C. difficile*.

Keywords: antibiotic-associated diarrhea, toxin, infection, *Clostridium difficile*

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	Clostridium difficile	8
2.1	Toksiinit	8
2.2	Esiintyvyys	9
2.3	Torjunta	11
2.4	Hoito	12
	DIAGNOSTIIKKA	14
	Menetelmän herkkyys ja tarkkuus	15
2.5	Muut menetelmät	16
2.6	Clostridium difficileen patogeenisuusalue	17
2.7	C. difficileen analyysimenetelmä Illumigene	18
2.7.1	Silmukkavälitteinen isoterminen monistus	19
2.7.2	Herkkyys ja spesifisyys	19
2.7.3	Menetelmän suoritus	20
2.8	C. difficileen analyysimenetelmä GenomEra	21
2.8.1	PCR	21
2.8.2	Herkkyys ja spesifisyys	24
2.8.3	Menetelmän suoritus	25
3	Validointiprosessi ja tulokset	26
	Menetelmien käytettävyyden vertailua	29
4	Pohdinta	31
	LÄHTEET	33

1 JOHDANTO

Clostridium difficile on anaerobinen, grampositiivinen sauvabakteeri ja yleinen antibioottiripulin aiheuttaja (Arkkila ym. 2013, 1671). Se on itiöitä muodostava suolistobakteeri, joka tuottaa toksineja. Yleisimmät toksinit ovat A ja B, joista A on enterotoksiini ja B sytotoksiini. (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2015a, viitattu 19.4.2016.) Tunnetuimpien taudinaiheuttajien toksiinien A ja B lisäksi joillakin *Clostridium difficile* kannoilla on todettu olevan myös binääritoksiini CDT, jonka rooli taudin aiheuttamisessa on vielä epäselvä. (Kuehne ym. 2014, 83,86.)

Vuonna 2014 Suomessa kirjattiin *C. difficile*-ilmoituksia 5725 kappaletta, joista toksiinipositiivisia oli 5156. *C. difficile* tapausmäärät ovat laskeneet viimeiset viisi vuotta. Naisten osuus sairastuneista on hieman suurempi (58 %) kuin miesten ja lähes puolet tautitapauksista todetaan yli 75-vuotiailla. (Jaakola, ym. 2015, 17).

Ensisijaisena hoitona *C. difficile* tapauksissa on antibioottikuurin lopetus tai vaihtaminen toiseen (Mayo Clinic 2013, viitattu 20.4.2016). Jos antibioottia ei voida lopettaa, suositellaan antibioottihoitoksi metronidatsolia ja vankomysiiniä. Vankomysiinin on todettu olevan osallinen vankomysiini-resistenttien bakteerien leviämisessä, joten sitä ei yleensä käytetä ensimmäisenä antibioottina. (Weston 2008, 161.)

C. difficile diagnosointi perustuu kliiniseen kuvaan, ulostenäytteen toksiinien/toksiinigeenien osoitukseen tai viljelyyn. Spesifisin ja herkin menetelmä *C. difficile* toteamiseen on viljeleminen selektiiviselle kasvumaljalalle. Yleisimmin laboratoriot käyttävät kaupallisia nukleinihappomenetelmiä, koska ne ovat nopeita ja herkkiä. (Ylisiurua 2015, 138–139.)

Vertasimme kahta *C. difficile* menetelmää toisiinsa 147 kappaleella kliinisiä

potilasnäytteitä. Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää Illumigene ja GenomEra menetelmien herkkyyttä ja tarkkuutta kliinisten potilasnäytteiden tutkimiseen.

Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä kliinisen mikrobiologian laboratorion kanssa. *Clostridium difficile* menetelmien vertailutulokset analysoitiin vuonna 2015 kerätyistä näytteistä ja kultaisena standardina käytettiin Illumigene-menetelmän tuloksia, koska tälle menetelmälle on tehty viljelyvertailu.

2 Clostridium difficile

Clostridium difficile on anaerobinen, grampositiivinen sauvabakteeri ja se aiheuttaa antibioottiripulia (Arkkila ym. 2013, 1671). *C. difficile* on itiöitä muodostava suolistobakteeri, joka tuottaa toksineja. Yleisimmät toksinit ovat A (enterotoksiini) ja B (sytotoksiini) (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2015a, viitattu 19.4.2016). Oireisia infektoita esiintyy mikrobilääkehoitojen yhteydessä erityisesti käytettäessä kefalosporiineja, fluorokinoloneja ja klindamysiiniä. Taudin itämisaika vaihtelee vuorokausista useisiin viikkoihin. (Arkkila ym. 2013, 1671.)

Antibioottiripulin tyypillisimpiä oireita ovat vesiripuli ja pahanhajuiset löysät ulosteet, joihin voi liittyä vatsakipua. Pahoinvointi, oksentelu ja kuume ovat enemmän tyypillisiä ruokamyrkytyksille ja virusperäisille ripuleille kuin antibioottiripuleille. *C. difficile* voi aiheuttaa pseudomembranoottisen koliitin eli paksusuolen tulehduksen, jossa on tyypillistä korkea kuume, yhtäkkinen ummetus sekä lisääntyvät vatsakivut ja veri ulosteissa. Pseudomembranoottisia koliitteja todetaan Suomessa vuosittain vain muutamia. (Lumio 2014, viitattu 20.4.2016.)

*Clostridium difficile*ä on jo vuonna 1935 nimitetty ”hankalaksi klostridiksi”, sillä sen eristäminen ja viljely laboratorio-olosuhteissa oli vaikeaa. *C. difficilen* yhteys antibioottien käyttöön ja pseudomembranoottiseen koliittiin tunnistettiin vasta 1970-luvulla. (Weston 2013, 325)

2.1 Toksiinit

Osalla *C. difficile* kannoilla on todettu binääritoksiini CDT, jonka rooli taudin aiheuttamisessa on vielä epäselvä. On epäilty, että CDT vaikuttaa muun muassa toksini A:n virulenssin lisääntymiseen ja se, että CDT:n tuntemattoman roolin

vuoksi aikaisemmat tutkimustulokset toksiinien A ja B virulenssista ovat ristiriitaisia. On kuitenkin todistettu, että toksiini A sekä toksiini B voivat myös yksin aiheuttaa oireisen taudin. (Kuehne ym. 2014, 83,86.) On olemassa myös *C. difficile* kantoja jotka eivät tuota toksiineja lainkaan. Nämä ovat yleensä ihmiselle oireettomia. (Jousimies-Somer & Ristola 2003, 234–236.) Suurella osalla vastasyntyneistä on suolistossaan *C. difficile* bakteeria, mutta ikääntyessä sen määrä suolistossa vähenee ja sitä tavataan enää vain muutamalta prosentilta terveistä aikuisista. Esiintyessään suolen normaaliflooran joukossa *C. difficile* ei aiheuta sairautta eikä tartuntaa. (Lumio 2014, viitattu 20.4.2016.)

2000-luvun alussa alkoi maailmalla levitä uusi hypervirulentti molempia toksiineja (A ja B) tuottava *C. difficile* kanta 027, joka aiheuttaa muita kantoja vakavamman ja vaikeahoitoisemman taudin. (Lumio 2014, viitattu 20.4.2016.) *C. difficile* n 027-kanta tuottaa muihin kantoihin verrattuna moninkertaisen määrän toksiineja ja siitä on tullut vastustuskykyinen kinoliryhmän mikrobilääkkeille (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2015a, viitattu 19.4.2016). Toisena merkittävänä löydöksenä voidaan pitää PCR ribotyyppi 078 kantaa, jonka taudinaiheuttamiskyky on samaa luokkaa kuin 027. Ribotyyppi 078 esiintyy useimmiten nuoremmilla henkilöillä, sekä avohoidon potilailla. (Ylisiurua 2015, 138.) Ribotyypin 027 lisäksi Suomessa on tavattu muitakin potentiaalisia hypervirulentteja kantoja, esimerkiksi ribotyypit 023, 045 ja 126 (Mentula 2013, 14).

2.2 Esiintyvyys

Suomessa Terveyden ja hyvinvoinninlaitos on tilastoinut *C. difficile* tartuntoja vuodesta 2008 alkaen. Tartuntatauti-ilmoituksia tulee vuosittain n. 5000 kappaletta, joista suurin osa on toksiiniposiitivisia. Vuonna 2014 Suomessa kirjattiin *C. difficile* – ilmoituksia 5725 kappaletta, joista toksiiniposiitivisia oli 5156. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2015b, Viitattu 19.4.2015.) *C. difficile* tapausten määrät ovat vähentyneet viime vuosina (Jaakola ym. 2015, 17). Naisten osuus

sairastuneista on hieman suurempi (58 %) kuin miesten ja lähes puolet tautitapauksista todetaan yli 75 vuotiailla. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2015a, viitattu 19.4.2016.) Nykyään noin 20 % oireisista *Clostridium difficile* tartunnoista ovat hypervirulentin kannan aiheuttamia (Lumio 2014, viitattu 20.4.2016).

Vuonna 2011 Suomessa todetuista 33 eri ribotyypistä 14 ilmaantui vain kerran (Mentula 2013, 16). Terveyden ja hyvinvoinnin laitos tyypittää kaikki epidemiaepäilyihin ja vakaviin yksittäistapauksiin liittyvät kannat (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2015b, viitattu 19.4.2016). Vuosittain Terveyden ja hyvinvoinnin laitos tyypittää noin 200 näytettä, vuonna 2011 näytteitä oli 195 kappaletta (Mentula, sähköpostiviesti 26.7.2016). 32 % ribotyypitykseen tulleista näytteistä ovat epidemiaepäilyksiä ja 23 % on saanut poikkeavan profiilin PCR:ssä (Mentula 2013, 16).

Vuonna 2015 julkaistussa tutkimuksessa todetaan, että Yhdysvalloissa arvioidaan olleen 435 000 *C. difficile* infektiota vuonna 2011. *Clostridium difficile* arvioitiin samana vuonna olleen osallinen myös jopa 29 000 kuolemantapaukseen. Taudin ilmaantuvuus oli muualla kuin sairaalassa 30–120 tapausta 100 000:tta potilasta kohden. Sairaalaympäristössä ilmaantuvuus oli 50–160 tapausta 100 000:tta potilasta kohden. Tulokset ovat laskennallisia arvioita, 10 osavaltion rekisteröidyistä tapauksista. Näissä kymmenessä osavaltiossa todettiin vuoden 2011 aikana 15 461 CDI tapausta. Yli 65-vuotiailla, valkoisilla ja naisilla oli korkeampi riski sairastua kuin verrokkiryhmillään. (Lessa ym. 2015, viitattu 20.4.2016.)

Kanadassa todettiin vuosina 2007–2011 vuosittain noin 2200 - 3200 terveydenhuoltolähtöistä *C. difficile* -infektiota. Taudin ilmaantuvuus tuhatta potilasta kohden oli noin 5 (sairastunutta potilasta). Vuosien 2009 ja 2010 välisenä aikana kuolleisuus 30 päivän kuluttua positiivisesta viljelynäytteestä

nousi 33 tapauksesta 88 tapaukseen. (Public Health Agency of Canada 2013, viitattu 20.4.2016.)

Iso-Britanniassa *Clostridium difficile* tapauksia tilastoidaan vuosittain noin 13 500 kappaletta (viimeisin tilasto vuodelta 2014). Määrä on laskenut rajusti viime vuosina, koska esimerkiksi 2008 tilastoitiin vielä yli 40 500 tapausta. Tuloksissa on otettu huomioon vain yli kaksivuotiaat potilaat. (Public Health England 2014, viitattu 20.4.2016.)

Japanissa toteutettiin kaksi vuotta kestänyt tutkimus 550 hoitopaikkaisessa Sapporolaisessa sairaalassa syyskuun 2010 elokuun 2012 välisenä aikana. Sairaalassa hoidettiin 22 863 potilasta ja 126 potilaalla todettiin *C. difficile* infektio. Infektioon sairastuneiden potilaiden mediaani-ikä oli 78 vuotta. Kolmelle potilaalle suoritettiin infektion takia leikkaus ja 19 potilasta kuoli 30 päivän sisällä *C. difficile* infektion hoidon päättymisestä. (Honda ym. 2014, viitattu 20.4.2016.)

Aasiassa tietoisuus *Clostridium difficile* infektiosta on pysynyt heikkona huolimatta sen merkittävästä kasvusta Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa viime vuosikymmenen aikana. Tutkimuksia on tehty niukasti, mutta ne osoittavat että *C. difficile* on merkittävä patogeeni myös Aasiassa vaikka sen merkitys on vielä epäselvä. Valvomaton antibioottien käyttö monissa Aasian maissa viittaa siihen, että CDI tapausten määrä voi olla oletettua suurempi. (Collins ym. 2013, 1)

2.3 Torjunta

C. difficile aiheuttama ripuli uusiutuu antibioottihoidon jälkeen noin 30 %:lla potilaista ja he tarvitsevat uuden, vahvemman antibioottikuurin. Helpon uusiutuvuutensa vuoksi, tulisi antibioottikuureja yrittää välttää. (Jousimies-Somer & Ristola 2010, 235.)

Tartunta saadaan bakteerin itiöistä. Sairaalaympäristössä tauti voi levitä

kosketustartuntana potilaasta toiseen. Bakteerin itiöt säilyvät hengissä elimistön ulkopuolella ja ne alkavat lisääntyä päästessään elimistöön. Käsihuuhde ei tuhoa *C. difficile* itiöitä, joten käsien pesu saippualla on erittäin tärkeää. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2015a, viitattu 19.4.2016.)

Jopa 70 %:lla terveistä aikuisista on suolistossaan *C. difficile* toksiinien vasta-aineita, mikä viittaa yleiseen altistumiseen. Suoliston normaalifloora yleensä estää *C. difficile* kolonisoitumisen terveellä aikuisella, antibioottikuurin aiheuttama häiriö suolistossa taas voi edistää kolonisoitumista. (Weston 2008, 159)

Tartunnan on todettu kulkevan reittiä uloste-käsi-suu. Paras tapa ehkäistä infektion leviämistä sairaalassa on pitää henkilökunta koulutettuna ripulipotilaiden hoidosta. Potilaalle on hyvä antaa kotiuttamisen yhteydessä kirjallinen ohje käsihygieniasta ja ympäristön puhtaana pitämisestä. (Elomaa 2007, 119.)

Infektoituneet potilaat on eristettävä sairaaloissa tartuntojen ehkäisemiseksi, sillä *C. difficile* itiöitä on erittäin vaikea hävittää oireisen potilaan ympäristöstä. (Jousimies-Somer & Ristola 2010, 235.) Potilas on parasta sijoittaa kosketuseristykseen erilliseen huoneeseen, jossa potilaalla on oma wc ja suihku. Kosketuseristyksessä olevan potilaan luokse mennessä on kaikkien henkilöiden käytettävä suojaimia. Suojakäsineiden poiston jälkeen on ensisijaisesti pestävä kädet vedellä ja saippualla. (Elomaa 2007, 121.)

2.4 Hoito

Clostridium difficile -infektion ensisijaisena hoitona on antibioottikuurin lopetus tai vaihtaminen toiseen (Mayo Clinic 2013, viitattu 20.4.2016). Jos antibioottia ei voida lopettaa, suositellaan antibiootihoidoksi metronidatsolia ja vankomysiiniä. Metronidatsolia käytetään ensisijaisena antibioottina, koska sen on todettu tehoavan hyvin suurimpaan osaan *C. difficile* isolaateista ja se on halvempi kuin

vankomysiini. Vankomysiiniä käytetään vain, jos metrodinatsolihoito ei tehoa, tauti on vakava tai potilaalla on muita metrodinatsolihoiton kontraindikaatioita (muun muassa raskaus ja imetys). Vankomysiinin on todettu olevan osallinen vankomysiini-resistenttien bakteerien leviämisessä, joten sitä ei yleensä käytetä ensimmäisenä antibioottina. (Weston 2008, 161.)

Radikaalein hoitomuoto on ulosteen siirto. Ulosteen siirrolla tarkoitetaan toimenpidettä, jossa terveen henkilön ulostetta siirretään CDI-potilaan paksusuoleen kolonoskopisesti (peräsuolen kautta) tai nenämahaletkulla. Terveen henkilön uloste on ennen siirtoa analysoitu tarkasti parasiittien, virusten, bakteerien ja vasta-aineiden osalta. (Mayo Clinic 2013, viitattu 20.4.2016). Ulosteen siirron on todettu tehoavan toistuvan *C. difficile* -infektion hoidossa kansainvälisissä tutkimuksissa n. 73–100% tapauksissa. Ulosteen siirron vaikutuksen on osoitettu säilyvän vähintään kolme kuukautta. Ulosteen siirtoa pidetään tehokkaana ja turvallisena toimenpiteenä koska sen käytön jälkeen todetaan harvoin merkittäviä komplikaatioita. (Arkkila ym. 2013, 1674.)

Clostridium difficile – infektiota vastaan on kehitteillä rokote, joka stimuloi immuunijärjestelmää taistelemaan *C. difficile*nsen toksiineja vastaan ja ennaltaehkäisemään *C. difficile* – infektioiden syntyä. Rokote on tutkimusvaiheessa ja sitä rahoittaa Sanofi Pasteur. Tutkimuksen nimi on Cdiffence. Tutkimukset on ollut määrä aloittaa elokuussa 2013 Yhdysvalloissa sopivien testihenkilöiden rekrytoinnilla. Testihenkilöt kuuluvat riskiryhmään ja heidät jaetaan kahteen ryhmään joista toiset saavat kehitteillä olevaa rokotetta ja toiset lumerokotetta. Tutkimus kestää yhden potilaan kohdalla jopa kolme vuotta. (Sanofi Pasteur 2013, viitattu 20.4.2016.) Suomessa rokotetta tutkii Rokotetutkimuskeskus, joka aloitti potilastutkimukset Turussa vuoden 2013 lopulla. Myöhemmin tutkimukset laajennetaan muihin yliopistollisiin keskussairaaloihin. Tutkimus toteutetaan 17 maassa ja siihen osallistuu 15 000 vapaaehtoista henkilöä. (Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiri 2014, viitattu 8.10.2015.)

DIAGNOSTIIKKA

C. difficile -infektion diagnosointi perustuu kliiniseen kuvaan, ulostenäytteen toksiinien/toksiinigeenien osoitukseen tai viljelyyn. Spesifisin ja herkin menetelmä *C. difficile* n toteamiseen on viljeleminen selektiiviselle kasvumaljalle. Viljeltyä maljaa kasvatetaan anaerobisissa olosuhteissa 35 °C:ssa 48 tuntia. Pesäkkeet tunnistetaan silmämääräisesti pesäkemorfologiaan perustuen. Pesäke on sinivihreä 360 nm:n UV-valossa. Lopullinen vastaus voidaan antaa vasta 2-3 päivän kuluttua. (Ylisiurua 2015, 138.)

C. difficile on anaerobinen bakteeri, ja se on viljeltävä mahdollisimman nopeasti geeliputkesta maljalle. Kasvattaminen tapahtuu anaerobisissa olosuhteissa kahden vuorokauden ajan. CCFA -malja (Cycloserine cefoxitin fructose agar), jota käytetään viljelyssä, sisältää antibiootteja, jotka estävät muiden bakteereiden kasvun. Mikäli ulostenäytteelle tehdään alkoholikäsittely ennen viljelyä, se suositellaan viljeltäväksi CCEY -maljalle (Cefoxitin cycloserine egg yolk), joka sisältää itiöiden kasvattamisen mahdollistavaa koolihappoa. Alkoholikäsittely auttaa *C. difficile* itiöitä kasvamaan ja tuhoaa muita bakteereja. CCFA -maljalla pesäke on kellertävä, kun taas CCEY -maljalla pesäke on harmahtava tai valkoinen. Antibioottiherkkyudet voidaan tehdä jatkotutkimuksena, jolloin käytetään yleisimmin metronidatsolia ja vankomysiiniä, koska ne ovat yleensä tehokkaita antibiootteja jatkohoidoissa. Antibioottimaljalle laitettujen antibioottikiekkojen ympärille kasvava estorengas, kertoo sensitiivisyydestä ja kiekkoon kiinni kasvava kanta resistenttiydestä. Maljalta ei voida havaita toksiinin tuottoa, vaan sen määrittämiseen käytetään omaa jatkotutkimusta. (Jalava ym. 2009. 246–248.)

Yleisimmin laboratoriot käyttävät kaupallisia nukleiinihappomenetelmiä, sillä ne ovat nopeita ja herkkiä. Suomessa oli 18 *C. difficile* diagnostiikkaa tekevää laboratoriota vuonna 2014, joista 12 käytti nukleiinihapon osoitusta ensisijaisena

menetelmänään. (Ylisiurua 2015, 139.) Nukleiinihappomenetelmät eivät kerro onko näytteessä toksiineja sillä ne havaitsevat vain toksiinigeenin (Mentula 2012, 14). Tässä opinnäytetyössä käsiteltävät Illumigene ja GenomEra perustuvat molemmat nukleiinihappomenetelmiin.

Entsyymi-immunologinen määrittely eli EIA (Enzyme immunoassay)-testit vievät aikaa kolmisen tuntia ja niiden herkkyys on 54–67%, kun nukleiinihappomenetelmien spesifisyys on 95–100%. (Ylisiurua 2015, 139.) Nykyiset EIA -menetelmät jättävät noin 40 % tapauksista diagnosoimatta (Bartlett & Gerding, 2008, viitattu 2.5.2016). EIA -menetelmässä entsyymillä leimattu antigeeni kilpailee näytteessä olevan antigeenin kanssa rajatusta määrästä vasta-aineen antigeenin sitoutumiskohtia. Vasta-aine on kiinnitettynä kiinteään faasiin, yleensä kuoppalevyn kaivoihin. Kiinnittymättömät entsyymileimat pestään pois ja lisätään substraattia. Lopputuotteeksi saadaan spektrofotometrillä mitattava värillinen yhdiste. Laitteella mitattava absorbanssi on kääntäen verrannollinen antigeenin pitoisuuteen. Kun määritettävää antigeenia on runsaasti, kilpailu leimatun antigeenin kanssa tehostuu ja absorbanssi jää pieneksi. (Openmichigan 2010, viitattu 2.5.2016.)

Menetelmän herkkyys ja tarkkuus

Herkkyys on mittalaitteen signaalin arvon muutoksen suhde analyytin pitoisuuden muutokseen, eli kuinka herkästi mittalaite havaitsee muutoksen mitattavassa arvossa (Jaarinen & Niiranen 2008, 13). Herkkyys eli sensitiivisyys kuvaa siis todennäköisyyttä, jolla sairas todetaan sairaaksi (Labquality 2016, viitattu 2.9.2016).

Spesifisyys eli tarkkuus tarkoittaa menetelmän kykyä mitata vain tarkoitettua analyyttiä (Linko ym. 1997, 48). Spesifisyys kuvaa sitä todennäköisyyttä, jolla terve todetaan terveeksi (Labquality 2016, viitattu 2.9.2016).

Korrelaatio tarkoittaa kahden suureen riippuvuutta toisistaan (Creative Research Systems 2016, viitattu 2.9.2016). Korrelaatiolla on kuvattu tulosten oikeellisuutta verraten saatuja tuloksia toisella, luotettavammalla menetelmällä oikeiksi todistettuihin tuloksiin. Virheellisyysprosentti kuvaa sitä määrää tuloksista, joka poikkeaa oikeaksi todistetuista tuloksista.

2.5 Muut menetelmät

Muina tutkimusmenetelminä voidaan käyttää sytotoksisuus- ja antigeenitestejä (Mentula 2012, 6). Lisäksi on olemassa pikatestejä, jotka osoittavat CDI toksiinin suoraan ulosteesta. Tulos on mahdollista saada jopa 15 minuutissa, mutta spesifisyys on vain 52–72%. (Ylisiurua 2015, 139.)

Sytotoksisuustestissä infektion tunnistus perustuu oireisiin, sekä toksiinin havaitsemiseen ulosteesta tai isolaatista (Mentula 2012, 6). Sytotoksisuusmenetelmää pidetään usein parhaana diagnosointimenetelmänä. Se on myös ensimmäinen *C. difficile*n diagnosointiin kuvattu menetelmä. Sytotoksisuustesti ei ole yhtä herkkä menetelmä kuin ulosteviljely, mutta se on edelleen herkin menetelmä toksiini B:n diagnosointiin. Sytotoksisuustestin heikkoja puolia ovat sen vaatima tekninen osaaminen ja suhteellisen pitkä aika. (Bartlett & Gerding 2008, 15.) Sytotoksisuustestin valmistumisessa menee 6-48 tuntia (Mentula 2012, 6).

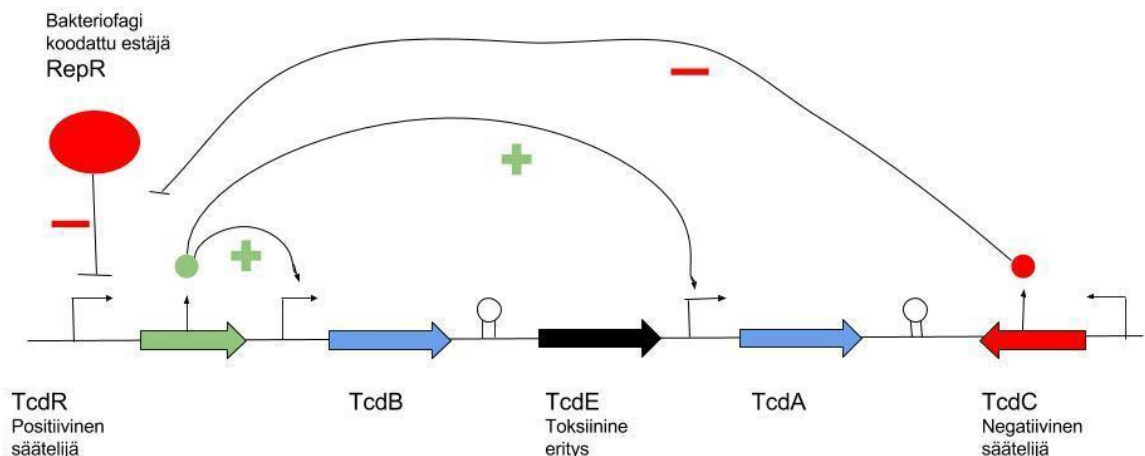
Glutamaatti-dehydrogenaasi antigeenitesti havaitsee niin toksiinia tuottavat kuin tuottamattomat *C. difficile* kannat. Menetelmää pidetään herkkänä, mutta se ei ole yhtä spesifinen toksiinia tuottavan *C. difficile*n diagnosoinnissa. Menetelmä tunnistaa *C. difficile*n, mutta ei sitä, tuottaako kyseinen bakteeri toksiineja vai ei. (Lab Tests Online 2014, viitattu 28.4.2016)

Terveysten ja hyvinvoinnin laitos tyypittää kaikki epidemiaepäilyihin ja vakaviin yksittäistapauksiin liittyvät kannat (Terveysten ja hyvinvoinnin laitos 2015b, viitattu

19.4.2016). Tyypittämällä *C. difficile* kantoja tutkitaan infektion laatua niin potilaskohtaisesti kuin yleisellä tasolla. On potilaan edun mukaista selvittää, mikä *C. difficile* kanta on taudinaiheuttaja, sillä tämä on tärkeä tieto taudin uusiutuessa. Yleisellä tasolla kanta on hyvä tunnistaa epidemioiden ja trendien seuraamiseksi, uusien virulenttien tyyppien havaitsemiseksi ja alueellisten erojen kartoittamiseksi. (Mentula 2012, 13–14.)

2.6 Clostridium difficilen patogeenisuusalue

PaLoc on noin 19 kb (emäsparin) mittainen alue, jolla *C. difficile*n toksiinit TcdA ja TcdB sijaitsevat. Alueella on myös positiivinen säätelijä tcdR. Mikäli tcdR on aktiivinen ja toimiva eivät TcdB ja TcdA pysty lisääntymään. PaLoc alueelle on koodattuna myös negatiivinen säätelijä tcdC. (Fortier ym. 2013, viitattu 7.3.2016.) Hypervirulentti kanta 027 sisältää tcdC-geenissä yhden emäksen deleetion, mikä johtaa monikertaiseen toksiinien tuottoon (Jalava ym. 2009, 246–247). Kuviossa 1 on havainnollistamisen helpottamiseksi piirroskuva, jossa tylppäpäiset viivat kuvaavat negatiivista vaikutusta ja nuolelliset viivat positiivista vaikutusta.



KUVIO 1 *C. difficile* n patogeenisuus alue eli PaLoc. Tehnyt Maijastiina Kontio.

Alukkeet monistavat emäsparin kohdesekvenssiä TcdA -geenin 5´ -alueella yhteensä 204 emäsparia. Konservatiivinen alue on yhteinen kaikille sytotoksisesti positiivisille kannoille A+/B+, sekä A-/B+ -kannoille, mutta negatiivisilla A-/B- kannoilla sitä ei ole. Spesifiset alukkeet monistavat myös binääritoksiinia, jota muodostaa vain hypervirulenteista kannoista. (Ylisiurua 2014; UTUlab 2013, viitattu 18.1.16.)

2.7 C. difficilen analyysimenetelmä Illumigene

Illumigenen *Clostridium difficile* on Meridian Bioscience, Inc:n menetelmä, joka perustuu LAMP- (loop-mediated isothermal amplification) eli silmukavälitteiseen isotermiseen monistustekniikkaan. Siinä DNA-monistus tapahtuu vakioämpötilassa. Menetelmä on nopea ja helppo. Laite on pieni ja helposti muunneltavissa jokaiseen laboratorioon. Laite ei tarvitse erillistä tietokonetta toimiakseen. (Meridian Bioscience Inc 2016, viitattu 20.4.2016.)

Menetelmässä tarvitaan kuutta erilaista aluketta monistukseen ja lopputuotteen pidennykseen. Alukkeet on suunniteltu sitoutumaan patogeenisuusalueelle (PaLoc), joka on sairautta aiheuttava alue. Kaikilla toksiinia tuottavilla *C. difficile* -kannoilla toksiini A ja toksiini B geenit sijaitsevat PaLoc:n konservatiivisella alueella. (Ylisiurua 2014).

Näytteiden esikäsittely on suositeltavaa tehdä laminaarikaapissa. Suorituksessa tulisi ottaa huomioon, että näytteiden esikäsittely sekä erittely tulisi tehdä eri tiloissa kuin monistus ja detektio. (Ylisiurua 2014.) Reaktio tapahtuu noin 60 minuutissa. IllumigenePro-10 laitteessa on kaksi blokkia, joihin kumpaankin mahtuu viisi näytettä kerrallaan. Menetelmä vaatii kuivan lämpöhauteen, joka lämpenee 95 celsiusasteeseen, IllumigenePro-10 -laitteen sekä vortex -sekoittajan.

DNA-monistuksen sivutuotteena syntyy magnesium-pyrofosfaattia. Tämä yhdiste muodostaa valkean saostuman saavuttaessaan kyllästymispisteen ja saostuu liuoksesta. Kyseinen saostuminen on merkki positiivisesta tuloksesta ja se mitataan turbidimetrillä. (Ylisiurua 2014.)

2.7.1 Silmukavälitteinen isoterminen monistus

LAMP (loop-mediated isothermal amplification) eli silmukavälitteinen isoterminen monistus on tehokas, tarkka ja nopea DNA:n monistusmenetelmä. LAMP-tekniikka eroaa PCR:sta erityisesti siinä, että LAMP ei vaadi lämmönvaihtelua reaktion suorittamiseen, joten DNA:ta voidaan monistaa yksinkertaisemmissa olosuhteissa. Reaktio voidaan suorittaa yhdessä putkessa, johon on lisätty neljää spesifistä aluketta, jotka tunnistavat kuusi spesifistä sekvenssiä kohde-DNA:sta. Reaktiosta syntyy sivutuotteena magnesiumpyrofosfaattia niin paljon, että varsinkin suurempia näytemääriä käsiteltäessä voidaan lopputulos havaita paljaalla silmällä. (Codony 2015, viitattu 20.4.2016.)

2.7.2 Herkkyys ja spesifisyys

Illumigene-menetelmä on käyttöönotettaessa validoitu mikrobiologian laboratorioon viljelymenetelmän avulla. Illumigene menetelmää käytettiin mikrobiologian laboratoriossa menetelmänä viiden vuoden ajan vuoden 2016 alkuun saakka.

Tärkeimpinä kriteereinä testiajoille pidettiin herkkyyttä ja spesifisyyttä, sekä uusittavien näytteiden määrää. Uusittavien näytteiden määrät sisältävät muun muassa liian suurista tai pienistä näytemääristä johtuvat ajot, joista ei olla saatu tulosta. Tällaisten tulosten määrän tulisi olla alle 10% kokonaistuloksista.

Mikrobiologian laboratorion valintakriteerit olivat näytteen analysointi-aika, käsityön määrä ja hinta.

Illumigene *C. difficile* on arvioitu vuonna 2010 neljässä itsenäisessä kliinisessä koepaikassa (test site), sekä valmistuttajan omassa testissä. Koepaikat sijaitsivat Yhdysvaltojen Eteläosissa sekä Keskilännessä. Tutkimuksen mukaan herkkyys on 95.2 %, spesifisyys 95.3 %, korrelaatio 95.3 % ja virheellisyys 2.9 %. (Meridian Bioscience Inc 2010, viitattu 20.4.2016.)

2.7.3 Menetelmän suoritus

Ulostetta otetaan näyteastiasta sen verran, että harja peittyy puoliksi näytteeseen. Harjan tikku katkaistaan erilliseen näyteputkeen. Näytettä sisältävää putkea sekoitetaan vortexioimalla 10 sekuntia. Näyteputkesta poistetaan ala korkki ja puristamalla siirretään 5-10 tippaa lämpöä kestäväan pienempään putkeen. Putkea lämmitetään 10 minuuttia 95 °C, jonka jälkeen putkea sekoitetaan 10 sekunnin ajan vortexilla. Lämmitettä näytettä otetaan 50 µl (mikrolitraa) eppendorf putkeen, jossa on reaktiopuskuria ja sekoitetaan 10 sekunnin ajan. Steriilejä, suodattimellisia pipetinkärkiä käyttäen siirretään 50 µl vierekkäisiin testikitteihin. Kitit suljetaan ja varmistetaan, etteivät ne sisällä ilmakuplia, jonka jälkeen ne asetetaan Illumipro-10- laitteeseen. (Meridian Bioscience Inc 2010, viitattu 20.4.2016.)

Tutkittavan näytteen tulee saapua mikrobiologian laitokselle kierrekorkillisessa muovipurkissa, tai tutkimusta ei voida suorittaa. Ulostenäyte olisi hyvä ottaa kahden vuorokauden sisällä ensioireista, sillä mikrobien määrä saattaa vähentyä huomattavasti sen jälkeen. Menetelmällä havaitaan toksiini A sekä toksiini B. Alle kaksivuotiaiden ulostenäytteiden tulokset eivät ole spesifisiä, koska *C. difficile* voi kuulua lasten suolistossa normaaliflooraan. (Ylisiurua 2014.) Jopa puolella vastasyntyneistä CDI kuuluu normaaliflooraan ensimmäisenä elinvuodem

aikana. *C. difficile*n kantajuus vähenee iän myötä jolloin yli 2 -vuotiaista ja aikuisista on kantajia enää noin 3 %. (Jousimies-Somer & Ristola 2010, 234.)

2.8 C. difficilen analyysimenetelmä GenomEra

GenomEra CDX on Abacus Diagnostican PCR-menetelmällä toimiva, infektiodiagnostiikkaan kohdennettu suljettu ja nopea testausmenetelmä. Suljetun systeemin vuoksi PCR-analytiikan kontaminaatoriski voidaan minimoida ja analyysit voidaan suorittaa myös ilman erillistä puhdistilaa. Teknologian taustalla on patentoitu testilastu, jossa on valmiiksi kuivattuna kaikki monistusreaktioon vaadittavat komponentit. (Triolab 2016, viitattu 20.4.2016.)

Analysaattori sisältää eri lämpötiloihin säädettyjä Peltier-elementtejä, joissa testilastuja kierrätetään (Triolab 2016, viitattu 20.4.2016). Peltier-elementin sisällä Peltier-efekti tuottaa sähkövirran avulla lämpötilaeroja kahden johtimen välillä. Vaihtovirran suunnasta riippuen Peltier-elementin avulla voidaan tuottaa sekä lämpöä että kylmää ilman mekaanisia muutoksia. (Meerstetter Engineering 2015, viitattu 20.4.2016.) Näin saadaan aikaan monistusreaktiolle tyypillisiä syklejä ilman perinteisiä kuumennus- ja jäähdytysvaiheita. Perinteinen PCR-menetelmällä tehty määrittäminen kestää noin 2-3 tuntia, kun taas GenomEralla CDX-menetelmällä tehty määrittäminen valmistuu alle tunnissa. GenomEra tunnistaa vain toksini B:tä koodaavan geenin. Analysaattori sinetöi testilastut niin, ettei monistettu tuote pääse lastun ulkopuolelle, mikä vähentää kontaminaatoriskiä. (Triolab 2016, viitattu 20.4.2016.) Analysaattoriin mahtuu neljä testilastua kerrallaan.

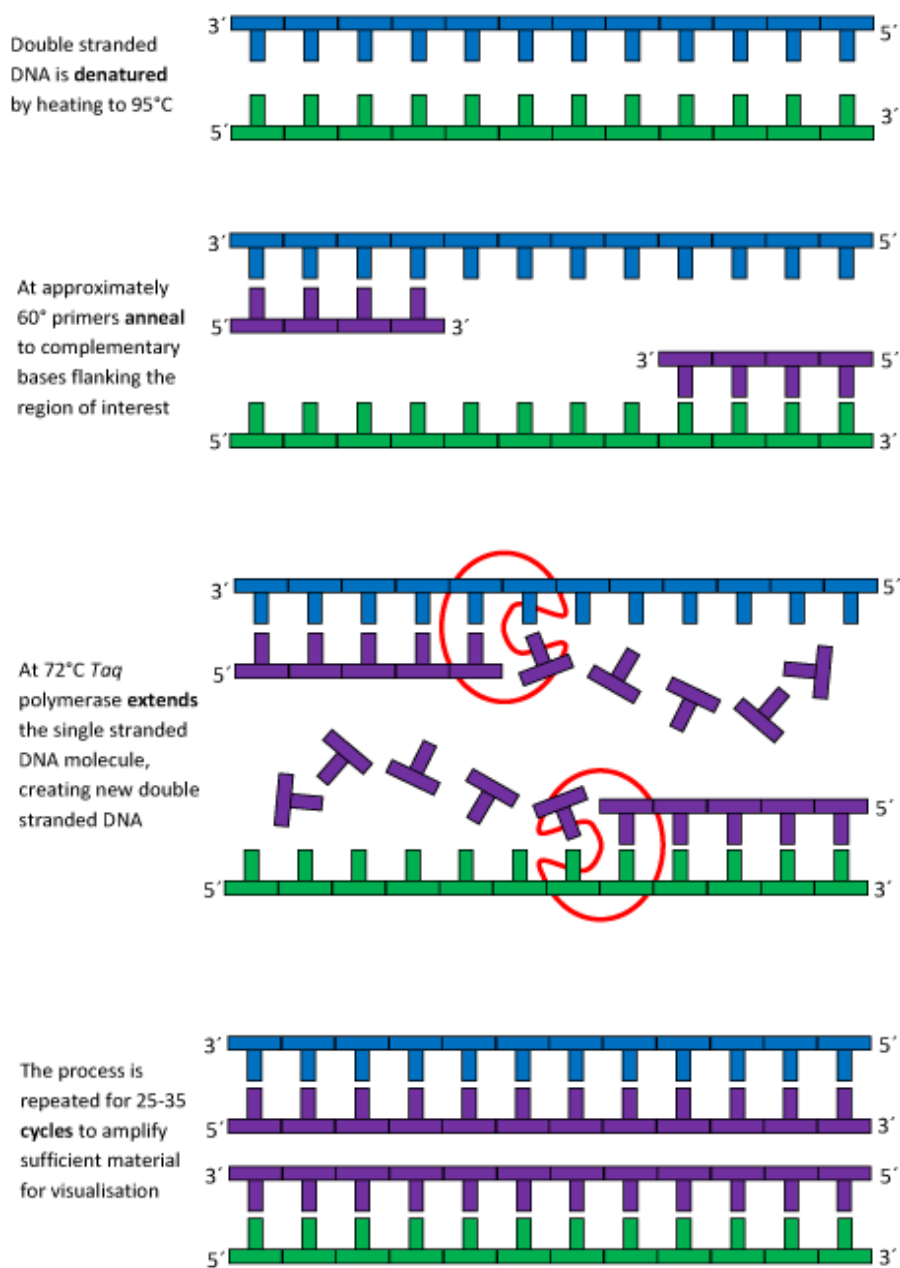
2.8.1 PCR

PCR (polymerase chain reaction) eli polymeerasiketjureaktio on menetelmä, jonka avulla pystytään monistamaan yksittäinen geeni tai DNA-fragmentti jopa

miljardikertaiseksi muutamassa tunnissa. Menetelmän on keksinyt Kary Mullis vuonna 1983. Nykyään siitä on monia eri versioita yleisesti käytössä lääketieteen sekä biologian laboratorioissa. (Suomen virtuaaliyliopisto, 2006. viitattu 20.3.2016.)

Polymeraasiketjureaktion lähtömateriaalina voi olla esimerkiksi kudosisäily, veri, maanäyte, sylki tai solut (Suominen ym. 2010, 153–155). Toimiakseen PCR menetelmä tarvitsee monistettavan DNA:n eli templaatti DNA:n, alukkeet, DNA-polymeraasin, nukleotideja eli dNTP:n, puskuriliuoksen sekä ioneja. (Suomen virtuaaliyliopisto, 2006. viitattu 20.3.2016.) Jotta alukkeet voisivat sitoutua monistettavaan DNA:han, tulee sen sekvenssi tuntea alueen reunoilta. Oligonukleotidit eli alukkeet ovat noin 15–40 emäksen mittaisia synteettisesti valmistettuja DNA-jaksoja. Alukkeet ovat komplementaarisia templaatti-DNA:lle. Polymeraasientsyymit ovat erittäin hyvin lämpöä kestäviä, niitä on useita ominaisuuksiltaan erilaisia. Optimiolosuhteet reaktiolle saadaan puskurilla, joka myös stabiloi polymeraasientsyymiä. Reaktiotarkkuuteen vaikuttaa reaktioliuoksen ioni-konsentraatio. (Suominen ym. 2010, 153–155, 162–164.) Kuviossa 2 on selkeyttävä piirroskuva reaktion kulusta.

Kolmivaiheinen reaktio alkaa denaturaatiovaiheesta, jossa lämpötila nousee 95 °C:een ja DNA:n kaksi juostetta irtoavat toisistaan. Lämpötila voi vaihdella riippuen käytetystä menetelmästä. Toisessa- eli annealing -vaiheessa lämpötila lasketaan alukkeista riippuen 55–72°C välille. Alukkeet kiinnittyvät lämpötilan laskiessa emäspariutumisen vaikutuksesta templaatti-DNA:n. Kolmannessa- eli ekstensio -vaiheessa lämpötila nostetaan noin 72 °C riippuen polymeraasientsyymistä. Tällöin DNA-polymeraasi syntetisoi uutta ketjua templaatti-DNA:n mallin mukaisesti liittämällä reaktioseoksessa olevia vapaita nukleotideja alukseen 5` päästä kohti 3`päästä. Tätä haluttua kolmivaiheista reaktiota toistetaan haluttu määrä. Yleisesti syklien enimmäismääränä pidetään 35:ttä sykliä. Epäspesifisen tuotteen syntymahdollisuus lisääntyy, jos sykliä toistetaan liian monta kertaa. (Suominen ym. 2010, 153–155, 162–164.)



KUVIO 2. Polymeerasiketjureaktio (East Midlands Forensic Pathology Unit 2016, viitattu 2.5.2016)

Monistamisen lisäksi PCR tekniikalla voidaan muuttaa DNA:ta suunnitelmallisesti. Mahdollisuuksia on monia ja yhtenä esimerkkinä on, että

DNA:han lisätään katkaisukohta restriktioentsyymille. (Suomen virtuaaliyliopisto, 2006. viitattu 20.3.2016.)

2.8.2 Herkkyys ja spesifisyys

Valmistaja on arvioinut menetelmän kliinisen käytön suorituskyvyn kahdessa suomalaisessa ja yhdessä hollantilaisessa laboratoriossa. Menetelmää vertailtiin laboratorioissa käytössä oleviin tunnistusmenetelmiin. Säilömättömiä ulostenäytteitä oli 322 kappaletta (65 tuoretta, 257 kertaalleen pakastettua). Testausmenetelmän herkkyys säilöntäaineettomille näytteille oli 99,0 %, spesifisyys 99,1 %, korrelaatio 99,1 % ja virheellisyys 1,2 %. (Abacus Diagnostica 2016, viitattu 20.4.2016.) GenomEran kliininen suorituskyky yhteistyölaboratoriomme saamien tulosten mukaan on kuvattu taulukossa 2

Vaasan keskussairaalassa tehtiin tutkimus, jossa kerättiin 310 löysää ulostenäytettä sairaalan potilailta elo-syyskuussa 2012. Potilaiden keski-ikä oli 72 vuotta, potilaiden iän vaihdellessa seitsemästä 95 vuoteen. Näytteet tutkittiin viljelymenetelmällä ja ne jäädytettiin -70 asteeseen. Lajit tunnistettiin viljellyistä API 20A, API 20E ja RapiD ANA – menetelmillä. Tunnistettujen lajien kannat määritettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen mikrobiologian yksikössä. Näistä näytteistä valittiin 33 tunnettua *C. difficile* positiivista näytettä, 15 *C. difficile* negatiivista näytettä ja 18 muita klostrideja sisältäviä tai klostridinegatiivisia näytteitä, jotka tutkittiin GenomEra-menetelmällä. Pakastetut näytteet tutkittiin GenomEran lisäksi myös GeneXpert PCR-menetelmällä sekä viljelemällä näytteet CCEY-maljalle ja inkuboimalla anaerobisesti 48 tuntia 38 °C. GenomEran herkkyudeksi laskettiin 98,8 % ja spesifisyydeksi 99,6 %. GenomEra-menetelmällä havaitaan vain toksini B:tä koodaava geeni, jonka on todettu olevan toksini A:n geeniä parempi kohde seulottaessa *Clostridium difficile* -infektioita. (Hirvonen ym. 2013, 3-5, 8)

2.8.3 Menetelmän suoritus

Analysointikitti sisältää puskuriliuosta, Z-putken, testilastuja ja 1 µl viljelysauvan. Ulostenäytettä annostellaan viljelysauvalla puskuriliuokseen, josta siirretään viljelysauvalla 1 µl näytettä Z-putkeen. Z-putkea sekoitetaan viisi minuuttia vortexilla, jotta solut rikkoutuvat. Liuoksesta pipetoidaan 35 µl suspensiota testilastulle, jonka jälkeen lastu ja lastuteline suljetaan huolellisesti. Lastuteline siirretään analysaattoriin ja analysointi voidaan aloittaa. (Abacus Diagnostica 2016, viitattu 20.4.2016.)

3 Validointiprosessi ja tulokset

Validointi tarkoittaa menettelyä, jolla osoitetaan tietyn analyysimenetelmän soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Validointi suoritetaan ennalta suunniteltujen mittausten avulla ja mittauksista saatuja tuloksia hyödynnetään muun olemassa olevan tiedon ja tausta-aineiston kanssa, jotta voidaan määrittää menetelmän luotettavuus. Validoinnista tehdään raportti, johon kirjataan laitteen suorituskykyä mittaavat parametrit, miten nämä tulokset on saatu sekä menetelmän laatuvaatimukset. Validointiraportin pohjalta luodaan menetelmäohje, jossa kuvataan menetelmän suoritus ja muut ohjeet analyysin tekijälle. (Jaarinen & Niiranen 2008, 11, 14-15)

Validointi tehdään, kun on tarpeellista todentaa analyysimenetelmän riittävä suorituskyky esimerkiksi kehitettäessä uutta menetelmää tiettyyn tarkoitukseen tai jos käytössä olevaa menetelmää uudistetaan. Validoinnin laajuus riippuu siitä, millaisia muutoksia menetelmään tehdään. Vaikka menetelmä on validoitu kansainvälisesti käyttöön sopivaksi, tulee sen käyttökelpoisuus vielä tarkistaa käyttölaboratoriossa. (Metrologian neuvottelukunta & Ehder, T. 2005, 25-26)

Mikrobiologian laboratorion *C. difficile* analyysimenetelmän vaihto Illumigenestä GenomEraan on suoritettu kesällä 2015. Menetelmän vaihto tuli ajankohtaiseksi, koska markkinoille oli tullut uusia vaihtoehtoja. Testiajot suoritettiin laboratorion sairaalamikrobiologi touko-kesäkuussa 2015. Näytteet, joita oli 147 kappaletta, tutkittiin käytössä olevan Illumigenen lisäksi kahdella muulla analyysimenetelmällä (GenomEra ja GenREAD). Näistä GenomEra valittiin uudeksi menetelmäksi. Emme ole laskeneet GenREADin suorituskykyä, mutta arvioimme saamistamme tuloksista, että se oli hyvin lähellä GenomEran suorituskykyä. Mikrobiologinen laboratorio teki valinnan GenomEran ja GenREADin välillä hinnan, ajoajan, käsityömäärän ja tietenkin spesifisyyden ja herkkyyden vaikuttaessa asiaan. Valitsimme näkökulmaksi verrata uutta

menetelmää käytössä olevaan, sillä se on aikanaan spesifioitu käyttöön vertaamalla sitä luotettavana pidettyyn viljelymenetelmään.

Taulukosta 1 nähdään, että GenomEralla todettiin 59 positiivista tulosta, 85 negatiivista tulosta ja kolme väärää negatiivista tulosta. Vääriä positiivisia tuloksia ei ollut. Yhteensä näytteitä oli 147, joista 62 positiivista ja 85 negatiivista.

TAULUKKO 1 Näytemäärät ja tulokset

	Illumigene	GenomEra
Positiivinen	62	59
Negatiivinen	85	85
Väärä negatiivinen	-	3
Väärä positiivinen	-	-
Näytemäärä yht	147	147

Tuloksissa on huomioitu vääriksi tuloksiksi vain tulokset, jotka ovat lopullisesti väärin, eli tulos ei muuttunut uusinta-ajossa. Jos testi on jostain syystä uusittu, ja tulos on sitten vastannut vanhalla menetelmällä saatua tulosta, olemme sen tässä taulukossa laskeneet oikeaksi tulokseksi. GenomEran näytemäärä on hyvin tarkka (1µl), väärä näytemäärä aiheuttaa virheilmoituksen. Nämä testit kuitenkin uusitaan aina, joten emme laskeneet niitä vääriksi tuloksiksi. Uusittuja näytteitä oli 12 kappaletta.

GenomEran (ML) suorituskyvyn tulokset on laskettu taulukkoon 2 taulukon 1 lukujen mukaisesti. GenomEran valmistajan lupaama suorituskyky on kuvattu taulukossa 2 keskellä. Illumigenen tulokset (Taulukko 2 oikea reuna) on otettu suoraan käyttöoppaasta, eli ne kuvaavat valmistajan lupaamaa suorituskykyä.

TAULUKKO 2 Kliinisen suorituskyvyn tulokset

	GenomEra ML (%) Näytteitä 147 kpl	GenomEra Valmistaja (%) Näytteitä 322 kpl	Illumigene (%) Näytteitä 697 kpl
Herkkyys	95.2	99.0	95.2
Spesifisyys	100	99.1	95.3
Korrelaatio	98.0	99.1	95.3
Virheellisyys	0	1.2	2.9

Herkkyys on laskettu jakamalla GenomEralla saatujen positiivisten tulosten määrä Illumigenella saatujen positiivisten määrällä. Herkkyys eli sensitiivisyys kuvaa siis todennäköisyyttä, jolla sairas todetaan sairaaksi. Spesifisyys on saatu jakamalla GenomEralla saatujen negatiivisten tulosten määrä Illumigenella saatujen negatiivisten tulosten määrällä. Spesifisyys eli tarkkuus kuvaa todennäköisyyttä, jolla terve todetaan terveeksi. (Labquality 2016, viitattu 2.9.2016)

Korrelaatio on laskettu vähentämällä kokonaisnäytemäärästä väärin negatiivisten (ja väärin positiivisten, jos tällaisia esiintyisi) tulosten määrä ja jakamalla tämä luku kokonaisnäytemäärällä. Toisin sanoen GenomEralla saatujen (Illumigenellä) oikeaksi todistettujen tulosten määrä on jaettu Illumigenella saatujen tulosten määrällä eli kokonaisnäytemäärällä. Korrelaatio tarkoittaa kahden suureen, tässä tapauksessa tuloksen, riippuvuutta toisistaan (Creative Research Systems 2016, viitattu 2.9.2016).

Virheellisyys on laskettu jakamalla virheellisten tulosten määrä kokonaisnäytemäärällä. Ongelmaksi muodostuu se, että tässä

kokonaisnäytemäärässä ei ollut virheelliseksi tulkittavia tuloksia. Myös väärien negatiivisten osuus oli niin pieni, että tulokset eivät ole yleistettävissä laajemmin.

Tulosten positiivinen ennustearvo on 100 % ja negatiivinen ennustearvo 96,6 %. Positiivinen ennustearvo kuvaa sitä, millä todennäköisyydellä positiivisen tuloksen saanut potilas on sairas. Negatiivinen ennustearvo kuvaa sitä, millä todennäköisyydellä negatiivisen tuloksen saanut potilas on terve. (Labquality 2016, viitattu 2.9.2016)

Menetelmien käytettävyyden vertailua

GenomEran näytemäärät ovat todella pieniä, analysointiin tarvittava näytemäärän on oltava tarkalleen 1 mikrolitraa, kun taas Illumigenellä määrä on häilyvä ”puolikas harjallinen”. Pipetointimäärät ovat Illumigenessa isompia ja helpommin hallittavia. GenomErassa työvaiheita on huomattavasti vähemmän kuin Illumigenessä. GenomEra vaatii enemmän totuttelua ja harjoittelua, juurikin pienen näytemäärän takia. GenomEran analysaattori huomauttaa helposti jos näytettä on liian vähän tai liian paljon. Tällöin kone antaa virheilmoituksen PCR-inhibitio, määrittelemätön, määrittely epäonnistunut tai kaikki määrittelyt epäonnistuneet jolloin näyte on laimennettava 1:10 ja analyysi uusittava.

PCR-inhibitio -tulos johtuu liiallisesta näytemäärästä, jolloin ulosteen sisältämät inhiboivat yhdisteet häiritsevät monistumista. Analysointi suositellaan uusittavan laimennetusta näytteestä. Määrittelemätön (Borderline) tulos merkitsee sitä, että kohdesekvenssin esiintymistä näytteessä ei ole voitu luotettavasti osoittaa ja tulos on määrittelemätön. Tällaisessa tapauksessa analysointi suositellaan suorittamaan 2 μ l näytemäärällä. Määrittely epäonnistunut (Assay failed) tarkoittaa, että näyte ei ole yhteensopiva määrittelyksen kanssa. Näytettä voi olla liikaa tai sitä ei ole lainkaan. Samea näyte suositellaan laimentamaan ennen uudelleenanalysointia. Kaikki määrittelyt epäonnistuneet (Run failed) tarkoittaa järjestelmän toimintahäiriötä, jossa koko määrittely on epäonnistunut ja tuloksia ei

ole saatavilla. Tämä virheilmoitus on erittäin harvinainen ja se ei johdu käytettävistä näytteistä. (Abacus Diagnostica 2016, viitattu 2.9.2016)

Illumigene vaatii työntekijältä huomattavasti enemmän työvaiheita, sekä pipetointikertoja, jolloin virheiden tekemisen mahdollisuus suurenee GenomEraan verrattuna. Illumigenen työvaiheisiin kuuluu enemmän korkkien avaamista ja näytteen siirtämistä putkesta toiseen. GenomErassa näyte pipetoidaan eppendorff -putkesta testilastun kaivoon, jonka jälkeen testilastu suljetaan ja laitetaan analysaattoriin. Testilastun pieneen reikään pipetointi vaatii usein harjoittelua, sillä kaivoon ei saa päästä ilmakuplaa. Näin ollen GenomEra on työntekijälle miellyttävämpi menetelmä.

4 Pohdinta

GenomEran ja Illumigenen herkkyys, spesifisyys, korrelaatio ja virheellisyys eivät ole täysin verrattavissa keskenään. GenomEran tulosten laskennassa on käytetty vain 147 näytteen tulosta kun Illumigenen tulokset ovat suoraan valmistajan käyttöoppaasta, jossa tulosten laskentaan on käytetty tietoja noin 700 näytteestä. GenomEran valmistajan antamat kliinisen suorituskyvyn arvot ovat kuitenkin luettavissa GenomEran käyttöoppaasta sekä tämän raportin kappaleessa GenomEra. Emme saaneet käyttööme mikrobiologian laboratorion alkuperäisiä viljelytuloksia, joiden avulla Illumigene on aikanaan validoitu. Tulokset ovat kuitenkin hyviä, ja menetelmä ei vaihtunut tulosten perusteella huonompaan. Vaihdoksen syinä olivat menetelmän vanheneminen ja sen muuttaminen uuteen

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia mikrobiologian laboratorion *Clostridium difficile* analyysimenetelmiä. Tutkimme käytöstä poistuvaa Illumigene- sekä käyttöön otettavaa GenomEra -menetelmää. Menetelmänvaihdos suoritettiin, koska Illumigenen menetelmä vanheni. Validoidun kliinisen laboratorion menetelmät tulee tarkistaa käyttöön sopiviksi tietyin väliajoin. Samalla tulee selvittää, onko tarpeisiin sopivampaa menetelmää saapunut markkinoille.

Tavoitteenamme oli selvittää, kumpi menetelmistä on toimivampi ja miten menetelmän vaihdos suoritetaan kliinisessä laboratoriossa. Tutkimme analyysien tulokset 147 näytteestä, jotka oli analysoitu Illumigenen ja GenomEran lisäksi GenREAD -analyysimenetelmällä. Nämä kesä-elokuussa 2015 kootut tulokset saimme mikrobiologian laboratorion sairaalamikrobiologilta.

Yleisesti ottaen opinnäytetyöprosessi sujui hyvin. Opinnäytetyö oppimisprosessina lisäsi tietouttamme mikrobiologiasta sekä mikrobiologian

laboratorion menetelmävaihdosprosessista. Yhteistyö mikrobiologian laboratorion kanssa onnistui hyvin.

Saimme opiskelijoina todella paljon arvokasta tietoa ja kokemusta mikrobiologian laboratorion analyysimenetelmien vertailusta. Opinnäytetyön tekemisen kautta saimme ammatillista varmuutta mikrobiologian alalle.

LÄHTEET

Abacus Diagnostica. 2016. *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* CE IVD. Abacus Diagnostica. Viitattu 20.4.2016, <http://www.abacusdiagnostica.com/clostridium.html>.

Arkkila, P., Mattila, E. & Anttila, V. 2013. Ulosteesiirto *Clostridium difficile* -infektion hoitona. Helsinki: Duodecim. (16), 1671–1679.

Bartlett, J. G. & Gerding, D. N. 2008. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 46 Suppl 1, 15.

Codony, F. 2013. Loop-mediated Isothermal Amplification. Bitesize Bio. Viitattu 20.4.2016, <http://bitesizebio.com/23129/loop-mediated-isothermal-amplification/>

Collins, D. A., Hawkey, P. M. & Riley, T. V. 2013. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. Antimicrobial resistance and infection control, 2013, 2 (1), 1.

Creative Research Systems. 2016. Correlation. Viitattu 2.9.2016, <http://www.surveysystem.com/correlation.htm>

East Midlands Forensic Pathology Unit. Illustration of the PCR process. 2016. University of Leicester, UK. Viitattu 2.5.2016.

Elomaa, N. 2007. Käytännön toimet osastolla - *Clostridium difficile*. Suomen sairaalahygienialehti 25 (3), 119, 121.

Fortier, L. & Sekulovic, O. 2013. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 2013, 4 (5), 354–65. Viitattu 7.3.2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23611873>

Hirvonen, J. J., Mentula, S. & Kaukoranta, S. 2013. Evaluation of a new automated homogeneous PCR assay, GenomEra *C. difficile*, for rapid detection of Toxigenic *Clostridium difficile* in fecal specimens. *Journal of clinical microbiology*, 2013 51 (9), 3-5, 8.

Honda, H., Yamazaki, A., Sato, Y. & Dubberke, E. R. *Anaerobe*, 2014, Vol.25, pp.5-10. Incidence and mortality associated with *Clostridium difficile* infection at a Japanese tertiary care center. Viitattu 20.4.2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184291>

Jaakola, S. (2015). *Tartuntataudit Suomessa 2014*. Helsinki: Terveystieteiden tutkimuskeskus ja Hyvinvoinnin laitos

Jaarinen, S & Niiranen, J. 2008. *Laboratorion analyysitekniikka*. 5.-6. painos. Helsinki: Edita, 11, 14-15)

Jalava, J., Eerola, E., Lindholm, L., Meurman, O. & Virolainen-Julkunen, A. 2009. *Clostridium difficile*en toteaminen ja kantojen tyypitys. *Moodi* 5/2009, 246–248.

Jousimies-Somer, H. & Ristola, M. 2003. *Clostridium-lajit*. *Clostridium-lajit. Mikrobiologia ja infektiosairaudet*. Kirja 1. Helsinki: Duodecim, 234–236.

Kanta-Hämeen keskussairaala Kosketuseristys K-HKS:ssa. 2016. Viitattu 20.4.2016, <http://www.khshp.fi/img/file.php?id=385>

Kuehne, S. A., Collery, M. M., Kelly, M. L., Cartman, S. T., Cockayne, A. & Minton, N. P. 2014. Importance of Toxin A, Toxin B, and CDT in Virulence of an Epidemic *Clostridium difficile* Strain. *Journal of Infectious Diseases* 209 (1), 83,86.

Labquality. 2016. Taulukko 6. Kvalitatiivisten analyysien yleisimmät suorituskykyominaisuudet. Viitattu 2.9.2016, <http://www.labquality.org/LQ/pdf.aspx?dir=3&path=Vieritestaus/Korjaus1.pdf>

Lab Tests Online. 2014. *Clostridium difficile* and *C. difficile* Toxin Testing. American Association for Clinical Chemistry. Viitattu 28.4.2016, <https://labtestsonline.org/understanding/analytes/cdiff/tab/test/>

Lessa, F. C., Mu, Y., Bamberg, W. M., Beldavs, Z. G., Dumyati, G. K., Dunn, J. R., Farley, M. M., Holzbauer, S. M., Meek, J. I., Phipps, E. C., Wilson, L. E., Winston, L. G., Cohen, J. A., Limbago, B. M., Fridkin, S. K., Gerding, D. N. & Mcdonald, L. C. Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 26 February 2015, 372 (9), 825–834. Viitattu 20.4.2016, <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1408913>

Linko, S., Komppa, V., KRP, & Rikostekninen laboratorio. 1997. Analyyttisen ja kliinisen kemian laadunvarmistussanasto. Helsinki: Eurachem-Suomi : KRP, rikostekninen laboratorio.

Lumio, J. 2014. *Clostridium difficile* -bakteerin aiheuttama ripuli (antibioottiripuli). Helsinki: Duodecim. Viitattu 20.4.2016, http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00806

Mayo Clinic. 2013. Diseases and Conditions - *C. difficile* infection: Treatments and drugs. Mayo Foundation for Medical Education and Research. Viitattu 20.4.2016, <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/c-difficile/basics/treatment/con-20029664>.

Meerstetter Engineering. 2015. Peltier Elements: How does a Peltier Element Work? Rubigen, Switzerland: Meerstetter Engineering GmbH. Viitattu 20.4.2016, <http://www.meerstetter.ch/compendium/peltier-elements>.

Mentula, S. 2013. *Clostridium difficile* diagnostiikka, Labquality neuvottelukokous 2.11.2012. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos bakteriologia, 6, 13–14, 16.

Mentula, S. 2016. *Clostridium difficile* ribotyypitys. Erikoistutkija, Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Sähköpostiviesti 26.7.2016.

Meridian Bioscience Inc. 2010. Illumipro-10 esite. Meridian Bioscience Inc. Viitattu 20.4.2016, <http://www.meridianbioscience.com/Content/Assets/Files/Group%20B%20Strep/illumipro.pdf>

Metrologian neuvottelukunta., & Ehder, T. 2005. *Kemian metrologian opas*. Helsinki: Mittatekniikan keskus, 25-26.

Openmichigan. 2010. Enzyme immunoassay (EIA) to detect antigens - Multi-Lingual Captions. Video. Viitattu 2.5.2016. https://www.youtube.com/watch?v=70TPrL_8-M

Public Health England. 2014. *C. difficile* infections: quarterly counts by acute trust and CCG, and financial year counts and rates by acute trust and CCG, up to financial year 2014 to 2015. Gov.uk. Viitattu 20.4.2016, <https://www.gov.uk/government/statistics/clostridium-difficile-infection-annual-data>

Public Health Agency of Canada. 2016. The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program; *Clostridium difficile* Associated Disease (CDAD)

Surveillance. Public Health Agency of Canada. Viitattu 20.4.2016, <http://www.phac-aspc.gc.ca/nois-sinp/projects/cdad-eng.php>

Sanofi Pasteur. 2013. Tell me more about the CDiffense Study. Viitattu 20.4.2016, <http://www.cdifffense.org/node/9#>.

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu, 153–155, 162–164.

Suomen virtuaaliyliopisto, 2006. Nukleiinihappojen monistus. Viitattu 20.3.2016, http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_monistaminen/2/

Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. 2015a. *Clostridium difficile*. Viitattu 19.4.2016, <https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/clostridium-difficile>.

Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. 2015b. *Clostridium difficile* löydökset 2014. Viitattu 19.4.2016, <https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/seuranta-ja-epidemiat/tartuntatautirekisteri/tartuntataudit-suomessa-vuosiraportit/tautien-esiintyvyyys-2014/clostridium-difficile-esiintyvyyys-2014>.

Triolab. GenomEra CDX -PCR-testit (Abacus). Turku: Triolab. Viitattu 20.4.2016, <http://www.triolab.fi/genomera-cdx-pcr-testit>

Turun yliopisto. 2013. UTUlab: CLOSTRIDIUM DIFFICILE GENOTYYPITYS. Viitattu 18.1.2016, <https://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/utulab/ohjekirja/Documents/Ohjekirja%20pdf/mikrobiologia/CLOSTRIDIUM%20DIFFICILE%20GENOTYYPITYS.pdf>

Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiri. 2014. Vaarallista *Clostridium difficile* – sairaalabakteeria vastaan kehitetään suojaavaa rokotetta myös Turussa. Viitattu

8.10.2015, <http://www.vsshp.fi/fi/sairaanhoitopiiri/media-tiedotteet-viestinta/tiedotteet/Sivut/Vaarallista-Clostridium-difficile-%E2%80%93sairaalabakteeria-vastaa-kehitet%C3%A4%C3%A4n-suojaavaa-rokotetta-my%C3%B6s-Turussa.aspx>.

Weston, D. 2008. Infection prevention and control: theory and clinical practice for healthcare professionals. Chichester England: John Wiley & Sons. 159–161

Weston, D. 2013. Fundamentals: Fundamentals of Infection Prevention and Control: Theory and Practice (2nd Edition). Somerset, NJ, USA: John Wiley & Sons. 325.

Ylisiurua, P. 2014. F- *Clostridium difficile*, toksiinigeeni, nukleinihappo (kval) menetelmätyöohje.

Ylisiurua, P. 2015. *Clostridium difficile* -diagnoosiikka. Moodi, 39, (4-5), 138–139.