

# **VERIMALJALLA KASVAVIEN BAKTEERIEN TUNNISTAMINEN DMS-TEKNIIKALLA**

Jaakko Lepomäki ja Artturi Kesti  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta  
Kirurgian professori Oksalan tutkimusryhmä  
Helmikuu 2018

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta  
Kirurgian professori Oksalan tutkimusryhmä

LEPOMÄKI JAAKKO JA KESTI ARTTURI: VERIMALJALLA  
KASVAVIEN BAKTEERIEN TUNNISTAMINEN DMS-TEKNIIKALLA

Kirjallinen työ, 21 sivua.

Ohjaaja: LT Antti Roine ja kirurgian professori Niku Oksala

Helmikuu 2018

Avainsanat: elektroninen nenä, bakteremia, VOC

-----

Tutkimme DMS-teknologiaan perustuvan elektronisen nenän kykyä tunnistaa verimaljalla kasvavia bakteereita. Näytteinämme oli 642 Fimlabin näytevirrasta kerättyä verimaljaa, joilla kasvoi tunnistettuja bakteereita. Analyysiin valikoitui 537 näytettä 15:sta eri bakteerilajista. Ulos rajautuivat ne bakteerilajit, joita esiintyi alle 10 kappaletta koko aineistossa.

Käyttämämme elektroninen nenä tunnisti oikein 70.7% analysoiduista bakteereista. Suurimmat sekaannukset aiheutuivat lähisukuisten bakteerien kanssa, esimerkiksi 12.5% *Str. Pyogenes* -bakteerista tunnistettiin *Str. Pneumoniae* -bakteeriksi molempien ollessa Grampositiivisia streptokokkeja.

Tutkimuksemme osoitti DMS-teknologian mahdollistavan bakteerien tunnistamisen ilman huolellista esivalmistelua ja varsin lyhyessä ajassa. Aikaisempiin tutkimuksiin nähden koeasetelmamme oli vähemmän kontrolloitu, koska se oli toteutettu käytännön olosuhteissa.

Tuloksemme perusteella voidaan suunnitella jatkotutkimuksia kliinistä diagnostiikkaa varten. Jatkossa tavoitteellista olisi validoida laitteisto tunnistamaan tuoreita tai lyhyen aikaa viljeltyjä näytteitä. Tutkimuksemme virhelähteet ja puutteet antavat myös hyviä kehitysajatuksia tulevien koeasetelmien sekä laitteistojen suunnitteluun.

# SISÄLLYSLUETTELO

## 1 TAUSTA

### 1.1 Bakteerien tunnistaminen

1.1.1 Menetelmiä bakteerien ja antibioottiresistenssien tunnistamiseen

1.1.2 Bakteeriviljely

1.1.3 Maldi-TOF MS

1.1.4 PCR

### 1.2 Elektroninen nenä

1.2.1 Haistaminen ja haihtuvat molekyylit

1.2.2 Elektronisen nenän toimintaperiaate

1.2.3 DMS-tekniikka

### 1.3 Menetelmien hyödyntäminen bakteeridiagnostiikassa

## 2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITTEET

## 3 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 3.1 Aineisto

### 3.2 Menetelmät

3.2.1 Tilastolliset menetelmät

## 4 TULOKSET

## 5 POHDINTA

## 6 JOHTOPÄÄTÖKSET

## 7 LÄHTEET

## 1.1 TAUSTA

Bakteerit ovat prokaryoottisia eliöitä, joita esiintyy kaikkialla. Bakteerit voivat aiheuttaa sairauksia ihmisille syrjäyttämällä elimistön normaalin flooran kasvamalla hallitsemattomasti elimistön osissa, joissa ei normaalisti ole bakteereja. Tulehduksia bakteerit aiheuttavat erittämällä elimistöä ärsyttäviä entsyymejä ja muita elimistöön kuulumattomia proteiineja, jotka laukaisevat immuunipuolustuksen. Bakteerien varhainen tunnistaminen mahdollistaa hoidon aloittamisen ennen tulehduksen leviämistä ympäröiviin kudoksiin. Etenkin verenkierrrossa kasvavien bakteerien nopea tunnistaminen ja hoito ovat tärkeitä elimistön homeostaasin ylläpitämiseksi.

### 1.1 Bakteerien tunnistaminen

Bakteeridiagnostiikka vaatii kolmen ammattiryhmän saumatonta yhteistyötä. Kliinikko tarvitsee tiedon bakteerin antibioottiresistenssistä ja laboratoriotyöntekijä pystyy tekemään laajasti analyyskejä tiedon saamiseksi. Näytteenottaja huolehtii näytteen laadusta ja kuljetuksen mahdollistamisesta. Huonosti otettu näyte ei anna edustavaa kuvaa tutkittavasta kohteesta eikä välttämättä tarjoa riittävästi materiaalia analyysin suorittamiseksi. Kliinikon tehtävä on kysymyksenasettelulla rajata tutkittavaa asiaa, jotta laboratorio osaa kohdentaa tutkimuksensa varman diagnoosin saamiseksi. Tilattu tutkimus vaikuttaa usein näytteenottotekniikkaan, esimerkiksi veren litiumpitoisuusnäytettä ei voida ottaa litium-hepariini-veriputkeen. Kun näytteenottaja tuntee kliinikon tarpeen ja tietää laboratorion vaatimukset, saadaan edustavampia näytteitä ja tarkempia tuloksia.<sup>1</sup>

### 1.1.1 Menetelmiä bakteerien ja antibioottiresistenssien tunnistamiseen

Bakteerit voidaan jakaa eri luokkiin lukuisilla tavoilla. Kliinisesti tärkeintä on selvittää bakteerin vastustuskyky antibiootteja kohtaan. Osa bakteerilajeista on luonnostaan resistenttejä joillekin antibioottiryhmille, joten jo lajintunnistuksella saadaan tietoa antibioottiresistenssistä. Perinteisin jako bakteerien välillä perustuu bakteerien peptidoglykaaniseinämän paksuuteen. Gram-värjäys jakaa bakteerit positiivisiin ja negatiivisiin. Grampositiivinen bakteeri värjäytyy sinivioletiksi pelkällä gramvärjäyksellä, koska paksu peptidoglykaaniseinäjä sitoo itseensä väriä. Ohut peptidoglykaaniseinäjä päästää gram-värin solun sisään ja värjäyksen huuhteluvaiheessa myös ulos solusta. Nämä Gramnegatiiviset bakteerit värjätään mikroskopoinnin helpottamiseksi vaaleanpunaisiksi safraniinilla. Grampositiiviset ovat keskimäärin herkempiä antibiooteille soluseinän yksinkertaisemman rakenteen vuoksi.

Pelkällä Gram-värjäyksellä ei saavuteta tietoa bakteerin antibioottiresistenssistä. Värjäys on olennainen osa bakteerin tunnistamista, mutta yksittäisenä tutkimuksena se ei tuota riittävästi informaatiota hoidon aloittamiseksi.

Bakteereilla esiintyy muotoja, joiden mukaan ne lajitellaan morfologisiin ryhmiin. Pyöreitä kutsutaan kokeiksi, sylinterimäisiä sauvoiksi ja kierteisiä sylinterimäisiä spirilleiksi. Kliinisesti pelkän morfologian avulla ei voida päästä tarkkaan diagnoosiin, mutta kuten gram-värjäyskin, tuottaa morfologian tutkiminen lisätietoa mahdollisesta infektion aiheuttajasta.

Osa bakteereista tuottaa hemolyyttisiä entsyymejä. Verimaljalla kasvaessaan näiden bakteerien ympärillä nähdään tyypillinen vaaleampi alue, joilta hemoglobiini on pilkkottu. Alfahemolyyttinen solu pilkkoo hemoglobiinin osittain vihertäväksi. Beetahemolyyttinen kanta pilkkoo hemoglobiinin kokonaan, jolloin verimaljalla nähdään selkeämpi kirkastuma bakteeripesäkkeen ympärillä.

Fysikaalisiakin olosuhteita käytetään bakteerien tunnistamisessa. Osa kannoista kestää kuumuutta muita paremmin, toiset happamuutta. Peroksidia hyödyntämällä voidaan erotella katalaasi-entsyymiä tuottavat kannat sitä tuottamattomista.

Kun erilaisista tutkimuksista saatua tietoa yhdistellään, päästään usein diagnoosiin bakteerin lajista. Mikroskoopilla nähdään gram-värjäyksen tulos ja samalla bakteerin morfologia. Bakteripesäkkeen kasvutapa eri maljoilla yhdistettynä mahdollisiin erityisvärjäyksiin ja tietoon näytteen alkuperästä antaa usein riittävän tiedon työdiagnoosin asettamiseksi ja antibiootin empiiriseen aloittamiseen.

Joissakin infektiotilanteissa empiirisesti aloitetulla antibiootilla voidaan hoitaa kliinisesti riittävä määrä infektioista hyvin, esimerkkinä avohoitopneumonian hoito amoksisilliinilla. Kuitenkin usein tarvitaan bakteerin tunnistamista joko infektion erottamiseksi virustulehduksesta tai spesifin antibiootihoidon aloittamista varten. Jos bakteeri on resistentti valittua antibioottia vastaan, johtaa empiirisesti valittu hoito huonompaan lopputulokseen ja tilanteen pitkittymiseen. Empiirinen antibiootti haittaa myöhempää herkkyysdiagnoosiikkaa, joten näytteenottoon tulee kiinnittää huomiota jo ennen antibiootin aloittamista. Septisissä infektioissa oikea-aikainen diagnostiikka ja oikean antibiootin aloittaminen parantavat selvästi potilaan ennustetta.<sup>2</sup>

### **1.1.2 Bakteeriviljely**

Bakteeriviljely tarkoittaa bakteerien hallittua kasvattamista niiden tunnistamiseksi. Yleisesti käytetty menetelmä on viljellä bakteereita petrimaljalle valetulla alustalla. Yleisimmin käytettyjä alustoja ovat Agar-levästä tehty elatusaine, veri-agar ja niin kutsuttu suklaamalja. Veri-agarissa tavanomaiseen elatusaineeseen on lisätty verta, joka tarjoaa monipuolisemmin ravintoaineita kasvaville bakteereille ja toisaalta antaa diagnostisen työkalun hemolyyttisiä bakteereita tunnistettaessa. Suklaamaljat poikkeavat veri-agareista siten, että niiden veri on keitetty ennen bakteerien viljelyä verisolujen hajottamiseksi. Hajonneista

verisoluista vapautuu ravintoaineita bakteerien kasvulle, jolloin saadaan paremmin esimerkiksi hemofilus- ja meningokokkikantoja.<sup>1</sup>

Bakteeriviljelmälle voidaan asettaa antibioottikiekko, jolloin bakteerin lisääntyessä nähdään, estääkö antibiootti bakteerin kasvua.

Laboratoriostandardien mukaan 5 mm tai suurempi etäisyys antibiootista bakteerikasvustoon tarkoittaa herkkyyttä kyseiselle antibiootille. Viljelyyn liitetyllä herkkyyskokeella saadaan siis suoraan tietoon mahdolliset antibioottiresistentit kannat sekä bakteeriin purevat antibiootit. Viljelyn suurin heikkous on sen hitaus. Keskimäärin varman viljelytuloksen ja resistenssimäärittelyn saaminen kestää noin 2 vuorokautta.

### 1.1.3 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF eli *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* on tarkka bakteerien tunnistusmenetelmä. Se käyttää hyväkseen massaspektrometria ja tunnistaa tämän avulla hajotettujen bakteereiden proteiiniprofiilit. MALDI-TOF MS tunnisti eri bakteerilajit 95,2% tarkkuudella<sup>3</sup> ja toisessa tutkimuksessa 94,4% tarkkuudella.<sup>4</sup> Seng et al myös arvioi, että MALDI-TOF MS olisi noin neljäsosan kustannustehokkaampaa kuin perinteinen automaattinen viljely. MALDI-TOF -laitteisto on kuitenkin kallis ja näitä on saatavilla ainoastaan suurissa laboratorioissa. Tällä menetelmällä bakteerin eristämisestä ja viljelystä luotettavaan tulokseen kuluu aikaa 1h-24h<sup>4</sup>, joten parhaimmissakaan tapauksissa tuloksia ei saa heti, mutta se on nopeampaa kuin bakteeriviljely.

### 1.1.4 PCR

PCR eli polymerase chain reaction on erittäin tarkka ja herkkä testi, siksi se onkin tällä hetkellä kultainen standardi mikrobien tunnistamisessa ja erottelussa.<sup>5</sup> Tässä menetelmässä tietty kohta bakteerien DNA:sta monistetaan koeputkessa ja tämän jälkeen se tunnistetaan tietyillä

kaupallisesti valmistetuilla koettimilla. PCR-tekniikan etuna on sen korkea herkkyys. PCR pystyy tunnistamaan bakteerit verestä vaikka potilalle olisi aloitettu antibioottikuuri. Tällöin esimerkiksi bakteeriviljely yleensä jää negatiiviseksi. Toisaalta pienikin määrä ulkopuolista DNA:ta monistusputkessa voi tehdä tuloksista väärän, joten tässä tunnistustekniikassa virheen mahdollisuudet ovat korkeat. PCR tekniikka vaatii myös kalliit laitteistot, oikeat olosuhteet ja koulutetun henkilökunnan.<sup>6</sup>

Nykyään on olemassa Real-Time-PCR bakteerintunnistusmenetelmiä, jotka ovat nopeampia kuin perinteinen PCR. Lehrmann et al tutkimusryhmä mittasi näytteiden keräämisestä tulosten valmistumiseen 4.5h ajan. Tämä testi oli tehty kaupallisella SeptiFast® tekniikalla. Tällä tekniikalla saatiin testin sensitiivisyydeksi 82% ja spesifisyydeksi 60%, kun etsittiin patogeeneja virtsanäytteistä.<sup>7</sup>

PCR:n herkkyys hankaloittaa diagnostiikkaa erityisesti silloin, kun jonkin kehonosan normaalifloora aiheuttaa infektioita. Esimerkiksi *Clostridium Difficile* kuuluu suolen normaaliin bakteerikantaan, mutta PCR antaa herkkyytensä vuoksi usein positiivisen tuloksen myös kliinisesti terveessä tilanteessa.

## 1.2 Elektroninen nenä

### 1.2.1 Haistaminen ja haihtuvat molekyylit.

Hajuaistilla on tärkeä rooli eläinten ja ihmisten toiminnanohjauksessa. Ravinnonhankinta ja -etsintä perustuvat paitsi näkö- myös hajuaistiin. Hajuaistin avulla voidaan havaita haitallisia tai vaarallisia kohteita. Esimerkiksi pilaantunut liha tai hedelmä hylätään usein hajun perusteella, vaikka ulkonäöltään ravinnossa ei olisi vikaa. Hajuaistilla on osuutensa myös parinmuodostuksessa, tästä esimerkkinä uroskoirien käytöksen muutos kiimaisen nartun läheisyydessä.

Lääketieteessäkin hajuaistilla on roolinsa. Kokenut klinikko osaa päätellä jo haavan hajusta infektion mahdollisuutta. Hengityksen haistaminen voi



kertoa potilaan päihtymyksestä tai ohjata ajattelua metaboliseen häiriöön. Hajuaistilla on tärkeä rooli ihmiskehon tarvitseman ravinnon saannin säätelyssä ja varoitusjärjestelmänä silloin, jos ihminen altistuu vaarallisille haihtuville yhdisteille. Jos hajuaisti puuttuu, voi se olla riskitekijä esimerkiksi työelämässä. Hajuaisti on myös merkittävä elämänlaadun kannalta, sen puuttuminen voi heikentää elämänlaatua.<sup>8</sup>

Haistaminen perustuu haihtuviin molekyyliin. NTP-olosuhteissa (normal temperature and pressure) kaasumaisessa olomuodossa olevien orgaanisten molekyylien tyypillinen kiehumispiste on korkeintaan 250°C. Suuremmat molekyylit eivät esiinny kaasuna riittävän suurina pitoisuuksina hajuaistin havaittavaksi.<sup>9</sup>

Hajuaistimus syntyy, kun hajumolekyyli kulkeutuu nenän kautta hajureseptorille nenäontelon yläosaan. Tästä syntyy hajureseptorin kemiallinen stimulaatio, josta muodostuu viesti otsalohkon alla sijaitsevaan hajukäämiin. Hajukäämistä sähkökemiallinen viesti siirtyy aivoihin käsiteltäväksi.

Kaasukromatografia ja myöhemmin massaspektrometria loivat pohjan elektroniselle haistamiselle. Käytännössä elektronisessa haistamisessa pyritään tunnistamaan kohteet haihtuvien molekyylien laatu mahdollisimman tarkasti. Massaspektrometrialla voidaan tunnistaa kappaleet erittäin tarkasti. Ongelmana massaspektrometriassa on paitsi laitteen suuri koko ja hinta, myös tutkimuksen hitaus. Kaasukromatografiaa ja massaspektrometriaa yhdistelevät laitteet ovat toki tarkempia erottelemaan partikkeleita, mutta yhdistelmälaiteiston ongelmat ovat samoja kuin massaspektrometrian.

### **1.2.2 Elektronisen nenän toimintaperiaate**

Jotta sähkökenttää voidaan käyttää partikkeleiden erottamiseen toisistaan, tulee niiden olla varautuneita positiivisesti tai negatiivisesti, eli olla ionisoituneita. Esimerkiksi tasaisella säteilylähteellä (radioaktiivinen isotooppi) voidaan ionisoida tutkittavia kappaleita.

Massaspektrometrian kvantitatiivisen analyysin sijaan nykyiset elektroniset nenät perustuvat kvalitatiiviselle analyysille. Erilaisten sensoreiden avulla pyritään luomaan haihtuvista yhdisteistä spektri, jonka avulla tunnistaminen tehdään.

Elektronista nenää edelsi IMS-teknologiaan (ionimobilitaettispektrometria) perustuva tunnistusjärjestelmä. IMS-teknikka poikkeaa massaspektrometriasta siten, että analysoidut partikkelit liikkuvat tyhjiön sijaan standardoidussa, poolisia molekyylejä sisältävässä, väliaineessa. Tällaiseksi väliaineeksi sopii esimerkiksi kosteusvakioitu ilma, missä vesimolekyylit toimivat poolisena komponenttina. IMS-teknikassa kappaleen liikkeeseen vaikuttaa siis massan ja varauksen lisäksi muoto ja polaarisuus.

Elektronisen nenän toimintaperiaate on samankaltainen nisäkkäiden hajuaistin kanssa. Näytteistysvaiheessa pyritään tasalaatuistamaan sensorille saatavat näytteet vertailukelpoisuuden mahdollistamiseksi. Vastaava näytteistysvaihe tapahtuu nisäkkäillä nenäontelossa, jossa haistettavaa ilmaa suodatetaan, lämmitetään ja sen ilmankosteus kasvaa. Elektronisessa nenässä hajuepiteeliä vastaa sensori, joka vastaanottaa hajumolekyylin ja tuottaa mitattavan ärsyksen. Sensoreiden tuottaman tiedon analysoi tietokone siinä missä hajuepiteelin ärsykkeiden tulkinnasta vastaa aivokuoren hajualueet yhdessä muun aivokuoren kanssa.<sup>10</sup> Keinotekoisessa haistamisessa voidaan käyttää useita erilaisia sensoreita. Yksinkertaisin näistä on metallioksidipuolijohdesensori. Sen toiminta vaatii korkeita lämpötiloja, mikä lisää energiankulutusta. Aistiminen tapahtuu hajumolekyylien muuttaessa sensorin sähkönjohtavuutta. Yksinkertaisuutensa vuoksi tällaiset sensorit ovat edullisia ja kestäviä.<sup>11 12 13</sup> Osa uusista sensoreista mahdollistaa huoneenlämpöisen toiminnan. Esimerkiksi erilaiset polymeereistä valmistetut sensorit eivät vaadi runsaasti energiaa toimiakseen. Muita sensoryyppöjä ovat muun muassa valoreaktioihin perustuvat sensorit sekä pietsokide- ja nanoputkisensorit. Sensoreista voidaan valita sopiva kokonaisuus laitteiston ja tutkimusasetelman tarpeiden mukaan.

Elektroninen nenä pyrkii analysoimaan haistettavan näytteen kokonaishajun. Mitä vähemmän ennakkovalmisteluita näytteelle tarvitaan, sitä nopeampaa tällaisen laitteen käyttäminen kohteen tunnistamiseen on. Nisäkkään nenä toimii myös tällä tavalla, eikä luonnollisissa olosuhteissa hajun väkevöittämiseen tai muuhun valikointiin ole juuri mahdollisuutta. Kuten aivokuori, voi tietokonekin oppia tunnistamaan hajuspektrejä vertaamalla näytettä aiempiin tunnistettuihin hajuihin.

### 1.2.3 DMS-teknikka

DMS eli differentiaalimobiliteettispektrometria on ionimobiliteettispektrometrian erikoistapaus, jossa varatut hiukkaset viedään väliaineessa kahden elektrodin väliin, johon luodaan epäsymmetrinen sähkökenttä ajan funktiona. Tämän kentän ansiosta varautuneet hiukkaset liikkuvat tietyllä ajanhetkellä tiettyyn suuntaan. Detektorille pääsee varaukseltaan erilaisia hiukkasia, koska sähkökenttä vaihtuu. Näin saadaan haihtuvasta näytteestä "sormenjälki", jota voidaan verrata tausta-aineistoon.<sup>14</sup>

Tässä tutkimuksessa käytettiin DMS-teknikkaa bakteerimaljoilla kasvavien bakteerien "sormenjälkien" tunnistamiseksi.

## 1.3. Menetelmien hyödyntäminen bakteeridiagnostiikassa

Elektronisella nenällä voidaan tunnistaa bakteereita niistä haihtuvien molekyylien avulla. Pavlou et al. viljeli verimaljoilla *Clostridium*-kantoja ja *Bacteroides Fragilista*. He pystyivät erottamaan bakteerikannat toisistaan ja puhtaista verimaljoista käyttäen 14-sensorista elektronista nenää. He myös luokittelivat oikein 8 tuntematonta bakteerimaljaa hyödyntäen ristiinvalidointia.<sup>15</sup> Yusuf et al. tunnistivat erinomaisella erottelukyvyllä diabeetikkojen jalkahaavojen bakteerikantoja. He pystyivät erottamaan mono- ja polybakteriaaliset kannat toisistaan myös eri kasvualustoilla luotettavasti. Heidän elektronisella nenällään voitiin erottaa myös yksin

kasvavat bakteerikannat sekakannassa kasvavista lajitovereistaan.<sup>16</sup> Roine et al. osoitti elektronisen nenän hyödyllisyyden virtsateiden bakteeri-infektioiden diagnostiikassa. He erottivat bakteerimaljan steriilistä 95% herkkyydellä ja 97% tarkkuudella. Eri bakteerikannat he tunnistivat toisistaan 95% herkkyydellä ja 96% tarkkuudella.<sup>17</sup> Bruins et al tunnisti keskimäärin 87% oikein 6-8 tunnin aikana. Heidän koeasetelmassaan elektroninen nenä seurasi VOC:ien muodostumista bakteeriviljelyn aikana keräten dataa jatkuvasti.<sup>18</sup>

## **2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITTEET**

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, pystytäänkö tutkimusasetelmassa käytetyllä laitteistolla erottamaan eri bakteerikantoja toisistaan.

Tarkoituksena oli haistella verimaljalla Fimlabin laboratoriestandardien mukaan viljeltyjä bakteereita suoraan näytevirrasta ilman ennakkovalmisteluita.

Tavoitteena oli luoda pohjaa kliiniseen diagnostiikkaan veressä kasvavien bakteerien tunnistamiseksi.

## **3 AINEISTO JA MENETELMÄT**

### **3.1 Aineisto**

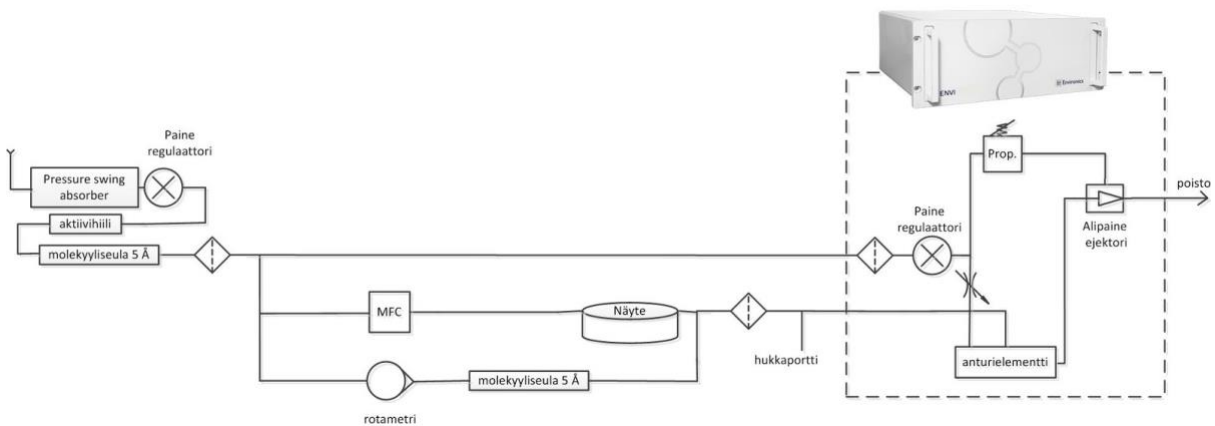
Aineistona tutkimuksessa oli 642 verimaljalla viljeltyä bakteeria.

Tutkimuksen aineistoon sisältyi yhteensä 42 eri bakteerilajia. Näistä tilastollisen analyysin ulkopuolelle rajattiin kaikki lajit, joita esiintyi alle kymmenen kertaa koko aineistossa.

Rajattuun aineistoon kuului 537 analysoitua bakteerimaljaa yhteensä 15:sta eri bakteerilajista. Kunkin bakteerin määrät on listattu taulukkoon 1.

### 3.2 Menetelmät

Tutkimuksessa käytetyt bakteerit kerättiin valikoimatta Fimlabin näytevirrasta. Bakteerit viljeltiin veri-agar-maljoilla Fimlabin standardien mukaisesti. Veri-agarimaljat oli tehty 92 mm x 16 mm Petri-maljoille. Viljely toteutettiin ilman antibioottiherkkyysmäärittystä. Bakteereja viljeltiin normaalin protokollan mukaan. Näytteet analysoitiin huoneenlämpöisinä ilman esivalmisteluita ja keskenään satunnaisessa järjestyksessä. Järjestelmän puhtauden ylläpitämiseksi bakteerinäytteiden välillä näytekammiossa pidettiin puhdasta vettä, joka huuhtoi putkistosta bakteereista haihtuneita molekyylejä.



Kuva 1. Laitteiston kytkentäkaavio

Kuva 1 esittää tutkimuksessa käytettyä bakteerien mittauslaitteistoa. Pääkomponenttina Environics Oy:n kaupallisesti valmistama Envi AMC-laitte. Paineilmaa syötetään letkustoon, jossa se puhdistetaan ja kosteusvakioidaan. Ilma viedään näytekammion läpi, josta se kulkeutuu Envi AMC -laitteelle. Näytteen sisältävään letkustoon on saatava tasainen paine, joten ilma ohjataan myös paineregulaattorille, joka pitää ilmanpaineen tasaisena. Molekyyliseula on tutkimuksessa käytetyssä laitteistossa korvattu kalvokuivaimella.

Tutkimuksessa käytettiin kaupallisesti valmistettua Envi AMC -sensoria (Environics Oy, Mikkeli, Finland). Tässä sensorissa käytetään hyväksi DMS-tekniikkaa. Envi AMC -laitteeseen on liitetty Tampereen teknillisessä yliopistossa valmistettu näytteenottojärjestelmä, joka liittyy näytekammion

ja paineilman sensoriin. Kuljetuskaasuna (eng. *carrier gas*) käytettiin kuivattua ja aktiivihilellä puhdistettua paineilmaa.

### 3.2.1 Tilastolliset menetelmät

Aineisto analysoitiin Matlab-ohjelmistoa käyttäen. Käytetty tilastollinen menetelmä oli *K Nearest Neighbor* -luokittelu, jossa luokittelijana käytettiin arvoa yksi. Tulokset ristivalidoitiin käyttäen leave-one-out -ristivalidaatiota.

## 4 TULOKSET

Koeasetelmalla pystyttiin tunnistamaan verimaljalla kasvavat bakteerit 65.1% tarkkuudella. Kun tuloksista poistetaan ne bakteerit, jotka esiintyvät aineistossa alle 10 kertaa, tarkkuus oli 70.7%. Todennäköisyys saada oikea tulos sattumalta 15:sta bakteerin joukosta on ilman painotusta 6.7%. Kun todennäköisyys painotetaan bakteerien jakauman mukaisesti, saadaan kullekin bakteerille oma todennäköisyys, joka on esitetty taulukossa 3. Taulukosta 2 käy ilmi eNosen tekemät virheelliset tulokset lajeittain. Bakteerikohtaiset tarkkuudet on lueteltu taulukossa 3.

Grampositiivisia bakteereita tutkimuksessa oli 294, näistä tunnistettiin oikein 67%. Gramnegatiivisia bakteereita analysoitiin 243 ja näistä saatiin 75% oikein. Taulukossa 4 nähdään, kuinka hyvin menetelmä erottaa nämä bakteerit toisistaan. Tarkkuus gramnegatiivisten bakteereiden erottelussa oli 90% ja -positiivisten 92%.

**Taulukko 1**

Bakteeri	Analysoitujen bakteerimaljojen määrä
Str. Pyogenes	96
S. Aureus	80
E. Coli	69
P. Aeruginosa	64
Str. Pneumoniae	36
E. Cloacae	30
P. Mirabilis	27
E. Faecalis	25
Srt. Agalactiae	21
S. Haemolyticus	20
M. Catarrhalis	17
K. Pneumoniae	14
Str. Milleri	14
C. Koseri	12
S. Marcecens	12

Taulukko 2

ryhmät	S.aur.	E.coli	Str.pyog.	P.mirab.	P.aerug.	Str.agal.	Str.pneum.	E.faec.	K.pneum.	E.cloacae	C.koseri	S.haemol.	Str.millieri	M.catarrh.	S.marcezens
S.aur.	56	2	0	7	0	0	0	0	3	5	0	5	0	0	0
E.coli	4	56	0	0	2	0	1	0	1	0	4	1	0	0	0
Str.pyog.	1	0	72	1	1	1	12	1	0	0	0	2	5	0	0
P.mirab.	0	0	0	24	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
P.aerug.	2	4	0	2	49	0	0	0	1	2	1	1	0	2	0
Str.agal.	0	0	0	0	0	13	5	2	0	0	0	1	0	0	0
Str.pneum.	2	0	7	0	0	5	19	2	0	0	0	1	0	0	0
E.faec.	0	0	0	0	0	2	4	18	0	0	0	0	1	0	0
K.pneum.	4	0	0	0	5	1	0	0	3	1	0	0	0	0	0
E.cloacae	3	0	0	0	3	0	0	0	1	22	0	1	0	0	0
C.koseri	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
S.haemol.	3	1	1	0	1	1	1	0	0	2	0	10	0	0	0
Str.millieri	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
M.catarrh.	4	0	1	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	8	0
S.marcezens	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	Gram+ kokki	Gram- sauva	G+ kokki	G- sauva	G- sauva	G+ kokki	G+ kokki	G+ kokki	G- sauva	G- sauva	G- sauva	G+ kokki	G+ kokki	G- kokki	G- sauva



**Taulukko 3**

Bakteeri	Oikein tunnistettuja	Todennäköisyys osua oikeaan sattumalta
<i>S. Aureus</i>	70,0%	14,9%
<i>E. Coli</i>	81,2%	12,9%
<i>Str. Pyogenes</i>	75,0%	17,9%
<i>P. Mirabilis</i>	88,9%	5,0%
<i>P. Aeruginosa</i>	76,6%	11,9%
<i>Str. Agalactiae</i>	61,9%	3,9%
<i>Str. Pneumoniae</i>	52,8%	6,7%
<i>E. Faecalis</i>	72,0%	4,7%
<i>K. Pneumoniae</i>	21,4%	2,6%
<i>E. Cloacae</i>	73,3%	5,6%
<i>C. Koseri</i>	83,3%	2,2%
<i>S. Haemolyticus</i>	50,0%	3,7%
<i>Str. Milleri</i>	71,4%	2,6%
<i>M. Catarrhalis</i>	47,1%	3,2%
<i>S. Marcecens</i>	83,3%	2,2%

**Taulukko 4**

	gram-	gram+
gram-	220	25
gram+	23	269

## 5 POHDINTA

Käyttämämme elektroninen nenä pystyi tunnistamaan verimaljalla kasvavat bakteerit hyvin. Analysoidun aineiston bakteerit tunnistettiin oikein keskimäärin 70.7% tarkkuudella. Bakterikohtaiset erot olivat suuria, tarkimmin laitteistollamme tunnistettiin *P. Mirabilis* 88.9% tarkkuudella (n. 27). Heikoimmin tunnistetuksi tuli *K. Pneumoniae*, josta tunnistettiin oikein 21.4% (n. 14). Neljän useimmin aineistossa esiintyneen bakteerin tunnistusprosentit olivat *S. Aureus* 70.0%, *E. Coli* 81.2%, *P. Aeruginosa* 76.6% ja *Str. Pyogenes* 75.0%.

Suurin osa virheellisistä analyysistä johtui bakteerin tunnistamisesta sukulaisbakteeriksi. Esimerkiksi *Str. Pyogenes* -bakteereista 12.5% tunnistettiin *Str. Pneumoniae* -bakteereiksi molempien ollessa Grampositiivisia streptokokkeja. Vastaavasti *Str. Pneumoniae* -bakteereista 19,4% tunnistettiin *Str. Pyogenes* -bakteereiksi.

Tunnistimme bakteerit toisistaan hieman huonommin kuin Roine et al 2014. He erottivat vastaavalla laitteistolla bakteerit toisistaan 95% herkkyydellä ja 96% tarkkuudella. Aineistomme oli kuitenkin huomattavasti laajempi ja kaikki bakteerilajit sisällytettiin tutkimukseen ilman esivalintaa. Tutkitut bakteerit olivat potilaista kerättyjä näytteitä, joten saman lajin bakteerit eivät todennäköisesti edustaneet täysin samaa kantaa, millä on vaikutusta hajujälkeen.

Analysointi-aikamme poikkesi osasta tutkimuksista. Bruins et al. tunnisti 6-8 tunnin analyysin aikana bakteerinsa keskimäärin 87 prosenttisesti. Meillä analysointiin käytettiin keskimäärin kuusi minuuttia bakteeria kohden.

Bakteerimaljamme tulivat suoraan alueemme laboratorion näytevirrasta, joten emme vakioineet tai optimoineet kasvatusalustaa VOC:n muodostuksen maksimoimiseksi. Pyrimme muutoinkin näytteiden vähäiseen esivalmisteluun, emmekä esimerkiksi varmistaneet näytteiden

yhtenevää lämpötilaa ennen mittauksia, jotta tilanne vastaisi mahdollisimman hyvin käytännön kliinistä asetelmaa.

Yhtenä tutkimuksemme heikkouksista oli edellisen näytteen aiheuttaman signaalin poistumisen silmämääräinen tulkinta. Laitteisto piirsi tutkitusta bakteerista spektrin, joka silmämääräisesti muuttui hieman kunkin mittauksen välissä. Tarkoituksena oli myös havaita näytteiden väleissä analysoidun veden puhdistava vaikutus, mutta tässä oli melko runsaasti vaihtelua, koska bakteereista vapautuvien molekyylien määrä vaihteli huomattavasti. Jatkossa laitteistoon olisi syytä integroida selkeä nolla-referenssi, jotta edellisen analysoidun näytteen signaali ei häiritsisi seuraavaa mittausta.

Tulevaisuudessa nykyisellä teknologialla voitaneen päästä reaaliaikaisempaan analytiikkaan. Tutkimuksemme osoitti laitteiston kykenevän tunnistamaan verimaljalla kasvavia bakteereita toisistaan ilman huolellista esivalmistelua. Kun edellisen analyysin vaikutus hajujälkeen saadaan minimoitua ja riittävä määrä vertailutuloksia eri bakteerien ominaishajuista tallennettua analyysin tueksi, voidaan tutkia laitteiston kykyä tunnistaa tuoreita tai hyvin lyhyen aikaa inkuboituja näytteitä.

## **6 JOHTOPÄÄTÖKSET**

DMS-tekniikka soveltuu aerobisten bakteeriviljelmien tunnistamiseen. Analysoimamme bakteerit vaikuttavat luokittuvan myös taksonomiensa mukaisesti. Geneettisesti lähemmät bakteerit tuottivat eniten mittausvirheitä, esimerkiksi taulukosta 2 nähdään, että KNN analyysi antoi 12 kertaa *S. Pneumoniaen* *S. Pyogenekseksi*.

Jatkossa tulisi kehittää algoritmeja jotka tunnistaisivat bakteerit tämän sensorin datasta vielä tarkemmin.

## 7 LÄHTEET

1. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the infectious diseases society of america (IDSA) and the american society for microbiology (ASM)(a). *Clin Infect Dis*. 2013;57(4):e121. Accessed Feb 11, 2018. doi: 10.1093/cid/cit278.
2. Eagye KJ, Kim A, Laohavaleeson S, Kuti JL, Nicolau DP. Surgical site infections: Does inadequate antibiotic therapy affect patient outcomes? *Surg Infect (Larchmt)*. 2009;10(4):323-331. Accessed Feb 11, 2018. doi: 10.1089/sur.2008.053.
3. Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr A. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin Lab*. 2009;55(7-8):289-296. Accessed Feb 11, 2018.
4. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 2009;49(4):543-551. Accessed Feb 11, 2018. doi: 10.1086/600885.
5. Klindworth, Pruesse, Schweer, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies.
6. Goldman E. *Practical handbook of microbiology*. 2. ed. ed. Boca Raton, Fla: CRC Press; 2009.
7. Lehmann LE, Hauser S, Malinka T, et al. Rapid qualitative urinary tract infection pathogen identification by SeptiFast real-time PCR. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e17146. <http://boris.unibe.ch/6055/>. doi: 10.1371/journal.pone.0017146.
8. Hummel T, Nordin S. Olfactory disorders and their consequences for quality of life. *Acta Otolaryngol*. 2005;125(2):116-121. Accessed Feb 12, 2018.
9. Directive 2004/42/CE of the european parliament and of the council of 21 april 2004 on the limitation of emissions of volatile organic compounds due to the use of organic solvents in certain paints and varnishes and vehicle refinishing products and amending directive 1999/13/EC. . 2004. <http://data.europa.eu/eli/dir/2004/42/oj/eng>. Accessed Feb 12, 2018.
10. Mustonen Sari, Vento Seija, Tuorila Hely. Hajuaistin toiminnan mittaaminen. *Suomen Lääkärilehti*. 2007;36(62):3177-3183.
11. Chen S, Wang Y, Choi S. Applications and technology of electronic nose for clinical diagnosis. *Open Journal of Applied Biosensor*. 2013;02(02):39. <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=31243&#abstr> act. Accessed Feb 12, 2018. doi: 10.4236/ojab.2013.22005.
12. Paccagnella L. *Open access*. Vol 727. Bologna: Il Mulino; 2010:1105-1176. <http://www.mdpi.com/1424-8220/11/1/1105>.
13. Arshak K, Moore E, Lyons GM, Harris J, Clifford S. A review of gas sensors employed in electronic nose applications. *Sensor Review*. 2004;24(2):181-198. <http://www.emeraldinsight.com/doi/abs/10.1108/02602280410525977>. doi: 10.1108/02602280410525977.

14. Campbell JL, Le Blanc JY, Kibbey RG. Differential mobility spectrometry: A valuable technology for analyzing challenging biological samples. *Bioanalysis*. 2015;7(7):853-856. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4467198/>. doi: 10.4155/bio.15.14.
15. Pavlou A, Turner APF, Magan N. Recognition of anaerobic bacterial isolates in vitro using electronic nose technology. *Letters in Applied Microbiology*. 2002;35(5):366-369. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.2002.01197.x/abstract>. doi: 10.1046/j.1472-765X.2002.01197.x.
16. Yusuf N, Zakaria A, Omar MI, et al. In-vitro diagnosis of single and poly microbial species targeted for diabetic foot infection using e-nose technology. *BMC bioinformatics*. 2015;16(1):158. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25971258>. doi: 10.1186/s12859-015-0601-5.
17. Antti Roine, Taavi Saviauk, Pekka Kumpulainen, et al. Rapid and accurate detection of urinary pathogens by mobile IMS-based electronic nose: A proof-of-principle study. *PLoS One*. 2014;9(12):e114279. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25526592>. doi: 10.1371/journal.pone.0114279.
18. Bruins M, Bos A, Petit P, et al. Device-independent, real-time identification of bacterial pathogens with a metal oxide-based olfactory sensor. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: an international journal on pathogenesis, diagnosis, epidemiology, therapy, and prevention of infectious diseases*. 2009;28(7):775-780. <http://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai:repub.eur.nl:15742>. doi: 10.1007/s10096-009-0700-1.