



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Essi Jousmäki

Nielutulehdusten piilevät aiheuttajat

Non-hemolyyttinen *Streptococcus pyogenes*, *Arcanobacterium haemolyticum* ja *Fusobacterium necrophorum*

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

16.4.2019

Tekijä Otsikko	Essi Jousmäki Nielutulehdusten piilevät aiheuttajat
Sivumäärä Aika	39 sivua 16.4.2019
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Merja Ojala Sairaalamikrobiologi Vesa Kirjavainen Sairaalamikrobiologi Terhi Miikkulainen-Lahti
<p>Tässä opinnäytetyössä tutkimuksen kohteena ovat nielutulehdukset ja nieluviljelyssä toisinaan vaikeasti löydettävät bakteerit. Tutkimuksen tarkoituksena on arvioida, kuinka luotettava nielu streptokokkiviljelyn tulos on ja jääkö nieluviljelystä tunnistamatta non-hemolyyttisiä A-streptokokkeja eli <i>Streptococcus pyogenes</i>-bakteereita. Lisäksi tarkastellaan, kuinka paljon <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>-bakteeria esiintyy nieluviljelynäytteissä. Opinnäytetyössä tuodaan esille Lemmeren-oireyhtymän aiheuttajabakteeri, <i>Fusobacterium necrophorum</i>. Bakteeria ei kuitenkaan tutkita, koska käytössä ei ole nielun anaerobiviljelystä.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin HUSLABin Kliinisen mikrobiologian Bakteriologian yksikölle, jossa oli tarve tutkia nieluviljelyssä helposti tunnistamatta jääviä nielutulehdusten aiheuttajia. Opinnäytetyön tulosten pohjalta Bakteriologian yksikkö sai tietoa, kuinka runsaasti non-hemolyyttisiä A-streptokokkeja ja <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>-bakteereja esiintyi nieluäytteissä. Tietoa saatiin lisäksi käytössä olevien menetelmien tehokkuudesta ja soveltuvuudesta nykyiseen näytevirtaan.</p> <p>Negatiivisiksi vastatuista eSwab-nielunäytteistä (n=253) etsittiin non-hemolyyttisiä <i>Streptococcus pyogenes</i>-kantoja Abbott ID NOW™ Strep A 2 -molekulaarisen testin avulla. Lisäksi <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>-bakteeria etsittiin negatiivisilta nieluviljelymaljoilta (n=1541) ja tarvittaessa pesäkkeitä tutkittiin VITEK® MS MALDI-TOF -analysaattorilla. Käytettävissä ollut tutkimusaineisto koostui HUSLABin Bakteriologian yksikön potilasnielunäytteistä, joten näytteitä ei erikseen tarvinnut kerätä.</p> <p>Negatiivisten nieluäytteiden (n=253) joukosta löytyi positiivisia A-streptokokkikantoja kahdeksan (8) kappaletta (3,16 %), joista yksi (1) kappale osoittautui non-hemolyyttiseksi A-streptokokiksi (0,4 %). <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>-bakteeria ei löytynyt yhtään negatiivisilta nieluviljelymaljoilta (n=1541). Tutkimuksen perusteella non-hemolyyttisiä A-streptokokkikantoja esiintyy vähän negatiiviseksi vastatuissa nieluviljelynäytteissä (0,4 %), mutta A-streptokokkikantoja jää seulonnassa toisinaan huomaamatta (3,16 %). <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>-bakteeria ei esiintynyt tämän tutkimuksen nieluäyteotoksessa lainkaan (0,00 %).</p> <p>Aiempien tutkimuksien perusteella non-hemolyyttiset <i>Streptococcus pyogenes</i>-kannat voivat aiheuttaa myös invasiivisia ja vakavia infektioita, jopa epidemioita. Tämän takia non-hemolyyttisten A-streptokokkikantojen tunnistaminen ja diagnosointi on tärkeää. <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>-bakteerin hidas ja heikko kasvu vaikeuttaa bakteerin tunnistamista viljelymaljoilta. Näin ollen on hyvä pitää mielessä nämä bakteerit mahdollisina nieluopatoogeneineinä ja muistaa bakteerien olemassaolo.</p>	
Avainsanat	<i>Streptococcus pyogenes</i> , non-hemolyyttinen <i>Streptococcus pyogenes</i> , A-streptokokki, <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , nielutulehdus, nieluviljely

Author Title	Essi Jousmäki The Underlying Causes of Pharyngitis
Number of Pages Date	39 pages 16 April 2019
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Merja Ojala, Senior Lecturer Vesa Kirjavainen, Hospital Microbiologist Terhi Miikkulainen-Lahti, Hospital Microbiologist
<p>This thesis targets pharyngitis and bacteria that are difficult to detect in the throat culture. The purpose of my study was to research how much non-hemolytic <i>Streptococcus pyogenes</i> (group A Streptococcus) occurs in throat samples and what is their clinical meaning. More over purpose of my study was to sort out how much <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>-bacteria occurs in throat culture. This thesis also mentions <i>Fusobacterium necrophorum</i>-bacteria, but it is not being investigated, because there is no anaerobic cultivation of the throat available.</p> <p>This study of thesis was made to Hospital District of Helsinki and Uusimaa laboratory (HUSLAB) Clinical microbiology Bacteriology units in Helsinki, Finland. They had a need for a study of bacteria, which are easily left undetected in the throat. Based on the results of this thesis the HUSLAB Bacteriology units received information on the high prevalence on non-hemolytic <i>Streptococcus pyogenes</i> and <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> as well as on the effectiveness and suitability of its methods for the current sample stream.</p> <p>A total of 253 negative throat samples were re-examined using the Abbot ID NOW™ Strep A 2 molecular assay. In addition, <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> was searched on 1 541 negative culture plates. If it was necessary, the colonies were also examined with a VITEK® MS MALDI-TOF -analyzer. The available research material consisted of patient samples from the patients of HUSLAB Bacteriology unit. The samples did not need to be collected separately.</p> <p>In negative throat samples there were eight (8) positive <i>Streptococcus pyogenes</i> (3,16 %) found and one (1) of them was a non-hemolytic <i>Streptococcus pyogenes</i> (0,4 %). <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> weren't found on any of the throat cultivation (=1541). In the conclusion of this study, it was found that non-hemolytic <i>Streptococcus pyogenes</i> are present in a small number of negative throat samples (0,4%). Sometimes <i>Streptococcus pyogenes</i> was missing in the culture (3,16 %) for some reason. <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>-bacterium were not present in this study (0,00 %).</p> <p>Finally based on the previous studies, non-hemolytic <i>Streptococcus pyogenes</i> may also cause invasive and serious infection. Fast identification and diagnosis of non-hemolytic <i>Streptococcus pyogenes</i> is important. Study also shows, that low and weak growth of <i>the Arcanobacterium haemolyticum</i> makes it difficult to identify them from the culture plates. When looking at the results, it is good to keep in mind these possible pathogens and their existence.</p>	
Keywords	<i>Streptococcus pyogenes</i> , non-hemolytic <i>Streptococcus pyogenes</i> , group A Streptococcus, <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , pharyngitis, throat culture

Käsitteet ja lyhenteet

Abbott ID NOW™ Strep A 2= Molekulaarinen testilaitte, joka hyödyntää isotermaalista nukleiinihappomonistustekniikkaa A-streptokokki-infektion toteamiseksi.

Bakteeriviljely= Menetelmä, jolla bakteereita kasvatetaan laboratorioissa. Viljely toimii yhtenä osana bakteeridiagnostiikkaa.

BHS= β -hemolytic Streptococci, β -hemolyttinen streptokokki.

Eksoentsyymit, toksiinit= Eliön aineenvaihdunnan tuottamaa myrkyllistä ainetta. Esimerkiksi bakteerien tuottamat hemolysiinit.

GABHS= Group A β -hemolytic Streptococci, ryhmän A β -hemolyttinen streptokokki.

GAS= Group A Streptococci, ryhmän A streptokokki.

Gramvärjäys= Värjäysmenetelmä, joka värjää grampositiiviset ja -negatiiviset bakteerit eri värisiksi niiden soluseinien rakenteen perusteella.

Hemolyysi= Punasolujen hajoaminen. Streptokokit jaetaan hemolyyssiryhmiin niiden hemolyyssikyvyn mukaan: alfa (α), beeta (β) ja non (γ).

In vitro= Keinotekoisissa olosuhteissa.

Katalaasitesti= Strepto- ja stafylokokkien erotusdiagnostiikkamenetelmä. Streptokokit eivät tuota katalaasientsyymiä eli nämä bakteerit eivät kykene hajottamaan vetyperoksidia vedeksi ja hapeksi. Katalaasinegatiiviset bakteerit eivät saa kuohumisreaktiota aikaan.

Lemierren= Oireyhtymä, jossa esiintyy vasemman sisemmän kaulalaskimon märkäinen laskimoveritulppa, joka voi lähettää tulppia eri puolelle kehoa esimerkiksi maksaan, keuhkoihin tai jopa luuytimeen. Oireyhtymä liittyy nielutulehduksiin. Oireyhtymän aiheuttajana on yleensä *Fusobacterium necrophorum*-bakteeri.

MALDI-TOF= Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight-analysaattorin menetelmän toiminta perustuu massaspektrometriaan. Laitteella pystytään tunnistamaan näytteestä erilaisia proteiineja, peptidejä ja polymeerejä. Saatua informaatiota verrataan tietokantaan ja saadaan selville bakteerilaji.

O-hemolysiini= Bakteerien tuottama happilabiili eli epävakaa hemolysiini (SLO), osallistuu hemolyyssireaktioon.

PCR= Polymerase Chain Reaction eli polymeerasiketjureaktio on menetelmä, jossa lämpötilojen vaihtelun ja alukkeiden avulla monistetaan eksponentiaalisesti esimerkiksi DNA:ta.

Vieritesti= POC (point of care) eli "pikatesti" on hoitopaikkatesti, joka suoritetaan potilaan läsnä ollessa nopeasti.

S-hemolysiini= Bakteerien tuottama happivakaa hemolysiini (SLS), osallistuu hemolyyssireaktioon.

Tonsilliitti= Nielutulehdus, nielurisetulehdus, angiina.

Viljelyagarmalja= Viljelyalusta, jonka agarille bakteerinäytteet viljellään. Esimerkiksi streptokokkiselektiiviselle CO-maljalle eli kolistiini-oksoliinihappo-maljalle viljellään yleensä streptokokkinäytteitä.

α = Alfa, kreikkalainen kirjain, kirjaimistossa ensimmäinen kirjain.

β = Beeta, kreikkalainen kirjain, kirjaimistossa toinen kirjain.

γ = Gamma, kreikkalainen kirjain, kirjaimistossa kolmas kirjain.

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Bakteerien aiheuttamat nielutulehdukset	2
2.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	3
2.2	Non-hemolyyttinen <i>Streptococcus pyogenes</i>	7
2.3	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	9
2.4	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	11
3	Bakteerien tutkiminen nielutulehduksissa	12
3.1	Streptokokkien tunnistustestit	13
3.2	Abbott ID NOW™ Strep A 2	15
3.3	VITEK® MS MALDI-TOF	16
3.4	Xpert® Xpress Strep A	17
4	Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	17
5	Opinnäytetyön toteutus	18
5.1	Näytteiden kerääminen	18
5.2	Näytteiden analysointi	20
6	Opinnäytetyön tulokset	24
6.1	Non-hemolyyttinen <i>Streptococcus pyogenes</i>	24
6.2	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	25
7	Tulosten tarkastelu	26
8	Pohdinta	29
8.1	Luotettavuus	29
8.2	Eettisyys	30
8.3	Johtopäätökset	31
8.4	Kehittämis ehdotukset	32
8.5	Ammatillinen kasvu	33
	Lähteet	34

1 Johdanto

Tämän opinnäytetyön mielenkiinnon kohteena olivat nielutulehdukset ja nieluviiljelyssä vaikeasti havaittavat bakteerit. Nielutulehdukset ovat yleisimpiä syitä hakeutua perusterveydenhuollon piiriin jokaisessa ikäluokassa. Nielun bakteeri-infektioissa yleisin taudinaiheuttaja on A-streptokokki eli *Streptococcus pyogenes*. *Arcanobacterium haemolyticum*-bakteerin esiintyvyys nielunäytteissä on noin 0,5–2,0 % (Carlson – Järvinen 2010: 154). *A. haemolyticum* kasvaa hitaasti ja heikosti, joten sen esiintulo on haasteellisempaa laboratorio-olosuhteissa. Opinnäytetyössä tuodaan esille myös *Fusobacterium necrophorum*-bakteeri, joka aiheuttaa Lemierren-oireyhtymää. *Fusobacterium necrophorum*-bakteeria ei kuitenkaan tutkita tässä opinnäytetyössä, koska nielun anaerobiviljelyä ei ole laboratoriossa saatavilla.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli arvioida, kuinka luotettava nielun streptokokkiviljelyn tulos on ja jääkö nieluviiljelystä tunnistamatta non-hemolyttisiä A-streptokokkeja eli *S. pyogenes*-bakteereita. Negatiiviseksi todetut eSwab-nielunäytteet (n=253) tutkittiin uudelleen Abbott ID NOW™ Strep A 2 -molekulaarisen testin avulla. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, kuinka paljon negatiiviseksi vastatuista viljelytuloksista muuttuisi molekulaarista menetelmää käyttämällä positiivisiksi. Lisäksi tarkastelun kohteena oli hitaasti viljelyssä kasvava *A. haemolyticum*-bakteeri. Tarkoituksena oli selvittää, kuinka paljon *A. haemolyticum*-bakteeria esiintyy nieluviiljelynäytteissä. *A. haemolyticum*-bakteeria etsittiin negatiiviseksi vastatuilta nieluviiljelymaljoilta (n=1541). *A. haemolyticum*-bakteerin osalta analysointimenetelmänä käytettiin VITEK® MS MALDI-TOF -analyysaattoria.

Opinnäytetyö laadittiin Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratoriolle, HUSLABille, Kliinisen mikrobiologian Bakteriologian yksikölle Meilahteen, Helsinkiin. Laboratoriolla oli tarve tutkia nielutulehdusten aiheuttajia, jotka jäävät viljelyssä helposti tunnistamatta. Opinnäytetyön tulosten pohjalta Bakteriologian yksikkö sai tietoa menetelmiensä tehokkuudesta ja soveltuvuudesta nykyiseen näytevirtaan. Opinnäytetyö on 15 opintopisteen kokonaisuus, joka kuuluu bioanalytiikka (AMK) tutkinto-ohjelmaan (210 op).

Aiheeseen oli mukava tarttua, koska aihe oli mielenkiintoinen ja tutkimukselle sekä tutkimuksen tuomalle uudelle tiedolle ja tuloksille oli selkeä tarve. Opinnäytetyön tarkoituksena oli siis tutkia, kuinka paljon non-hemolyyttisiä A-streptokokkikantoja jäi havaitsematta nieluviiljelyssä ja mikä oli näiden non-hemolyyttisten kantojen kliininen merkitys sekä onko nielun negatiivinen streptokokkiviljelyn tulos luotettava. Lisäksi tutkittiin, paljonko *A. haemolyticum*-bakteeria esiintyi nielunäytteissä.

Aiempien tutkimusten perusteella opinnäytetyön aihe on ajankohtainen ja tärkeä niin laboratorion kuin potilaan hoidon kannalta. Useat aiemmat tutkimuksen painottavat, etteivät käytössä olevat rutiinitutkimukset ole aina tarpeeksi herkkiä havaitsemaan non-hemolyyttisiä A-streptokokkikantoja. *A. haemolyticumin* hidas ja heikko kasvu taas vaikuttavat *A. haemolyticumin* tunnistamiseen. Vaikka non-hemolyyttiset A-streptokokkikannat ovat harvinaisia, on aiemmissa tutkimuksissa ilmennyt tapauksia, jotka johtivat vakaviin invasiivisiin infektioihin ja jopa kuolemaan saakka, koska diagnoosia ei saatu tarpeeksi ajoissa. Olisiko nämä tapaukset voitu estää, jos laboratoriodien diagnostiikka olisi herkempää mahdollisten non-hemolyyttisten A-streptokokkikantojen suhteen?

2 Bakteerien aiheuttamat nielutulehdukset

Nielutulehdukset ovat yleisimpiä syitä hakeutua perusterveydenhuollon piiriin jokaisessa ikäluokassa. Virukset esimerkiksi adenovirukset ja Epstein–Barrin virus ovat aiheuttajina useimmissa nieluinfektiotapauksissa. Bakteeriperäisissä tartunnoissa yleisin aiheuttaja on A-streptokokki eli *S. pyogenes*. Tämän lisäksi β -hemolyttiset streptokokkiryhvät (BHS) C ja G (*Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis*) voivat aiheuttaa nielutulehduksia. *A. haemolyticum* ja *F. necrophorum* ovat erotusdiagnostisesti tärkeitä nielutulehduksien aiheuttajia. (Nielutulehdus: Käypä hoito -suositus 2018.)

Bakteerit ovat yksisoluisia, tumattomia organismeja ja bakteerien elinolosuhteet vaihtelevat. Osa bakteereista ovat fakultatiivisia eli ne pystyvät lisääntymään niin hapellisissa (aerobinen) kuin hapettomissa olosuhteissa (anaerobinen). Osa bakteereista ovat joko aerobisia tai anaerobisia. (Yleistä mikrobeista 2018.) Bakteerin soluseinä antaa bakteereille ominaisen muotonsa ja soluseinän rakenne on monien antibioottien toimintamekanismien perustana. Soluseinän rakenne jakaa bakteerit grampositiivisiin ja -negatiivisiin. (Vaara ym. 2010: 21.)

S. pyogenes ja *A. haemolyticum* ovat grampositiivisia bakteereita. *S. pyogenes* on muodoltaan kokkibakteeri ja *A. haemolyticum* on sauvabakteeri. (Nousiainen – Tarvainen – Aaltonen – Carlson 2000; A-ryhmän streptokokki 2016.) *F. necrophorum* on gramnegatiivinen sauvabakteeri (Nuikka – Jarva – Meri 2018). Grampositiivisilla bakteereilla on paksu soluseinä ja gramnegatiivisilla bakteereilla on ylimääräinen ulkomembraani soluseinässään. Sekä grampositiivisilla että gramnegatiivisilla bakteereilla on soluseinässä peptidoglykaanikerros, joka on mureiinia. Peptidoglykaanikerros on jäykkä ja vaikuttaa bakteerin muotoon ja kokoon. (Vaara ym. 2010: 21–22.)

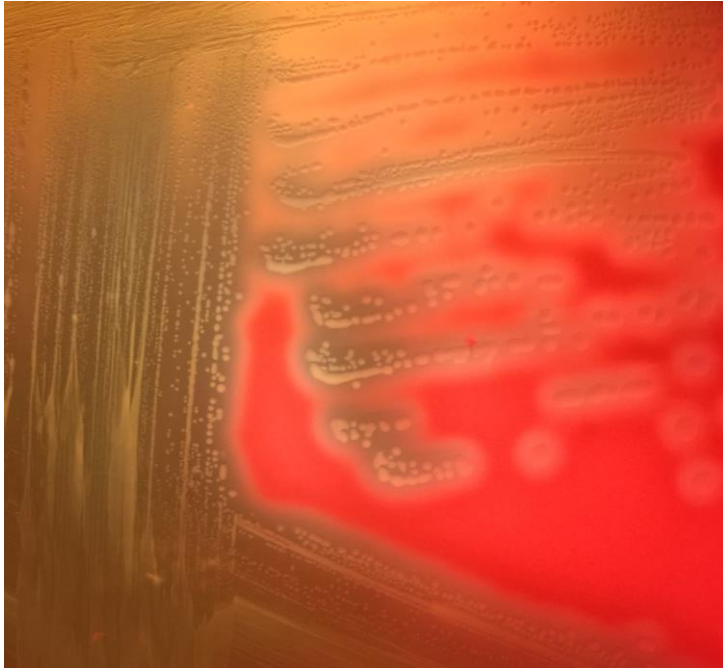
Aikuisen väestön nielutulehduksista 5–10 % on streptokokin aiheuttamia. Lapsilla ja kouluikäisillä A-streptokokki aiheuttaa 10–30 % nielutulehdustapauksista. A-streptokokin aiheuttama nielutulehdus esiintyykin yleensä juuri leikki- ja kouluikäisillä lapsilla. Alle 3-vuotiailla A-streptokokin aiheuttama nielutulehdus on harvinainen. (Lumio – Jalanko 2018.) A-, C-, ja G-ryhmän streptokokit voivat aiheuttaa epidemioita. Tilannetta, jossa 15–20 % ryhmästä (esimerkiksi päiväkotia, armeija tai perhe) sairastaa streptokokki-infektioita kutsutaan epidemiaksi. Tällöin on tärkeää tunnistaa epidemia ajoissa ja lääkittää potilaat yhtä aikaa. Nieluviljely on epidemiatapauksissa nielunäytteiden analysointimenetelmänä. (Nielutulehdus: Käypä hoito -suositus 2018.)

Nielutulehdukset voivat olla kivuliaita ja kuumetta voi esiintyä. Lapsilla kurkkukivun voi havaita lisääntyneenä kuolaamisena ja ruokahaluttomuutena. (Lumio – Jalanko 2018.) Potilailla ei yleensä bakteerin aiheuttamassa infektiossa ilmene lainkaan nuhaa eikä yskää. Nuha ja yskä viittaavat virusperäiseen infektiin. Virusperäiseen infektiin ei määrätä antibiootteja eli mikrobilääkkeitä, koska virusinfektiot paranevat itsestään. (Eskelinen 2016a.) Nielutulehdusten aiheuttajat ja ilmeneminen vaihtelevat niin väestöryhmän kuin vuodenajan sekä nielutulehdusten määrittämisen ja paikallisten tutkimusten mukaan (Nielutulehdus: Käypä hoito -suositus 2018).

2.1 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes eli A-streptokokki kuuluu A-streptokokkiryhmään (GAS) ja on ryhmän A β -hemolyttinen streptokokki (GABHS) (Gera – McIver 2013). *S. pyogenes* on grampositiivinen kokkibakteeri ja aiheuttaa yleensä nielutulehdusta eli angiinaa (A-ryhmän streptokokki 2016). *S. pyogenes* kykenee myös aiheuttamaan vakavia infektioita kuten verenmyrkytyksiä (Vuopio-Varkila – Syrjänen – Kotilainen 2010: 102).

Ulkonäöltään A-streptokokkipesäkkeet ovat valkoharmaita, sileähköjä ja kosteapintaisia. Muodoltaan *S. pyogenes*-pesäkkeet ovat selkeäreunaisia ja kupolimaisia. A-streptokokkipesäkkeet ovat halkaisijaltaan alle 0,5 millimetriä. Bakterin tunnistettavuuteen vaikuttaa suuresti pesäkettä ympäröivä β -hemolyysivyöhyke, jossa veriagar muuttuu punaisesta kellertäväksi, kun bakteeri hajottaa verimaljan punasolut hemolysiinien avulla (Kuvio 1). Hemolyysivyöhyke on bakteripesäkettä selvästi suurempi. (Spellerberg – Brandt 2016.)



Kuvio 1. *S. pyogenes*-bakteripesäkkeitä CO-verimaljalla. Bakterin tuottama β -hemolyysi on täydellistä ja maljan agarissa esiintyy vaaleita vyöhykkeitä bakteripesäkkeiden ympärillä. β -hemolyysissä maljan punasolut ovat pesäkkeiden ympäriltä hajonneet bakterin tuottamien S- ja O-hemolysiinien takia. CO-verimaljan väri on muuttunut bakteripesäkkeiden ympäriltä punaisesta kellertävän läpinäkyväksi.

A-streptokokilla on useita virulenssitekijöitä, joiden avulla bakteeri pystyy välttämään isäntänsä puolustusjärjestelmän (Walker ym. 2014). Esimerkiksi A-streptokokin soluseinän uloimman kerroksen kapseli koostuu hyaluronihaposta, joka toimii suojaavana tekijänä fagosytoosia eli solusyöntiä vastaan. Soluseinä sisältää esimerkiksi M-proteiinia. M-proteiinin avulla bakteeri puolustautuu elimistön puolustusjärjestelmää vastaan. M-proteiinin avulla A-streptokokkeja voidaan luokitella serotyyppeihin. A-streptokokki tuottaa eksoentsyymejä- ja toksiineja, kuten S- ja O-hemolysiinejä. (Vuopio-Varkila ym. 2010: 102.) A-streptokokkibakteerilla on myös kyky hajottaa epiteeliä aiheuttaen invasiivisia eli elimistön sisäisiä infektioita (Walker ym. 2014).

A-streptokokkeja voidaan serotyypityksen lisäksi tyypittää *emm*-tyypityksellä. Eri *emm*-tyyppejä on löydetty yli 230 kappaletta. *Emm*-tyypitys perustuu M-proteiinia koodaavan geenin sekvensointiin. Useimmiten vakavat infektiot ovat tyyppien *emm1* ja *emm3* aiheuttamia. (Vuorela ym. 2017.) *Emm*-tyypit 1, 3, 12 ja 28 aiheuttavat yleensä A-streptokokkitartuntoja teollistuneissa maissa. Eri *emm*-tyypit ovatkin jakautuneet maantieteellisesti ja sosioekonomisesti eri puolille maailmaa. Pinnallisia infektiota aiheuttavat *emm*-tyypit 2, 4, 6, 12 ja 44/61. Invasiivisten infektioiden aiheuttajat ovat *emm*-tyyppejä 1, 3 ja 49. Tietty *emm*-tyypit liittyvät tiettyihin infektioiden kuten akuuttiin reumakuumeeseen. (Walker ym. 2014.) Vakavat A-streptokokki-infektiot aiheuttavat yleensä epidemia-aaltoja. Bakteerien parantunut kyky levitä ihmisestä toiseen on seurausta bakteereissa tapahtuneista geneettisistä muutoksista. (Vuopio 2018.)

A-streptokokkien tyypillisiä tartuntatapoja ovat kosketus- ja pisaratartunta. Tartunnan voi saada myös ruoan välityksellä, joka on kontaminoitunut. Itämissä A-streptokokki-infektiossa on noin 1 – 4 vuorokautta, jopa kuukausi, tartunnan saamisesta oireiden ilmeneeseen. (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2018; Vuopio-Varkila ym. 2010: 108.)

A-ryhmän streptokokin aiheuttamassa infektiossa kuume nousee nopeasti, imusolmukkeet turpoavat sekä nielu aristaa, punottaa ja nielussa esiintyy peitteitä (Lumio – Jalanko 2018). Yleisoireet kuten päänsärky, huonovointisuus ja oksentelu ovat mahdollisia infektiioireita A-streptokokkitartunnassa. A-streptokokki voi aiheuttaa ruusua ja sepsistä eli verenmyrkytystä, mutta tällöin tartuntareitti on eri kuin nielutulehduksissa. Jos infektio leviää nielusta eteenpäin, voi mahdollisesti esiintyä esimerkiksi välikorvan tai nenän sivuontelon tulehdus tai keuhkokuume. (Vuopio-Varkila ym. 2010: 103.) Potilaalla voi esiintyä lisäksi pernaalista eli peräaukon ihottumaa, märkärupia, mansikkakieli tai kynsivallin tulehdus. Nämä löydökset puoltavat A-streptokokki-infektioita tyypillisten oireiden (Taulukko 1) kanssa. (Nielutulehdus. Käypä hoito -suositus 2018.)

Jälkitautina A-streptokokki-infektiosta on tavattu reumakuume, joka vaurioittaa sydänläppiä. Reumakuumeen aiheuttaja on elimistön immuunipuolustuksen reaktio eikä niinkään bakteeri. (Lumio – Jalanko 2018.) Immuunipuolustuksen reaktio on ristireaktio, joka johtuu A-streptokokin uloimman seinän hyaluraanihakosta (Vuopio-Varkila ym. 2010: 102).

Taulukko 1. Taulukossa on kuvattu yleisimmät A-streptokokin aiheuttamat nielutulehduksen oireet (Nielutulehdus: Käypä hoito -suositus 2018).

Tyypilliset oireet A-streptokokin aiheuttamassa nielutulehduksessa

Nielu kipeä, varsinkin nieltäessä

Oireet ilmaantuvat nopeasti

Nielurisoissa valkoista peitettä

Kuumetta yli 38,0 °C

Imusolmukkeet turvonneet ja aristavat kaulalla

Päänsärky, pahoinvointi ja oksentelu

Ei nuhaa ja yskää

A-streptokokki-infektio diagnosoidaan nieluviljelyllä tai nieluvieritestillä. Tarvittaessa negatiivinen vieritestin tulos varmistetaan viljelymenetelmällä luotettavan tuloksen saamiseksi. (Nielutulehdus: Käypä hoito -suositus 2018.) Jos epäillään nielussa β -hemolyyttistä A-streptokokkia, pyyntönä on streptokokkiviljely eli Ps-StrVi (Bakteeri, nieluviljely, laaja 2018).

Hoitona bakteeri-infektiossa käytetään antibiootteja eli mikrobilääkkeitä (Rantala 2013). Mikroibihoito poistaa aiheuttajan, estää taudin leviämistä, lieventää oireita ja jälkitautien ilmaantumisen todennäköisyys pienenee. (Nielutulehdus: Käypä hoito -suositus 2018.) 10 vuorokauden antibioottikuuri on nielutulehduksissa tavallinen, vaikka lyhyempikin kuuri parantaisi taudin. Pidempi kuuri edistää bakteerin häviämistä nielusta ja estää jälkitautien esiintymistä. (Lumio – Jalanko 2018.)

β -hemolyyttiset streptokokit ovat herkkiä beetalaktaameille kuten kefalosporiineille ja penisilliinille. Penisilliiniä, klindamysiinia, ensimmäisen polven kefalosporiinia tai makrolideja käytetään A-streptokokki-infektion hoidossa. Penisilliini ja klindamysiini tehoavat jakautuviin soluihin, mutta klindamysiini estää myös proteiinisynteesin. (Rantala 2013.) A-streptokokilla ei esiinny resistenttiyttä eli vastustuskykyä penisilliinille. (Nielutulehdus: Käypä hoito -suositus 2018.)

2.2 Non-hemolyttinen *Streptococcus pyogenes*

Non-hemolyttinen *Streptococcus pyogenes* on *S. pyogenes*-bakteerin fenotyyppi eli ilmiäsu, joka ei muodosta β -hemolyysiä veriagarmaljalle S-hemolysiinin tuotannon häiriintymisen takia. (Walker ym. 2014) Nieluviljely perustuu β -hemolyysin tunnistamiseen veriagarmaljalta bakteeripesäkkeiden ympäriltä pesäkkeiden morfologian lisäksi. Ei-hemolyttinen eli non- eli gamma (γ) -hemolyttinen A-streptokokki voi jäädä huomaamatta, koska kyseinen bakteerikanta ei hajota punasoluja veriagarmaljalta eli hemolyysivyöhykettä ei muodostu bakteeripesäkkeen ympärille (Kuvio 2). (Purcell – Phelan – Doyle 2013.) Aiemmissa tutkimuksissa on painotettu, että non-hemolyttiset kannat jäävät helposti huomaamatta normaalissa nieluviiljelyjen seulonnassa hemolyysin puuttumisen takia. Viljelyä pidetään kuitenkin nykyisin hyvin toimivana menetelmänä. (Cimolai – Trombley – Bhanju 2002.)



Kuvio 2. Non-hemolyttisiä *S. pyogenes*-bakteeripesäkkeitä. Non-hemolyttinen bakteeri ei hemolysoi veriagarmaljalla eli bakteeri ei hajota lainakaan maljan punasoluja.

Non-hemolyttinen A-streptokokki on esimerkiksi Yhdysvalloissa aiheuttanut nielutulehdus- ja reumakuume-epidemian vuonna 1971. Nielutulehduksen jälkitautina tavattiin reumakuumetta. Tämä vahvisti, että non-hemolyttiset A-streptokokkikannat voivat yhtä hyvin aiheuttaa jälkitauteja kuin tavanomaiset β -hemolyttiset A-streptokokki-kannat. (Purcell ym. 2013.)

Non-hemolyyttisten A-streptokokkikantojen esiintyvyys on aiemmissa tutkimuksissa ollut alhainen. Japanissa 1 690 kappaleen otoksessa oli 818 kappaletta positiivisia A-streptokokkinäytteitä, joista 9 kappaletta osoittautuivat non-hemolyyttisiksi A-streptokokkikannoiksi (Yoshino ym. 2010). Esimerkiksi 361 kappaleen nielunäyteotoksessa oli 3 % non-hemolyyttisiä A-streptokokkikantoja. Kanadassa 216 kappaleen otoksessa löytyi 1 non-hemolyyttinen A-streptokokki-kanta. (Purcell ym. 2013.)

Erään tutkimustapauksen epätyypillinen kliininen kuva ja näytteen erikoinen pesäkemorfologia johtivat siihen, että näyte tutkittiin 16S rRNA-sekvensoinnilla eli lajispesifisten geenialueiden monistuksella sekä fenotyyppien karakterisoinnilla. A-streptokokki tuottaa S- ja O-hemolysiiniä. Taudinaiheuttajaksi löydetty non-hemolyyttinen A-streptokokki oli mutantti S-hemolysiinitekijän suhteen. Bakteerin tuottama S-hemolysiini aiheuttaa A-streptokokille ominaisen β -hemolyyysin veriagarmaljalla, joten S-hemolysiinitekijän mutaation takia S-hemolysiä ei muodostu lainkaan. Tutkimuksessa painotetaan, että A-streptokokki aiheuttaa myös vakavia infektoita, joten diagnostiikan tulee olla luotettavaa myös mutatoituneiden kantojen osalta. Tietoisuutta non-hemolyyttisistä löydöksistä tulee lisätä mikrobiologian laboratorioissa. (Sönksen – Ekelund – Bruun 2006.)

Eräessä tutkimuksessa veriviljelyssä ilmennyt epätyypillinen A-streptokokki oli non-hemolyyttinen ja vaikea tunnistaa. Tämä non-hemolyyttinen A-streptokokki-kanta tuottaa vain O-hemolysiiniä eikä siksi saa aikaan β -hemolysiä, koska S-hemolysiini puuttuu. Toisinaan myös epäpuhtaudet kuten näytteenottokohdan lähialueiden mikrobit voivat häiritä bakteerimääritystä. Tutkimuksessa kehoitetaan olemaan laboratorioissa tietoisia varianteista A-streptokokkikannoista. (Turner – Gunn 2007.)

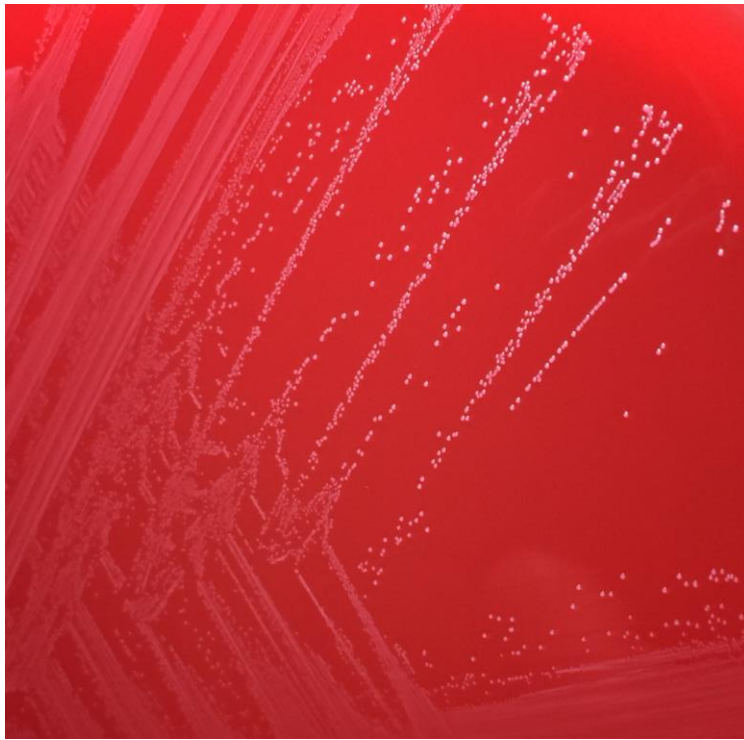
Jantsch ym. (2013) tutkimuksessa pehmytkudosnäyte sekvensoitiin epäselvän diagnoosin vuoksi ja A-streptokokki-kannan sag-operonissa havaittiin deleetio eli poistuma. Perimässä oli ennenaikainen lopetuskodoni S-hemolysiiniä koodaavassa geenissä. Geeni palautettiin plasmidivektorin avulla normaaliksi ja bakteerin ominaisuus tuottaa S-hemolysiiniä palautui. Samalla myös bakteerin β -hemolyyssikyky palautui. Tämä viittaa siihen, että SLS-geeni ja sagC-operoni ovat yhteydessä bakteerin toksisiin ominaisuuksiin. Tapaus osoitti bakteerin tunnistamisen vaikeuden rutiinitutkimuksissa, jos hemolyyssireaktio puuttuu pesäkkeen ympäriltä bakteerikannan mutaation vuoksi. Analysoinnissa tulee kiinnittää huomiota pesäkkeisiin, joiden ympärillä ei ole hemolyyssivyöhykettä eli punasolut eivät ole hajonneet, mutta pesäkkeen ulkonäkö muistuttaa *S. pyogenes*-bakteeria eli A-streptokokkia.

Yoshino ym. (2010) tutkimuksessa selvitettiin epf-geenistä (koodaa solunulkoista matriksia) sag-operoniin (S-hemolysiinin tuotanto) välillä olevalla deleetiolla eli poistumalla olevan vaikutusta bakteerin fenotyyppiin ja S-hemolysiinin tuotantoon. Näiden tekijöiden katsottiin olevan häiriö bakteerin tunnistamiselle. Tutkimuksessa 818 kappaleen otoksesta löytyi 9 kappaletta non-hemolyttisiä A-streptokokkikantoja (1,1 %). Tutkimuksessa painotettiin, että bakteeriviljelyssä on riski non-hemolyttisten A-streptokokkikantojen huomaamatta jäämiseen, vaikkakin kyseiset non-hemolyttiset A-streptokokkikannat ovat harvinaisia.

2.3 *Arcanobacterium haemolyticum*

Arcanobacterium haemolyticum (ent. *Corynebacterium haemolyticum*) eli arkanobakteeri on *Arcanobacterium*-sukuun kuuluva tärkein ihmispatogeeni. *A. haemolyticum* kuuluu difteroideihin eli koryneformeihin. (Nousainen ym. 2000). *A. haemolyticum* on aerobinen grampositiivinen sauvabakteeri, joka aiheuttaa nielutulehduksia yleensä 15–25 vuotiaalle henkilölle. Esiintyvyys nielunäytteistä on noin 0,5–2,0 %. (Carlson – Järvinen 2010: 154.)

A. haemolyticum-bakteerin pesäke on pyöreä ja pistemäinen. Ulkonäöltään *A. haemolyticum*-bakteeripesäke on vaaleahko ja läpikuultamaton (Kuvio 3). Pesäkkeen halkaisija on noin 0,5 millimetriä ja pesäkettä ympäröi yleensä kapea β -hemolyyssivyöhyke. (Alós.) Jos *A. haemolyticum*-pesäkkeen kaapii pois verimaljan agarilta, jää agarin pinnalle tumma kuoppa siinä kohdassa olleesta bakteeripesäkkeestä (Cummings ym.1993).



Kuvio 3. *Arcanobacterium haemolyticum*-bakteeripesäkkeitä, jotka ovat veriagarmaljalla pistemäisenä kasvustona. Tämä *A. haemolyticum*-kanta on non-hemolyyttinen eli hemolyysiä ei ole näkyvissä.

Rokkomainen ihottuma, kuume, yskä ja suurentuneet imusolmukkeet ovat mahdollisia oireita *A. haemolyticum*-infektiossa. Taudille spesifiset iho-oireet ilmaantuvat tartunnan alkuvaiheessa, joka voi hankaloittaa taudin tunnistamista oireiden perusteella. (Nousiainen ym. 2000.) *A. haemolyticum*-bakteeri voi aiheuttaa sepsistä eli verenmyrkytystä ja diabeetikkojen jalkainfektioita (Carlson – Järvinen 2010: 154).

A. haemolyticum-bakteeri kasvaa hitaasti, joten sen esiintulo on haastavaa laboratorioolosuhteissa (Carlson – Järvinen 2010: 154). Kasvu voidaan todelta viljelymaljalta 24–48 tunnin kuluttua viljelystä kasvatuksen jälkeen (Nousainen ym. 2000). *A. haemolyticum*-bakteeria ei yleensä etsitä normaalista nieluviiljelystä, joten *A. haemolyticumia* epäiltäessä pyyntönä tulee olla laaja nieluviiljely eli Ps-BaktVi (Bakteeri, nieluviiljely, laaja).

A. haemolyticum on tolerantti penisilliinille, joten antibiootti ei tapa bakteeria vaan estää bakteerin kasvua. Tämä tuottaa ongelmia bakteeri-infektion hoidon suhteen. Makrolidit ja niiden ryhmään kuuluva erytromysiini tehoavat sen sijaan kyseiseen bakteeriin paremmin. (Nousiainen ym. 2000.)

Aiemmissa tutkimuksissa on havaittu, että nielussa esiintyy useammin β -hemolyyttisiä streptokokkeja kuin *A. haemolyticum*-kantoja (Carlson – Renkonen – Kontiainen 1994). Tässä Carlson ym. (1994) tutkimuksessa 3 922 kappaleen nielunäyteotoksesta löytyi *A. haemolyticum*-bakteeria 0,5 % eli pienessä osassa otosta. Puolessa infektiotapauksista *A. haemolyticum*-kanta oli ainoa nielussa esiintyvä bakteeri ja puolessa tapauksista esiintyi lisäksi myös β -hemolyyttisiä streptokokkeja. Tutkimus painottaa, että β -hemolyttiset streptokokit esiintyvät nielussa useammin kuin *A. haemolyticum*-bakteeri.

Mackenzie ym. (1995) tutkimuksessa *A. haemolyticum*-bakteeria tutkittiin yhteensä 11 620 kappaleen nielunäyteotoksesta. *A. haemolyticum*-bakteeria esiintyi 42 näytteessä, erityisesti 15–18-vuotiailla henkilöillä. *A. haemolyticum*-bakteerin esiintyvyys otoksessa oli 2,5 %. Tutkimus osoitti, että *A. haemolyticum* on patogeeni, jota esiintyy erityisesti nuorilla henkilöillä, yleensä noin 15–18-vuotiailla.

Eräissä aiemmissa tutkimuksissa havaittiin, että *A. haemolyticum*-bakteerin nopea tunnistaminen on tärkeää oikean antibiootin löytämiseksi. *A. haemolyticum*-bakteerin hidas kasvu ja heikko hemolyysi häiritsevät bakteerin tunnistamista. (Volante – Corina – Conucci – Calò – Artuso 2008.) Toisessa tutkimuksessa havaittiin, että on tärkeää tunnistaa *A. haemolyticum*-kannat ja erottaa kannat muista läheisistä taudinaiheuttajista. Myöhäiseksi jäänyt bakteerin tunnistus voi aiheuttaa vakavia infektioita. (Parija ym. 2005.) Eräissä tutkimuksissa havaittiin, että *A. haemolyticum*in β -hemolyysi tuli ilmi nopeammin ihmisveriagarmaljalla kuin lampaanveriagarmaljalla (Balikci – Topkayan– Belaş 2011; Gaston – Zurowski 1996).

2.4 *Fusobacterium necrophorum*

Fusobacterium necrophorum on gramnegatiivinen ja anaerobinen sauvabakteeri. Levitessään bakteeri aiheuttaa tyypillisesti nuorille perusterveille henkeä uhkaavan infektion, joka kantaa nimeä Lemierren. *F. necrophorum*-bakteeri on tärkein Lemierren-oireyhtymän aiheuttaja. Tärkeää on diagnosoida ja hoitaa infektio mahdollisimman nopeasti, jotta vakavilta jälkiseuraamuksilta vältytään. Esiintyvyys Lemierren-oireyhtymällä on arviolta 0,8–1,5 infektiota vuodessa miljoonaa henkeä kohden. Suomessa näin arvioiden tapauksia on vuosittain 5–8 kappaletta. Taudin yleistymiselle viime vuosina on nähty syinä esimerkiksi mikrobilääkkeiden harkitumpi käyttö kuin ennen ja parantunut diagnostiikka. *F. necrophorum*-infektion ominaisia löydöksiä ovat *F. necrophorum*-positiivinen veriviljely sekä kuvantamistutkimuksilla kaulan ja pään alueen laskimoiden septiset tromboosit. (Nuikka ym. 2018.)

Lemierren-oireyhtymä alkaa yleensä ylähengitystieinfektioilla, jolloin esiintyy tonsilliittia ja seurauksena kurkkupaise. Infektiossa voi esiintyä toispuoleisesti niska- ja kaulakipua. Paiseesta bakteeri leviää pään- ja kaulanalueelle ja septiset embolukset eli tulpat leviävät tältä alueelta ympäri kehoa esimerkiksi keuhkoihin, luihin, niveliin ja maksaan. *F. necrophorum* voi jäädä huomaamatta, koska bakteeri vaatii anaerobiviljelyä. Bakteeri kasvaa lisäksi hitaasti. Metronidatsoli on suosittu mikrobilääke infektion hoitoon, koska se tehoaa kaikkiin *Fusobacterium*-kantoihin. (Nuikka ym. 2018.) HUSLABin Bakteriologian yksikössä ei ole tarjolla nielun anaerobiviljelyä, joten kyseisessä laboratoriossa ei *F. necrophorum*-bakteeria pystytä löytämään ja diagnosoimaan.

Lemierren-oireyhtymään sairastavuutta sekä kuolleisuutta edistää *F. necrophorum*-bakteerin vaikea eristämien ja tunnistaminen laboratorio-olosuhteissa. Näin hoito voi viivästyä. Eräässä tutkimuksessa suositellaan käyttämään kuvantamista taudin toteamisen tueksi ja antibioottien nopeaa käyttöä. (Creemers-Schild ym. 2014.)

3 Bakteerien tutkiminen nielutulehduksissa

Nieluviljely on nielutulehduksien perusdiagnostiikkamenetelmä (Blomberg 2012a). Nieluviljelyä pidetään toimivana ja niin sanottuna standardimenetelmänä muihin vastaaviin testeihin verrattuna. Nieluviljelyn tulokseen vaikuttaa esimerkiksi työntekijöiden koulutus eli kuinka työntekijät tulkitsevat bakteereita ja niiden ominaisuuksia viljelymaljoilta. (Blomberg 2012b.) Viljelyn hyviä puolia ovat laajat jatkotutkimusmahdollisuudet kuten antibioottiherkkyuden määrytykset. Viljelyn tulkintaa voi vaikeuttaa näytteeseen joutunut normaalifloora. (Heikkilä ym. 2005: 95.)

Nielunäytteenottoon tulee kiinnittää erityistä huomiota, sillä näyte tulee ottaa potilaan mahdollisesti peitteisistä tonsilloista eli nielurisoista ja nielun takaseinästä näytteenottotikulla. Näytteenottotikulla ei saa koskettaa kieltä eikä hampaita. (Blomberg 2012a.) Ennen nielunäytteenottoa on hyvä olla syömättä ja juomatta sekä vältettävä erilaisten huuhteiden ja kurkkupastillien käyttöä, jottei nielussa olevat bakteerit vähenisivät (Nielunäytteenotto).

Bakteeriviljelyssä näyte viljellään elatusaineelle, jossa on suotuisat keinotekoiset olosuhteet bakteerille. Elatusaineissa on optimaalinen määrä esimerkiksi ravinneaineita ja suoloja. Bakteerit lisääntyvät nopeasti ja eksponentiaalisesti elatusainemaljoilla. (Eskelinen 2016b.) Osa bakteereista vaatii happea lisääntyäkseen ja osa bakteereista ei happea

siedä. Bakteereja kasvatetaan viljelykaapeissa, joissa on otettu huomioon bakteerien yksilölliset kasvuolosuhteiden tarpeet. Osalla bakteereista lisääntyminen on optimaalista hiilidioksidi läsnä ollessa. Tällöin bakteerien kasvatuksessa käytetään hyödyksi CO₂-viljelykaappeja, joihin lisätään hiilidioksidikaasua. (Heikkilä ym. 2005: 35.)

Näyte viljellään sopivalle elatusaineelle yleensä hajotusviljelytekniikalla manuaalisesti käsin tai WASP-viljelyautomaatilla. Neljäsosa maljan pinnasta pyyhitään näytteenottotikulla tikkua samanaikaisesti pyöritellen. Tämän jälkeen ensimmäinen hajotus tehdään puolelle maljalle puhtaalla viljelysauvalla. Sauvalla tehdään vielä toinen hajotus, joka tarkoituksena on tuoda esiin yksittäiset bakteeripesäkkeet viljelmän kasvaessa. (Heikkilä ym. 2005: 105.)

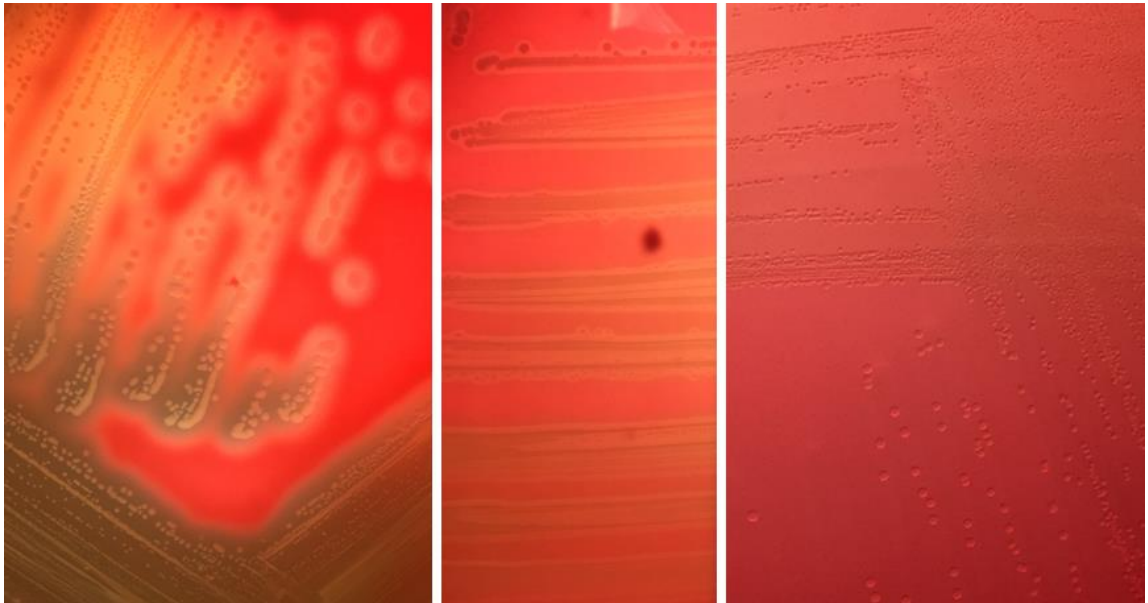
Nieluviljelyt kasvavat niille suotuisissa olosuhteissa yleensä 1–2 vuorokautta (Heikkilä ym. 2005: 95) Nieluviljelymaljoihin lisätty lampaanveri on tavallisin ja parhaimmaksi koettu etenkin streptokokkeja ja niiden hemolyyttisiä ominaisuuksia havaitsemaan (Heikkilä ym. 2005: 36). A-streptokokki kasvaa hyvin +37 °C ja 5–10 % hiilidioksidin läsnä ollessa (Gera – McIver 2013).

3.1 Streptokokkien tunnistustestit

Bakteerit voidaan värjätä Hans Christian Gramin mukaan nimetyn värjäyksen avulla (Coico 2005; Vaara ym. 2010: 21). Gram-värjäyksen avulla bakteerit voidaan luokitella esimerkiksi grampositiivisiin ja -negatiivisiin kokkeihin sekä grampositiivisiin ja -negatiivisiin sauvoihin mikroskooppia apuna käyttäen (Nousiainen ym. 2000; A-ryhmän streptokokki 2016). Gram-värjäyksessä grampositiiviset bakteerit värjäytyvät violeteiksi ja gramnegatiiviset vaaleanpunaisiksi (Vaara ym. 2010: 21). Grampositiivisilla bakteereilla on paksu, monikerroksinen peptidoglykaanikerros, joka säilyttää kristalliviolettivärin sisällään ja bakteerit värjäytyvät violeteiksi. Gramnegatiivisilla bakteereilla sen sijaan on ulkoinen solukalvo, mutta ohut peptidoglykaanikerros. Safraniini värjää gramnegatiiviset bakteerit vaaleanpunaisiksi. (Gram-värjäys.)

Hemolyysi tarkoittaa erytrosyyttien eli punasolujen hajoamista. Veriagarmaljalle viljeltyt bakteerit hajottavat veriagarmaljan punasoluja S- ja O-hemolysiinien avulla. Hemolysiinit ovat eksotoksiineja, joka aiheuttavat hemolyyssireaktion. Hemolyyssireaktioita on kolmea lajia ja ne tulevat esille veriagarmaljoilla (Kuvio 4). Hemolyyssireaktioista β-hemolyysi on täydellinen ja veriagar muuttuu punaisesta kellertäväksi ja samalla läpinäkyväksi S- ja O-hemolysiinien takia. O-hemolysiini (SLO) on happilabiili eli epävakaa ja S-hemolysiini

(SLS) on happistabiili eli happivakaa. Epätäydellisessä α -hemolyysissä veriagar muuttuu vihertäväksi. Tämä vihertävä α -hemolyysireaktio johtuu bakteerin tuottamasta vetyperoksidista, joka hapettaa veriagarmaljan punasolujen hemoglobiinin methemoglobiiniksi. Non- eli gamma(γ)-hemolyysi tarkoittaa tilannetta, jossa hemolyysivyöhykettä ei muodostu lainkaan bakteeripesäkkeiden ympärille eli bakteeri ei hajota ollenkaan veriagarmaljan punasoluja. (Sharma – Gupta 2014.) Hemolyysiominaisuus voi vaihdella riippuen, minkä eläimen verta agarmaljaan on lisätty (Anand – Gordon – Shaw – Fonseca – Olsen 2000).



Kuvio 4. Vasemalla β -hemolyyttinen *Streptococcus pyogenes*, keskellä α -hemolyyttinen *Enterococcus faecium* ja oikealla non-hemolyyttinen *Streptococcus pyogenes*.

Katalaasitestillä pystytään erottamaan esimerkiksi streptokokit stafylokokkeista. Katalaasiposiitiviset bakteerit tuottavat katalaasientsyymiä, joka hajoittaa vetyperoksidin hapeksi ja vedeksi. Positiivinen tulos näkyy seoksen kuplimisena. Katalaasia tuottamattomat katalaasinegatiiviset bakteerit eivät muodosta kuplintaa, kun bakteerimassaa lisätään 3 %-vetyperoksidiliuokseen. Stafylokokit ovat katalaasiposiitivisia ja streptokokit ovat katalaasinegatiivisia. (Reiner 2010.)

β -hemolyttiset streptokokit (BHS) voidaan jakaa eri ryhmiin agglutinaatiotestin avulla. Bakteerit jaetaan soluseinän antigeenien perusteella eri Lancefieldin ryhmiin: A, B, C ja G (D, F). (Rantala 2013.) Agglutinaatiotesti on nimetty testin kehittäjän Rebecca Lancefieldin mukaan. A-streptokokeilla on soluseinässään antigeeni A, johon ryhmäspesifeillä vasta-aineilla päällystetyt agglutinaatiotestin latex-partikkelit sitoutuvat ja tapahtuu

agglutinaatio. Agglutinaatio näkyy seoksen rakeisuutena testialustalla, jossa on bakteerisuspensiota ja agglutinaatiotestin ryhmäspesifistä reagenssia. (Streptococcal grouping kit).

Bakteerin tunnistus voidaan myös tehdä käyttäen erilaisia biokemiallisia testejä tai menetelmiä, joilla selvitetään taudinaiheuttajan perimä (Rantala 2013). A-streptokokki eroaa muista β -hemolytyisistä bakteereista basitrasiiniherkkyydensä vuoksi. A-streptokokki muodostaa viljelymaljalle lisätyn basitrasiinikiekon ympärille estorengaan. (Blomberg 2012a.)

3.2 Abbott ID NOW™ Strep A 2

Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laite on molekulaarinen ja in vitro-testi, jonka analysointiaika on noin kuusi minuuttia (Kuvio 5). Menetelmänä toimii kvalitatiivinen ja isoterminen nukleiinihappojen monistustekniikka, jossa templaatteja hyödynnetään monistamisessa. Sitoutuneet fluoresenssileimatut molekyylit tunnistetaan fluoresenssin avulla. Laite antaa tuloksen nopeasti, koska isotermisen monistamisen takia lämpötilojen muuttaminen ja nukleiinihapon puhdistaminen jäävät välistä. (Abbott.)

Isoterminen menetelmä toimii suhteellisen alhaisessa sekä tasaisessa lämpötilassa. Menetelmä on nopeampi ja halvempi kuin markkinoilla olevat PCR (Polymerase Chain Reaction) -monistuslaitteet, joita käytetään perimän monistamiseen lämpötila eroja hyödyntäen. (Kerttula – Lavikainen 2017.) Negatiivinen vastaus saadaan Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laitteella kuudessa minuutissa, positiivinen tulos jopa 2–3 minuutissa (Abbott). Abbott ID NOW™ Strep A 2-laitteen herkkyys on 98,5 % ja spesifisyys 93,4 % (Alere™ i strep A 2 on nyt ID NOW™ strep A 2).



Kuvio 5. Kuvassa Abbott ID NOW™ (Alere™ i) -laite, jolla analysoitiin negatiiviseksi vastattuja nielunäytteitä uudelleen etsien niistä non-hemolyttisiä A-streptokokkikantoja, jotka eivät hemolysoi veriagarmaljalla.

3.3 VITEK® MS MALDI-TOF

MALDI-TOF (=Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight) -analysaattorin toiminta perustuu massaspektrometriaan ja laitetta käytetään bakteerien lajimääritykseen klinisen mikrobiologian laboratorioissa. Analysaattorilla pystytään tunnistamaan näytteestä erilaisia proteiineja, peptidejä ja polymeerejä. Mikrobin tunnistaminen perustuu tyhjiöputkessa lentävien eri ionien nopeuseroihin. Saatuja parametrejä verrataan tietokantaan, jossa on esimerkiksi tiettyjen bakteerien parametrejä. Käsité TOF (=time of flight) eli lentoaika kuvaa analysaattorin menetelmää, jossa kappaleet lentävät massojensa koon takia tyhjiöputkessa eri nopeuksilla eri ajassa. (MALDI-TOF Mass Spectrometry, VITEK® MS; Singhal – Kumar– Kanaujia – Virdi 2015.)

Bakteeripesäkkeistä peräisin oleva bakteerimassa levitetään metalliselle näytelevylle ja päällystetään matriksilla. Matrikseja on erilaisia ja käytettävä matriksi valitaan tutkittavan kohteen mukaan. Matriksi koostuu happamista molekyyleistä, orgaanisista aineista ja useimmiten tislatus vedestä. Laitteen 337 nanometrin aallonpituudella toimiva lasersäde höyrystää matriksin ja absorboi energiaa lasersäteestä. Tapahtuu ionisaatio, jossa näyte varautuu sähköisesti, kun energia siirtyy näytteeseen. Massa-varaussuhde mitataan. Näytteestä ja matriksista muodostuneet ionit kiihdytetään sähkökentän avulla ja ionit järjestyvät tyhjiöön eri järjestyksessä massakoon perusteella. Lentoaika, jonka ioni

kulkee tyhjiön läpi, mitataan. Lentoaika on riippuvainen varauksen ja massan suhteesta. Pienet ionit etenevät nopeammin tyhjiön läpi. Lentoputken ionipeili korjaa ionien välisiä eroja ja tarkentaa mittausta. Muodostuneita spektrejä verrataan tietokantojen tietoihin ja saadaan määritettyä oikea bakteerilaji näytteelle. (MALDI-TOF Mass Spectrometry, VI-TEK® MS; Singhal ym. 2015.)

3.4 Xpert® Xpress Strep A

GeneXpert® -laitteessa menetelmänä toimii reaaliaikainen-PCR eli polymeraasiketjureaktio. (GeneXpert® IV). PCR-menetelmällä pystytään monistamaan esimerkiksi taudinaiheuttajan DNA:ta ja tunnistamaan siitä alukkeiden avulla DNA-jaksoja. Lämpötilojen vaihtelun avulla kaksijuosteinen perimä saadaan avautumaan, monistumaan ja alukkeet sitoutumaan avautuneisiin yksijuosteisiin DNA-molekyyleihin. Syklejä toistetaan noin 30 kertaa ja saadaan lopputuotteena monistettua DNA:ta. (Nukleiinihappojen monistaminen.) Reaaliaikaisessa-PCR -menetelmässä voidaan näytteistä mitata etsittävän DNA-jakson määrää merkkiaineiden avulla reaaliaikaisesti. (QPCR-menetelmä).

Xpert® Xpress Strep A -testissä on korkea herkkyys (100 %) ja spesifisyys (94.1 %) laitteen molekulaarisen menetelmän ansiosta. (Xpert Xpress Strep A – Nyt saatavilla! 2017) Laitte havaitsee reaaliaikaisen-PCR -menetelmän avulla leimatun kohdesekvenssin monistetuista nukleiinihapoista. Strep A -testikasetti sisältää määrittämiseen tarvittavat reagenssit ja tutkittava näyte lisätään valmiiseen testikasettiin. A-streptokokkipositiivinen tulos saadaan jopa 18 minuutissa. (GeneXpert® IV.)

4 Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyö liittyy nielutulehduksiin, joiden aiheuttajat ovat toisinaan haastavasti havaittavissa nykyisillä diagnostimenetelmillä. Opinnäytetyön tarkoitus oli selvittää, kuinka luotettava nielun negatiivinen streptokokkiviljelytulos on, paljonko non-hemolyyttisiä A-streptokokkeja jäi huomaamatta viljelymenetelmää käytettäessä ja mikä oli non-hemolyyttisten A-streptokokkien kliininen merkitys. Tulosten pohjalta HUSLABin Bakteriologian yksikkö sai tietoa ovatko analyysimenetelmät tarpeeksi herkkiä määrittämään non-hemolyyttisiä A-streptokokki-kantoja.

Lisäksi tutkittiin, paljonko *Arcanobacterium haemolyticum*-bakteeria esiintyi nielunäytteissä. Nykyisin nielunäytteitä kasvatetaan vuorokausi, mutta *A. haemolyticum*-bakteeri

vaatisi pidempiaikaista kasvatusta. Tutkimuksen avulla saadaan selville, onko *A. haemolyticum*-bakteeria helpompi havaita pidempään kasvaneilta nieluviiljelymaljoilta ja täytyykö kasvatusaika olla pidempi, jotta kyseinen kanta saataisiin esiin nielunäytteistä.

Tutkimuskysymykset:

- 1) Kuinka luotettava negatiivinen nielun streptokokkiviljelyn (Ps-StrVi) tulos on?
- 2) Kuinka paljon non-hemolyttisiä A-streptokokkeja esiintyy nielunäytteissä?
- 3) Kuinka paljon *Arcanobacterium haemolyticumia* esiintyy nielunäytteissä?
- 4) Mikä on non-hemolyttisten streptokokkikantojen kliininen merkitys?

5 Opinnäytetyön toteutus

Tutkimus toteutettiin HUSLABin Kliinisen mikrobiologian laboratoriossa Bakteriologian yksikössä Meilahdessa, Helsingissä viikoilla 46–49 vuonna 2018. Opinnäytetyössä käytettiin pääasiallisina analysointimenetelmänä Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laitetta, jolla tutkittiin 253 kappaletta negatiiviseksi vastattuja eSwab-nielunäytteitä etsien näytteistä non-hemolyttisiä A-streptokokkeja. Toisena analysointimenetelmänä käytössä oli VI-TEK® MS MALDI-TOF -analysaattori, jonka avulla tunnistettiin negatiivisilta nieluviiljelymaljoilta (n=1541) mahdollisia *A. haemolyticum*-bakteereita. Xpert® Xpress Strep A -testiä käytettiin Abbott ID NOW Strep A 2 -testin referenssimenetelmänä.

5.1 Näytteiden kerääminen

Tutkimuksessa käytetyt nielunäytteet olivat potilasnäytteitä. Nielunäytteet saapuvat eri HUSLABin toimipisteistä Bakteriologian laboratorioon analysoitavaksi. Näytteet saapuivat tutkimusohjekirjan mukaisesti geelikuljetusputkissa (esimerkiksi Transpocult) tai nestemäisissä kuljetusputkissa (eSwab) (Streptokokki, viljely, (beetahemolyttinen streptokokki), nielueroitteestä). Geelikuljetusputkissa saapuneet näytteet viljellään käsin CO-maljoille, mutta eSwab-nielunäytteet viljellään käyttäen apuna WASP-viljelyautomaattia, joka viljelee nielunäytteen viljelymaljalle. Non-hemolyttisen A-streptokokin osalta tutkimuksessa oli mukana vain eSwab-kuljetusputkiin otettuja näytteitä.

Nielunäytteet viljeltiin CO-maljalle (kolistiini-oksoliinihappo), joka on selektiivinen streptokokkimalja, joka sisältää lampaan verta. Streptokokkiselektiivisyyden vuoksi streptokokkien kasvu on maljalla optimaalinen. CO-viljelymalja on ravinnerikas ja juuri tällä maljalla streptokokkien hemolyysikyky tulee hyvin ilmi. (Petts 1984.)

Nielunäytteiden viljelemisen jälkeen maljat menivät kasvamaan CO₂-kaappiin ja itse nielunäyteputket menivät nieluhuoneeseen säilytykseen odottamaan vastausta, minkä jälkeen näytteistä valikoitui satunnainen otos mukaan tutkimukseen (n=253). Nielunäytemaljat seulottiin ja bakteeripesäkkeet analysoitiin normaaliin tapaan yhden vuorokauden kasvatuksen jälkeen nielupisteessä eli maljoilta etsittiin streptokokeja muistuttavia β-hemolyyttisiä pesäkkeitä. Pesäkkeistä tehtiin agglutinaatiotesti, joka antaa vastaukseksi A, G, C tai B-streptokokki. Potilas sai vastauksen normaaliin tapaan ja tämän jälkeen nielunäyteputki siirtyi tutkimusaineistoksi opinnäytetyöhön.

Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laitteella analysoitavat negatiiviseksi vastatut nielunäytteet (n=253) non-hemolyyttisten A-streptokokin etsintään valittiin satunnaisesti eSwab-nielunäytteistä. Nielunäytteitä ei valikoitu muuten kuin ottopäivänmäärän eli näytteen tuoreuden suhteen. Näytteinä pyrittiin käyttämään edellispäivänä viljeltyjä näytteitä, jolloin näytteet ovat mahdollisimman tuoreita ja ainakin negatiivinen vastaus oli jo vastattu My+ -potilastietojärjestelmään. Näytevirta oli sen verran runsasta, ettei näytteiden tuoreuden suhteen ollut ongelmaa. Näytteeksi valikoitui satunnaisesti näytteitä naisilta ja miehiltä sekä eri ikäluokista ja hoitoyksiköistä.

Tuore nielunäyte mahdollistaa optimaalisen tuloksen Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laitteella. Nielunäytettä voi säilyttää 72 tuntia huoneenlämmössä tai jääkaappilämpötilassa. Näytettä täytyy myös olla riittävästi oikean tuloksen saamiseksi ja näyte tulee olla oikein otettu. Kosketusta kieleen, hampaisiin ja poskiin tulee välttää nielunäytettä otettaessa, jotta näytteestä tulisi edustava. (Abbott.)

A. haemolyticumin etsimisessä käytettiin negatiiviseksi seulottuja nieluviljelymaljoja (n=1541). Ajanjaksolta 11.11. – 20.11.2018 kerättiin kaikki yhden vuorokauden kasvatetut negatiivisiksi nielupisteellä todetut nieluviljelymaljat lisäkasvatukseen kahdeksi vuorokaudeksi CO₂- eli hiilidioksidiviljelykaappiin. Maljoja kasvatettiin lisää kaksi vuorokautta, joten CO-viljelymaljat olivat CO₂-viljelykaapissa kokonaisuudessaan kolme vuorokautta *A. haemolyticum*-bakteerin hidaskasvuisuuden vuoksi. Tällä pyrittiin maksimoimaan bakteerin löytyminen ja testaamaan pidemmän kasvatusajan vaikutusta bakteerin kasvamiseen.

5.2 Näytteiden analysointi

Non-hemolyttisiä A-streptokokkeja etsittiin negatiivisiksi vastatuista eSwab-nieluviljelynäytteistä käyttämällä Abbott ID NOW™ Strep A 2 -analysaattoria. *A. haemolyticum*-bakteeria etsittiin nieluviljelymaljoilta käyttäen VITEK® MS MALDI-TOF -analysaattoria (Kuvio 6). Negatiiviseksi vastatut eSwab-nielunäytteet analysoitiin Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laitteella, joka antaa tulokseksi A-streptokokki positiivinen tai negatiivinen. Laitteella etsittiin non-hemolyttisiä A-streptokokkikantoja, jotka eivät non-hemolyysin taakia tule aina välttämättä esiin maljojen seulonnassa yhden vuorokauden kasvatuksen jälkeen.

Tutkimuspäivinä Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laitteella tutkittavat nielunäytteet varmistettiin My+ -potilastietojärjestelmästä negatiivisiksi, jolloin näytteet sopivat tähän tutkimukseen. Negatiiviseksi todetut nielunäytteet syötettiin Excel-laskentataulukkoon ja ajettiin satunnaisessa järjestyksessä Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laitteella. Kokonaisuudessaan negatiivisiksi todettuja eSwab-nielunäytteitä tutkittiin Abbott ID NOW™ Strep A 2 -testillä yhteensä 253 kappaletta. Näyteitä analysoitiin päivässä noin 20 kappaletta.

Opinnäytetyön toteutus aloitettiin Alere™ i Strep A -laitteella. Uusi versio laitteesta saapui tutkimuksien aikana, jolloin laite sai uuden nimen Abbott ID NOW™. Laite säilyi samana, mutta päivitettyjen reagenssien johdosta analysointi-aika lyheni noin 2 minuuttia. Negatiivinen vastaus saatiin viimeistään 6 minuutissa, positiivinen nopeamminkin. (Abbott). Työvaiheista jäi pois näytevastaanottimen lämmitys. Tämä nopeutti ja suoraviivaisti työnkulkua selvästi. Abbott ID NOW™ Strep A 2 -testillä negatiiviseksi vastatuista nielunäytteistä saadut positiiviset A-streptokokkitulokset varmistettiin Xpert® Xpress Strep A -testillä.

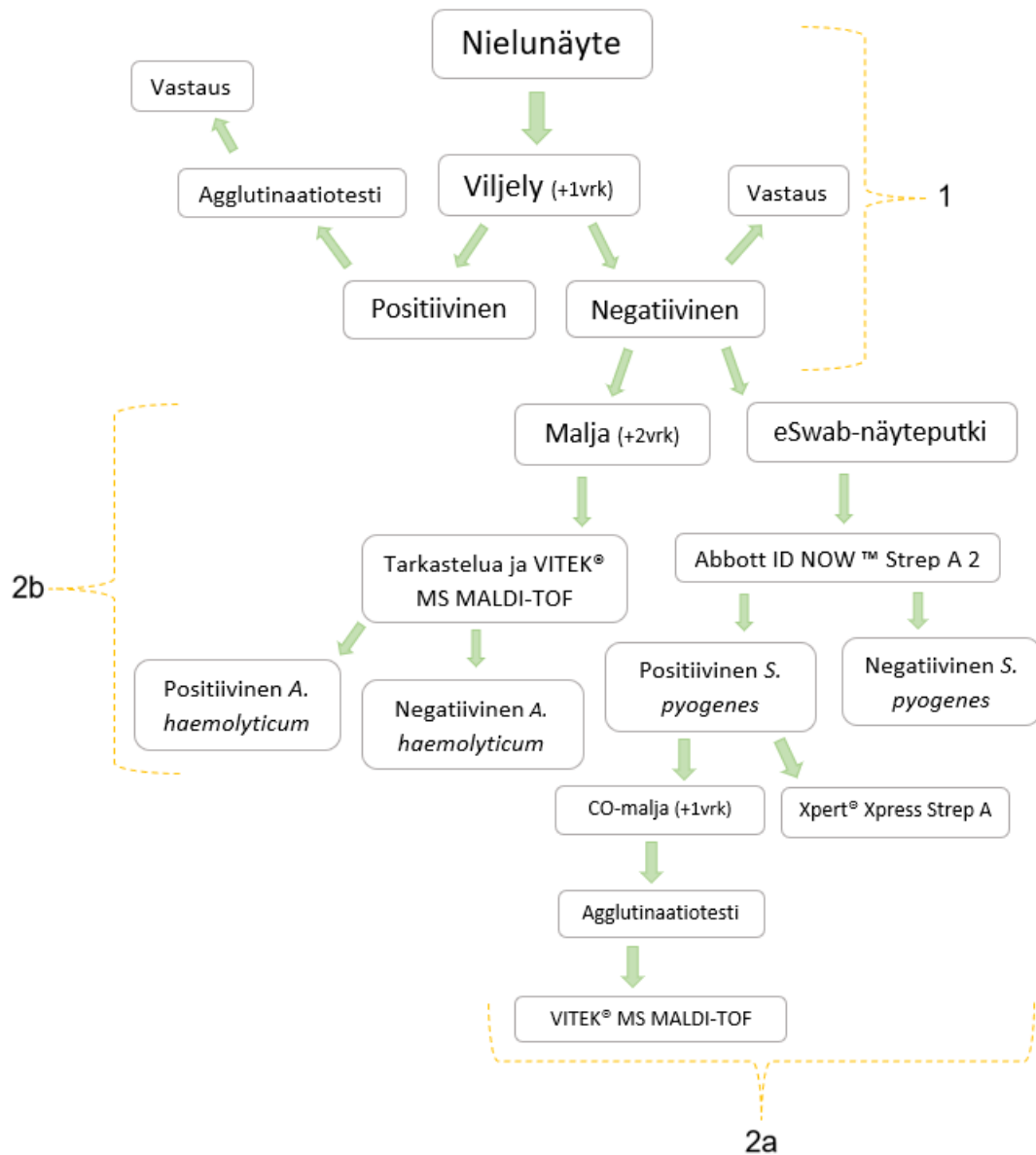
Viljelymaljoilta, joilta etsittiin *A. haemolyticum*-bakteeria tehtiin päätös bakteerin pesäkemorfologian perusteella VITEK® MS MALDI-TOF -analyysistä. Tutkimuksen aikana VITEK® MS MALDI-TOF -analysaattorilla tehtiin analyysyjä 213 kappaletta *A. haemolyticum*-bakteeria epäiltäessä eli noin 14 % koko otoksesta (n=1541). VITEK® MS MALDI-TOF -analyysyjä tehtiin keskimääräin 23 kappaletta päivässä. VITEK® MS MALDI-TOF -analyysyjä 182 kappaletta onnistui (85 %). Epäonnistumisen syynä oli esimerkiksi, ettei näytettä ollut riittävästi. Osasta heikko- ja niukkasvuisista maljoista tehtiin puhdasviljelmiä pesäkkeistä, jotka näyttivät etsimältämme bakteerilta.

Puhdasviljelmä on yhdestä bakteeripesäkkeestä tehty puhdas viljelmä, jossa on vain yhtä bakteeria (Heikkilä ym. 2005: 95). Näin ollen joistakin maljoista tehtiin useampia VITEK® MS MALDI-TOF -analyysijä. Kolme vuorokautta kasvatettuja viljelymaljoja tarkasteltiin päivässä noin 19–297 kappaletta. Keskimäärin viljelymaljoja tarkasteltiin 171 kappaletta päivässä.

Sivulla 22 olevan kuvion avulla tutkimuksen kulku on helpompi hahmottaa. Ensimmäisessä osassa (1) nielunäyte saapui laboratorioon, näyte viljeltiin, kasvatettiin ja analysoitiin. Potilas sai tämän jälkeen tuloksen My+ -potilastietojärjestelmään. Toisessa osassa (2a) negatiiviseksi vastattu eSwab-näyteputki valikoitui mukaan tutkimukseen, jossa etsittiin non-hemolyttisiä A-streptokokkeja. Näyte analysoitiin Abbott ID NOW™ Strep A 2 -testillä. Jos näyte oli A-streptokokkipositiivinen, tehtiin näytteestä viljelymalja, jota kasvatettiin vuorokausi. Viljelymaljalla tuli ilmi bakteerin hemolyysi tai hemolyysin puute. Kasvatuksen jälkeen maljalla olevista pesäkkeistä, jotka muistuttavat A-streptokokkia tehtiin agglutinaatiotesti ja VITEK® MS MALDI-TOF. Nämä vahvistivat, oliko kyseessä *S. pyogenes*- eli A-streptokokki-bakteeri. Abbott ID NOW™ Strep A 2 -testillä positiiviset näytteet varmistettiin positiivisiksi myös Xpert® Xpress Strep A -testillä (Kuvio 6).

A. haemolyticum-bakteerin etsimiseksi vuorokauden kasvaneet negatiiviset nieluviljelymaljat kerättiin talteen tietyltä ajanjaksolta ja niitä kasvatettiin lisää kaksi vuorokautta CO₂-viljelykaapissa (2b). Yhteensä kolmen vuorokauden kasvatuksen jälkeen jokainen nielupisteellä negatiiviseksi vastattu CO-viljelymalja luettiin Excel-laskentataulukon. Maljoilta etsittiin *A. haemolyticum*-bakteeria tarkastelemalla maljalla kasvavia bakteeripesäkkeitä. Huomiota kiinnitettiin pesäkkeiden kokoon, väriin, läpinäkyvyyteen ja hemolyysiin. Tarvittaessa maljoja verrattiin referenssimaljaan, jossa kasvoi hemolysoimatonta *A. haemolyticum*-bakteeria (Kuvio 3).

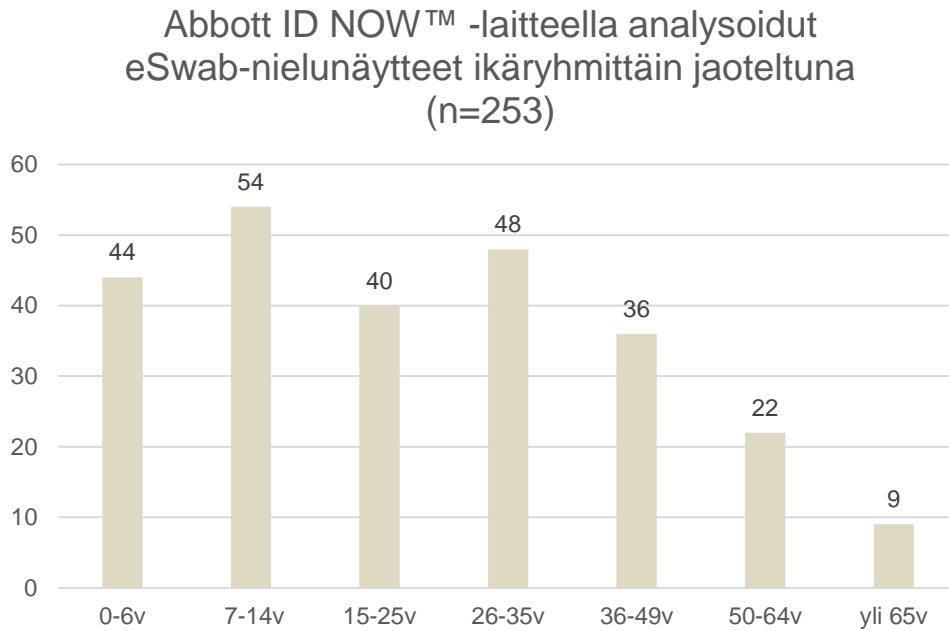
Maljalla kasvavien pesäkkeiden muistuttaessa *A. haemolyticum*-bakteeria, tutkittiin pesäkkeet VITEK® MS MALDI-TOF -analyysaattorilla, jolla varmistettiin maljalla olevien pesäkkeiden bakteerilaji. (Kuvio 6) Tarvittaessa alkuperäisiltä maljoilta tehtiin hajotus- tai puhdasviljelmiä tilanteen mukaan, jolloin saatiin lisää pesäkkeitä tarkasteluun ja VITEK® MS MALDI-TOF -analyysiin. Maljoja tarkasteltiin yhteensä 1541 kappaletta.



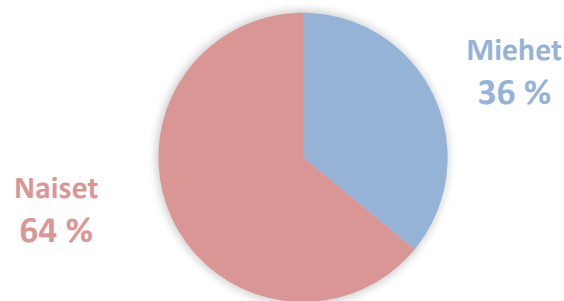
Kuvio 6. Kuviossa on esitettyä nielunäytteiden kulku non-hemolyyttisten A-streptokokkien (eSwab) ja *A. haemolyticum*-bakteerien (viljelymalja) osalta. Kuvio auttaa hahmottamaan tutkimuksen ja näytteiden kulun kokonaisuutta.

Tutkimukseen, jossa etsittiin non-hemolyyttisiä A-streptokokkeja valikoitui eniten lasten nielunäytteitä (Kuvio 7). Naisten nielunäytteitä oli tutkimuksissa mukana enemmän kuin miesten (Kuvio 8). Naisten näytteitä oli mukana Abbott ID NOW™ -laitteella tutkittaessa yhteensä 162 kappaletta ja miesten 91 kappaletta.

Kuvio 7. Kaikkien Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laitteella tutkittujen eSwab-nielunäytteiden ikäkaumat pylväsdiagrammissa esitettynä. Ikäjakautuksessa tuodaan esille eri ikäluokkia kuten lapset/kouluikäiset, nuoret aikuiset ja vanhukset.



SUKUPUOLIJAKAUMA
NIELUNÄYTEOTOKSESSA (N=253)

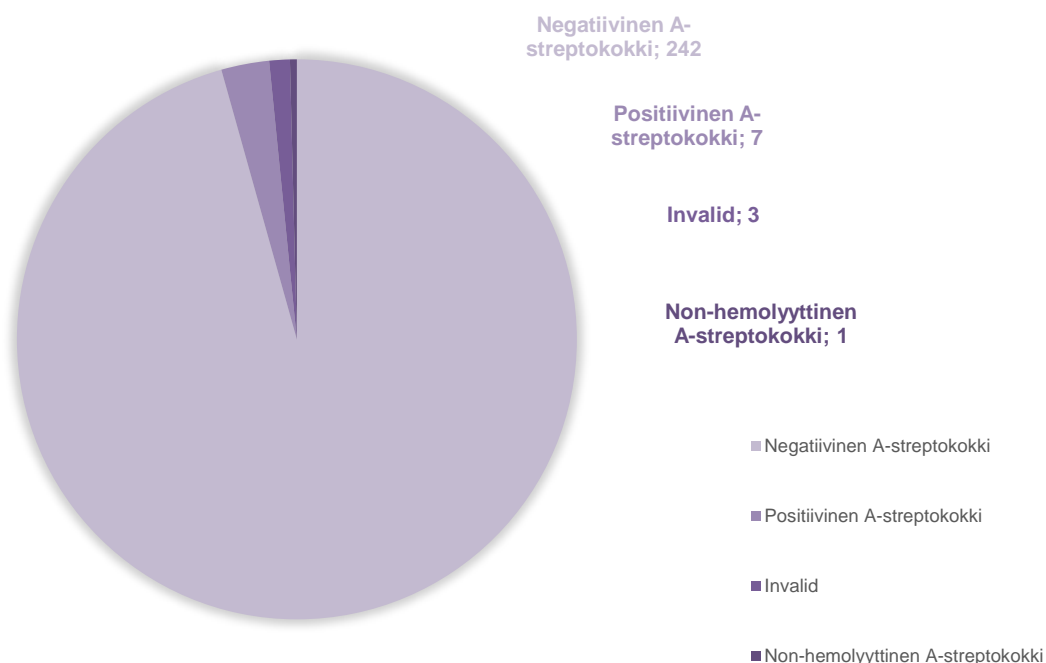


Kuvio 8. Tutkimuksessa tutkittiin Abbott ID NOW™ -laitteella eSwab-nielunäytteitä (n=253) enemmän naisilta kuin miehiltä.

6 Opinnäytetyön tulokset

6.1 Non-hemolyyttinen *Streptococcus pyogenes*

Negatiiviseksi vastatuista eSwab-nielunäytteistä (n=253) löytyi Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laitteella uudelleen tutkittaessa 8 kappaletta positiivisia A-streptokokkinäytteitä. Positiivisten A-streptokokkinäytteiden esiintyvyys koko otoksessa (n=253) oli 3,16 %. Varsinaisia non-hemolyyttisiä A-streptokokkeja 8 positiivisen A-streptokokkinäytteen joukossa oli 1 kappale. Non-hemolyyttisyys tuli esille, kun näytteet viljeltiin positiivisen tuloksen jälkeen viljelyagarmaljalle. Non-hemolyyttisten A-streptokokkien osuus koko otoksesta (n=253) oli 0,4 %. Testatuista nielunäytteistä (n=253) 3 kappaletta (1,18 %) sai tulokseksi invalid, joten varsinaista tulosta näistä kolmesta näytteistä ei saatu (Kuvio 9).



Kuvio 9. Aiemmin negatiiviseksi vastattujen nielunäytteiden (n=253) uudet tulokset molekulaarisella Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laitteella tutkittuna.

Näyte numerolla 101 oli ainut positiivinen näyte, joka osoittautui veriagarmaljalla non-hemolyyttiseksi A-streptokokki-kannaksi. Taulukosta käy ilmi, että kaikki Abbott ID NOW™ -laitteella saadut positiiviset A-streptokokkinäytteet olivat myös positiivisia Xpert® Xpress Strep A -referenssitestillä analysoitaessa. A-streptokokkipositiivisia näytteitä tarkasteltaessa huomaa, etteivät kaikki näytteet esimerkiksi olleet A-streptokokki-ryhmäpositiivisia agglutinaatiotestissä tai VITEK® MS MALDI-TOF -analysointorilla *S.*

pyogenes-positiivisia (Taulukko 2). Abbott ID NOW™ -laitteella löydettyistä A-streptokokkipositiivisista näytteistä naispuolisten näytteitä oli 5 kappaletta ja miespuolisten näytteitä 3 kappaletta.

Taulukko 2. Tässä taulukossa on kaikki positiiviset A-streptokokkinäytteet, jotka analysoitiin Abbott ID NOW™ Strep A 2 -laitteella. Negatiiviseksi vastattujen nielunäytteiden otoksesta (n=253) löytyi 8 kappaletta A-streptokokki positiivista näytettä, joista 1 oli non-hemolyttinen kanta.

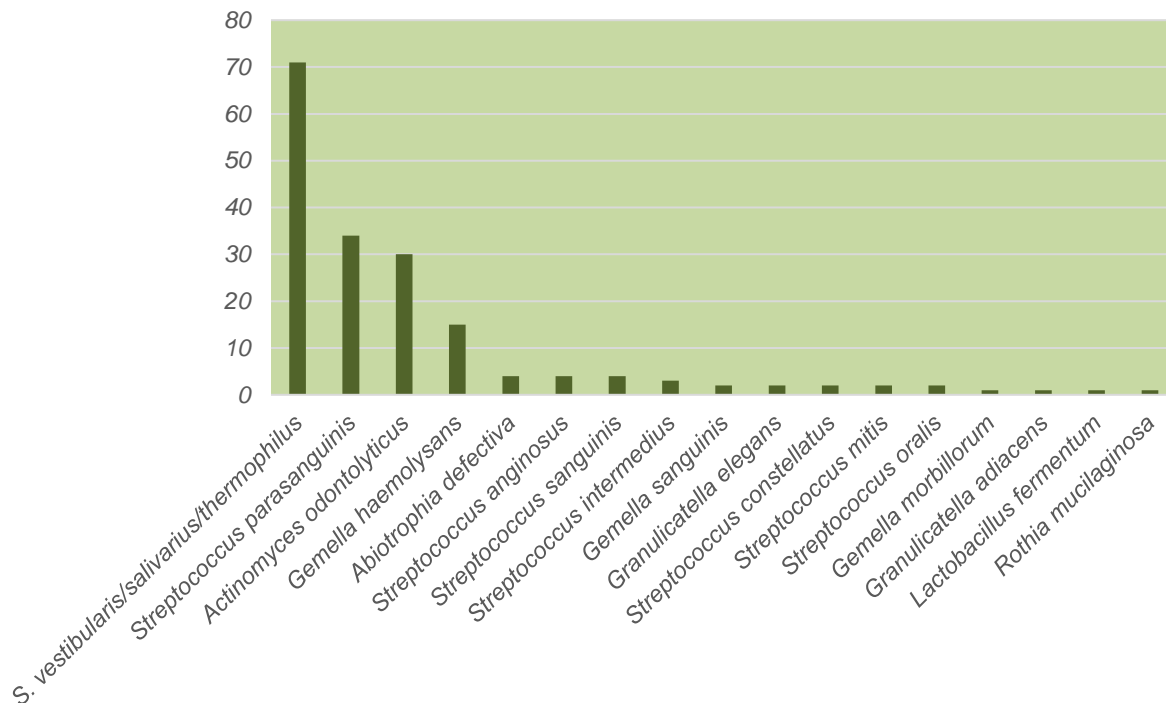
Näyte	Alkuperäinen viljely, +/-	Abbott ID NOW™ Strep A 2	Näytteen uudelleen viljely, määrä: +/-/+	Xpert® Xpress Strep A	Aggluti-naatiotesti, A+	VITEK® MS MALDI-TOF, <i>S. pyogenes</i>	Non-hemolyysi, <i>S. pyogenes</i>
15	-	+	+	+	+	+	-
44	-	+	+++	+	-	-	-
76	-	+	+++	+	+	-	-
95	-	+	+	+	+	-	-
101	-	+	+	+	+	+	+
113	-	+	++	+	-	-	-
168	-	+	+++	+	-	-	-
208	-	+	+	+	+	+	-

6.2 *Arcanobacterium haemolyticum*

Negatiivisilta nieluviljelymaljoilta (n=1541) ei löytynyt yhtään *Arcanobacterium haemolyticum*-bakteerikantaa (Kuvio 10). Tutkimustuloksena voidaan pitää sitä, ettei *A. haemolyticum*-bakteeria esiinny nieluviljelynäytteissä.

Kuvio 10. Negatiivisilta nieluviljelymaljoilta (n=1541), joilta etsittiin *A. haemolyticum*-bakteeria VITEK® MS MALDI-TOF -analysaattorin avulla löytyi pääasiassa nielun normaaliflooraa ja Viridans-ryhmän streptokokkeja, jotka ovat tavallisia bakteereita nielussa ja suussa.

Löydöksiä negatiivisilta nieluviljelymaljoilta (n=1541) etsittäessä *A. haemolyticum*-bakteeria VITEK® MS MALDI-TOF -analysaattorilla



7 Tulosten tarkastelu

Non-hemolyttisten A-streptokokkien osuus tutkimuksessa jäi pieneksi. Koko otoksesta (n=253) löytyi 8 positiivista A-streptokokkia (3,16 %). A-streptokokkipositiivisten näytteiden joukossa oli varmasti 1 non-hemolyttinen A-streptokokki (0,4 %). Aiemmissä tutkimuksissa non-hemolyttisten A-streptokokkikantojen osuus oli myös pientä. Purcell ym. (2013) tutkimuksessa non-hemolyttisiä kantoja löytyi 3 % ja Yosino ym. (2010) tutkimuksesta kantoja löytyi noin 1,11 %. Nieluviljelyn negatiivista tulosta voidaan pitää luotettavana, koska vain noin 3 % oikeasti positiivisista A-streptokokkikannoista jäi huomaamatta koko otoksesta ja nieluviljelyn tulos on siten luotettava (96,84 %).

Yksi non-hemolyttinen A-streptokokki tuli ilmi viljelymaljalla, jossa bakteeripesäkkeiden ympärille ei muodostunut hemolyysivyöhykettä. Bakteeri varmistettiin agglutinaatiotestillä ja VITEK® MS MALDI-TOF -analysaattorilla A-ryhmäiseksi *S. pyogenes*-bakteeriksi. Tutkimus osoitti, että non-hemolyttisiä A-streptokokkeja esiintyy nielunäytteissä. On mahdollista, että seulonnassa huomatuissa positiivisissa nielunäytteissä esiintyi myös

non-hemolyttisiä A-streptokokkeja, vaikka maljoilla oli myös β -hemolyttistä kasvustoa, jonka takia näytteet menivät jatkoviljelyyn.

Tämän tutkimuksen tulokset mukailivat aiempia tutkimustuloksia, joissa non-hemolyttisiä A-streptokokkeja oli tutkittu. Aiemmissä tutkimuksissa non-hemolyttisiä A-streptokokkikantoja ei esiintynyt myöskään runsaana (Purcell ym. 2013). Aiempien tutkimuksien perusteella non-hemolyttiset A-streptokokkikannat voivat aiheuttaa myös invasiivisia ja vakavia infektoita, jopa epidemioita, joten non-hemolyttisten kantojen tunnistaminen ja diagnosointi on tärkeää (Sönksen ym. 2006).

Kaikki uudet positiiviset (n=8) A-streptokokkilöydökset olivat peräisi 0–10 vuotialta potilailta. Lapsilta nielunäytteenotto on yleensä haastavampaa kuin aikuisilta, joten näytettä ei saada välttämättä tarpeeksi ja näyte on niukka. Näin ollen näyte ei välttämättä kasva tarpeeksi runsaana viljelymaljalla ja A-streptokokki jää siten huomaamatta. Haastavan näytteenottotilanteen takia näyte voi olla otettu väärältä alueelta eli näytteenottotikka ei ole osunut peitteisiin nielurisoihin vaan esimerkiksi kieleen, hampaisiin tai poskiin. Tällöin näyte on otettu väärästä paikasta ja bakteeria ei mahdollisesti ole päässyt näytteeseen runsaasti.

Kaikki tekijät, jotka vaikuttavat näytteeseen ja sen laatuun ennen näytteen saapumista laboratorioon kutsutaan preanalyttisiksi tekijöiksi (Heikkilä ym. 2005: 99). Nielunäytteenottotavat voivat poiketa toisistaan eri laboratorioissa ja eri henkilöiden suorittamana, vaikka näytteenotto-ohjeet ovat kaikkialla samantapaiset.

Tutkimuksessa mukana olleet näytteet saapuivat Bakteriologian yksikköön analysoitavaksi eri laboratorioista ja eri henkilöiden ottamina, joten näytteenottotavoissa voi esiintyä eroja, joita ei tässä tutkimuksessa ole voitu huomioida. Potilaiden ohjeistus voi poiketa eri laboratorioissa toisistaan. Ennen nielunäytteenottoa potilasta ei välttämättä ole ohjeistettu olla syömättä ja juomatta ennen nielunäytteenottoa tai annettuja ohjeita ei noudateta. Esimerkiksi sairaan lapsen nielukipu voi altistaa näytteenotto-ohjeiden huomiotta jättämiselle ja tällöin lapset voivat olla juoneet tai syöneet juuri ennen näytteenottoa. Tämä muuttaa nielun bakteerimäärää ja väärää nieluviljelytulosta.

Lapset voivat olla mahdollisesti A-streptokokin kantajia, koska jopa kymmenellä prosentilla esiintyy nielussa A-streptokokkia, mutta heillä ei ole oireita (Lumio – Jalanko 2018). Tällöin bakteeri ei välttämättä kasva viljelymaljalla yhtä runsaana kuin potilailla, joilla on

selkeät A-streptokokki-infektion oireet. Lapsilla tiettyjen A-streptokokkityyppien esiintyminen voi olla myös mahdollista. Bakterikannan hidas kasvu lapsipotilaiden näytteiden kohdalla voi olla mahdollista.

Nieluviljelymaljojen seulonnan epätarkkuus ja inhimilliset virheet kuten A-streptokokki-kasvuston huomaamatta jääminen voivat olla mahdollisia bakteerin heikon kasvun vuoksi. Toisinaan nieluviljelymaljojen seulonnassa jää huomaamatta esimerkiksi valtakasvuston alta β -hemolyyttinen A-streptokokki, jos näytteeseen on esimerkiksi eksynyt paljon suun normaaliflooraa haastavan näytteenottotilanteen vuoksi. Viljelymaljojen kasvatus voi olla jostain syystä epäonnistunutta. Muita syitä bakteerin kasvamattomuudelle voi olla esimerkiksi viljelymaljojen toimimattomuus tai nielunäytteiden säilytyksen epäonnistuminen.

Tutkimuksessa käytetty Abbott ID NOW™ -molekulaarinen testilaitte on hyvin herkkä (98,5 %). Laitte soveltuisi hyvin vieridiagnostiikkaan hoitoyksikön yhteyteen. Laitte ei yksinään kerro, onko bakteeri näytteessä elävä vai kuollut. Abbott ID NOW™ -laitte oli mielestäni helppokäyttöinen, nopea ja käyttäjäystävällinen. Pidän sitä myös luotettavana sen korkean herkkyyden ja spesifisyyden ansiosta. Laitte toimisi varmasti hyvin päivystyskäytössä tai pienempien toimipisteiden laboratorioissa. Laitteen käytön oppi nopeasti laitteen sen selkeyden ja yksinkertaisuuden vuoksi.

A. haemolyticum-bakteeria ei löytynyt yhtään tutkimuksessa tarkastelluilta nieluviljelymaljoilta (n=1541). Nieluviljelymaljoilta löytyi nielun normaaliflooraa ja Viridans-ryhmän streptokokkeja, jotka ovat tavallisia bakteereita ihmisen suussa (Soukka – Gaebler – Meurman 2017). Tutkitut nieluviljelymaljat olivat kolmen vuorokauden kasvatuksen jälkeen hankalia tarkasteltavia, koska kasvusto maljalla oli runsasta. On mahdollista, että heikko- sekä hidaskasvuinen *A. haemolyticum*-bakteeri peittyi valtakasvuston alle. Maljojen lukijan kokemus bakteerien pesäkemorfologian ja ulkonäön tunnistamisessa voi myös vaikuttaa.

Aiemmissä tutkimuksissa *A. haemolyticum*-bakteerin esiintyvyys ei ole ollut korkea. *A. haemolyticum*-bakteerin esiintyvyys on ollut puolesta prosentista (Carlson 1994) kahteen ja puoleen prosenttiin (Mackenzie ym. 1995; Carlson – Järvinen 2010.) *A. haemolyticum*-bakteeri vaatisi pidemmän kasvatusajan hitaan kasvun vuoksi, joten kyseistä bakteeria epäillessä tulee pyytää laaja nieluviljely (Ps-BaktVi) eikä nielun streptokokkiviljely (Ps-StrVi) (Bakteeri, nieluviljely, laaja).

Aiempien tutkimusten perusteella *A. haemolyticum*-bakteeri on kuitenkin hyvä pitää mielessä mahdollisena nielupatogeeninä (Parija ym. 2005). Näin ollen nielupisteidenkin työntekijöiden on hyvä harjaantua *A. haemolyticumin* tunnistamisessa siltä varalta, että bakteeria ilmenee seulonnassa nielunäytemaljoilla. Nielunäytevirrat ovat niin suuria, ettei näytteitä ole mahdollista kasvattaa pidempää aikaa nielupisteellä. Koska *A. haemolyticum*-bakteeria ei löytynyt tässä tutkimuksessa, ei viljelymaljojen lisäkasvatus välttämättä nostaisi bakteerin esiintymistiheyttä laboratoriossa.

HUSLABin Bakteriologian yksikössä pidetään tilastoa diagnostiikassa löytyneistä non-hemolyyttisistä A-streptokokkikannoista. Laboratorioon saapuneesta koko nielunäytemääristä noin 30 % päätyy seulonnasta jatkoviljelyyn (StrJVi). Näistä noin 1 % on non-hemolyyttisiä kantoja, yleisimmin A- tai C-streptokokkia. Ajanjaksolta 8/2018–2/2019 laboratorioon saapui yhteensä 44 867 nieluviljelynäytettä. Niistä 160 kappaletta oli non-hemolyyttisiä-kantoja, jotka huomattiin viljelymaljojen seulonnassa ja tutkittiin sekä vastattiin normaaliin tapaan. Non-hemolyyttisten kantojen osuus koko tämän ajanjakson näytteistä oli 0,37 %. Eniten eli 79 kappaletta non-hemolyyttisistä kannoista oli A-streptokokkia, C-streptokokkia oli 77 kappaletta ja G-streptokokkia oli vain 4 kappaletta.

Terveys- ja hyvinvoinnin laitos (THL) on tyypittänyt 22 kappaletta laboratoriossa ajalta 19.11.–14.12.2018 löytynyttä non-hemolyyttistä A-streptokokki-kantaa. Kaikki tyypitetyt kannat (n=22) olivat tyyppiä *emm4.0*. Tämä *emm*-tyyppi 4.0 kuuluu viiden yleisimmän *emm*-tyypin joukkoon. Kannoista 10 kappaletta (10/22=45 %) olivat peräisin espoolaisilta potilailta ja 5 kappaletta (5/22=23 %) peräisin helsinkiläisiltä potilailta. Loput näytteistä (7/22=31 %) olivat peräisin muualta. Vaikuttaa siltä, että kyseessä on ollut epideeminen non-hemolyyttinen kanta, joka on levinnyt ihmisten kesken tietyllä alueella.

8 Pohdinta

8.1 Luotettavuus

Työskentelin huolellisesti tehdessäni tutkimusta. Käsittelin näytteitä tarkasti ja tunnollisesti. Kaikki tutkimuksessa tehdyt asiat ja tutkitut näytteet kirjattiin Excel-taulukon, mikä lisää luotettavuutta tutkimuksessa. Jos oli ongelmia, sain opinnäytetyön ohjaajaltani apua ongelman ratkaisemiseksi. Kaikki tutkimuksessa tekemäni asiat pyrin kuvaamaan opinnäytetyössä mahdollisimman tarkasti. Käytin opinnäytetyössäni mahdollisimman

lisimman luotettavia lähteitä sekä etsin tietoa monipuolisesti niin kotimaisista kuin ulkomaalaisista tutkimuksista ja artikkeleista lähdekriittisesti. Merkitsin lähdeviitteet selkeästi niin tekstiin kuin lähdeluetteloon Metropolian ohjeiden mukaisesti, jolloin lukija voi tutustua tietojen alkuperään.

Abbott ID NOW™ -laitteella saadut positiiviset A-streptokokkitulokset negatiivisiksi vastatuista nielunäytteistä varmistettiin ensin agglutinaatiotestillä ja sitten VITEK® MS MALDI-TOF -analysointilaitteella. Jos kasvu oli runsasta ja hyvin puhdasta A-streptokokkikantaa eli *S. pyogenes*-bakteeria, vastattiin tämä potilaan hoitoyksikköön. Lisäksi positiiviset A-streptokokkipositiiviset nieluviljelynäytteet analysoitiin Xpert® Xpress Strep A -laitteella Abbott ID NOW™ -tuloksen varmistamiseksi. Tulokset olivat jokaisen positiivisen näytteen kohdalla yhteneväisiä. Kaikki positiiviset eSwab-nielunäytteet säilytettiin jääkaappilämpötilassa, jotta näytteet säilyisivät paremmin ja olisivat edelleen edustavia lisäviljely- ja analyysijärjestelmien varten. Abbott ID NOW™ -laitteelle tehtiin aina positiivinen ja negatiivinen kontrolli, kun reagenssierä vaihtui.

A. haemolyticum-bakteeria etsittäessä negatiivisilta viljelymaljoilta pyrittiin pitämään laatu yllä ja joka päivä tutkimaan *A. haemolyticum*-bakteeria muistuttavia pesäkkeitä. VITEK® MS MALDI-TOF -analysointilaitteella analysoitaessa kontrollina on *E. coli*. Kun *A. haemolyticum*-bakteeria etsittiin streptokokkinegatiivisilta viljelymaljoilta, käytettiin referenssimaljana viljelymaljaa, jossa kasvoi *A. haemolyticum*-bakteeria. Referenssimaljaan oli hyvä verrata pesäkkeitä, joita tarkastelin tutkimusmaljoilta. Pehdyin myös *A. haemolyticum*-bakteerin ulkonäköön erilaisten lähteiden kautta.

Vieritestilaitetta käytettäessä tulee muistaa, että varsinkin lapsipotilaiden negatiivinen tulos tulee varmistaa viljelyllä. Vieritestit soveltuvat tilanteeseen, jossa potilas odottaa paikan päällä testin valmistumista ja vastausta, koska vastaus saadaan nopeasti. Epidemiatilanteissa tulee käyttää viljelymenetelmää eikä vieritestejä. Laitteen herkkyys tulee testata aidossa käyttöympäristössä ennen sen käyttöä diagnostiikassa. (Nielutulehdus: Käypä hoito -suositus 2018.) Abbott ID NOW™ -laitteen herkkyys on molekulaarisen menetelmän takia kuitenkin niin korkea, ettei laitevalmistajan mielestä tulosta tarvitse varmistaa viljelyllä (Abbott).

8.2 Eettisyys

Tutkimuksiin liittyy eettisiä ohjeita, jotka ohjaavat tutkimuksellista työskentelyä. Aihetta tutkivalla tutkijalla tulee olla aito kiinnostus uuden tiedon hankkimiseen ja tutkitun tiedon

tulee olla luotettavaa. Vilppejä kuten esimerkiksi tulosten vääristelyä ei tutkimuksissa hyväksytä. Tutkimuksen tekeminen ei saa tapahtua ihmisten kustannuksella tai loukata kehtään. Tutkimuksen tulee edistää ammatinharjoitusta. (Kankkunen – Vehviläinen – Julkunen 2013: 211–212.)

Opinnäytetyöstä tehtiin Metropolian kanssa sopimus sekä saatiin Helsingin ja Uudenmaansairaanhoidopiiriltä hyväksytty HUS-tutkimuslupa. Nämä yhdessä mahdollistivat tutkimuksen tekemisen. Tutkimuslupaan liitettiin esimerkiksi salassapitosopimus, EU:n tietosuoja-asetus selvitys ja tutkimuksen rahoitussuunnitelma.

Opinnäytetyön tutkimuksessa oli eettinen näkökulma. Potilaalle tuli ilmoittaa, jos nieluviiljelyssä negatiivisena vastattu näyte osoittautuikin myöhemmissä tutkimuksissa A-streptokokkipositiiviseksi molekulaarisella testillä analysoitaessa. Muutamat uudet Abbott ID NOW™ -laitteella löydetty A-streptokokkilöydökset vastattiin hoitavaan yksikköön, koska kyseisen nielunäytteen kasvusto oli hyvin runsasta ja puhdasta viljelymaljalla.

Tutkittavana oli oikeiden potilaiden näytteitä, joita käsiteltiin potilasturvallisesti ja eettisesti. Näytteet tutkittiin anonymisti eikä potilastietoja tuoda julki tässä opinnäytetyössä. Näytteet olivat kuitenkin tunnistettavissa mahdollisten lisädiagnoosien varalta. Mahdollinen infektoriski tuli ottaa huomioon näytteitä käsiteltäessä. Aseptinen työskentely ja erilaisien suojavälineiden käyttö vähentävät infektoriskiä laboratoriossa työskennellessä.

Toimin itse tutkimuksessa eettisesti. Säilytin näytteitä turvallisessa paikassa ja hävitin henkilötietoja sisältävät näytteet ohjeiden mukaisesti tietosuojattavaan jätteeseen. Käsittelemällä tutkimusaineistoja Bakteriologian verkkoasemalla, joka on turvallinen ja suojattu.

8.3 Johtopäätökset

Negatiivinen nielun streptokokkiviljelyn (Ps-StrVi) tulos on luotettava, koska vain 3,16 % negatiiviseksi vastatuista oikeasti positiivisista näytteistä jäi tunnistamatta seulonnassa. Negatiivisen nielun streptokokkiviljelyn luotettavuus on korkea (yli 95 %). Non-hemolyytisiä A-streptokokkeja esiintyi 253 kappaleen nielunäyteotoksessa 1 kappale (0,4 %).

Arcanobacterium haemolyticum-bakteeria ei esiintynyt tutkimuksen nieluviiljelymaljoilla (=1541) lainkaan. On silti hyvä pitää mielessä, että bakteeri voi olla mahdollinen nielu-patogeeni aiemmin tehtyjen tutkimuksien perusteella, varsinkin jos kyseessä on nuori aikuinen. Tällöin tulee *A. haemolyticum*-bakteeri ottaa huomioon erotusdiagnostiikassa.

Non-hemolyyttisten A-streptokokkien kliininen merkitys ei ole suuri, koska non-hemolyyttisiä kantoja esiintyi tutkimusotoksessa todella vähän (0,4 %). Non-hemolyyttinen A-streptokokki-kanta voi aiheuttaa silti vakavia infektioita, jos ei bakteeria tunnisteta ajoissa (Sönksen ym. 2006). Yleistasolla pieni kliininen merkitys voi olla yksilötasolla suuri. Esimerkiksi non-hemolyyttisen A-streptokokin aiheuttama raju infektio voi olla kohtalokas, jos hoitoa ei saada aloitettua ajoissa bakteerin tunnistamisviiveen takia.

8.4 Kehittämisehdotukset

Non-hemolyyttisiin streptokokkikantoihin kohdistuvaa tutkimusta voisi kohdentaa esimerkiksi C- tai G-streptokokkiryhmiin ja etsiä niistä non-hemolyyttisiä kantoja. Tutkimuksen kohteena voisi viljelyssä negatiivisten nielunäytteiden sijasta olla positiivisia nielunäyteitä. Tässä tapauksessa voitaisiin tutkia, esiintyykö β -hemolyyttisten streptokokkien lisäksi samalla maljalla non-hemolyyttisiä streptokokkikantoja. Löydettyjen non-hemolyyttisten streptokokkikantojen tyypittäminen laajemmin yhteistyössä Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen kanssa voisi liittyä tutkimuksen kehittämissuuntiin. Näin saataisiin laajemmin tietoa, esiintyykö jotain tiettyä streptokokkikantaa yleisemmin non-hemolyyttisenä ja liittyykö kantojen esiintymiseen vuodenaikavaihtelua. Tutkimusta voisi laajentaa myös muihin kuin nielunäytteisiin.

A. haemolyticum-bakteeria voi esiintyä β -hemolyyttisten streptokokkien kanssa ja bakteerit voivat aiheuttaa yhdessä nielutulehduksen (Nousiainen ym. 2000). Näin ollen *A. haemolyticum*-bakteerikantoja voisi etsiä β -hemolyysi positiivisilta streptokokkinieluviljelymaljoilta negatiivisten nieluviljelymaljojen sijasta. Jos positiivisia *A. haemolyticum*-maljoja löytyisi, mielenkiintoista olisi selvittää minkä ikäiseltä potilaalta näyte on ja ovatko kaikki *A. haemolyticum*-positiiviset näytteet tietyltä maantieteelliseltä alueelta peräisin. Viljelymalja, jolle *A. haemolyticum*-näytteet tutkimuksessa viljeltäisiin voisi olla jokin muu kuin CO-malja. CO-malja on tarkoitettu streptokokeille ja se estää gramnegatiivisten sauvojen, basillusten ja stafylokokkien lisäksi myös difteroidien kasvua (Petts 1984). Joten CO-malja ei välttämättä ole optimaalisin maljavaihtoehto juuri *A. haemolyticum*-bakteerin kasvamiselle. *F. necrophorum*-bakteerin osalta olisi mielenkiintoista koota tilastoja, kuinka paljon bakteeria diagnosoidaan laboratoriossa, jossa nielun anaerobiviljelyä on saatavilla.

8.5 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyön tavoitteena on tuoda esiin opiskelijan kykyä soveltaa oppimiaan taitoja sekä tietoja. Tavoitteena on myös kehittää opiskelijan kykyjä ja luoda valmiuksia oman alan asiantuntijatehtäviin. Opinnäytetyö tehdään tiiviissä yhteistyössä yhteistyökumppanin kanssa viimeisenä opiskeluvuotena. Näin olleen opinnäytetyö tehdäänkin useimmiten työelämän tarpeisiin, mutta opinnäytetyön aihe liittyy lisäksi vahvasti opiskelijan koulutusohjelmaan sekä opiskelijan omiin henkilökohtaisiin mielenkiinnonkohteisiin. (Metropolia.)

Koko opinnäytetyöprosessi kehitti ammatillista kasvuani ja opetti tutkimusprosessin etenemisestä. Opinnäytetyön vuoksi perehdyin nielutulehduksiin, nielutulehdusten aiheuttajabakteereihin sekä työssä käytettäviin laitteisiin ja testeihin perusteellisesti. Opin paljon lisää aiheista ja tiedän nyt aihepiiristä monipuolisemmin. Opinnäytetyötä tehdessä pääsin soveltamaan opintojaksoilta opittuja asioita käytännötyössä laboratoriossa. Opinnäytetyön työstäminen kehitti johdonmukaista ja prosessinomaista työskentelyä. Tutkimusta tehdessäni taitoni työskennellä bakteriologisessa laboratoriossa kehittyivät. Opin käsittelemään bakteerinäytteitä ja työskentelemään turvallisesti bakteerien kanssa.

Opinnäytetyö eteni suunnitelman mukaisesti. Opinnäytetyön suunnitelma laadittiin syksyllä 2018. Tutkimuksellisen osion työstöön varattiin reilusti aikaa ja varauduttiin mahdollisiin ongelmiin ja viivästyksiin. Ongelmilta kuitenkin vältyttiin ja kaikki meni aikataulussa suunnitelmien mukaisesti. Ennen opinnäytetyön alkua harjoittelu Bakteriologian laboratoriossa tuki valmiuksiani lähteä työstämään opinnäytetyötä. Harjoittelun aikana opin opinnäytetyön tutkimuksellisessa osuudessa tarvittavia bakteriologian perusmenetelmiä sekä tutustuin laboratorion toimintaan ja näytteiden kulkuun. Opinnäytetyön raportin kirjoittamiselle varattiin myös riittävästi aikaa. Tämä varmasti vaikutti positiivisesti opinnäytetyöhön.

Opinnäytetyöprosessi kokonaisuudessaan eteni hyvin omalla painollaan kiinnostavan aiheen myötä. Opinnäytetyötä oli mukava työstää ja asioihin perehtyminen oli mielekästä, koska aihe kiinnosti aidosti. Koko opinnäytetyöprojekti oli opettavainen kokemus. Jälkeenpäin ajateltuna, joitakin asioita opinnäytetyöprosessissa olisi voinut tehdä paremmin, mutta kokonaisuudessaan opinnäytetyö meni mielestäni hyvin. Olen tyytyväinen lopputulokseen.

Lähteet

Abbott. Abbott ID NOW™ Strep A 2 Package Insert. Esite.

Alere™ i Strep A 2 on nyt ID NOW™ Strep A 2. Verkkodokumentti. <<https://www.alere.com/fi/fi/product-details/id-now-strep-a-2.html>> Luettu 3.2.2019.

Alós, Juan-Ignacio. *Arcanobacterium haemolyticum*. Antimicrobe. Verkkodokumentti. <<http://www.antimicrobe.org/b78.asp>> Luettu 3.2.2019.

Anand, Chandar – Gordon, Rhonda – Shaw, Helene – Fonseca, Kevin – Olsen, Merle 2000. Pig and Goat Blood as Substitutes for Sheep Blood in Blood-Supplemented Agar Media. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (2). 591–594. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86154/>> Luettu 1.4.2019.

A-ryhmän streptokokki. 2016. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos THL. Päivitetty 26.4.2016. Verkkodokumentti. <<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/a-ryhman-streptokokki>> Luettu 15.9.2018.

Bakteeri, nieluviljely, laaja. 2019. Tutkimusohjekirja. HUSLAB. Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Päivitetty 9.1.2019. Verkkodokumentti. <<https://huslab.fi/ohjekirja/4290.html>> Luettu 11.4.2019.

Balikci, A – Topkaya, A, E – Belaş, Z 2011. A frequently overlooked bacteria in clinical microbiology laboratories: *Arcanobacterium haemolyticum*. *Mikrobiyoloji Bulteni* 45 (3). 535–540. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21935787>> Luettu 12.1.2019.

Blomberg, Hans 2012a. Nieluviljely. Käypä hoito -suositus 2012. Verkkodokumentti. <<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/suositus;jsessionid=47C0D8415D972337A3E585886CD3EDE3?id=nix01743>> Luettu 12.1.2019.

Blomberg, Hans 2012b. StrA-bakteeriviljely vs. antigeenitesti vastaanotolla StrA-nielutulehduksen diagnostiikassa. Käypä hoito -suositus 2012. Verkkodokumentti. <<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/suositus?id=nak07606&suositusid=hoi38020>> Luettu 15.1.2019.

Carlson, P – Renkonen, O, V – Kontiainen, S 1994. *Arcanobacterium haemolyticum* and streptococcal pharyngitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 26 (3). 283–287. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7939427>>. Luettu 17.1.2019.

Carlson, Petteri – Järvinen, Asko 2010. Muita grampositiivisia aerobisia sauvoja; *Arcanobacterium*. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) 2010: *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Kirja 1. 151–159. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Cimolai, N – Trombley, C – Bhanju, N, M, E 2002. Nonhemolytic *Streptococcus pyogenes* Causing Invasive Infectio. *Clinical Pediatrics* 41 (6). 453. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://search.proquest.com/openview/dab7ccb1e334d399c33a233717a9bb20/1?pq-origsite=gscholar&cbl=42114>> Luettu 18.9.2018.

Coico, R 2005. Gram staining. *Current protocols in microbiology*. Verkkodokumentti <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18770544>> Luettu 18.1.2019.

Creemers-Schild, D – Gronthoud, F – Spanjaard, L – Visser, L, G – Brouwer, C, N, M – Kuijper, E, J 2014. *Fusobacterium necrophorum*, an emerging pathogen of otogenic and paranasal infections? *New Microbes New Infections* 2 (3). 52–57. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4184658/>> Luettu 12.3.2019.

Cummings, Lisa, A – Whei-Kuo, WU – Larson, Ann, M – Gavin, Sue, E – Fine, James, S – Coyle, Marie, B 1993. Effects of media, atmosphere, and incubation time on colonial morphology of *arcanobacterium haemolyticum*. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (12). 3223–3226. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://jcm.asm.org/content/jcm/31/12/3223.full.pdf>> Luettu 18.3.2019.

Eskelinen, Seija 2016a. Nieluviljely (Ps-StrVi). Duodecim terveyskirjasto. Verkkodokumentti. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03161> Luettu 12.1.2019.

Eskelinen, Seija 2016b. Bakteeninäytteet. Duodecim terveyskirjasto. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk02050> Luettu 20.1.2019.

Gaston, D, A – Zurowski, S, M 1996. *Arcanobacterium haemolyticum* pharyngitis exanthem. *Arch Dermatol* 132 (1). 61–64. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://jamanetwork.com/journals/jamadermatology/article-abstract/557415>> Luettu 24.3.2019.

GeneXpert® IV. Cepheid. Verkkodokumentti. <<http://www.cepheid.com/en/cepheid-solutions/systems/genexpert-systems/genexpert-iv>> Luettu 1.4.2019.

Gera, Kanika – McIver, Kevin, S 2013. Laboratory Growth and Maintenance of *Streptococcus pyogenes* (The Group A *Streptococcus*, GAS). *Current protocols in microbiology* 2 (30). 9D.2.1–9D.2.13. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920295/>> Luettu 15.2.2019.

Gram-värijäys. R-order. Verkkodokumentti. <<https://r-order.reagen.com/catalog/category/view/s/gram-varjays/id/53/>> Luettu 14.3.2019.

Heikkilä, Ritva – Hellstén, Soile – Koukila-Kähkölä, Pirkko – Kurkinen, Tuula – Meurman, Olli – Nummelin, Raija – Pastila, Satu – Richardson, Malcom – Yrjönen, Helga 2005. *Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa*. 2. uudistettu painos. Helsinki: Suomen Kuntaliitto.

Jantsch, Jonathan – Gerlach, Roman, G – Ensser, Armin – Dahesh, Samira – Popp, Isabel – Heeg, Christiane – Bleiziffer, Oliver – Merz, Thomas – Schulz, Theresia–

Horch, Raymund, E – Bogdan, Christian – Nizet, Victor – van der Linden, Mark 2013. Severe Soft Tissue Infection Caused by a Non-Beta-Hemolytic Streptococcus pyogenes Strain Harboring a Premature Stop Mutation in the sagC Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 51 (6). 1962–1965. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://jcm.asm.org/content/51/6/1962>> Luettu 24.9.2018.

Kankkunen, Päivi – Vehviläinen-Julkunen, Katri 2013. Tutkimus hoitotieteessä. 3. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Kerttula, Anne-Marie – Lavikainen, Antti 2017. Nukleiinihapon osoitus parasitologiassa diagnostiikassa. *Duodecim* 133 (8). 742–748. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.duodecimlehti.fi/lehti/2017/8/duo13655>> Luettu 12.9.2018.

Lumio, Jukka – Jalanko, Hannu 2018. Nielurisatulehdus ("angiina"). *Duodecim terveyskirjasto*. Verkkodokumentti. <https://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p_artikkeli=dlk00309> Luettu 13.9.2018.

Mackenzie, Andrew – Fuite, Louise, A – Chan Francis, T, H – King, Jim – Allen, Upton – MacDonald, Noni – Diaz-Mitoma, Francisco 1995. Incidence and pathogenicity of *Arcanobacterium haemolyticum* during a 2-year study in Ottawa. *Clinical infectious diseases* 21 (1). 177–181. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://academic.oup.com/cid/article-abstract/21/1/177/402638>> Luettu 11.1.2019.

MALDI-TOF Mass Spectrometry. Creative Proteomics. Verkkodokumentti. <<https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>> Luettu 28.9.2018.

Metropolia. Opinnäytetyöntekijä - AMK ja YAMK. Verkkodokumentti. <<https://www.metropolia.fi/palvelut/opinnaytetyontekijat/>> Luettu 22.9.2018.

Nielunäytteenotto. Labquality. Verkkodokumentti. <<https://www.labquality.fi/vieritesti-suositus/naytteenotto/nielunaytteenotto/>> Luettu 27.1.2019.

Nielutulehdus: Käypä hoito -suositus 2018. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Yleislääketieteen yhdistyksen, Suomen Otolaryngologiyhdistyksen, Suomen Infektiolääkärit ry:n ja Kliiniset mikrobiologit ry:n asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2018 (viitattu 28.9.2018). Saatavilla sähköisesti: <<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituks/suositus?id=hoi38020>> 22.9.2018.

Nousiainen, Tiina – Tarvainen, Kyllikki – Aaltonen, Tellervo – Carlson, Petteri 2000. Tunnetko arkanobakteerin aiheuttaman nielutulehduksen ja ihottuman? *Duodecimlehti* 116 (11). 1251–1218. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.duodecimlehti.fi/api/pdf/duo91559>> Luettu 11.8.2018.

Nuikka Antti, – Jarva, Hanna – Meri, Seppo 2018. Nuorten aikuisten septinen laskimotulehdus. *Fusobacterium necrophorum* ja Lemierren oireyhtymä. *Duodecimlehti* 123 (18). 2266–2269. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.duodecimlehti.fi/api/pdf/duo14462>> Luettu 25.9.2018.

Nukleinihappojen monistaminen. Solunetti. Verkkodokumentti. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleinihappojen_monistaminen/2/> Luettu 11.4.2019.

Parija, Subhash, Chandra – Kaliaperumal, Venkatesh – Kumar, Saka, Vinod – Sujatha, Sistla – Babu, Venkateshwara – Balu, V 2005. Arcanobacterium haemolyticum associated with pyothorax: case report. BMC Infectious Diseases 5 (68). Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1236925/>> Luettu 2.10.2018.

Petts, David, N 1984. Colistin-oxolinic acid-blood agar: a new selective medium for streptococci. Journal of Clinical Microbiology 19 (1). 4–7. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC270967/?page=1>> Luettu 1.4.2019.

Purcell, M – Phelan, E – Doyle, M 2013. Non- β -haemolytic variants of Streptococcus pyogenes: a challenge for the microbiology laborator. Biomedical science in Brief 70 (4). 175–177. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09674845.2013.11978285>> Luettu 2.2.2019.

QPCR-menetelmä. Mikrobioni. Verkkodokumentti. <<https://mikrobioni.fi/qpcr-menetelma/>> Luettu 11.4.2019.

Rantala, Sari 2013. Beetahemolyttisten streptokokkien aiheuttamat bakteremiat aikuisilla. Duodecimlehti 129 (14). 1477–1484. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.duodecimlehti.fi/lehti///duo11094>> Luettu 18.9.2018.

Reiner, Karen 2010. Catalase test protocol. American Society for Microbiology. Verkkodokumentti. <<https://www.asm.org/getattachment/72a871fc-ba92-4128-a194-6f1bab5c3ab7/Catalase-Test-Protocol.pdf>> Luettu 27.3.2019.

Sharma, Ruchi – Gupta, Aditi 2014. Differentiation of oral streptococcal species by haemolysis in blood agar medium in vitro. International Journal of Engineering and Advanced Technology 3 (4). 143–144. Saatavilla myös sähköisesti. <<http://citeseeerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.676.6419&rep=rep1&type=pdf>> Luettu 30.9.2018.

Singhal, Neelja – Kumar, Manish – Kanaujia, Pawan, K – Viridi, Jugsharan, S 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology 6 (791). 1–16. Saatavilla myös sähköisesti. <https://www.researchgate.net/publication/280069168_MALDI-TOF_mass_spectrometry_An_emerging_technology_for_microbial_identification_and_diagnosis> Luettu 20.9.2018.

Soukka, T – Gaebler, J – Meurman, O 2017. Suu- ja leukakirurgisten infektioiden yksinkertainen bakteeriviljely. Suomen Hammaslääkärilehti. Päivitetty 2.3.2017. Verkkodokumentti. <<http://www.hammaslaakarilehti.fi/fi/tiede/suu-ja-leukakirurgisten-infektioiden-yksinkertainen-bakteeriviljely>> Luettu 2.4.2019.

Spellerberg, Barbara – Brandt, Claudia 2016. Laboratory Diagnosis of Streptococcus pyogenes (group A streptococci). Ferretti, Joseph, J – Stevens, Dennis, L – Fischetti, Vincent, A 2016. Teoksessa Basic Biology to Clinical Manifestations. University of Oklahoma 2016. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343617/#>> Luettu 7.1.2019.

Streptococcal grouping kit. Thermo Scientific. Verkkodokumentti. <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=DR0585&c=UK&lang=EN&org=133&img=DR0585A&sec=2> Luettu 1.4.2019.

Streptokokki, viljely, (beetahemolyttinen streptokokki), nielueritteestä. 2018. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Päivitetty 5.10.2018. Verkkodokumentti. <<https://huslab.fi/ohjekirja/2703.html>> Luettu 20.2.2019.

Sönksen, U, W – Ekelund, K – Bruun, B, G 2006. Case of bacteraemic cellulitis by a non-haemolytic strain of *Streptococcus pyogenes*. *Scandinavian journal of infectious diseases* 39 (3). 262–264. Saatavilla myös sähköisesti. <<http://web.b.ebsco-host.com.ezproxy.metropolia.fi/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=5a85ae1a-6c3d-4858-a4a3-dfad15a61b22%40sessionmgr104>, <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00365540600868362?journalCode=infid19>> Luettu 18.9.2018.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2018. A-streptokokin tartuntatavat, tartuttavuus- ja itä-misaika. Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos. Päivitetty 4.7.2018. Verkkodokumentti. <<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/a-ryhman-streptokokki/toimenpideohje-a-ryhman-beetahemolyttisen-streptokokin-aiheuttamien-infektioiden-ja-epidemioiden-ehkaisemiseksi/a-streptokokin-tartuntatavat-tartuttavuus-ja-itamis aika>> Luettu 23.1.2019.

Turner, David P, J – Gunn, Sarah, L 2007. Fatal case of sepsis caused by a non-haemolytic strain of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Clinical Pathology* 60 (9). 1057. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1972414/>> Luettu 24.9.2018.

Vaara, Martti – Skurnik, Mikael – Sarvas, Matti 2010. Bakteerisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) 2010: Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. 14–40. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Walker, Mark, J – Barnett, Timothy, C – McArthur, Jason, D – Cole Jason, N – Gillen, Christine, M – Henningham, Anna – Sriprakash, K, S - Sanderson-Smith, Martina, L – Nizet, Victor 2014. Disease Manifestations and Pathogenic Mechanisms of Group A *Streptococcus*. *Clinical Microbiology Reviews* 27(2). 264–301. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993104/>> Luettu 2.10.2018.

VITEK® MS. Mass spectrometry microbial identification system. Verkkodokumentti. <<https://www.biomerieux-diagnostics.com/vitekr-ms-0>> Luettu 15.1.2019.

Volante, M – Corina, L – Contucci, A, M – Calò, L – Artuso, A 2008. *Arcanobacterium Haemolyticum*: two case reports. *ACTA Otorhinolaryngologica Italica* 28 (3).144–146. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2644988/>> Luettu 2.10.2018.

Vuopio, Jaana 2018. Vakavat A-ryhmän streptokokki-infektiot ovat lisääntyneet, nopea hoidon aloitus on tärkeää. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Verkkodokumentti.

<<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/-/vakavat-a-ryhman-streptokokki-infektiot-ovat-lisaantyneet-nopea-hoidon-aloitus-on-tarkeaa>> Luettu 12.3.2018.

Vuopio-Varkila, Jaana – Syrjänen, Jaana – Kotilainen, Pirkko 2010. A-ryhmän streptokokki. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) 2010: Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. 102–109. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Vuorela, Marjo – Ruotsalainen, Eeva – Valtonen, Kirsi – Vuopio, Jaana – Lyytikäinen, Outi. A-ryhmän streptokokki voi aiheuttaa epidemian 2017. Suomen lääkirilehti 72 (1-2). 51–56. Verkkodokumentti. <http://www.hus.fi/ammattilaiselle/hoito-ohjeet/infektio-ohjeet/Documents/A-streptokokkiepidemia_L%C3%A4%C3%A4k%C3%A4rilehti_2017.pdf> Luettu 2.1.2019.

Xpert Xpress Strep A – Nyt saatavilla! 2017. Immunodiagnostic. Verkkodokumentti. <<https://www.immunodiagnostic.fi/xpert-xpress-strep-a-nyt-saatavilla/>> Luettu 15.3.2019.

Yleistä mikrobeista 2018. Evira. Päivitetty 6.9.2018. Verkkodokumentti. <<https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/yleista-mikrobeista/>> Luettu 17.9.2018.

Yoshino, Miho – Murayama, Somay, Y – Sunaoshi, Katsuhiko – Wajima, Takeaki – Takahashi, Miki – Masaki, Junko – Kurokawa, Iku – Ubukata, Kimiko 2010. Nonhemolytic *Streptococcus pyogenes* Isolates That Lack Large Regions of the *sag* Operon Mediating Streptolysin S Production. *Journal on Clinical Microbiology* 48 (2). 635–638. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://jcm.asm.org/content/jcm/48/2/635.full.pdf>> Luettu 25.9.2018.