



CLOSTRIDIUM DIFFICILEN
TOKSIINIGEENIEN OSOITUKSEEN
KÄYTETTÄVÄN XPERT®
C. DIFFICILE -TESTIN VALIDOINTI

Marjut Jokinen
Paula Körmöläinen

Opinnäytetyö
Lokakuu 2012
Bioanalytiikan
koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

MARJUT JOKINEN & PAULA KÖRMÖLÄINEN:

Clostridium difficilen toksinigeenien osoitukseen käytettävän Xpert® *C.difficile* -testin validointi

Opinnäytetyö 43 sivua, josta liitteitä 2 sivua
Lokakuu 2012

Opinnäytetyön aihe saatiin Päijät-Hämeen sosiaali- ja terveysyhtymän klinisen mikrobiologian laboratoriosta, jonne haluttiin sensitiivisempi ja nopeampi menetelmä *Clostridium difficile* -infektion diagnostiikkaan. Tarkoituksena oli analysoida ulostenäytteitä Xpert® *C. difficile* -testillä ja tutkia sen soveltuvuutta *C. difficile* -diagnoosiin. Xpert® *C. difficile* -testillä saatuja tuloksia verrattiin Immunocard® Toxins A&B -testillä sekä ulosteviljelyllä saatuihin tuloksiin. Tehtävinä oli selvittää eroaako Xpert® *C. difficile* -testin sensitiivisyys ja spesifisyys Immunocard® Toxins A&B -testistä ja nopeuttaako Xpert® *C. difficile* -testi *Clostridium difficile* -infektion diagnosointia.

Kokeellisessa osiossa analysoitiin 45 ulostenäytettä, joista viljelypositiivisia oli 13 ja viljelynegatiivisia 32 näytettä. Xpert® *C. difficile* -testi tunnisti viljelypositiivisista ulostenäytteistä 12 sekä 31 viljelynegatiivista näytettä. Lisäksi testillä saatiin yksi väärä negatiivinen ja yksi väärä positiivinen tulos. Xpert® *C. difficile* -testin sensitiivisyydeksi saatiin 92% ja spesifisyydeksi 97%. Immunocard® Toxins A&B -testi tunnisti kaikki viljelynegatiiviset näytteet. Testi antoi viisi väärää negatiivista tulosta, mutta ei yhtään väärää positiivista tulosta. Sen sensitiivisyydeksi saatiin 62% ja spesifisyydeksi 100%.

Xpert® *C. difficile* -testi osoittautui huomattavasti sensitiivisemmäksi kuin Immunocard® Toxins A&B -testi. Spesifisyyksissä ei testien välillä ollut suurta eroa. Xpert® *C. difficile* -testin suoritus oli yksinkertaisempi ja nopeampi kuin Immunocard® Toxins A&B -testin. Paremman sensitiivisyytensä ansiosta Xpert® *C. difficile* -testi nopeuttaisi *C. difficile* -infektion diagnostiikkaa. Xpert® *C. difficile* -menetelmä on kuitenkin selvästi kalliimpi kuin Immunocard® Toxins A&B -menetelmä.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

MARJUT JOKINEN & PAULA KÖRMÖLÄINEN:
Validation of a quantitative PCR-assay Xpert® *C. difficile*

Bachelor's thesis 43 pages, appendices 2 pages
October 2012

Clostridium difficile is an anaerobic spore-forming bacterium. It is the most common cause of nosocomial diarrhoea in Europe and North America. The diagnosis of *clostridium difficile* infection (CDI) is based on the clinical symptoms of the patient and the isolation of *C. difficile* or its toxins from faeces. The objective of this study was to validate a new PCR-assay used for the diagnosis of CDI called Xpert® *C. difficile*.

The study was carried out by analysing 45 faecal samples with Xpert® *C. difficile*. These samples had already been analysed by using the Immunocard® Toxins A&B assay. Bacterial culture of the faecal samples was used as a reference method. The data were analysed by calculating the sensitivities and specificities of Xpert® *C. difficile* and Immunocard® Toxins A&B and the results were compared to each other.

The study showed that Xpert® *C. difficile* is a far more sensitive method than the Immunocard® Toxins A&B. The specificities of the two tests showed no significant differences. In conclusion, using Xpert® *C. difficile* would expedite the diagnostics of CDI.

Key words: *clostridium difficile*, CDI, nosocomial diarrhoea

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO.....	5
2	CLOSTRIDIUM DIFFICILE.....	6
2.1	<i>Clostridium difficile</i> en patogeneesi	6
2.2	<i>Clostridium difficile</i> -infektio	7
2.3	Hypervirulentti <i>Clostridium difficile</i> 027-kanta	8
2.4	<i>Clostridium difficile</i> -infektion hoitomuodot.....	9
2.5	Uusiutunut <i>Clostridium difficile</i> -infektio ja sen hoito	10
3	CLOSTRIDIUM DIFFICILE -INFEKTION DIAGNOSTIIKKA	12
3.1	Viljely	12
3.2	Toksiiniosoitus EIA-menetelmällä	13
3.3	Toksiinigeenien osoitus reaaliaikaisella PCR -menetelmällä.....	13
3.4	<i>Clostridium difficile</i> -diagnostiikka Päijät-Hämeen sosiaali- ja terveysyhtymässä.....	14
4	XPRT® C. DIFFICILE-TESTI.....	17
4.1	GeneXpert -analysaattorin käyttö <i>Clostridium difficile</i> -diagnostiikassa	17
4.2	Testin periaate.....	18
4.3	Laadunvarmistus.....	19
4.4	Testin tulosvaihtoehdot.....	20
4.5	Hylätyn testin uusiminen	21
5	VALIDOINTI.....	22
6	AIKAISEMMA TUTKIMUKSET	23
7	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	25
8	TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄ.....	28
9	XPRT® C. DIFFICILE -TESTIN KOESTUS PÄIJÄT-HÄMEEN SOSIAALI- JA TERVEYSYHTYMÄSSÄ	29
9.1	Näyttemateriaali ja sen käsittely	29
9.2	Xpert® C. difficile -testin suoritus	30
9.3	Tulosten käsittely	31
10	TULOKSET	33
11	POHDINTA.....	35
	LÄHTEET.....	38
	LIITTEET	42

1 JOHDANTO

Clostridium difficile on anaerobinen itiöitä muodostava bakteeri, jonka merkittävä virulenssitekijä on toksiinien tuottaminen. Sitä löydetään suurelta osalta vastasyntyneistä mutta terveiltä aikuisilta enää muutamalta prosentilta. Toksiineja tuottava *C. difficile* on yleisin antibioottihoitoon liittyvän ripulin sekä sairaalaperäisen ripulin aiheuttaja. Viime vuosina sen aiheuttamien infektioiden määrä on lisääntynyt, taudinkuva vaikeutunut ja kuolleisuus lisääntynyt etenkin iäkkäillä potilailla.

C. difficile -infektioiden rajoittamisessa ja ehkäisyssä sekä kantojen tunnistamisessa nopea ja luotettava laboratoriodiagnostiikka on tärkeässä asemassa. Mikrobiologinen diagnoosi perustuu yleensä bakteerin viljelyyn ja toksiinien osoitukseen. Näiden menetelmien rinnalle on kehitetty toksinigeenien osoittamiseen perustuvia testejä, jotka pohjautuvat PCR-menetelmään.

Opinnäytetyömme aiheena on *Clostridium difficile* toksinigeenien osoitukseen käytettävän PCR-testin validointi. Toimeksiantaja on Päijät-Hämeen sosiaali- ja terveysyhtymän kliinisen mikrobiologian yksikkö, jossa toksineja tuottavat kannat tunnistetaan tällä hetkellä entsyymi-immunologiaan perustuvalla Immunocard® Toxins A&B -pikatestillä (Meridian Bioscience Inc.) sekä viljelyllä selektiiviselle elatusaineelle. Kyseisen pikatestin sensitiivisyydessä on ilmaantunut puutteita, joten toimeksiantaja on kiinnostunut löytämään sensitiivisemmän menetelmän *Clostridium difficile* -infektion diagnosointiin.

Työmme tarkoituksena on selvittää soveltuuko Cepheidin valmistama Xpert® *C. difficile* PCR-testi *C. difficile* -diagnostiikkaan ja tavoitteena on Xpert® *C. difficile* PCR-testin validointi. Analysoimme viisikymmentä ulostenäytettä uudella Xpert® PCR-testillä, ja vertaamme tuloksia Immunocard® Toxins A&B -testillä sekä ulosteviljelyllä saatuihin tuloksiin. Tarkoituksenamme on laskea saatujen tulosten avulla molemmille menetelmille sensitiivisyydet, spesifisyydet sekä positiivinen ja negatiivinen ennustearvo ja vertailla niitä.

2 CLOSTRIDIUM DIFFICILE

2.1 *Clostridium difficile* patogeenesi

Clostridium-suku koostuu suurimmaksi osaksi anaerobisista gram-positiivisista sauvoista, mutta sisältää myös fakultatiivisia anaerobisia lajeja. Suvusta on tunnistettu tällä hetkellä noin 200 lajia, joista kuitenkin vain muutama kymmenen on kliinisesti merkittäviä. *Clostridium*-lajeja löytyy laajalti luonnosta, koska ne kykenevät muodostamaan lepoitiöitä eli endosporeja. Clostrideja esiintyy myös suoliston normaalifloorassa. (Stevens, Bryant, Berger & Eichel-Streiber 2011, 834-835).

Clostridium difficile on anaerobinen gram-positiivinen sauvabakteeri, jonka yhteys antibioottilhoidon aiheuttamaan ripuliin huomattiin 1970-luvulla (Dawson, Valiente & Wren 2009, 1410; Kuipers & Surawicz 2009, 1486). On arvioitu että noin 30% vastasyntyneistä ja 3-5% terveestä aikuisväestöstä kantavat *C. difficileä* osana suolistonsa normaaliflooraa. Pelkkä kolonisaatio ei siis aiheuta tautia, vaan ihminen voi olla myös oireeton *C. difficile* kantaja. (Stevens ym. 2011, 838.) Vastasyntyneillä ei ole vielä kehittynyt suolen seinämään reseptoreita, joihin toksiinit tarttuvat, mikä suojelee heitä taudilta (Leffler & Lamont 2012, 97).

Virulentit *C. difficile* -kannat tuottavat primaaritoksiineja, joita ovat A-toksiini eli enterotoksiini sekä B-toksiini eli sytotoksiini. Nämä aiheuttavat merkittävimmät kliiniset oireet infektion aikana, kuten paksusuolen limakalvojen tulehduksen. Aiemmin luultiin näiden toksiinien yhteisvaikutuksen aiheuttavan taudin, mutta on huomattu että toksiini-B pystyy myös yksinään aiheuttamaan oireet. Toksiineja koodaavat geenit sijaitsevat *C. difficile* genomissa niin kutsutulla PaLoc-alueella, joka on herkkä mutaatioille. Tämän seurauksena on syntynyt muun muassa hypervirulentti *Clostridium difficile* -kanta (PCR-ribotyypin 027), joka tuottaa moninkertaiset määrät toksiineja ja kykenee aiheuttamaan maailmanlaajuisia epidemioita. (Jalava ym. 2009, 246; Hedman ym. 2010, 235.) Osa *C. difficile* -kannoista tuottaa myös binaaritoksiinia, jonka lokus koostuu kahdesta geenistä; *cdtA* ja *cdtB* (Cepheid 2011, 1).

Sairaalaolosuhteissa tauti leviää helposti potilaasta toiseen, sillä *C. difficile* tuottaa pitkään säilyviä itiöitä, jotka eivät tuhoudu pelkän alkoholikäsihuuhteen avulla (Laine

2010). Tartunta voi tapahtua uloste-suuteitse potilaalta toiselle, hoitohenkilökunnasta potilaaseen tai kontaminoituneiden pintojen ja välineiden kautta (Hedman ym. 2010, 235). Tartuntojen estämiseksi ripulipotilaat hoidetaan omissa eristys huoneissaan (Laine 2010). *Clostridium difficile* on yleisin ripulin aiheuttaja sairaalahoidon aikana, mutta sen aiheuttamia infektiota esiintyy myös avohoidossa (Kuipers & Surawicz 2008, 1486; Leffler & Lamont 2012, 96).

2.2 *Clostridium difficile* -infektio

Clostridium difficile -infektio (CDI) on erityisesti antibioottihoitoon liittyvä sairaus, jonka vaikeusaste vaihtelee lievästä ripulista henkeä uhkaavaan pseudomembranoottiseen suolitulehdukseen (Wilcox, Mooney, Bendall, Settle & Fawley 2008, 388). Kun suoliston normaalifloora häiriintyy mikrobilääkityksen johdosta, voi suolistossa pieninä määrinä endogeenisesti esiintyvä *C. difficile* lisääntyä, jolloin syntyy antibioottiripuli (Hedman, Heikkinen, Huovinen, Järvinen, Meri & Vaara 2010, 234). *Clostridium difficile* -infektio voi ilmaantua välittömästi antibioottihoiton aikana tai 4-6 viikon kuluttua hoidon loppumisesta. Infektioita esiintyy etenkin klindamysiinin, laajakirjoisten kefalosporiinien ja fluorokinolonien käytön yhteydessä. (Stevens ym. 2011, 838.) Mikäli suolen toiminta on heikentynyt esimerkiksi suolistoleikkauksen jälkeen tai suolitukoksen johdosta, voi *Clostridium difficile* aiheuttaa ripulin myös ilman edeltävää antibioottihoitoa (Hedman ym. 2010, 235). Kliinisten laboratoriodien tulee ilmoittaa kaikki löydetty *C. difficile* -tautitapaukset tartuntatautirekisteriin (Jalava ym. 2009, 250).

Lieviissä infektioiden potilaalla on löysää ulostetta muutamia kertoja päivässä, lievää lämmön nousua ja mahdollisesti vatsakramppeja tai -kipuja. Tauti voi edetä myös vaikeaan koliittiin, jossa suolen pinta peittyy vaaleilla plakeilla eli pseudomembraaneilla. Plakit ovat suolen limakalvon tulehduspesäkkeitä, jotka koostuvat neutrofiileista, fibriinistä ja kuolleesta solukosta. (Kuipers & Surawicz 2008, 1486; Weston 2008, 159.) Pseudomembranoottinen tulehdus voi johtaa vakaviin komplikaatioihin, kuten suolen puhkeamiseen. Erittäin vaikeissa tautitapauksissa potilaalle joudutaan suorittamaan kolektomia, eli paksusuolen tai sen osan poisto. (Kuipers & Surawicz 2008, 1487.)

Potilas, joka saa *C. difficile* -infektion, joutuu todennäköisesti olemaan sairaalassa kauemmin. Näin ollen infektio lisää potilaan hoitopäiviä sekä potilaan hoidosta ja eristämisestä johtuvia kustannuksia. (Agthe 2009, 23.) Tarkat arviot *Clostridium difficile* aiheuttamista kustannuksista ovat kuitenkin vaihtelevia. Infektion aiheuttamien lisähoitopäivien laskeminen on ongelmallista, sillä välillä on vaikea päätellä onko infektio syy vai seuraus hoidon pidentymisestä. (Agthe 2009, 15; McCollum & Rodriguez 2012, 581.)

2.3 Hypervirulentti *Clostridium difficile* 027-kanta

Clostridium difficile aiheuttamien infektioiden määrä ja vakavuusaste on viime vuosina lisääntynyt huomattavasti, kun niin sanotut hypervirulentit kannat ovat levinneet. (Lyras ym. 2009, 1176–1410; O'Connor, Johnson & Gerding 2009, 1913.) Vakavien tautitapausten yhteydessä on suositeltavaa määrittää mikä *C. difficile* -kanta potilaalla on. Näin hoitavat lääkärit pystyvät tarkkailemaan *C. difficile* leviämistä ja hypervirulenttien kantojen määrää. Yleisin keino kantojen määrittämiseen on PCR-ribotyypitys, joka perustuu 16S ja 23S RNA-molekyylejä koodaavien geenien välisen alueen monistamiseen spesifisillä alukkeilla. (Stevens ym. 2011, 849.) Näiden geenien kopioiden määrä vaihtelee kantojen välillä. Saatu PCR-tuote analysoidaan geelielektroforeesin avulla, ja monistettujen DNA-jaksojen juosteprofiili on kyseisen kannan ribotyyppi. (Jalava ym. 2009, 249.) Eri ribotyypeille on annettu numero, joka kertoo mistä kannasta on kyse (Baron & Tenover nd. 6).

Yksi tällainen hypervirulentti kanta on PCR-ribotyyppi 027, joka tuottaa noin 16-kertaisen määrän toksiini A:tä ja 23-kertaisen määrän toksiini B:tä verrattuna muihin kantoihin. Lisäksi se tuottaa niin sanottua binaaritoksiinia, jonka tarkkaa vaikutusta ei kuitenkaan vielä tunneta. Ribotyypin 027-kanta on erittäin resistentti fluorokinoloneille, ja sen yleistymisen epäilläänkin liittyvän näiden antibioottien lisääntyneeseen käyttöön. (Warny, Pepin, Fang, Killgore, Thompson, Brazier, Frost & McDonald 2005, 1082; Turner, Williams, Taichman & Hessen 2010, 2.)

Tärkeä havainto hypervirulentin *C. difficile* toksiinituotannon säätelyn ymmärtämisessä on ollut *tcdC*-geenin toiminnan tarkastelu. Se on ainut PaLoc-alueen geeneistä joka ekspressoituu solun eksponentiaalisen kasvun vaiheessa. Heti kun solu

pääsee stationaarisen kasvun vaiheeseen, *tcdC*-geenin ekspressio lopetetaan ja toksiinituotanto alkaa. Tämä löydös on viitannut siihen, että *tcdC* on säätelygeeni, joka estää toksiinigeenien ekspressoitumista. Se selittää sen, miksi hypervirulentit kannat, joilla on mutaatioita *tcdC*-geenissä, tuottavat moninkertaiset määrät toksiinia. Hypervirulenteilla kannoilla on kahdeksantoista emäsparin deleetio *tcdC*-geenin 3' päässä sekä yhden emäsparin mutaatio lähellä 5' päätä, joka johtaa lyhentyneen ja toimimattoman säätelyproteiinin tuotantoon. (Dupuy, Govind, Antunes & Matamouros 2008, 687-688.)

Suomen ensimmäinen 027-kanta havaittiin vuonna 2007 (Lyytikäinen ym. 2007, 3303). Tämän löydöksen vuoksi Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirissä päädyttiin vuoden 2007 lopussa tyypittämään kaikki positiiviset *C. difficile* -löydökset. Hypervirulentin 027- kannan osuus oli noin 20 prosenttia positiivisten näytteiden osuudesta. Lisäksi havaittiin, että 027-ribotyypin kantojen aiheuttama infektio uusiutui muita kantoja useammin. Kuolleisuus 027-kantaan oli noin 5-10 prosenttia suurempi kuin muilla kannoilla. (Anttila, V-J & Tissari, P. 2008, 2147.)

2.4 *Clostridium difficile* -infektion hoitomuodot

Tärkein hoitomuoto *C. difficilen* aiheuttamaan ripuliin on sen laukaisseen antibiootihoidon lopettaminen, jos se on mahdollista. Tilanteissa, joissa antibioottilääkitystä ei voida kokonaan lopettaa, se vaihdetaan sellaiseen, joka ei yhtä todennäköisesti aiheuttaisi *C. difficilen* lisääntymistä. (Turner ym. 2010, 7-8.) Lieväoireinen potilas yleensä toipuu muutamassa päivässä antibiootihoidon lopettamisen jälkeen eikä tarvitse muuta hoitoa (Weston 2008, 161).

Vaikeammissa tapauksissa *C. difficilen* hoitoon käytetään metronidatsolia ja vankomysiinia. Ensisijaiseksi lääkkeeksi suositellaan metronidatsolia, sillä vankomysiinin käytöllä on yhteyksiä resistenttien mikrobikantojen syntyyn. (Weston 2008, 161.) Antibiootin valintaan kuitenkin vaikuttaa se, hoidetaanko potilasta ensimmäistä kertaa vai uusiutuneen infektion vuoksi. (Turner ym. 2010, 8-9).

Suolen peristaltiikkaa hidastavia ripulilääkkeitä ei tulisi käyttää, sillä ne vähentävät hoitavan antibiootin tehokkuutta ja estävät toksiinien poistumista elimistöstä (Turner

ym. 2010, 8). Koska ripuli häiritsee nestetasapainoa, tulisi riittävästä nesteytyksestä huolehtia joko oraalisesti nautittavalla elektrolyyttiliuoksella tai vakavammissa tapauksissa suonensisäisen nesteytyksen avulla (Lumio 2012).

2.5 Uusiutunut *Clostridium difficile* -infektio ja sen hoito

Clostridium difficile -infektio uusiutuu noin joka viidennellä potilaalla. Riskitekijöitä uusiutuneelle infektiolle ovat sairaalahoidon pitkittyminen, yli 65 vuoden ikä ja immuunipuolustuksen vajavuudet. Uusiutunut infektio voi johtua joko saman kannan aiheuttamasta relapsista tai toisen kannan aiheuttamasta uudesta infektiosta. Monilla potilailla infektio uusiutuu useammin kuin kerran. (Weston 2008, 161; Johnson 2009, 403-404.) Uusiutuneen taudin hoidossa suositellaan käytettävän vankomysiiniä, jota annostellaan aluksi tihein väliajoin ja kuurin edetessä annosteluväliä harvennetaan. Tällä pyritään siihen, että potilaan suoleen mahdollisesti jääneet itiöt ehtisivät muuntua vegetatiiviseen muotoon annoksien välissä ja seuraava antibioottiannos tappaisi bakteerit. (Johnson 2009, 405.)

Uusiutuneen *Clostridium difficile* -infektion hoidossa voidaan käyttää myös ulosteensiirtoa. Tämä hoitomuoto perustuu suoliston bakteerikannan normalisointiin terveen luovuttajan ulosteen avulla. Luovuttajaksi sopii henkilö, jolla ei ole ollut antibioottikuuria kuuteen kuukauteen, eikä vatsaoireita, kuten ärtyneen suolen oireyhtymää. Lisäksi luovuttajan ulostetta ja verta tutkitaan laboratoriokokein, jotta varmistutaan, ettei luovuttajalla ole tarttuvia tauteja. Luovuttajaksi valitaan ensisijaisesti potilaan sukulainen. Tällä pyritään siihen, että luovutettu uloste vastaisi potilaan suolen normaaliflooraa mahdollisimman hyvin. Mikäli sopivaa luovuttajaa ei lähisukulaaisista löydy, voidaan siirteenä käyttää myös muiden terveiden henkilöiden ulostetta. Luovuttajan uloste kerätään korkeintaan kuusi tuntia ennen siirtoa, sillä ulosteen tulee olla tuoretta. Noin kaksikymmentä millilitraa luovutettua ulostetta homogenisoidaan 100-200 millilitraan vettä tai keittosuolaa. (Uusitalo-Seppälä & Moilanen 2010, 19; Mattila ym. 2012, 490-491.)

Ennen ulosteensiirtoa potilas saa vähintään neljän päivän kuurin vankomysiiniä tai metronidatsolia, kunnes oireet vähenevät. Antibioottihoito lopetetaan 36 tuntia ennen toimenpidettä ja lisäksi suoli tyhjennetään lääkkeiden avulla. (Mattila ym. 2012, 490-

491.) Ulosteensiirto voidaan tehdä joko gastroskopian tai kolonoskopian yhteydessä (Garborg ym. 2010, 857). Yleisimmin käytettävä menetelmä on kolonoskopia, jossa siirre ruiskutetaan ohutsuolen loppupäähän sekä paksusuolen alkupäähän. Jotta siirre pysyisi mahdollisimman kauan potilaan suolistossa, annetaan hänelle ennen toimenpidettä suolen supistumistoimintaa hidastavaa lääkettä. (Uusitalo-Seppälä & Moilanen 2010, 21.)

Mattilan ym. (2012) tutkimuksen mukaan 70 potilaasta 94% oli parantunut kaksitoista viikkoa ulosteensiirron jälkeen. Kaikki 34 potilasta, joilla ei ollut hypervirulenttia 027-kantaa olivat parantuneet ja hypervirulenttia 027-ribotyypin kantaa sairastaneistakin 89% oli parantunut. Hoitomuoto ei aiheuttanut haittavaikutuksia ja se oli turvallinen vaihtoehto myös vakavan perussairauden omaavilla potilailla. (Mattila ym. 2012, 490-491, 494.)

3 CLOSTRIDIUM DIFFICILE -INFEKTION DIAGNOSTIIKKA

3.1 Viljely

Clostridium difficile -infektion diagnoosi perustuu potilaan kliiniseen taudinkuvaan, sekä bakteerin ja sen erittämien toksiinien eristämiseen ulosteesta (Baron & Thomson 2011, 259). Ulostenäyte viljelyä varten otetaan anaerobinäytteelle tarkoitettuun geelikuljetusputkeen. Optimaalisesti näyte tulisi toimittaa heti laboratorioon, jotta se saataisiin viljeltyä kahden tunnin kuluessa näytteenotosta, mutta jääkaappilämpötilassa näyte säilyy viljelykelpoisena kaksi vuorokautta. (Jalava ym. 2009, 247; Stevens ym. 2011, 844.) Viljelyyn tulisi hyväksyä ainoastaan vetisiä ripuliulosteita, jotta välttyttäisiin diagnosoimasta sellaisia ihmisiä, jotka ovat vain *C. difficile* -kantajia (Stevens ym. 2011, 844).

Viljely voidaan suorittaa ei-selektiiviselle FAA-maljalle (fastidious anaerobe agar), joka on tarkoitettu anaerobisten bakteerien viljelyyn (Neogen 2011). Ulosteen runsaan normaaliflooran takia *C. difficile* viljelyssä käytetään kuitenkin yleensä selektiivisiä elatusaineita, kuten CCFA-agaria (cycloserine-cefoxitin-fructose agar) ja CCEY-agaria (cycloserine-cefoxitin-egg yolk-fructose agar), joiden sisältämät antibiootit, sykloseriini ja kefoksitiini, estävät useimpien muiden bakteerien kasvun. Normaaliflooran tuhoamiseksi ja itiöitymisen lisäämiseksi ulostenäytteelle voidaan tehdä myös alkoholikäsittely ennen viljelyä. Alkoholikäsittelyn jälkeen viljely suositellaan tehtävän CCEY-maljalle, joka sisältää peptonia, fruktoosia, hemiiniä, neutraalipunaa ja munankeltuaisemulsiota. (Jalava ym. 2009, 248; Atlas & Snyder 2011, 291.) Viljelyn jälkeen maljoja kasvatetaan kaksi vuorokautta anaerobisissa olosuhteissa lämpökaapissa. (Jalava ym. 2009, 248).

CCFA-maljalta *C. difficile* voidaan tunnistaa tyypillisen kasvutapansa mukaan. Pesäke on keltainen, litteä, suurehko ja reunaltaan epätasainen. CCEY-maljalla pesäke on väriltään harmahtava tai valkoinen. (Jalava ym. 2009, 248.) FAA-maljalla pesäkkeet ovat isoja, lähes valkoisia, keskustasta kohoavia ja reunoiltaan epätasaisia (*Clostridium difficile* tunnistaminen, 1). Maljoja voidaan tarvittaessa tarkastella myös ultraviolettivalossa, jossa *C. difficile* pesäkkeet fluoresoivat keltaista valoa (Tissari 2008, 304).

Diagnosoinnissa ei voida käyttää yksinään viljelyä, sillä se on hidas menetelmä, eikä sen avulla voida todeta, onko kyseessä patogeeninen, toksinia tuottava kanta (Jalava 2009, 248; Hedman ym. 2010, 235). Viljely on kuitenkin ainoa keino antibioottiherkkyyksien määrittämiseen ja kantojen tyypittämiseen (Könönen, Rasinperä, Virolainen, Mentula & Lyytikäinen 2009, 264).

3.2 Toksiiniosoitus EIA-menetelmällä

Viljelyä täydentävänä tutkimuksena käytetään usein entsyymi-immunologiaan perustuvaa toksiniosoitusta suoraan ulosteesta (Jalava ym. 2009, 248). Käytetyn testin tulisi mitata sekä toksinia A että toksinia B, sillä molemmat ovat kliinisesti merkittäviä (Rautio 2010, 235; Kuehne ym. 2010, 711).

EIA-menetelmä perustuu kaksoisvasta-aine -tekniikkaan. Siinä näytettä inkuboidaan entsyymikonjugaattiliuoksen kanssa, joka sisältää peroksidaasileimattuja vasta-aineita toksineille. Jos näyte sisältää toksineja, vasta-aineet kiinnittyvät toksineihin inkubaation aikana. Tämän jälkeen näyteliuos siirretään testikasetille. Testikasetilla olevaan kalvoon on sitoutettu vasta-aineita toksini A:ta ja B:tä vastaan. Näytteen sisältämät entsyymileimatut toksinit jäävät tähän kiinni, jonka jälkeen muut epäpuhtaudet pestään pois. Tämän jälkeen lisätään substraattia ja positiivinen reaktio voidaan havaita sinisenä värinä. (Meridian 2009, 1.)

Toksiinitestaus tulee tehdä mahdollisimman tuoreesta ulostenäytteestä, mutta se voidaan tehdä pisimmillään 4 vuorokautta jääkaappilämpötilassa olleesta näytteestä. Jos testiä ei voida suorittaa tässä ajassa, tulee näyte pakastaa ja säilyttää jäädytettynä -20°C. (Meridian 2009, 2.) Entsyymi-immunologiset menetelmät ovat nopeampia kuin viljely, mutta niiden sensitiivisyydet voivat olla matalia (Huang ym. 2009, 3730).

3.3 Toksiinigeenien osoitus reaaliaikaisella PCR -menetelmällä

Viljelyn ja toksiniosoituksen rinnalle on tullut erilaisia toksiinigeenien osoittamiseen perustuvia menetelmiä. PCR-menetelmät (polymerase chain reaction) ovat suhteellisen

nopeita ja toistettavia, eikä niiden käyttäminen vaadi puhdasviljelmiä. (Jalava ym. 2009, 251.) PCR-reaktion avulla voidaan monistaa DNA-jaksoja, joiden nukleotidijärjestys on ainakin osin tunnettu. Tähän tarvitaan spesifiset alukkeet, jotka rajaavat monistettavan alueen, eli tässä tapauksessa toksiinigeenit. (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2010, 153.)

Reaaliaikaisessa PCR-reaktiossa mitataan monistuvan tuotteen määrää samanaikaisesti kun reaktio tapahtuu. Tätä varten PCR-reaktiossa on normaalien komponenttien lisäksi mukana fluoresoivalla väriaineella leimattuja hybridisaatiokoettimia, jotka sitoutuvat spesifiseen paikkaan kohde-DNA:ssa. Kun koettimet sitoutuvat valmistuvaan kohde-DNA:han, niiden fluoresenssisignaali moninkertaistuu. Kun näitä koettimia eksitoidaan valon avulla ja mitataan niiden emittoimaa fluoresenssia joka syklin jälkeen, voidaan seurata PCR-tuotteen monistumista reaaliajassa. (Bustin 2005, 1117,1123; Suominen, ym. 2010, 166-167.)

PCR -menetelmien käyttö kuitenkin vaatii säännöllistä sekvenssitiedon täydentämistä ja käytettyjen alukkeiden testaamista, sillä *C. difficile* PaLoc -alueessa tapahtuu jatkuvasti mutaatioita. Toksiinigeenien osoitusmenetelmät mahdollistavat kantojen nopean seulonnan, mutta eivät korvaa perinteisiä diagnostisia keinoja kuten viljelyä. (Jalava ym. 2009, 251.)

3.4 *Clostridium difficile* -diagnostiikka Päijät-Hämeen sosiaali- ja terveysyhtymässä

F-CldiVTx -tutkimusta varten puhtaaseen ulostepurkkiin otetusta näytteestä tehdään Immunocard® Toxins A&B -osoitustesti. Sekä toksiini A/B -positiivinen että -negatiivinen pikatestin tulos suoraan ulosteesta vastataan heti laboratorion atk-järjestelmään. Tämä alustava vastaus on välittömästi nähtävissä myös näytteen lähittäneessä yksikössä. (Esko 2012; F-*Clostridium difficile*, viljely ja toksiinin osoitus, 1.)

Tämän jälkeen kaikki näytteet viljellään selektiiviselle CCEY-maljalle. Maljoja inkuboidaan +35-asteisessa lämpökaapissa anaerobiosuhteissa kaksi vuorokautta. Näytteiden lisäksi viljellään aina *C. difficile* -kontrollikanta sekä CCEY- että FAA-

maljalle. Kasvatuksen jälkeen CCEY-maljan kasvu tulkitaan tarkkailemalla pesäkkeiden ulkonäköä, muotoa sekä hajua. CCEY-maljalla *C. difficile* kasvaa tyypillisesti harmahtavana epätarkkarajaisena suurehkona pesäkkeenä, jolle on ominaista lannan haju. (*Clostridium difficile* tunnistaminen, 1; Esko 2012; F-*Clostridium difficile*, viljely ja toksiinin osoitus, 1.)

*Clostridium difficile*ksi epäillyistä pesäkkeistä tehdään gram-värijäys, jossa *C. difficile* näkyy isona ja paksuna gram-positiivisena sauvana. Jos toksiiniosoitus suoraan ulosteesta on ollut negatiivinen, mutta maljalla havaitaan *C. difficile* -kasvua, tehdään uusi toksiiniosoitus suoraan pesäkkeestä. Tässä vaiheessa positiivisesta viljelytuloksesta annetaan alustava vastaus ja viljelynegatiiviset näytteet vastataan lopullisesti. (*Clostridium difficile* tunnistaminen, 1; Esko 2012; F-*Clostridium difficile*, viljely ja toksiinin osoitus, 1.)

Primaarimaljalla kasvaneista epäillyistä *C. difficile* -pesäkkeistä tehdään puhdasviljelyt FAA- sekä CCEY-maljoille, joita kasvatetaan anaerobiosuhteissa. Näiden lisäksi pesäkkeestä viljellään suklaamalja, jota kasvatetaan aerobiosuhteissa, missä *C. difficile* ei saa kasvaa. Tämä on niin sanottu aerotoleranssitestti. Varsinainen löydöksen tunnistus tehdään suoraan pesäkkeestä VITEK® MS massaspektrometrillä. (*Clostridium difficile* tunnistaminen, 1; Esko 2012.) Siinä näyte ionisoidaan pommittamalla sitä elektronisuihkulla. Tämän jälkeen ionit ohjataan sähkö- ja magneettikentälle ja siitä edelleen tunnistimelle. Lopulta laite piirtää massaspektrin, joka kertoo erimassaisten ionien suhteelliset määrät, joiden avulla bakteeri tunnistetaan. (Gross 2004, 3-6.)

Tunnistetuille *Clostridium difficile* -kannoille tehdään herkkyysmäärytykset moksifloksasiinille ja klindamysiinille. Jos löydös on moksifloksasiinille resistentti (R), mutta klindamysiinille herkkä (S) kyseessä saattaa olla niin sanottu hypervirulentti ribotyypin 027-kanta. Herkkyystestin tulosta ei vastata hoitoyksikköön. Se kuitenkin talletetaan ja resistentit tulokset esitellään ylilääkärille tai sairaalamikrobiologille. Tarvittaessa infektiolääkäri päättää lähetetäänkö löydös ribotyypimäärytykseen. (*Clostridium difficile* tunnistaminen, 2; Esko 2012.)

Vastauksen tutkimuksesta antaa yleensä laboratoriohoitaja, paitsi erikoistapauksissa, joissa toksiiniosoitus suoraan ulosteesta on ollut positiivinen, mutta viljelyssä ei ole ollut *C. difficile* -pesäkkeitä. Tällöin lopullisen vastauksen antaa mikrobiologi tai

ylilääkäri. Lausunnossa otetaan huomioon näytteenottohetkellä ollut mahdollinen mikrobilääkitys, näytteen liian pitkä kuljetusaika laboratorioon tai *C. sordelliin* aiheuttaman ristireaktion mahdollisuus. (F-*Clostridium difficile*, viljely ja toksiinin osoitus, 2.)

Kaikki *C. difficile* -kannat talletetaan mikrobiologian laboratorion kantakokoelmaan -70 -asteeseen. Kun toksiinin osoitus suoraan ulosteesta on positiivinen tai viljelyssä on todettu *C. difficile*, tehdään tuloksista ilmoitus Terveiden ja hyvinvoinnin laitokseen laboratorioden tartuntatauti-ilmoitus -ohjelman kautta. Viljelypositiivisista tuloksista ilmoitetaan myös onko kanta toksiinintuoton suhteen positiivinen vai negatiivinen. (*Clostridium difficile* tunnistaminen, 2; Esko 2012.)

4 XPERT® C. DIFFICILE-TESTI

4.1 GeneXpert -analysaattorin käyttö *Clostridium difficile* -diagnostiikassa

Xpert® *C. difficile* -testi suoritetaan GeneXpert -analysaattorilla (kuva 1), joka on yhdistetty tietokoneeseen. Tietokoneelle täytyy olla asennettuna GeneXpert DX -ohjelmisto, jonka avulla voi ohjailla laitetta ja tarkastella tuloksia. Lisäksi testin suoritukseen tarvitaan Xpert® *C. difficile* -testikitti, suojakäsineitä, pumpulitikkuja, kertakäyttöpipettejä sekä putkisekoittajia. Testi on tarkoitettu toksiinien osoittamiseen suoraan ulosteesta. Ulostenäytteen tulisi olla mahdollisimman tuore, mutta myös pakkasessa säilytetyt ulostenäytteet ovat sopivaa näytemateriaalia. Yhden testin suorittamiseen kuluu noin tunti esivalmisteluineen, josta GeneXpert -laitteen suorittamaan analyysiin kuluu noin 47 minuuttia. (Cepheid 2010, 2-3; Huotari 2012.)



KUVA 1. GeneXpert -analysaattori

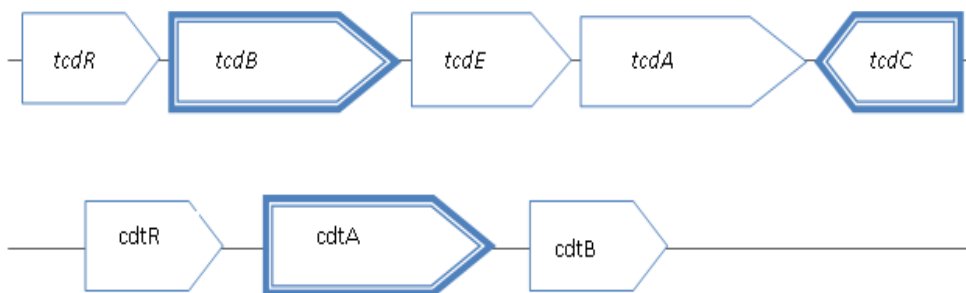
Xpert® *C. difficile* -testikitti sisältää reagenssit 1 ja 2, näyttereagenssin ja kertakäyttöisen määrityskasetin (kuva 2). Näyttereagenssi sisältää guanidiinitiosyanaattia ja pintajännitystä vähentäviä aineita. Reagenssi 1 sisältää EDTA:ta ja Tris-puskuria ja reagenssi 2 sisältää natriumhydroksidia. Kasetin sisällä on lyofilisoituna muut PCR-reaktioon tarvittavat komponentit eli alukkeet, deoksiribonukleotiditriposfaatteja ja DNA-polymeraasi. Testikittejä voi säilyttää huoneenlämmössä tai jääkaapissa, sillä niiden sallittu säilytyslämpötila on 2-28 °C. (Cepheid 2010, 2.)



KUVA 2. Testikitin sisältö

4.2 Testin periaate

Xpert® *C. difficile* on kvalitatiivinen testi, joka perustuu reaaliaikaiseen PCR-menetelmään (Cepheid 2010, 1). Xpert® *C. difficile* tunnistaa spesifisten koettimien avulla kolme eri kohdetta *C. difficile* genomissa. Nämä ovat toksiini B:tä koodaava geeni *tcdB*, binaaritoksiinia koodaava geeni *cdtA* ja *tcdC*-geenin mutaatio (kuvio 1). Näiden avulla testi tunnistaa toksiinia tuottavat kannat sekä hypervirulentit 027-kannat. (Cepheid 2010, 1.)



KUVIO 1. Xpert® *C. difficile* tunnistamat kohteet *C. difficile* genomissa tummennettuina (Cepheid nd., muokattu)

Jokaisen Xpert® *C. difficile* -kasetin sisältä löytyy kammio näytettä, reagensseja, prosessoitua näytettä ja jäteliuoksia varten. Yksi kammio sisältää ilmaa, joka tasaa painetta kasetin sisällä. Näyte ja reagenssit lisätään kasetin sisälle ohjeiden mukaan, ja kasetti asetetaan GeneXpert -laitteeseen. Tämän jälkeen kasetin sisällä oleva

venttiiliputki siirtää aineita kammiosta toiseen ja näyte esikäsitellään. Valmis näytteseos siirtyy kyvetiin, jossa varsinainen mittaus tapahtuu. (Cepheid 2008, 50.)

Kun kasetti asetetaan GeneXpert -laitteeseen, niin kasetin takapuolella sijaitseva kyveti asettuu laitteen sisällä sijaitsevaan I-CORE -moduliin, joka säätelee PCR-syklejä. Modulissa on keraamiset levyt, joissa on korkea lämmönjohtokyky. Näiden avulla taataan lämpötilojen nopea ja tasainen vaihtelu. Lisäksi laitteen sisällä on tehokkaat tuulettimet, jotka viilentävät keraamiset levyt nopeasti. Laitteen suurin lämmitysnopeus on 10°C sekunnissa ja suurin jäähdytysnopeus 2,5°C sekunnissa. Laite kontrolloi lämpötilojen vaihtelua ja ero tavoitelämpötilasta saa olla korkeintaan +/- 1.0 °C. (Cepheid 2008, 51.)

I-CORE -moduli myös mittaa näytteen emittoimaa fluoresenssia. Modulin sisällä sijaitseva optiikka koostuu LED-lampuista, jotka lähettävät koettimia eksitoivaa valoa, sekä kuutta eri aallonpituutta havainnoivista detektoreista. Laite pystyy siis havaitsemaan kuutta erilaista kohdetta kun käytetään erilaisilla fluoresoivilla leimoilla leimattuja koettimia. (Cepheid 2008, 52; Suominen ym. 2010, 167.)

4.3 Laadunvarmistus

Jokaisessa testissä on sisäisinä kontrolleina Sample Processing Control (SPC) ja Probe Check Control (PCC). Sample processing -kontrolli sisältää kuivattuja *Bacillus globigii* itiöitä, jotka lyysataan eli hajoitetaan ulträänellä. Kontrollin avulla varmistetaan, että näytteen käsittely on onnistunut ja kaikki sen sisältämät bakteerit ovat hajonneet. SPC:n pitäisi olla positiivinen negatiivisen näytteen yhteydessä. Kun kyseessä on *Clostridium difficile* -positiivinen näyte, voi kontrolli olla negatiivinen, sillä se kilpailee samoista reagensseista näytteen kanssa. (Cepheid 2010, 5.)

Probe check -kontrolli suoritetaan automaattisesti ennen PCR-reaktion aloittamista. Siinä GeneXpert Dx -laite mittaa fluoresenssin koettimista, jonka avulla varmistetaan, että kylmäkuivattuina olleet leimatut koettimet ovat rehydroituneet ja että reaktiokyveti on täyttynyt. (Cepheid 2010, 4; Huotari 2012.)

Ulkoista laadunarviointia tarjoavat sekä Labquality että UK NEQAS, joilla molemmilla on neljä laadunarviointikierrosta vuodessa. Näytteet ovat kylmäkuivattuja ja niitä kuuluu jokaiseen kierrokseen kaksi kappaletta. (Jalava ym. 2009, 250.)

4.4 Testin tulosvaihtoehdot

Xpert® *C. difficile* on kvalitatiivinen testi, joten saatu tulos on positiivinen, negatiivinen tai hylätty. Negatiivinen tulos tarkoittaa, että toksiini B:tä tuottavaa tcdB-geeniä ei havaita, mutta muita kohdegeenejä (cdtA ja/tai tcdC-geenin mutaatio) voidaan havaita. Positiivinen tulos merkitsee, että tcdB-geeniä havaitaan näytteestä, lisäksi voidaan havaita joko cdtA-geeniä tai tcdC-geenin deletio. Kun kyseessä on 027-kanta, niin kaikki kohdegeenit havaitaan. Testin antamia tuloksia on havainnollistettu taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Xpert® *C. difficile* -testin tulosvaihtoehdot

Tulos	Toksiini B	Binaaritoksiini	tcdCA	SPC-kontrolli
Toksiinia tuottava <i>C.difficile</i> , 027-kanta	+	+	+	+/-
Toksiinia tuottava <i>C.difficile</i>	+	+	-	+/-
	+	-	+	+/-
	+	-	-	+/-
Negatiivinen	-	+	+	+/-
	-	+	-	+/-
	-	-	+	+/-
	-	-	-	+

Muut mahdolliset tulokset ovat invalid, error ja no result. Invalid- tuloksen syynä on, että SP-kontrolli ei ole hyväksyttävissä rajoissa. Tämä johtuu näytteen käsittelyn epäonnistumisesta tai PCR-reaktion inhiboitumisesta. Sen vuoksi näytteessä mahdollisesti olevia kohdegeenejä ei voida havaita. Error -tuloksen tullessa PC-kontrolli on epäonnistunut. Tämä voi johtua näytteenottokohdassa olleesta kiinteästä

materiaalista, joka on aiheuttanut tukoksen, liian suuresta näytemäärästä, reaktiokyvetin vaillinaisesta täyttymisestä, maksimaalisen painerajan ylittymisestä tai siitä, että fluoresoivien koettimien signaali ei ole läpäissyt tarkistusta. Mikäli error- tulos tulee, vaikka PC-kontrolli on mennyt hyväksytysti läpi, on kyseessä laitevika. No result tarkoittaa, että on saatu liian vähän tietoa tuloksen antamiseksi. Syynä on esimerkiksi näytteen käsittelyn keskeyttäminen laitteen käyttäjän toimesta. (Cepheid 2010, 5; Huotari 2012.)

4.5 Hylätyn testin uusiminen

Mikäli tutkimus halutaan uusida epäonnistuneen ajon jälkeen, se voidaan tehdä kahdella eri tavalla. Jos määrittäminen uusitaan kolmen tunnin sisällä ensimmäisen ajon jälkeen, voidaan kasetin kammiossa S jäljellä oleva neste siirtää uuteen näyttereagenssipulloon. Reagenssipullon sekoituksen jälkeen sen sisältö siirretään uuteen kasettiin, johon lisätään myös reagenssit kuten normaalisti. Toinen vaihtoehto on suorittaa analyysi alusta asti ensimmäisen ajon tavoin ottamalla uusi tikkunäyte ulosteesta uuteen kasettiin. (Cepheid 2010,6.)

5 VALIDOINTI

Aina testimenetelmää vaihdettaessa tulisi uuden testin toimivuus varmistaa jollain tapaa, siten saadaan selville menetelmän toimivuus juuri kyseisessä laboratoriossa ja näytemateriaalissa. Käytännössä tämä tapahtuu usein niin, että verrataan uuden menetelmän tuloksia laboratoriossa jo käytössä olevaan menetelmään. Validoinnilla tarkoitetaan menetelmän kelpoisuuden osoittamista ja sillä varmistetaan, että menetelmä tuottaa luotettavia ja toistettavia tuloksia. (Liimatainen 2002, 12.)

Validoinnin tarkoituksena on mitata vertailumateriaalien avulla menetelmän kykyä tuottaa oikeita tuloksia sekä menetelmän sisäinen toistettavuus (Jaarinen & Niiranen 2005, 30). Sillä osoitetaan, että menetelmä on tieteellisesti pätevä niissä olosuhteissa, joissa sitä käytetään. Validoinnilla pyritään eliminoimaan systemaattiset virheet. (Pikkarainen 2000, 11.)

Validointi koostuu koejärjestelyjen suunnittelusta, mittausten suorittamisesta, tulosten arvioinnista ja tilastollisista laskuista sekä menetelmäohjeen laatimisesta (Jaarinen & Niiranen 2005, 30). Validoinnin jälkeen täytyy edelleen huolehtia menetelmän laadukkuudesta sisäisten kontrollien ja ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden avulla (Liimatainen 2002, 13). Uuden menetelmän validointi on tehtävä omassa työyksikössä ja materiaalin on oltava riittävän kattava. Validoinnissa tarkastellaan menetelmän herkkyyttä eli sensitiivisyyttä ja tarkkuutta eli spesifisyyttä. Koska menetelmät antavat sekä vääriä negatiivisia että vääriä positiivisia, tulee laskea ennustearvoja, jotka kuvaavat todennäköisyyttä jolla saatu positiivinen tai negatiivinen tulos on oikea. (Ikäheimo 2002, 13.)

Valittaessa validoitavaa menetelmää, on otettava huomioon erilaisia analyysille asetettuja vaatimuksia kuten tulosten tarkkuus, nopeus, soveltuvuus eri näytemateriaaleille sekä kustannukset (Jaarinen & Niiranen 2005, 30). Validointikokeet on suunniteltava huolellisesti ja saadut tulokset analysoitava sopivaa tilastollista menetelmää käyttäen. Menetelmän sopivuuden osoittamiseen käytetään eri parametrejä, joita ovat esimerkiksi sensitiivisyys, spesifisyys sekä positiivinen ja negatiivinen ennustearvo. (Pikkarainen 2000, 11.)

6 AIKAISEMMAAT TUTKIMUKSET

Xpert® *C. difficile* -testin soveltuvuutta *Clostridium difficile* diagnostiikkaan on tutkittu aikaisemminkin. Alkuvuodesta 2012 julkaistiin Pancholin, Kellyn, Raczkowskin & Balada-Llasat'n tekemä tutkimus, jossa verrattiin Illumigene® *C. difficile* - sekä Xpert® *C. difficile* -menetelmien sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä CCNA-menetelmään (cell culture neutralization assay). Tutkimuksessa analysoitiin 50 pakastettua *C. difficile* -positiivista ulostenäytettä sekä 200 tuorenäytettä. (Pancholi, Kelly, Raczkowski & Balada-Llasat, 2012, 4-5.) Myös Huang ym. (2009, 3729) vertasivat Xpert® *C. difficile*- ja CCNA-menetelmiä. Babadyn ym. (2010, 4519) tekemässä tutkimuksessa Xpert® *C. difficile*ä verrattiin kaksivaiheiseen määrittelyyn, joka muodostui EIA- ja CYT-menetelmistä (cytotoxin neutralization test).

Tutkimuksista kävi ilmi, että Xpert® *C. difficile* suoritus aika (noin 45 minuuttia) ja Illumigene® *C. difficile* suoritus aika (noin yksi tunti) olivat huomattavasti parempia kuin CCNA:n (vaihteluväli 6-72 tuntia) (Pancholi ym. 2012, 11; Huang ym. 2009, 3730). Babadyn ym. (2010, 4519,4522) tutkimuksessa huomattiin, että Xpert® *C. difficile* -testillä tulokset saadaan nopeammin ja se on nopeampi suorittaa kuin kaksivaiheinen EIA-CYT-menetelmä.

Pancholin ym. (2012, 9,11) tutkimuksessa Xpert® *C. difficile* omasi menetelmistä parhaimman sensitiivisyyden, 100%, tunnistuen kaikki positiiviset näytteet tuorenäytteiden osalta sekä pakastetuista. Myös spesifisyys oli 100%. Lisäksi Xpert® *C. difficile* tunnisti hypervirulentin 027-kannan täysin yhtäpitävästi referenssinä käytetyn tcdC-geenin sekvensoinnin kanssa. Babadyn ym. (2010, 4519) tutkimuksessa Xpert® *C. difficile* -testin sensitiivisyydeksi saatiin 100% ja spesifisyydeksi 97%, kun taas Huang ym. (2009, 3729) saivat Xpert® *C. difficile* -testille sensitiivisyydeksi 97% ja spesifisyydeksi 93%.

Tutkimuksista ilmeni, että koska Xpert® *C. difficile* -menetelmä tunnistaa tcdA- tai tcdB-geenejä, eikä itse toksiineja, se saattaa tunnistaa *C. difficile* -kantajan eikä varsinaisesti *C. difficile* -infektiota sairastavaa henkilöä. Vaikka Xpert® *C. difficile* oli vertailtavista menetelmistä selvästi kallein, se oli kuitenkin tutkimusten mukaan herkin, nopein ja helpoin menetelmä käyttää vertailussa olleista menetelmistä. Sen herkkyyden ja

nopea tuloksen saanti ovat tärkeässä asemassa infektion kontrolloimisen kannalta.
(Huang ym. 2009, 3730-3731; Babady ym. 2010, 4522-4523; Pancholi, ym. 2012, 10.)

7 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Tämä opinnäytetyö on kokeellinen tutkimus. Anttilan (2005, 270) mukaan kokeellinen tutkimus on systemaattista ja kontrolloitua havaintojen tekoa. Kokeellisen tutkimuksen tyypillinen piirre on, että tietystä populaatiosta valitaan näytteitä, jotka analysoidaan erilaisten koejärjestelyiden avulla (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara, 2008, 130). Tarkoituksena on mahdollisimman kontrolloiduissa olosuhteissa tutkia yhteensä noin viisikymmentä ulostenäytettä. Tutkimustuloksista tulee sitä luotettavampia mitä suurempi määrä näytteitä tutkitaan, sillä Anttilan (2005, 271) mukaan otoksen virhettä voidaan minimoida lisäämällä otoksen kokoa.

Otoksen muodostaa F-CldiVTx -tutkimuspyynnöllä PHSOTEY:n klinisen mikrobiologian laboratorioon tulleet näytteet. Viikon kestävän kokeellisen osion aikana näytteitä ei todennäköisesti saapuisi tarpeeksi, joten laboratorion henkilökunta kerää ulostenäytteitä talteen -20-asteeseen kokeellista osiota edeltäviltä viikoilta. Näiden lisäksi analysoidaan myös jääkaappilämpötilassa säilytettyjä tuoreita näytteitä, jotka saapuvat laboratorioon kokeellisen osion aikana. Tutkittavat näytteet sisältävät sekä *Clostridium difficile* -toksiiniposiitivisia että -negatiivisia näytteitä. Kokeellisen tutkimuksen periaatteiden mukaan tapahtumien kulku raportoidaan niin tarkasti, että sen uudelleen toistaminen on mahdollista (Anttila, 2005, 270).

Kun arvioidaan testin soveltuvuutta jonkin sairauden diagnostiikkaan, tarkastellaan sen kykyä erotella sairaat ja terveet ihmiset toisistaan. Tätä kykyä voidaan arvioida muun muassa sensitiivisyyden ja spesifisyyden avulla. Molemmat arvot ovat todennäköisyyksiä, ja ne ilmoitetaan prosenttilukuina. Sensitiivisyyden ja spesifisyyden laskemisessa käytetään apuna nelikenttätaulukkoa (taulukko 2), jossa näkyy testin antamat tulokset ja referenssinä käytetty oikea tulos. (Uhari & Nieminen 2012, 47.)

TAULUKKO 2. Sensitiivisyyden ja spesifisyyden määrittämisessä käytetty taulukko (Uhari & Nieminen 2012, muokattu)

	Sairaat/oikea positiivinen	Terveet/oikea negatiivinen
Testin antamat positiiviset tulokset	a	b
Testin antamat negatiiviset tulokset	c	d

Sensitiivisyys tarkoittaa tietyn tutkimuksen herkkyyttä löytää jokin sairaus, kun se on henkilöllä olemassa. Sensitiivisyys lasketaan jakamalla testin antamien oikeiden positiivisten tulosten määrä kaikkien niiden ihmisten lukumäärällä, joiden osalta tuloksen olisi kuulunut olla positiivinen (kuvio 2). Sensitiivisyyden laskemisessa otetaan siis huomioon testin antamien väärin negatiivisten lukumäärä. (Uhari & Nieminen 2012, 47; Nienstedt, Rautiainen, Pernaa, Salmi & Pirttimaa 2002, 598.)

$$\text{sensitiivisyys} = \frac{\text{oikeiden positiivisten lkm}}{\text{oikeiden positiivisten lkm} + \text{väärin negatiivisten lkm}} \times 100$$

KUVIO 2. Sensitiivisyyden laskukaava (Uhari & Nieminen 2012)

Spesifisyys kertoo testin kyvystä löytää terveet ihmiset. Se lasketaan jakamalla testin antamien oikeiden negatiivisten tuloksien määrä kaikkien niiden ihmisten lukumäärällä, joiden osalta tuloksen olisi kuulunut olla negatiivinen, eli kaikkien terveiden lukumäärällä (kuvio 3). Testi, joka on sataprosenttisen spesifinen, ei anna vääriä positiivisia tuloksia. (Uhari & Nieminen 2012, 47; Nienstedt ym. 2002, 622.)

$$\text{spesifisyys} = \frac{\text{oikeiden negatiivisten lkm}}{\text{oikeiden negatiivisten lkm} + \text{väärin positiivisten lkm}} \times 100$$

KUVIO 3. Spesifisyyden laskukaava (Uhari & Nieminen 2012)

Negatiivinen ennustearvo ilmaisee todennäköisyyden, jolla negatiivinen tulos sulkee pois kyseisen sairauden. Se lasketaan jakamalla oikeiden negatiivisten lukumäärä oikeiden ja väärin negatiivisten lukumäärien summalla (kuvio 4). (Miettinen 2011.)

$$\text{negatiivinen ennustearvo} = \frac{\text{oikeiden negatiivisten lkm}}{\text{oikeiden negatiivisten lkm} + \text{väärin negatiivisten lkm}} \times 100$$

KUVIO 4. Negatiivisen ennustearvon laskukaava (Miettinen 2011)

Positiivinen ennustearvo ilmaisee millä todennäköisyydellä testistä saatu positiivinen tulos merkitsee taudin olemassaoloa. Se saadaan jakamalla oikeiden positiivisten lukumäärä oikeiden ja väärin positiivisten summalla (kuvio 5). (Miettinen 2011.)

$$\text{positiivinen ennustearvo} = \frac{\text{oikeiden positiivisten lkm}}{\text{oikeiden positiivisten lkm} + \text{väärin positiivisten lkm}} \times 100$$

KUVIO 5. Positiivisen ennustearvon laskukaava (Miettinen 2011)

Saatuja tutkimustuloksia voidaan esittää tekstillä, taulukoilla ja kuvioilla. Kuvio on tarkoitettu nopeaan tiedonvälitykseen, kun taas taulukossa tarkkuus on oleellista. Onnistunut tilastokuvio välittää visuaalisesti suuren määrän tietoa pienessä tilassa, vääristämättä tietoihin liittyvää sanomaa. Hyvä kuvio saa katsojan kiinnostumaan asiasta ja sen avulla on helppo tehdä vertailuja kuvion eri osien välillä. Kuvio ei kuitenkaan saa olla irrallinen osio, vaan sen tulee tukea muuta aineistoa. (Heikkilä 2008, 154.)

8 TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄ

Opinnäytetyömme aihe on saatu Päijät-Hämeen sosiaali- ja terveystieteiden klinisen mikrobiologian laboratoriosta ja tarkoituksenamme on tutkia Xpert® *C. difficile* -testin soveltuvuutta *C. difficile* -diagnoosiin. Laboratoriossa tällä hetkellä käytössä olevan Immunocard® Toxins A&B -testin herkkyys on osoittautunut ongelmaksi, minkä vuoksi vertailemme näiden kahden testin sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä.

Tavoitteena on Xpert® *C. difficile* -testin validointi ja uuden menetelmän käyttöönoton kautta nopeuttaa diagnoosin aikaansaamista ja parantaa tuloksien luotettavuutta. Tämän myötä tavoitteena on myös kustannusten vähentäminen. Uuden testin käyttöönoton jälkeen määrityksen teko sitoisi työntekijää vähemmän analyysivaiheessa, joten työskentely tehostuisi.

Henkilökohtaisina tavoitteinamme on soveltaa koulussa oppimiamme teoreettisia sekä taitoja käytännön työskentelyssä. Näin vahvistamme omia ammatillisia valmiuksiamme ja toimimme osana työikäisten kehittämistä. Kirjalliseen työhön pyrimme etsimään luotettavia lähteitä ja siten kehittämään omaa kriittistä ajattelua.

Tarkoituksenamme on analysoida ulostenäytteitä Xpert® *C. difficile* -testillä ja verrata siitä saatuja tuloksia Immunocard® Toxins A&B:llä saatuihin tuloksiin sekä viljelyllä tulleisiin oikeisiin tuloksiin. Saadut tulokset tilastoimme selkeään taulukkomuotoon ja laskemme menetelmille sensitiivisyydet, spesifisyydet sekä positiiviset ja negatiiviset ennustearvot. Sensitiivisyyksistä ja spesifisyyksistä teemme kuvaajat, joista tuloksia on helppo vertailla.

Tehtävämme voidaan muotoilla seuraaviksi kysymyksiksi:

1. Eroaako Xpert® *C. difficile* -testin sensitiivisyys ja spesifisyys Immunocard® Toxins A&B -testistä?
2. Nopeuttaako Xpert® *C. difficile* -testi *Clostridium difficile* -infektion diagnosointia?

9 XPERT® C. DIFFICILE -TESTIN KOESTUS PÄIJÄT-HÄMEEN SOSIAALI- JA TERVEYSYHTYMÄSSÄ

9.1 Näytemateriaali ja sen käsittely

Kokeellinen osio suoritettiin Päijät-Hämeen sosiaali- ja terveysyhtymän klinisen mikrobiologian laboratoriossa 27.2.–2.3.2012 välisenä aikana. Näytemateriaali muodostui F-CldiVTx -tutkimuspyynnöllä tulleista näytteistä, joista Xpert® *C. difficile* -menetelmällä analysoitavat näytteet poimittiin sattumanvaraisesti, pyrkien kuitenkin ensisijaisesti tutkimaan mahdollisimman tuoreet näytteet.

Klinisen mikrobiologian laboratorion työntekijät olivat laittaneet 14.2.2012 lähtien F-CldiVTx -pyynnöllä tulleet ulostenäytteet pakkaseen (-20°C). Alle viikkoa ennen kokeellisen osion suorittamista tulleet ulostenäytteet oli säilytetty jääkaappilämpötilassa. Näytteiden keräämistä jääkaappiin jatkettiin edelleen kokeellisen osion suorituksen ajan, jotta analysoitavaksi saatiin myös mahdollisimman tuoreita näytteitä.

Kaikki otokseen kuuluneet ulostenäytteet oli jo analysoitu Päijät-Hämeen sosiaali- ja terveysyhtymän klinisen mikrobiologian laboratorion henkilökunnan toimesta Immunocard® Toxins A&B -pikatestillä sekä uloste viljelyllä CCEY-maljalle.

Näytteitä käsiteltiin anonymisti, vain näytenumeroita käyttäen. Näytteet testattiin Xpert® *C. difficile* -menetelmällä, ilman tietoa viljelyllä ja Immunocard® Toxins A&B -testillä saaduista tuloksista. Immuno Diagnostic Oy:n mikrobiologian tuotepäällikkö asensi Xpert® *C. difficile* -analysaattorin ja perehdytti opinnäytetyön tekijät analyysin suoritukseen. Kaksi ensimmäistä analyysiä suoritettiin hänen ohjauksessaan. Näin varmistettiin, että analyysi suoritettiin laadukkaasti eikä virhettä aiheutuisi väärin työskentelytapojen vuoksi.

Kokeellista osiota varten käytettävissä oli viisi Xpert® *C. difficile* -testikittiä, joista jokaisessa oli 10 näytekasettia. Käytettävissä oli siis yhteensä 50 näytekasettia, joka oli huomattavasti odotettua pienempi määrä. Näytekasettien määrää rajoittivat kustannukselliset syyt.

Kokeellisen osion aikana analysoitiin yhteensä kaksikymmentäkaksi jääkaapissa säilytettyä tuoretta ulostenäytettä sekä kaksikymmentäkuusi pakkasessa säilytettyä ulostenäytettä. Lisäksi tehtiin kaksi määritystä maljalla kasvavista pesäkkeistä, jotka olivat tunnettuja *C. difficile* -kantoja. Toinen määritys tehtiin FAA-maljalta ja toinen CCEY-maljalta. Kaikki saadut tulokset taulukoitiin (Liite 1) ja lopuksi niitä käytiin läpi yhdessä sairaalamikrobiologin kanssa.

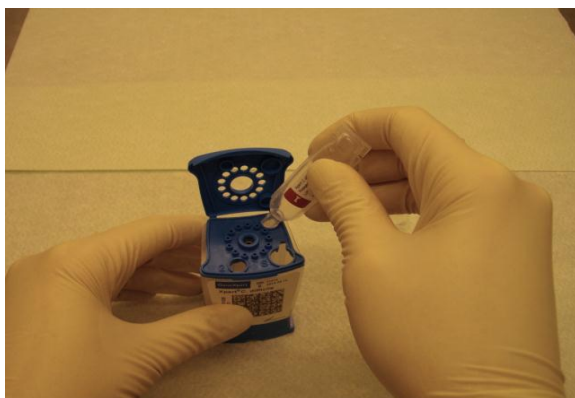
9.2 Xpert® *C. difficile* -testin suoritus

Tarvittava määrä määrityskasetteja poistettiin pakkauksistaan. Samalla tarkistettiin, että kasetin takapuolella oleva kyvetti oli ehjä, eikä se ollut vääntynyt tai muutoin vahingoittunut. Kasetit numeroitiin näytteitä vastaavilla näytenumeroilla siten, ettei etiketin viivakoodi peittynyt. Ulostenäytettä sekoitettiin ja siihen kastettiin kevyesti pumpulitikku välttämällä liian suurta näytemäärää (kuva 3).



KUVA 3. Sopiva näytemäärä.

Pumpulitikun pää katkaistiin näyttereagenssipulloon ja korkki suljettiin. Pulloa sekoitettiin putkisekoittajalla 10 sekuntia. Määrityskasetin kansi avattiin ja kaikki reagenssi ampullista 1 laitettiin kammioon ”1” (kuva 4) ja reagenssi 2 kammioon ”2”. Kaikki materiaali näyttereagenssipullostas siirrettiin kertakäyttöpipetillä näytekammioon. Pipetoitaessa varottiin, ettei näytettä roiskunut muihin kammioihin tai kasetin keskiosaan. Reagenssien lisäämisen jälkeen kasettia oli pidettävä pystyasennossa. Kasetin kansi suljettiin ja testi oli aloitettava 30 minuutin sisällä näytteen valmistelemisesta.



KUVA 4. Reagenssin lisääminen kasettiin

Maljalla kasvaneista *C. difficile* -pesäkkeistä valmistettiin 0,5MacFarland -liuos analyysia varten. Liuokseen kastettiin puhdas pumpulitikku, jonka jälkeen tikku katkaistiin näyttereagenssipulloon ja edettiin kuten normaalisti.

Testausta varten hankitussa analysaattorissa oli käytettävissä kaksi näytepaikkaa. Laitteissa on mahdollista muokata näytepaikkojen määrää. Yhteen *C. difficile* -määrittelykseen laitteelta kului aikaa noin 47 minuuttia. Analysaattoriin voi laittaa näytteen vaikka muissa näytepaikoissa olisi ajo käynnissä.

Analysaattoriin liitettyä tietokoneelta avattiin GeneXpertDx -ohjelma. Ohjelmasta valittiin ”Create test”, jonka jälkeen luettiin kasetin viivakoodi. Laite tunnistaa halutun testin kasetin perusteella. Tämän jälkeen luettiin näytenumeron viivakoodi ja valittiin näytöltä ”Start test”. Vapaan näytepaikan yllä alkoi vilkkua valo, jolloin luukku avattiin ja kasetti asetettiin analysaattoriin etiketti ulospäin näytepaikan etureunaan. Luukku työnnettiin rauhallisesti kiinni, jonka jälkeen laite alkoi prosessoida näytettä. Näytölle tuli näkyviin testin jäljellä oleva aika. Määrittelyksen valmistuttua näytepaikan luukku avautui automaattisesti ja tulos oli luettavissa näytöltä. Mikäli määrittely oli onnistunut, kasetti hävitettiin asianmukaisesti.

9.3 Tulosten käsittely

Oikeana tuloksena määrittelyksissä pidettiin viljelystä saatua vastausta, johon Xpert® *C. difficile*llä saatua vastausta verrattiin. Tuloksia verrattiin myös Immunocard® Toxins A&B -testillä saatuihin tuloksiin. Tuloksista tehtiin Excel-taulukko (Liite 1), jossa näkyi Xpert® *C. difficile*llä, Immunocard® Toxins A&B:llä ja viljelyllä saadut tulokset.

Tulosten perusteella laskettiin sensitiivisyys, spesifisyys sekä positiivinen ja negatiivinen ennustearvo Xpert® *C. difficile* -testille. Kyseiset laskut ja niistä saadut arvot ovat esitettynä kuviossa 6.

$$\begin{aligned}\text{sensitiivisyys} &= \frac{12}{12+1} \times 100 \approx 92\% \\ \text{spesifisyys} &= \frac{31}{31+1} \times 100 \approx 97\% \\ \text{positiivinen ennustearvo} &= \frac{12}{12+1} \times 100 \approx 92\% \\ \text{negatiivinen ennustearvo} &= \frac{31}{31+1} \times 100 \approx 97\%\end{aligned}$$

KUVIO 6. Xpert® *C.difficile* -testin analysointi matemaattisin parametrein

Laskimme tulosten avulla sensitiivisyyden, spesifisyyden sekä positiivisen ja negatiivisen ennustearvon myös Immunocard® Toxins A&B -testille. Nämä laskut ja saadut tulokset ovat näkyvissä kuviossa 7.

$$\begin{aligned}\text{sensitiivisyys} &= \frac{8}{8+5} \times 100 \approx 62\% \\ \text{spesifisyys} &= \frac{32}{32+0} \times 100 = 100\% \\ \text{positiivinen ennustearvo} &= \frac{8}{8+0} \times 100 = 100\% \\ \text{negatiivinen ennustearvo} &= \frac{32}{32+5} \times 100 \approx 86\%\end{aligned}$$

KUVIO 7. Immunocard® Toxins A&B -testin analysointi matemaattisin parametrein

10 TULOKSET

Kokeellisessa osiossa analysoitu näytemäärä oli lopulta 45. Tämä johtui siitä, että tehdyistä analyyseista saatiin kaksi error -tulosta ja yksi invalid -tulos. Lisäksi tehtiin kaksi pesäkemääritystä sairaalamikrobiologin pyynnöstä. Näitä määrittämiä ei huomioitu laskuissa, sillä ne tehtiin näytteistä, joista oli jo aikaisemmin tehty Xpert® *C. difficile* analyysi suoraan ulosteesta.

Analysoidut ulostenäytteet sisälsivät 13 viljelypositiivista näytettä (29%) ja 32 viljelynegatiivista näytettä (71%). Xpert® *C. difficile* -testi tunnisti viljelypositiivisista ulostenäytteistä 12 sekä 31 viljelynegatiivista näytettä. Näiden lisäksi saatiin yksi väärä negatiivinen ja yksi väärä positiivinen tulos (taulukko 2).

TAULUKKO 2. Xpert® *C. difficile* -menetelmällä saadut tulokset

XPRT® <i>C. difficile</i>	OIKEA POSITIIVINEN	OIKEA NEGATIIVINEN
POSITIIVINEN	12	1
NEGATIIVINEN	1	31

Saatujen tulosten perusteella laskimme Xpert® *C. difficile* -testille sensitiivisyyden, spesifisyyden sekä positiivisen ja negatiivisen ennustearvon. Spesifisyydeksi saimme 97% ja sensitiivisyydeksi 92%. Tutkimus antaa oikean negatiivisen tuloksen 97% todennäköisyydellä ja oikean positiivisen tuloksen 92% todennäköisyydellä (Liite 2).

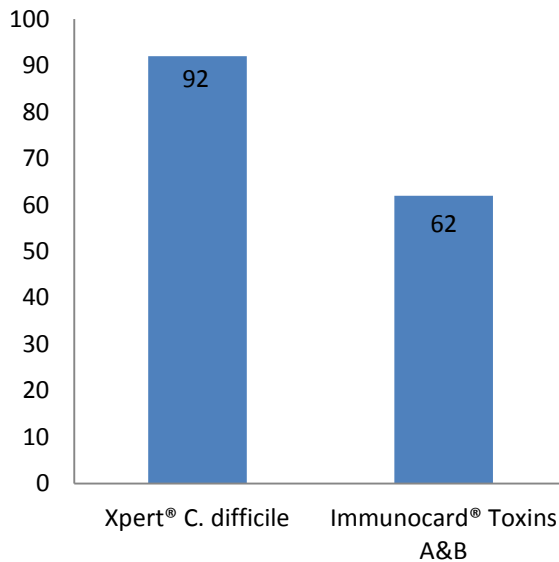
Immunocard® Toxins A&B -testi tunnisti 8 oikeaa positiivista ja kaikki viljelynegatiiviset näytteet. Testi antoi viisi väärää negatiivista tulosta, mutta ei yhtään väärää positiivista tulosta (taulukko 3).

TAULUKKO 3. Immunocard® Toxins A&B –menetelmällä saadut tulokset

Immunocard® Toxins A&B	OIKEA POSITIIVINEN	OIKEA NEGATIIVINEN
POSITIIVINEN	8	0
NEGATIIVINEN	5	32

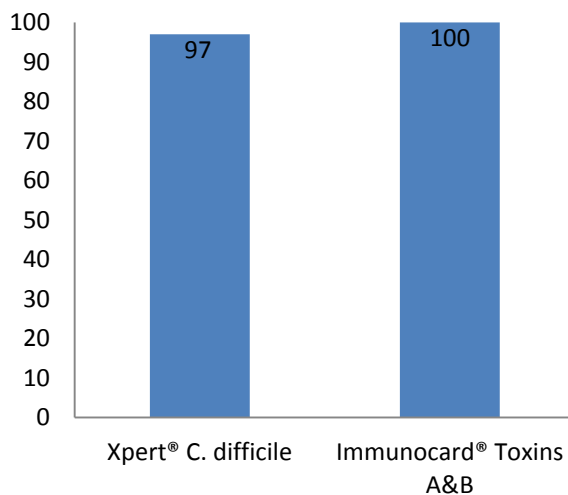
Immunocard® Toxins A&B -testin sensitiivisyydeksi saimme 62% ja spesifisyydeksi 100%. Testin antama positiivinen tulos on siis 100% varmuudella oikea, mutta negatiivinen tulos on oikea negatiivinen vain 86% varmuudella (Liite 3).

Kuviossa 8 on esitetty molempien menetelmien sensitiivisyydet pylväsdiagrammina. Xpert® *C. difficile* -testin sensitiivisyys on 30 prosenttiyksikköä korkeampi kuin Immunocard® Toxins A&B -testin.



KUVIO 8. Menetelmien sensitiivisyydet

Kuviossa 9 olevassa pylväsdiagrammissa on havainnollistettu menetelmien spesifisyyksiä. Siitä huomaa, että menetelmien välillä ei ole suurta eroa. Immunocard® Toxins A&B -testin spesifisyys on vain kolme prosenttiyksikköä suurempi kuin Xpert® *C. difficile* -testin.



KUVIO 9. Menetelmien spesifisyydet

11 POHDINTA

Opinäytetyön tarkoituksena oli tutkia Xpert® *C. difficile* -testin soveltuvuutta *C. difficile* -diagnostiikkaan määrittämällä Xpert® *C. difficile* -testin sensitiivisyys ja spesifisyys ja vertaamalla niitä Immunocard® Toxins A&B -testin vastaaviin arvoihin. Tavoitteenamme oli Xpert® *C. difficile* -testin validointi. Näyttemäärämme oli resurssien takia rajallinen ja verrattain pieni muihin validointeihin verrattuna. Tämän vuoksi näytteitä ei voitu analysoida alun perin suunniteltua määrää eikä toistettavuus- tai uusittavuusmittauksia voitu tehdä. Suuremmalla otannalla olisi saatu vielä luotettavampia tuloksia, mutta saamamme tulokset olivat kuitenkin samankaltaisia aikaisempien tutkimusten kanssa.

Testattava menetelmä Xpert® *C. difficile* on sensitiivisempi (92%) kuin käytössä oleva Immunocard® Toxins A&B (62%). Immunocardilla saadaan siis väärää negatiivisia tuloksia useammin kuin Xpertillä. Saimme Xpert® *C. difficile* -testillä yhden väärän negatiivisen tuloksen viikon vanhasta pakastetusta ulostenäytteestä, josta myös Immunocard® Toxins A&B -testi oli tuoreesta ulosteesta tehtynä antanut negatiivisen tuloksen. Kyseisen ulostenäytteen primaariviljelyssä oli löytynyt yksi *C. difficile*-pesäke, josta oli tehty jatkotutkimuksia ja todettu kannan tuottavan toksiniä. Teimme CCEY-maljalla kasvavista pesäkkeistä uuden ajon Xpert® *C. difficile* -menetelmällä ja saimme positiivisen tuloksen.

Spesifisyydessä Immunocard® Toxins A&B oli testissämme parempi (100%) kuin Xpert® *C. difficile* (97%). Saimme yhden väärän positiivisen tuloksen Xpertillä näytteestä, josta ei todettu viljelemällä *C. difficile*ä. Kyseisellä potilaalla oli kuitenkin vielä kaksi viikkoa aiemmin todettu *C. difficile* ulosteviljelystä. Näin ollen Xpert® *C. difficile* vaikutti potilaan kliiniseen tilaan suhteutettuna jopa liian herkältä. Kuten aikaisemmissakin tutkimuksissa oli huomattu, voi Xpert® *C. difficile* -testi tunnistaa myös pelkkiä *C. difficilen* kantajia. Tämän vuoksi tulisi kiinnittää erityistä huomiota siihen, että näytteeksi hyväksytään vain vetisiä ripuliulosteita.

Immunocard® Toxins A&B -testin ongelma on sen sensitiivisyys. Suoraan ulosteesta tehtyt määritykset ovat usein negatiivisia, vaikka viljelyssä kasvaakin *C. difficile*, joka uudelleen testattuna osoittautuu toksiniä tuottavaksi kannaksi. Näin ollen potilaan diagnoosi viivästyy. Xpert® *C. difficile* -testillä saadaan korkean sensitiivisyyden

ansioista luotettavampia tuloksia suoraan ulosteesta tehdyistä määrittelyistä. Xpert® *C. difficile* -menetelmän käyttöönotto siis nopeuttaisi *C. difficile* diagnostiikkaa, kun positiiviset tulokset saataisiin hoitavalle lääkärille heti ensimmäisen määrittelyn jälkeen, ilman että jouduttaisiin odottamaan viljelytuloksia. Näin ollen potilaan hoito voitaisiin aloittaa aikaisemmin ja huolehtia asianmukaisista eristystoimenpiteistä, joilla estetään infektion leviämistä.

Verrattuna Päijät-Hämeen sosiaali- ja terveystyöryhmässä käytössä olevaan Immunocard® Toxins A&B -testiin, on Xpert® *C. difficile* -testin suoritus yksinkertaisempi. Xpert® *C. difficile* -testi ei vaadi monen eri reagenssin lisäämistä eri aikoihin, vaan sekä näyte että reagenssit lisätään kerralla ja kasetti voidaan laittaa analysaattoriin. Tämä mahdollistaa myös muiden työtehtävien hoitamisen samanaikaisesti. Immunocard® Toxins A&B -testin suorituksessa taas on monia vaiheita, jotka vaativat reagenssien lisäämistä tiettyyn aikaan ja näin ollen testin suoritus sitoo työntekijää enemmän.

Yksi Xpert® *C. difficile* -menetelmän eduista on sen kyky erotella hypervirulentit 027-kannat muista kannoista. Immunocard® Toxins A&B -testi sen sijaan erottaa vain toksiinipositiiviset kannat toksiinia tuottamattomista. Oma otoksemme ei kuitenkaan sisältänyt yhtään hypervirulenttia kantaa, eikä sitä ole vielä esiintynyt PHSOTEY:ssä.

Vertailussa olleet menetelmät eroavat myös kustannuksiltaan. Xpert® *C. difficile* -testi on huomattavasti kalliimpi kuin Immunocard® Toxins A&B -testi. Kustannuksia laskettaessa tulee kuitenkin ottaa huomioon myös työmäärä, sillä Immunocard® Toxins A&B -testi joudutaan usein suorittamaan kahteen kertaan. Myös Xpert® *C. difficile* -testi saatetaan joutua suorittamaan uudestaan, jos laite antaa error tai invalid -tuloksen. Omista määrittelyistämme saatiin kaksi error -tulosta ja yksi invalid -tulos. Xpert® *C. difficile* -menetelmällä saadut error -tulokset johtuivat todennäköisesti kyvetin vaillinaisesta täyttymisestä, sillä molemmissa kyveteissä oli silmin havaittavissa olevat ilmakuplat. Error -tulokset ajettiin uudelleen ottamalla uusi tikkunäyte. Uudelleenajoista saatiin tulokset normaalisti.

Mikrobiologia on pitkään ollut hyvin käsityöpainotteista, mutta myös mikrobiologisia menetelmiä automatisoidaan enenevässä määrin. Molekyylibiologiset sovellutukset, kuten PCR-menetelmät, ovat tulevaisuuden suuntaus myös *C. difficile* diagnostiikassa.

GeneXpert -analysaattorilla voidaan suorittaa myös muuta diagnostiikkaa, kuten MRSA- sekä influenssa A- ja B-määrityksiä. Näitä tutkimuksia varten on olemassa omat testikasetit, joiden validointi olisi hyvä jatkotutkimusaihe.

LÄHTEET

- Agthe, N. 2009. *Clostridium difficile* –infektion aiheuttamat kustannukset ja sairaalahygienisellä interventiolla saavutettava kustannusvaikuttavuus. Kuopion yliopisto. Terveystieteiden ja -talouden laitos. Pro Gradu -tutkielma.
- Anttila, P. 2005. Ilmaisu, teos, tekeminen ja tutkiva toiminta. Hamina: AKATIIMI Oy.
- Anttila, V.-J. & Tissari, P. 2008. Lisääntyneet *Clostridium difficile* -ripulit aiheuttavat kustannuksia ja kuolleisuutta. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 124 (19), 2147-2148.
- Atlas, R.M. & Snyder, J.W. 2011. Reagents, Stains and Media: Bacteriology. Teoksessa Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L. & Warnock, D. W. (toim.) Manual of clinical microbiology. 10. painos. Washington: American society for Microbiology, 291.
- Babady, N. E., Stiles, J., Ruggiero, P., Khosa, P., Huang, D., Shuptar, S., Kampoj, M. & Kiehn, T. E. 2010. Evaluation of the Cepheid Xpert *Clostridium difficile* Epi Assay for Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection and Typing of the NAP1 Strain at a Cancer Hospital. Journal of Clinical Microbiology 48 (12), 4519-4523.
- Baron, E. J. & Tenover, F. C. nd. The Emerging threat of *Clostridium difficile* infection: New Insights into Diagnosis and Disease Management. Sunnyvale: Cepheid.
- Baron, E. J. & Thomson, R. B. Jr. 2011. Specimen collection, Transport, and Processing: Bacteriology. Teoksessa Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L. & Warnock, D. W. (toim.) Manual of clinical microbiology. 10. painos. Washington: American society for Microbiology, 228-271.
- Bustin, S. A. 2005. Real-time PCR. Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics. 1117-1125.
- Cepheid. nd. Xpert® *C. difficile*. Detection of *clostridium difficile* in 45 minutes. Esite. Sunnyvale.
- Cepheid. 2008. GeneXpert Dx System. Käyttöohje. Maurens-Scopont.
- Cepheid. 2010. Xpert® *C.difficile*. Laiteopas. Bromma.
- Clostridium difficile* tunnistaminen. nd. Työohje. Päijät-Hämeen sosiaali- ja terveystyöntekijät.
- Dawson, L., Valiente, E. & Wren, B.W. 2009. *Clostridium difficile* – A continually evolving and problematic pathogen. Infection, genetics and Evolution 6 (9), 1410-1417.
- Dupuy, B., Govind, R., Antunes, A. & Matamouros, S. 2008. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. Journal of Medical Microbiology 57 (6), 685-688.

Esko, E. sairaalamikrobiologi. 2012. Henkilökohtainen tiedonanto. Saatu 21.8.2012 sähköpostilla.

F-Clostridium difficile, viljely ja toksiinin osoitus. nd. Työohje. Päijät-Hämeen sosiaali- ja terveysyhtymä.

Garborg, K., Waagsbo, B., Stallemo, A., Matre, J. & Sundoy, A. 2010. Results of faecal donor instillation therapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 42 (11-12), 857.

Gross, J. H. 2004. Mass Spectrometry. Heidelberg: Springer.

Heikkilä, T. 2008. Tilastollinen tutkimus. Helsinki: Edita.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2008. Tutki ja kirjoita. 13. painos. Helsinki: Tammi.

Huang, H., Weintraub, A., Fang, H. & Nord, C. E. 2009. Comparison of a Commercial Multiplex Real-Time PCR to the Cell Cytotoxicity Neutralization Assay for Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections. Journal of Clinical Microbiology 47 (11), 3729-3731.

Huotari, P. Immunodiagnostic Oy:n mikrobiologian tuotepäällikkö. 2012. Henkilökohtainen tiedonanto.

Ikäheimo, I. 2002. Käytännön esimerkkejä kliinisen mikrobiologian menetelmien validoinnista ja verifiointista. Moodi 26 (1), 13.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita.

Jalava, J., Eerola, E., Lindholm, L., Meurman, O. & Virolainen-Julkunen, A. 2009. *Clostridium difficile*en toteaminen ja kantojen tyypitys. Moodi 33 (5), 246-251.

Kuehne, S. A., Cartman, S. T., Heap, J. T., Kelly, M. L., Cockayne, A. & Minton, P. 2010. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature 467 (7316), 711-713.

Kuipers, E. J. & Surawicz, C. M. 2008. *Clostridium difficile* infection. The Lancet 9623 (371), 1486-1488.

Könönen, E., Rasinperä, M., Virolainen, A., Mentula, S. & Lyytikäinen, O. 2009. Diagnostic trends in *Clostridium difficile* detection in Finnish microbiology laboratories. Anaerobe 6 (15), 261-265.

Laine, J. 2010. *Clostridium difficile* –ripuli. Julkaistu 9.6.2010. Luettu 25.10.2011. www.terveysportti.fi.

Leffler, D. A. & Lamont, J. T. 2012. Not So Nosocomial Anymore: The Growing Threat of Community-Acquired *Clostridium difficile*. American journal of gastroenterology 1(107), 96-98.

Liimatainen, O. 2002. Menetelmien validointi ja verifiointi kliinisen mikrobiologian laboratoriossa: yleisiä periaatteita. Moodi 26 (1), 12-13.

Lumio, J. 2012. *Clostridium difficile* -bakteerin aiheuttama ripuli (antibioottiripuli). Päivitetty 5.3.2012. Luettu 10.9.2012. <http://www.terveyskirjasto.fi>

Lyras, D., O'Connor, J. R., Howarth, P. M., Sambol, S. P., Carter, G. P., Phumoonna, T., Poon, R., Adams, V., Vedantam, G., Johnson, S., Gerding, D. N. & Rood, J. I. 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 458 (7242), 1176-1179.

Lyytikäinen O., Mentula S., Kononen E., Kotila S., Tarkka E., Anttila V-J., Mattila E., Kanerva M., Vaara M. & Valtonen V. 2007. First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Finland. *Eurosurveillance*. 12 (45), 3303.

Mattila, E., Uusitalo-Seppälä, R., Wuorela, M., Lehtola, L., Nurmi, H., Ristikankare, M., Moilanen, V., Salminen, K., Seppälä, M., Mattila, P. S., Anttila, V-J. & Arkkila, P. 2012. Fecal Transplantation, Through Colonoscopy, Is Effective Therapy for Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology* 142 (3), 490-491,494.

McCollum, D. L. & Rodriguez, J. M. 2012. Detection, Treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Clinical gastroenterology and hepatology* 6 (10), 581-592.

Meridian Bioscience. 2009. Immunocard® Toxins A & B. Käyttöohje. Villa Cortese.

Miettinen, M. 2011. Analyttinen laatu ja sen varmennus. Luento. Tampereen ammattikorkeakoulu. Tampere.

Neogen. 2011. Fastidious anaerobe agar. Esite. Päivitetty 3.3.2011. Luettu 10.9.2012. www.neogen.fi

Nienstedt, W., Rautiainen, E., Pernaa, M., Salmi, U. & Pirttimaa, H. (toim.) 2002. Lääketieteen termit. 4. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

O'Connor, J. R., Johnson, S. & Gerding, D. N. 2009. *Clostridium difficile* Infection Caused by the Epidemic BI/NAP1/027 Strain. *Gastroenterology* 136 (6), 1913-1924.

Pancholi, P., Kelly, C., Raczowski, M. & Balada-Llasat, J. M. 2012. Detection of Toxigenic *Clostridium difficile*: Comparison of the Cell Culture Neutralization, Xpert® *C. difficile*, Xpert® *C. difficile*/Epi and the Illumigene™ *C. difficile* Assays. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (4), 1331-1335.

Pikkarainen, A-L. 2000. Laadunvarmistus ja laadunohjaus analyttisessä laboratoriossa. Helsinki: Merentutkimuslaitos.

Rautio, M. 2010. Clostridium –lajit. Teoksessa Hedman, M., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet* osa 1. 1. painos. Helsinki: Duodecim, 235.

Stevens, D., Bryant, A., Berger, A., & Eichel-Streiber, C. 2011. Clostridium. Teoksessa Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L. & Warnock, D. W. (toim.) *Manual of clinical microbiology*. 10. painos. Washington: American society for Microbiology, 834-835.

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Tissari, P. 2008. *Clostridium difficile* –diagnoosiikka tänään. Suomen sairaalahygienialehti 26 (6), 304.

Turner, B. J., Williams, S., Taichman, D. & Hessen, M. T. 2010. *Clostridium difficile* Infection. Annals of Internal Medicine 153 (7), 2-13.

Uhari, M. & Nieminen, P. 2012. Epidemiologia ja biostatistiikka. 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Uusitalo-Seppälä, R. & Moilanen, V. 2010. Paksunsuolen normaalin bakteerikannan palautus eli ulosteensiirto toistuvan *Clostridium difficile* aiheuttaman ripulin hoidossa. Suomen Sairalahygienialehti 28 (1), 14-22.

Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost, E. & McDonald, L. C. 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. The Lancet 366, 1079-1084.

Weston, D. 2008. Infection prevention and control. Theory and practice for healthcare professionals. John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex.

Wilcox, M.H., Mooney, L., Bendall, R., Settle, C.D. & Fawley, W.N. 2008. A case-control study of community associated *Clostridium difficile* infection. Journal of antimicrobial chemotherapy 62 (2), 388.

LIITTEET

Liite 1. Tulokset taulukoituna

1 (2)

	Näytenumero	Xpert	Toxins A & B	Viljely
1	12C00272	neg	neg	neg
2	12C00273	neg	neg	neg
3	12C00275	pos	pos	pos
4	12C00276	neg	neg	neg
5	12C00277	neg	neg	neg
6	12C00278	neg	neg	neg
7	12C00279	pos	neg	pos
8	Pesäke 279	pos		
9	12C00281	neg	neg	neg
10	12C00282	pos	pos	pos
11	12C00283	pos	neg	pos
12	12C00290	pos	pos	pos
13	12C00291	neg	neg	neg
14	12C00289	pos	neg	pos
15	12C00295	INVALID		
16	12C00287	ERROR		
17	12C00287-2	neg	neg	neg
18	12C00288	neg	neg	neg
19	12C00285	neg	neg	neg
20	12C00292	neg	neg	neg
21	12C00293	neg	neg	neg
22	12C00294	neg	neg	neg
23	12C00297	pos	pos	pos

Näytteet 1-23 olivat jääkapissa säilytettyjä.

(jatkuu)

	Näytenumero	Xpert	Toxins A & B	Viljely
24	12C00235	pos	pos	pos
25	12C00236	ERROR		
26	12C00236-2	pos	neg	neg
27	12C00242	neg	neg	neg
28	12C00238	neg	neg	neg
29	12C00241	neg	neg	neg
30	12C00260	neg	neg	neg
31	12C00271	neg	neg	neg
32	12C00245	neg	neg	neg
33	12C00268	neg	neg	neg
34	12C00267	neg	neg	neg
35	12C00263	neg	neg	neg
36	12C00261	neg	neg	neg
37	12C00266	pos	pos	pos
38	12C00237	neg	neg	neg
39	12C00239	neg	neg	neg
40	12C00264	pos	pos	pos
41	12C00269	neg	neg	neg
42	12C00262	pos	pos	pos
43	12C00270	neg	neg	pos
44	Pesäke 270	pos		
45	12C00240	neg	neg	neg
46	12C00244	pos	neg	pos
47	12C00255	neg	neg	neg
48	12C00257	neg	neg	neg
49	12C00256	neg	neg	neg
50	12C00258	neg	neg	neg

Näytteet 24-50 olivat pakastettuja (-20°C).