

Opinnäytetyö (AMK)
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Mikrobiologia
2012

Sari Soittu

OIREETTOMIEN STREPTOKOKKI A -KANTAJIEN KARTOITTAMINEN ANTIGEENIOSOITUSTESTILLÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikan koulutusohjelma | Mikrobiologia

Joulukuu 2012 | 37+5

Ohjaaja Mika Venojärvi ja Janne Koskinen

Sari Soittu

OIREETTOMIEN STREPTOKOKKI A -KANTAJIEN KARTOITTAMINEN ANTIGEENIOSOITUSTESTILLÄ

Tämä opinnäytetyö on osa Turun ammattikorkeakoulun Agricola-hanketta, jonka tarkoitus on muun muassa yhteistyössä Turun AMK:n bioalojen ja diagnostiikka-alan yritysten kanssa diagnosointimenetelmien kehittäminen ja hoitoprosessin nopeuttaminen.

Tässä työssä tarkoitus oli A-ryhmän streptokokin oireettomien kantajien kartoittaminen antigeeniosoitustestillä. Tuloksia verrattiin bakteeriviljelyllä ja PCR:llä saatuihin tuloksiin. Tarkoitus oli selvittää, montako positiivista näytettä antigeeniosoitustestillä saadaan verrattuna viljelyyn ja PCR:ään, ja korreloivatko eri menetelmillä saadut tulokset keskenään.

Tutkimusta varten kerättiin 109 nielunäytettä itsensä terveeksi tuntevilta aikuisilta. Näytteenotto suoritettiin kahden bioanalytiikan opiskelijan toimesta keväällä 2012. Nielunäytteenotto tapahtui kahdella näytetikulla samanaikaisesti. Toinen tikuista käytettiin viljelyyn, ja toinen antigeeniosoitustestiin ja PCR:ään.

Antigeeniosoitustesti tehtiin ArcDian tiloissa Turussa Lemminkäisenkadulla. Käytössä oli ArcDian automatisoitu mariPOC[®] -pikatesti. Viljelyllä löydettiin kaksi (1,8%), antigeeniosoitustestillä kuusi (5,5%) ja PCR:llä 57 (52,3 %) positiivista näytettä. Antigeeniosoitustesti ja viljely löysivät yhden yhteisen positiivisen näytteen.

Voidaan olettaa, että mariPOC[®]-antigeeniosoitustesti on herkempi kuin viljely etsittäessä oireettomia A-ryhmän streptokokin kantajia. Tosin ei voida olla täysin varmoja siitä, että antaako antigeeniosoitustesti väärä positiivisia tuloksia. Vertailussa käytössä ollut PCR ei todennäköisesti ollut täysin spesifinen etsittäessä A-streptokokkia.

ASIASANAT:

A-ryhmän streptokokki, nielukantajuus, nielunäytteenotto ja antigeeniosoitustesti

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme of Biomedical Laboratory Science | Microbiology

December 2012 | 37+5

Instructor Mika Venojärvi and Janne Koskinen

Sari Soittu

DETECTING ASYMPTOMATIC CARRIER OF GROUP A STREPTOCOCCUS BY USING ANTIGEN DETECTION TEST

This bachelor's thesis is a part of a project named Aqricola carried out in Turku University of Applied Sciences (TUAS). The main goal was to cooperate with TUAS Bio Technology degree program and companies related in diagnostics to develop new diagnostic methods to make treatment process faster.

The aim of this study was to detect asymptomatic carrier of group A *Streptococcus* by using antigen detection test. Results were compared to culture and PCR. The purpose was to find out how many positive results could be found with the antigen detection test compared to the results of the culture and the PCR. Another aim was to study the correlation of the results of the different tests.

109 throat samples were collected from healthy adults for this study. The samples were taken by two degree students of Biomedical Laboratory Science at spring 2012. Samples were taken with two sticks at the same time. The first was used for the culture and the second for the antigen detection test and the PCR.

The antigen detection test was done at ArcDia Ltd in Turku Lemminkäisenkatu by using ArcDia's automated rapid antigen detection test mariPOC[®]. Two positive results (1.8 %) were found with the culture, six (5.5 %) positive results with the antigen detection test and 57 (52.3 %) positive results with the PCR.

We did make the assumption that the mariPOC[®] antigen detection test was more sensitive than the culture when detecting asymptomatic throat carrier of group A *Streptococcus*. However, we could not be sure if the antigen detection test was giving false positive results. It is likely that the PCR method which used was not specific when detecting A *streptococcus*.

KEYWORDS:

Group A Streptococcus, throat carriage, throat sampling and antigen detection test

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	7
2.1 A-ryhmän streptokokki	7
2.2 A-ryhmän streptokokin nielukantajuus	11
2.3 Nielunäytteenotto	13
2.4 StrA-antigeeniosoitustesti	14
3 TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT	19
4 KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	20
4.1 Opinnäytetyön toteutus	20
4.2 Metodologiset lähtökohdat	23
4.3 Eettisten näkökohtien tarkastelu	24
5 TULOKSET	27
6 POHDINTA	30
7 LÄHTEET	35

LIITTEET

Liite 1. Koehenkilötiedote ja suostumuslomake

Liite 2. Opinnäytetyön toimeksiantosopimus

KUVAT

Kuva 1. Beetahemolyysi verimaljalla (Liukko 2012).	7
Kuva 2. Nielunäytteenottokohdat (Meriluoto 2012a; mukaeltu).	14
Kuva 3. Viljelymalli (Meriluoto 2012b; mukaeltu).	22

TAULUKOT

Taulukko 1. Poikkeamat esivalmisteluissa ja näytteenotossa.	21
Taulukko 2. Positiiviset ja negatiiviset tulokset.	27
Taulukko 3. Yhteiset positiiviset tulokset.	28
Taulukko 4. Muiden streptokokkitulosten vertailua.	29

1 JOHDANTO

A-ryhmän streptokokki eli *Streptococcus pyogenes* on yleinen taudinaiheuttaja lapsilla ja aikuisilla. A-streptokokin aiheuttama yleisin infektio on nielurisatulehdus, ja kyseessä on yksi tavallisin avoterveydenhuollossa tehdyistä diagnooseista. (Mattila 2005.) Bakteeri aiheuttaa lisäksi monia erilaisia infektioita, joista osa on erittäin vakavia. A-streptokokki tarttuu pisara- ja kosketustartuntana henkilöstä toiseen, ja bakteeri aiheuttaa epidemioita. (Ruotsalainen 2009.) Myös oireeton A-streptokokin nielukantaja voi levittää tartuntaa (Vuopio-Varkila, Syrjänen & Kotilainen 2010). Oireettomia nielukantajia on aikuisväestössä noin viisi prosenttia (Ruotsalainen 2009, Siljander 2009).

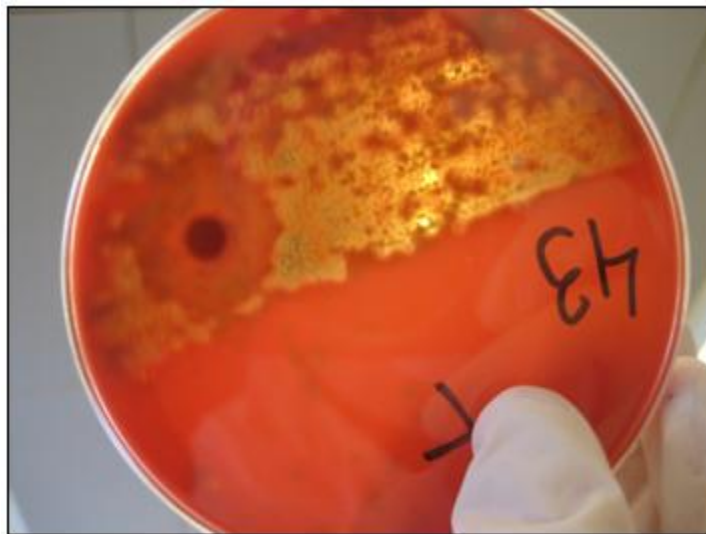
A-streptokokki diagnosoidaan yleensä bakteeriviljelyllä. Viljelyn suurin ongelma on hitaus, koska tulosta joudutaan odottamaan vähintään 18 tuntia. (Vuopio-Varkila ym. 2010.) A-streptokokin aiheuttamissa infektioissa on tärkeää aloittaa hoito mahdollisimman pian. Tämän vuoksi antigeeniosoitustestejä eli pikatestejä on kehitetty nopeuttamaan tuloksen saamista. Yleensä tulos saadaan noin vartitunnissa. (Leung, Newman, Kumar & Davies 2006.) Antigeeniosoitustestin herkkyys ja spesifisyys on ollut yleensä huonompi kuin viljelyn. (Gerber & Shulman 2004).

Tämä opinnäytetyö on osa Turun ammattikorkeakoulun Agricola-hanketta, jonka tarkoituksena on muun muassa yhteistyössä AMK:n bioalojen ja diagnostiikka-alan yritysten kanssa uusien diagnosointimenetelmien kehittäminen. (Agricola-hanke projektisuunnitelma 2011.) Tässä työssä kartoitetaan oireettomia A-streptokokin nielukantajia mariPOC[®]-antigeeniosoitustestillä, ja tuloksia verrataan viljelyllä ja PCR:llä saatuihin tuloksiin. Tarkoituksena on vertailla menetelmien eroja ja selvittää kuinka luotettava antigeeniosoitustesti on.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 A-ryhmän streptokokki

A-ryhmän streptokokki eli *streptococcus pyogenes* on beetahemolyyttinen ja grampositiivinen kokkibakteeri, joka on yleinen taudinaiheuttaja lapsilla ja aikuisilla (Vuopio-Varkila, Syrjänen & Kotilainen 2010). Beetahemolyyttinen bakteeri hajottaa tehokkaasti punasoluja kasvaessaan lampaanverimaljalla, jolloin maljalla on nähtävissä kirkkaita alueita bakteeripesäkkeiden ympärillä, kuten kuvassa 1 näkyy. A-streptokokki on yksi tärkeimmistä patogeenisistä bakteereista (Prescott, Harley & Klein 2005). Bakteeri tarttuu helposti pisara- ja kosketustartuntana, ja infektio on mahdollinen myös kontaminoitujen ruoka-aineiden välityksellä. A-streptokokki aiheuttaa epidemioita muun muassa päiväkodeissa, kouluissa ja varuskunnissa. Epidemioita esiintyy tavallisesti kylmien kuukausien aikana. (Ruotsalainen 2009, Vuopio-Varkila ym. 2010.)



Kuva 1. Beetahemolyysi verimaljalla (Liukko 2012).

A-streptokokin soluseinästä löytyy M-proteiinia, jonka avulla bakteeri pystyy viivästyttämään elimistön puolustusreaktioita (Prescott ym. 2005). M-proteiini on bakteerin tärkein virulenssitekijä. Näitä proteiineja löytyy yli 80 antigeenityyppiä, ja niiden perusteella A-streptokokit voidaan luokitella serotyyppeihin. A-

streptokokki tuottaa myös monia eksoentsyymejä ja eksotoksiineja, joiden avulla se parantaa omaa taudinaiheuttamiskykyään. (Vuopio-Varkila ym. 2010.) Eksoentsyymit ja eksotoksiinit ovat bakteerin tuottamia proteiineja, jotka erittyvät solun ulkopuolelle. Näiden proteiinien avulla bakteeri pystyy esimerkiksi tunkeutumaan ihmisen kudoksiin ja aiheuttamaan kudostuhoa. (Heikkilä & Meurman 2005.)

A-ryhmän streptokokki on tärkein nielurisatulehdusta eli tonsilliittia aiheuttavista bakteereista. Nielurisatulehdus tarkoittaa nielurisakudoksen infektoitumista, ja kyseessä on yksi yleisin avoterveydenhuollossa tehdyistä diagnooseista. A-streptokokin aiheuttamassa nielutulehduksessa nieluoireet ovat vallitsevia. (Mattila 2005.) Tavallisesti tulehduksen oireet alkavat nopeasti, ja tyypillisiä löydöksiä ovat kipeä ja punoittava nielu, korkea kuume, päänsärky, vaaleat katteet nielurisoissa, sekä suurentuneet ja aristavat imusolmukkeet leuan alla. Toisinaan oireet voivat olla hyvin lieviä etenkin pienillä lapsilla. Yleensä A-streptokokin aiheuttaman tulehduksen yhteydessä ei juuri tavata nuhaa tai yskää. (Mattila 2005, Vuopio-Varkila ym. 2010.)

Kurkkupaise eli peritonsillaarinen absessi on A-streptokokin aiheuttaman nielurisatulehduksen komplikaatio yleensä nuorilla aikuisilla. Infektio voi kehittyä noin viikon aikana nielurisatulehduksen jälkeen, huolimatta siitä onko mikrobilääkitys tehonnut nielurisatulehdukseen. Paise aiheuttaa tyypillisesti toispuoleisen kovan kurkku- ja korvakivun, nielemisvaikeuksia, puheen puuroutumista ja leuan lukiutumista. (Blomgren 2010.) Paiseen aiheuttama turvotus voi vaikeuttaa jopa hengittämistä. Kurkkupaise vaatiikin pikaista hoitoa. (Vuopio-Varkila ym. 2010.) Hoitoon kuuluu mikrobilääkityksen lisäksi paiseen avaus ja märän poisto, ettei tulehdus pääse leviämään (Blomgren 2010).

A-ryhmän streptokokki aiheuttaa lisäksi paljon erilaisia infektioita. Tulirokko eli scarlatina aiheuttaa punoittavan ihottuman kasvoilla ja ylävartalolla, punoittavan ja turvonneen kielen (eli niin kutsutun mansikkakielen), nielutulehdusta, kuumetta ja päänsärkyä. Ruusu eli erysipelas on ihonalaisen kudoksen infektio, jossa iholle muodostuu yleensä tarkkarajainen, turvonnut, punoittava ja kipeä alue. (Prescott ym. 2005.) Märkärupi eli impetigo contagiosa ilmenee yleensä lasten

kasvoilla rakkuloina ja kellertävän rupisina alueina (Hannuksela 2012). Selluliitti eli cellulitis on ihonalaiseen kudokseen ulottuva infektio, jonka oireita ovat paikallinen kipu, turvotus ja punoitus. Selluliitti ei yleensä aiheuta tarkkarajaista infektiota. Potilaalla tavataan usein myös yleisoireita, kuten korkeaa kuumetta ja pahoinvointia. (Vuopio-Varkila ym. 2010.)

A-streptokokki aiheuttaa myös hyvin vakavia infektoita. Verenmyrkytys eli sepsis on henkeä uhkaava yleisinfektio. Tällöin potilaan kunto romahtaa nopeasti, ja tavallisina oireina ovat yleiset ja paikalliset kivut, kuume, oksentelu ja ripuli. (Vuopio-Varkila ym. 2010.) Nekrotisoiva faskiitti on ihon alla nopeasti etenevä pehmytkudosinfektio, joka tuhoaa rasva- ja faskiakudosta aiheuttaen iholla kuumotusta, punoitusta ja sietämätöntä kipua (Vuopio-Varkila ym. 2010, Kiiski, Kääriäinen & Kuokkanen 2012). Lihastulehdus eli myosiitti on lihaksessa nopeasti etenevä infektio, joka voi johtaa koko lihaksen tuhoutumiseen. Toksinen sokkioireyhtymä on hengenvaarallinen tila, jossa verenpaine laskee rajusti, potilas kärsii kovasta kivusta, kuumeesta ja sokista. Kuolleisuus toksiseen sokkioireyhtymään on yli 30 prosenttia. (Prescott ym. 2005.) Toipuminen vakavasta infektiosta voi viedä useita kuukausia (Lukkarinen, Marttila, Perttilä, Virkki & Ruuskanen 2012).

Vakavan A-streptokokki-infektion voi saada kuka tahansa. Tartunnan lähde ei aina tiedetä, mutta altistavia tekijöitä ovat vakavat perussairaudet, immuunipuutos ja ihon haavaumat. Infektiot vaativat nopeaa tehohoitoa. Hoitona käytetään muun muassa antibioteerapiaa, ja joskus pehmytkudosinfektioiden yhteydessä joudutaan tekemään kirurgisia toimenpiteitä. (Jansson 2007.) Vakavat tautitapaukset ovat kuitenkin melko harvinaisia. Esimerkiksi Suomessa vuonna 2008 aikuisten positiivisia veriviljelynäytteitä löytyi 4068 kappaletta. Näistä 157 tapusta, eli noin neljä prosenttia, johtui A-ryhmän streptokokista. Lasten ja vanhuskeskuudessa A-streptokokki on vielä harvinaisempi veriviljelylöydös. Merkittävää kuitenkin on, että vakavat infektiot ovat lisääntyneet melko tasaisesti terveiden aikuisväestön keskuudessa. (Sarvikivi, Lyytikäinen & Vuopio-Varkila 2009.)

A-streptokokki-infektion harvinaisia jälkitauteja ovat reumakuume ja munuaiskerästulehdus eli glomerulonefriitti. Taudit ilmaantuvat noin neljän tai viiden viikon kuluessa akuutin infektion jälkeen. Reumakuume on melkein aina seurausta nielutulehduksesta. Sen aiheuttaman infektion oireet ilmenevät sydämessä, nivelissä, keskushermostossa ja ihonalaisessa kudoksessa. Tauti voi jättää jälkeensä esimerkiksi pysyvän sydänvian. Suurin osa sairastuneista on lapsia ja nuoria. Reumakuume uusiutuu herkästi myöhemmin sairastetun A-streptokokin aiheuttaman infektion jälkeen. (Prescott ym. 2005, Vuopio-Varkila ym. 2010.) Munuaiskerästulehdus aiheuttaa kuumetta, turvotusta, korkeaa verenpainetta ja veren erittymistä virtsaan. Jos munuainen ehtii vaurioitua, sitä ei voida enää korjata. Tauti voi kroonistua, jolloin potilas voi tarvita uuden munuaisen. Munuaiskerästulehdus on yleisin kouluikäisillä lapsilla. (Prescott ym. 2005.) Tauti on yleensä seurausta A-streptokokin aiheuttamasta ihotulehduksesta tai hengitystieinfektiosta (Vuopio-Varkila ym. 2010).

A-streptokokin aiheuttamat infektiot diagnosoidaan ottamalla näyte infektiokohdasta näytetikulla tai punktoimalla. Oireiden ollessa rajut, on syytä tehdä veriviljely. (Vuopio-Varkila ym. 2010.) Infektioita diagnosoidaan myös kliinisten oireiden perusteella. Esimerkiksi nieluviiljely on negatiivinen puolella potilaista, joilla on A-streptokokin aiheuttama kurkkupaise. Näissä tilanteissa laboratoriodiagnostiikasta ei ole juurikaan apua. (Blomgren 2010.)

A-streptokokin aiheuttama nieluinfektio tulee aina varmistaa laboratoriodiagnostiikan avulla (Käypä hoito 2012). Nielutulehdukset ovat hyvin yleisiä infektioita, mutta niitä aiheuttavat myös monet muut mikrobit. Esimerkiksi C- ja G-ryhmän streptokokit, adenovirus, Epstein-Barrin virus (EBV), klamydia ja mykoplasma aiheuttavat samankaltaisia oireita. Streptokokit aiheuttavat arviolta kolmasosan kaikista tonsilliiteista. (Vuopio-Varkila ym. 2010.) Yleensä nielutulehduksen aiheuttajaksi osoittautuu virus, mutta epidemian aikoihin A-streptokokki voi aiheuttaa jopa puolet nielutulehduksista. Potilaan oireiden perusteella onkin mahdollista tietää, mikä mikrobi infektion on saanut aikaan. Diagnostiikalla ratkaistaan tarvitaanko potilaan hoidossa mikrobilääkitystä, sillä virusinfektion hoito on oireenmukaista. (Mattila 2005.)

Bakteeriviljely on perusmenetelmä A-streptokokin tunnistamiseksi. Bakteerinäyte viljellään verimaljalle hajotusviljelytekniikkaa käyttäen. Hajotuksen tarkoituksena on saada bakteerien määrä tasaisesti vähenemään maljan eri osissa. (Tuokko, Rautajoki & Lehto 2008.) Bakteeri kasvaa hyvin lampaanverimaljalla, ja se tunnistetaan kirkkaan hemolyysinsä ansiosta. A-streptokokin tunnistaminen vaatii kuitenkin harjoittelua. (Vuopio-Varkila ym. 2010.) Bakteeri tarvitsee 18 – 24 tuntia lämpökaapissa muodostaakseen tunnistettavia bakteeripesäkkeitä (Tuokko ym. 2008). Apuna voidaan käyttää agglutinaatiotestejä, joilla saadaan streptokokkiryhmä selvitettyä (Vuopio-Varkila ym. 2010). Diagnoosia voidaan varmentaa käyttämällä apuna basitrasiinia. Kyseessä on antibiootti, jolle A-streptokokki on herkkä. Basitrasiinikiekko aiheuttaa verimaljalla estovyöhykkeen A-streptokokkikasvustoon. (Katila 2003.)

Hengitystieinfektioihin määrätään helposti antibiootteja, joista osa on turhia. Elimistön bakteeriston palautuminen normaaliksi antibioottikuurin jälkeen voi viedä kuukausia, tai jopa vuosia, joten turhien bakteerilääkekuurien käyttö ei ole merkityksetöntä. (Huovinen 2005.) Runsas antibioottien käyttö on myös kallista ja johtaa lääkeresistenssin kehittymiseen. Hengitystieinfektioiden diagnostiikkaa tehostamalla ja parantamalla voitaisiin vähentää turhien antibioottien käyttöä. (Aittoniemi & Vuento 2006.) A-streptokokin hoitoon penisilliini on edelleen hyvin tehokas, eikä sitä kohtaan ole ilmaantunut lääkeresistenssiä. Tetrasykliinia taas ei kehoiteta käyttämään, koska lääkeresistenssi sitä kohtaan on yleistynyt. (Vuopio-Varkila ym. 2010.)

2.2 A-ryhmän streptokokin nielukantajuus

Syntymän jälkeen ihmiselle kehittyy normaali mikrobisto eli normaalifloora ympäristön vaikutuksesta ja ihmisessä vallitsevien ominaisuuksien perusteella. Normaaliin mikrobistoon kuuluu erilaisia mikrobeja, joista bakteereita on ehdottomasti eniten. Suusta löytyy laaja mikrobisto, johon arvellaan kuuluvan yli 500 eri bakteerilajia. Normaaliflooran koostumuksessa on eroja sekä suun eri osissa, että yksilöiden välillä, mutta tärkeimmät pääryhmät löytyvät kaikilta. (Jalava

2011.) Suusta ja takanielusta löytyy muun muassa streptokokkeja, stafylokokkeja, veillonellaa, neisseriaa ja hiivaa. Suu tarjoaa bakteereille mainiot oltavat, koska vettä ja ravinteita on hyvin tarjolla, ja lisäksi suun pH ja lämpötila ovat otolliset. Bakteerien täytyy kuitenkin kestää jatkuvaa mekaanista rasitusta, joten niiden on pystyttävä kiinnittymään suun pinnoille. (Prescott ym. 2005.)

Ihmiseen tulee ympäristöstä koko ajan uusia mikrobeja, joista osa jää pysyväksi osaksi normaalia mikrobistoa, ja osa on väliaikaista. Lyhytaikaisten mikrobien joukossa voi olla patogeeneja, jotka eivät normaalitilanteessa pysty aiheuttamaan infektiota. Esimerkiksi A-ryhmän streptokokki voi jäädä nieluun kuukausien ajaksi. (Heikkilä & Pastila 2005.) A-ryhmän streptokokkia nielussaan kantavan nieluviiljely on positiivinen. Henkilölle ei kuitenkaan synny aktiivista immuunivastetta eikä tulehdusreaktio elimistössä käynnisty. Henkilö on myös täysin oireeton. Nielukantajien määrään voi vaikuttaa ikä, vuodenaika ja maantieteellinen sijainti. A-streptokokin kantajista suurin osa on kouluikäisiä lapsia ja nuoria, joista arviolta 15 – 25 prosenttia, tai jopa enemmän, kantaa bakteeria. Aikuisista oireettomia kantajia on alle viisi prosenttia. (Siljander 2009.) Bakteerin kantajuus on kuitenkin vaihtelevaa, ja voidaan olettaa, että väestöstä oireettomia kantajia on yleisesti 5 – 30 prosenttia (Ruotsalainen 2009). Kehitysmaissa A-ryhmän streptokokin oireeton nielukantajuus on paljon yleisempää, kuten myös lievät A-streptokokin aiheuttamat infektiot (Vuopio-Varkila ym. 2010).

Oireeton kantaja levittää A-streptokokkia ympäristöönsä samalla tavalla kuin oireileva potilaskin (Siljander 2009, Vuopio-Varkila ym. 2010). A-streptokokin aiheuttaman infektion, esimerkiksi nielutulehduksen, antibioottihoito voi epäonnistua, jos potilaan lähipiirissä tavataan oireetonta nielukantajuutta. Tällöin potilas voi saada bakteeritartunnan yhä uudelleen lähipiiristään. Toistuvissa infektioidissa myös lähipiiri on siis syytä tutkia, ja hoitaa, jos A-streptokokkia löytyy. Muuten oireettomia kantajia ei ole tarpeen hoitaa, ellei kyseessä ole esimerkiksi hoitotyötä tekevä henkilö. (Vuopio-Varkila ym. 2010.)

A-ryhmän streptokokin kantajuus voi olla myös pysyvää (Siljander 2009). Sela, Neeman, Keller ja Barzilai (2000) tutkivat 42 bakteerikantaa, ja osoittivat, että A-streptokokin aiheuttaman infektion antibioottihoito voi epäonnistua myös oman

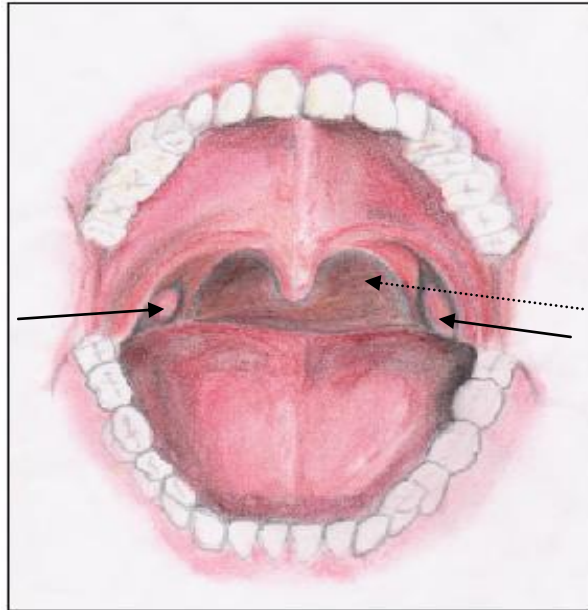
kroonisen nielukantajuuden takia. Tämä johtuu siitä, että bakteerilla on kyky tunkeutua suussa epiteelisolukkoon suojaan antibioottihoitoa. A-streptokokin on osoitettu myös pystyvän muodostamaan biofilmiä. Tutkinnan kohteena oli 289 A-streptokokki kantaa, joista jopa 90 prosenttia kykeni muodostamaan biofilmiä. (Baldassarri ym. 2006.) Biofilmi on pinnalle kiinnittynyt bakteerikasaua, jonka ansiosta bakteeri pystyy suojautumaan ulkoisia tekijöitä vastaan. Biofilmissä olevat bakteerit pystyvät kasvamaan, ja kasaumasta irrotessaan ne voivat levittää bakteeritartuntaa. Biofilmissä kasvavien bakteerien tuhoaminen antibiootein on vaikeaa. (Tapiainen, Salo & Uhari 2010.)

2.3 Nielunäytteenotto

Nielunäytteen tutkimustulos riippuu ratkaisevasti siitä, kuinka laadukkaasti näyte on otettu. Nielunäytteen on oltava edustava otos infektiokohdasta eli paikasta, jossa taudinaiheuttaja lisääntyy. Väärin otetusta näytteestä ei ikinä saada luotettavia tuloksia. Nielunäyte pitäisi ottaa ennen mikrobilääkityksen aloittamista, koska lääkitys voi haitata bakteerien kasvua ja muuttaa niiden ulkonäköä. (Kati-la 2003.) Syöminen, juominen ja kurkkutablettien imeskely ennen näytteenottoa heikentää tuloksen luotettavuutta, koska esimerkiksi jo veden juominen vähentää bakteerien määrää nielussa (Mikrobiologisten näytteiden ottaminen 2010). Näytettä otettaessa on varottava koskettamasta kieleen, ikeniin, hampaisiin tai kitapurjeeseen, koska näillä alueilla on runsaasti normaaliflooraa, joka voi häiritä tuloksen tulkintaa (Tuokko ym. 2008).

Viljelyä varten nielunäyte otetaan puuvillapäisellä näytteenottotikulla. Pikatestillä tai nukleinihapon monistusmenetelmällä tutkittavat näytteet otetaan steriilillä keinokuituvanutikulla. (Mikrobiologisten näytteiden ottaminen 2010.) Näyte tulee ottaa hyvässä valaistuksessa, ja potilaan kieli pidetään alhaalla spaattelin avulla. Nielunäyte otetaan näytetikua kunnolla painaen ja pyörittäen molempien nielurisojen pinnalla ja takanielussa. (Tuokko ym. 2008.) Näyte voidaan ottaa myös pelkästään nielurisoista (Mikrobiologisten näytteiden ottaminen 2010). Nielussa on molemmin puolin kaksi lihasten ja limakalvon muodostamaa nielu-

kaarta, joiden välissä nielurisa sijaitsee (Nienstedt, Hänninen, Arstila & Björkqvist 2008). Nielunäytteenottokohdat ovat nuolilla osoitettuina kuvassa 2. Näytetikun napakka painaminen näytteenottokohdassa on erittäin tärkeää, jotta näytteeseen saadaan irtoamaan kunnolla bakteereita. Jos nielurisat puuttuvat, näyte otetaan nielukaarten väliseltä alueelta. (Mikrobiologisten näytteiden ottaminen 2010.)



Kuva 2. Nielunäytteenottokohdat (Meriluoto 2012a; mukaeltu).

Näytteenoton jälkeen näytetikku viljellään heti verimaljalle. Jos näytettä ei voida viljellä saman tien, se laitetaan geelikuljetusputkeen ja lähetetään laboratorioon. (Tuokko ym. 2008.) Antigeeniosoitustesti tehdään heti nielunäytteenoton jälkeen. Mikrobiologiset näytteet kärsivät aina säilytyksen aikana, koska osa näytteessä olevista mikrobeista kuolee ja osa lisääntyy olosuhteista riippuen. Lähetettävät näytteet pitäisikin saada laboratorioon nopeasti, mielellään saman päivän aikana. (Mikrobiologisten näytteiden ottaminen 2010.)

2.4 StrA-antigeeniosoitustesti

Nieluinfektion diagnostiikkaan on kehitetty antigeeniosoitustestejä eli pikatestejä nopeuttamaan tuloksen saamista, koska perusmenetelmänä käytetyn bakteeri-

viljelyn suurin ongelma on hitaus (Gerber & Shulman 2004). Antigeeni on elimistölle vieras aine, joka käynnistää lymfaattisen järjestelmän. Antigeeneinä toimivat suuret molekyylit, kuten valkuuaisaineet, virukset ja bakteerit. Antigeenin pinnassa on antigeenideterminantteja eli epitooppeja, jotka kiinnittyvät immunosyytiin, esimerkiksi vasta-aineen, pinnassa olevaan reseptoriin eli vastaanottimeen. Jokaisen immunosyytin vastaanotin sopii vain tietynlaiseen epitooppiin tai epitooppien pitää olla toisiaan hyvin läheisesti muistuttavia, jotta sitoutuminen syntyy. (Niensted ym. 2008.) Antigeeniosoitustestillä osoitetaan näytteessä olevat antigeenit spesifisten vasta-aineiden avulla. Antigeenien määrä näytteessä selviää, kun sitoutuneet vasta-aineet määritellään. (Hänninen ym. 2000.)

Antigeeniosoitustestejä on erilaisia. Ensimmäiset pikatestit perustuivat latex-agglutinaatioon. Menetelmässä antigeenin ja vasta-aineen muodostaman kompleksin muodostuminen jäi melko epäselväksi, joten menetelmä ei ollut erityisen herkkä. (Halonen 2003, Gerber & Shulman 2004.) EIA-menetelmän (Enzyme Immunoassay) käyttö lisäsi antigeeniosoitustestin herkkyyttä, koska leimana käytetyn entsyymin avulla muodostunut kompleksi pystyttiin tarkemmin määrittämään. OIA-menetelmä (Optical Immunoassay) voi olla jo yhtä herkkä kuin viljelykin. (Gerber & Shulman 2004.) OIA-menetelmän avulla pystytään havaitsemaan A-streptokokin antigeenirakenteet suoraan näytteestä muuttuvan valoheijastuksen avulla (Harbeck, Teague, Crossen, Maul & Childers 1993).

Antigeeniosoitustestillä A-streptokokki tunnistetaan nopeasti, usein alle vartitunnissa, minkä ansiosta potilaan mahdollisesti tarvitsema mikrobilääkitys voidaan aloittaa nopeasti ja täsmällisellä lääkityksellä. Tämän seurauksena riski taudin leviämisestä pienenee ja potilaan oireiden kesto voi lyhentyä, jolloin sairauslomapäivät voivat vähentyä. (Leung, Newman, Kumar & Davies 2006.) Käypä hoito -suosituksen (2012) mukaan pikatestin käyttö on perusteltua, jos tulos saadaan potilaan odottaessa. Positiivinen tulos on yleensä luotettava, mutta negatiiviset tulokset voidaan kontrolloida vielä viljelyllä. Epidemiatilanteissa tulee käyttää ainoastaan viljelyä, ja näytteistä tulee tällöin etsiä myös C- ja G-ryhmän streptokokkeja.

Antigeeniosoitustestin suorittaminen on yleensä kalliimpaa kuin bakteeriviljelyn tekeminen. Myöskään testin tarkkuus eli spesifisyys ja herkkyys eli sensitiivisyys eivät perinteisesti ole saavuttaneet bakteeriviljelyn tasoa. (Gerber & Shulman 2004.) Vuonna 2005 labqualityn järjestämän ulkoisen laadunarviointikierroksen mukaan A-streptokokin diagnostiikkaan tarkoitetun antigeeniosoitustestin spesifisyys on Suomessa melkein 100 %. Herkkydessä tosin on vielä parantamisen varaa. Heikko positiivinen tulos tunnustetaan huonosti, ja vahvasti positiivisen tuloksenkin arvioi oikein vain yhdeksän kymmenestä osallistujasta. Osallistujia laadunarviointikierroksella oli lähes 500. (Nissinen 2006.)

Yhdysvaltalaisessa tutkimuksessa verrattiin bakteeriviljelyllä, antigeeniosoitustestillä ja PCR:llä saatuja tuloksia toisiinsa etsittäessä A-ryhmän streptokokkia. Tutkimuksessa analysoitiin 384 nielunäytettä. Näytteet otettiin kahdella näytteenottotikulla samanaikaisesti lääkärin tai hoitajan toimesta. Toinen tikuista analysoitiin PCR:llä, ja toinen käytettiin ensin viljelyyn ja sitten pikatestiin. Käytössä oli selektiivinen streptokokkimalja viljelyä varten, the Directigen 1-2-3 Group A Strep Test kit –antigeeniosoitustesti ja LightCycler PCR. Näytteistä oli positiivisia viljelyllä 55 kappaletta (14,3 %), pikatestillä 31 kappaletta (8,1 %) ja PCR:llä 58 kappaletta (15,1 %). Tutkimuksen mukaan antigeeniosoitustestin spesifisyys on 99 prosenttia ja herkkyys 55 prosenttia, kun taas PCR:n spesifisyys on 98 prosenttia ja herkkyys 93 prosenttia, kun tuloksia verrataan bakteeriviljelyyn. (Uhl ym. 2003.)

Antigeeniosoitustestin herkkyyteen vaikuttaa testin suorittajan koulutus. Laboratoriotyöntekijät raportoivat positiiviset näytteet useammin oikein verrattuna hoitotyöntekijöihin. (Fox, Cohen, Marcon, Cotton & Bonsu 2006, Nissinen 2006.) Esimerkiksi hoitotyöntekijöiden suorittaman pikatestin herkkyys vaihteli kahdessa seurannassa 56 – 82 prosentin välillä, kun laboratoriohenkilökunnan suorittaman testin herkkyys vaihteli 88 – 90 prosentin välillä. Hoitotyöntekijät suorittivat 1978 mittausta ja laboratoriotyöntekijät 909. Spesifisyys oli kaikilla 97 – 99 prosenttia. (Fox ym. 2006.)

Antigeeniosoitustestien on raportoitu antavan väärää positiivisia tuloksia, eli tuloksia, jotka ovat pikatestillä positiivisia ja viljelyllä negatiivisia. Tapaukset ovat

kuitenkin harvinaisia. Syitä on selitetty monin eri tavoin. Esimerkiksi antigeeniosoitustestin on mahdollista ristireagoida normaalifloorassa elävän *Streptococcus milleri* -ryhmän kanssa, jolloin pikatestitulos on virheellisesti positiivinen. Näytteenotossa voi myös sattua virheitä tai viiveitä, jolloin näytteet eivät ole vertailukelpoiset, tai viljelyyn tulevan näytteen bakteeripitoisuudet ovat muuttuneet kuljetuksen aikana. (Johnson & Kaplan 2001.) Cohen ym. (2012) toteavat, että suurin osa antigeeniosoitustestin mahdollisista vääristä positiivisista tuloksista johtuu elinkyvyltään heikentyneistä A-streptokokeista, jolloin kyseinen bakteeri ei tule esiin viljelyllä. Tutkimuksessa testattiin 1482 lasten nielu-näytettä, joista 51 antigeeniosoitustestillä saatua mahdollisesti väärää positiivista tulosta analysoitiin uudelleen eri menetelmillä. Näistä näytteistä löydettiin *Staphylococcus aureusta*, joka häiritsee A-streptokokin kasvua viljelymaljalla. Ristireagoinnista tuskin oli kyse, koska *S. milleri* -ryhmää ei näytteistä löydetty. Antigeeniosoitustestin spesifisyys on siis käytännön työssä 100 prosenttia.

Antigeeniosoitustestillä voidaan saada myös vääriä negatiivisia tuloksia, eli tuloksia, jotka ovat positiivisia viljelyllä ja negatiivisia pikatestillä. Tämän takia pikatestillä saatu negatiivinen tulos voidaan varmistaa vielä viljelyllä. Aina kyse ei ole kuitenkaan antigeeniosoitustestin antamasta väärästä tuloksesta. Antigeeniosoitustestin antamat väärät negatiiviset tulokset voivat johtua esimerkiksi bakteeriviljelyllä väärin tunnistetuista bakteereista. (Gerber & Shulman 2004.) A-streptokokki ei ole ainoa beetahemolyttinen bakteeri, vaan osa nielun normaaliin mikrobistoon kuuluvista streptokokeista aiheuttaa myös beetahemolyyysin verimaljalla. Agglutinaatiotestillä selvitetty streptokokkiryhmä ei ole täysin varma, koska muutkin streptokokit voivat agglutinoidua näissä testeissä. Basit-rasiinin käyttö voi myös johtaa virheellisiin identifikaatioihin, koska noin kolme prosenttia A-ryhmän streptokokeista ei ole herkkiä basit-rasiinille, ja toisaalta C- ja G-ryhmän streptokokeista löytyy basit-rasiinille herkkiä kantoja. (Vuopio-Varkila ym. 2010.)

Tässä opinnäytetyössä käytettiin ArcDian mariPOC[®]-antigeeniosoitustestiä. Menetelmä perustuu kaksoisfotonivirriteiseen fluoresenssitekniikkaan. Positiivisessa näytteessä polystyreenimikropartikkelien pinnalle muodostuu komplekse-

ja, jotka koostuvat vasta-aineesta, antigeenistä ja fluoroфорilla leimatusta vasta-aineesta eli koettimesta. Lasersäteiden säteilyvoimia käyttämällä saadaan mikropartikkelit vedettyä optiseen loukkuun, jossa mikropartikkelien pintaan sitoutunut koetin erotetaan sitoutumattomasta koettimesta. Erotus tapahtuu optisesti ilman pesuja. Tämän jälkeen mikropartikkelien antama signaali mitataan. Laite mittaa myös liuostaustan eli sitoutumattoman koettimen ja näytematriisin, jotta mahdolliset häiriötekijät pystytään kompensoimaan. (Hänninen ym. 2000.) Reaktio tapahtuu testilevyn reaktiokuopassa, jonne on valmistusvaiheessa lisätty kuivat reagenssit (Koskinen ym. 2007).

Kaksoisfotoniviritteinen fluoresenssitekniikka voi tarjota taloudellisen ja helpon tavan mitata biomolekyylejä kliiniseen käyttöön ja tutkimusten tarpeisiin (Hänninen ym. 2000). mariPOC[®]-antigeeniosoitustestillä tunnistetaan kymmenen eri hengitystieinfektion aiheuttajaa, joista esimerkkinä A-ryhmän streptokokki, pneumokokki, adenovirus ja RS-virus. Vahvasti positiivinen ja positiivinen tulos saadaan 20 minuutissa, mutta heikosti positiivisen ja negatiivisen tuloksen saamiseen menee kaksi tuntia. Testimenetelmän havainnointiraja A-ryhmän streptokokille on 200 CFU/ml, ja hieman tätä suurempi määrä on heikko positiivinen tulos. (Koskinen, Vuorinen, Siro & Kelo 2010.)

mariPOC[®]-antigeeniosoitustestin spesifisyys ja herkkyys ovat yleisesti parempia kuin muilla pikatesteillä. Tutkimuksessa analysoitiin 99 nielunäytettä kolmella menetelmällä, jotka olivat viljely, perinteinen antigeeniosoitustesti ja mariPOC[®] (StrA-antigeeniosoitustesti). Viljelyllä löytyi 11, perinteisellä pikatestillä 12 ja mariPOC[®]:lla 36 positiivista näytettä. Tutkimuksessa käytettiin tervettä kontrolliryhmää, jonka koko oli 39 henkilöä. Spesifisyyttä tuki myös laaja tutkimusaineisto aiemmista ristireaktiivisuustutkimuksista. (Koskinen ym. 2010.)

3 TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Tämä opinnäytetyö on osa Turun ammattikorkeakoulun Hyvinvointipalveluiden ja Terveysalan Agricola-hanketta, joka aloitettiin syksyllä 2011. Hankkeen tavoitteena oli projektiyhteistyön käynnistäminen Turun AMK:n bioalojen kanssa, ja mahdollisuuksien mukaan tehdä yhteistyötä diagnostiikka-alan yritysten kanssa. Hankkeessa pyrittiin uusien non-invasiivisten tutkimusmenetelmien löytämiseen ja diagnosointimenetelmien kehittämiseen. Pyrkimyksenä oli hoitoprosessin nopeuttaminen ja potilaan terveyden edistäminen. Tavoitteena oli myös opiskelijoiden projektityövalmiuksien kasvattaminen. (Agricola-hanke projektisuunnitelma 2011.)

Opinnäytetyö oli osa A-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin analyysimenetelmien vertailua. Kerätyistä nielunäytteistä suoritettiin antigeeniosoitustesti, jonka tuloksia verrattiin bakteeriviljelyllä ja PCR:llä saatuihin tuloksiin. Tavoitteena oli verrata menetelmiä keskenään ja selvittää antigeeniosoitustestin luotettavuutta. Tutkimustehtävät olivat seuraavat:

- Kuinka monta positiivista näytettä löytyy antigeeniosoitustestillä verrattuna viljelyyn ja PCR:ään?
- Onko antigeeniosoitustestillä saadut positiiviset tulokset samoja kuin kahdella muulla menetelmällä?
- Antaako antigeeniosoitustesti vääriä positiivisia tai vääriä negatiivisia tuloksia?

4 KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

4.1 Opinnäytetyön toteutus

Nielunäytteitä kerättiin toukokuussa 2012 Turun ammattikorkeakoulun Ruiskadun toimipisteessä. Kirjallinen toimeksiantosopimus kirjoitettiin toukokuussa ennen käytännön tutkimustyön aloittamista Ruiskadun bioanalytiikan koulutusohjelman koulutuspäällikkö Leila Tiilikan ja ArcDian R&D Director Janne Koskisen kanssa. Tietoa tästä tutkimuksesta, ja mahdollisuudesta osallistua siihen, informoitiin lähettämällä sähköpostia Ruiskadun opiskelijoille. Toimipisteessä oli esillä myös mainoksia. Kaikkien hankkeeseen osallistuvien kanssa allekirjoitettiin kirjallinen suostumuslomake, johon kirjattiin tietoa tutkimuksesta, sekä tutkijoiden yhteystiedot ja allekirjoitukset. Suostumuslomake käytiin osallistujan kanssa suullisesti läpi ennen näytteenottoa. Toinen kappale lomakkeesta jäi osallistujalle, ja toinen tutkijoille. Toimeksiantosopimus ja suostumuslomakkeen mallipohja ovat liitteenä.

Ennen hankkeen aloittamista näytteitä ottavat opiskelijat saivat koulutusta nielunäytteenottoon bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian opettajalta. Näytteenotto hajautettiin useammalle päivälle, jotta osallistujien määrä olisi mahdollisimman suuri. Nielunäytteitä otettiin terveistä vapaaehtoisista Ruiskadun terveysterveys- ja sosiaalialan opiskelijoista, henkilökunnasta ja satunnaisista vierailijoista koululla. Nuorin osallistuja oli 19-vuotias ja vanhin 69-vuotias. Osallistujien iän mediaani oli 23 vuotta, keski-ikä 29,9 vuotta ja keskihajonta 12,9.

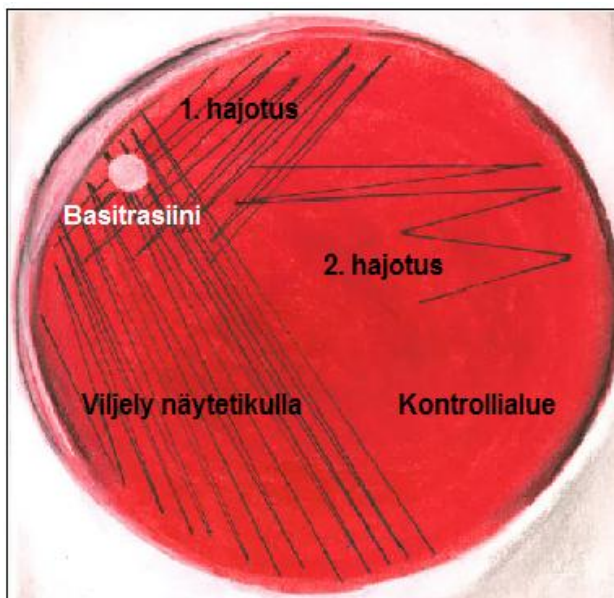
Nielunäytteet kerättiin kahden hankkeeseen osallistuvan bioanalyttikko-opiskelijan toimesta, jotka olivat Viivi Liukko ja Sari Soittu. Koehenkilöitä informoitiin ennen nielunäytteenottoa, että näytteenotto voi tuntua hieman epämiellyttävältä. Nielunäyte otettiin tehdaspuhtaalla pumpulitikulla ja steriilillä Copan Flocked Swab -nukkatikulla samanaikaisesti. Näyte kerättiin koehenkilön nielu-riisoista ja mahdollisuuden mukaan takanielusta. Koehenkilöiden esivalmisteluissa ja näytteenotossa sattuneet poikkeamat ovat esitettynä taulukossa 1. Nielunäytteitä kerättiin 109 kappaletta, ja kaikki näytteet tutkittiin kaikilla kolmel-

la menetelmällä. Koehenkilöille ilmoitettiin heidän mahdolliset positiiviset tuloksensa, jos he näin halusivat. Ilmoitus tapahtui puhelimitse marraskuussa 2012 henkilökohtaisesti.

Taulukko 1. Poikkeamat esivalmisteluissa ja näytteenotossa.

Näytenro 12	Koehenkilö juonut kahvia ennen näytteenottoa
Näytenro 34	Koehenkilöllä mahdollisesti allergista nuhaa
Näytenro 52	Koehenkilöllä allergisia oireita
Näytenro 59	Koehenkilöllä ollut nuuska huulella ennen näytteenottoa
Näytenro 65	Koehenkilö ollut hieman flunssainen, kurkku turvoksissa
Näytenro 78	Näytteenottotikut otettu peräkkäin
Näytenro 81	Koehenkilöllä allergisia oireita
Näytenro 88	Koehenkilö syönyt hieman ennen näytteenottoa

Näytteenoton jälkeen tavallinen pumpulitikku viljeltiin heti lampaanverimaljalle hajotusviljelytekniikkaa käyttäen. Ensin näytteenottotikulla viljeltiin noin puolet maljasta tikkua pyörittämällä, jonka jälkeen tehtiin viljelysauvalla kaksi hajotusta maljalle. Noin neljäsosa maljasta jätettiin viljelemättä kontrollialueeksi. Maljalle asetettiin valkoinen basitrasiniekko kohtaan, jossa tikulla viljelty alue ja ensimmäinen hajotus yhtyivät. Hajotusviljelytekniikka ja basitrasiniekon paikka ovat esitettyinä kuvassa 3. Antigeeniosoitustestiä ja PCR:ää varten otettu nukkatikku katkaistiin ja säilöttiin korkilliseen näyteputkeen, joka suljettiin vielä varmuuden vuoksi parafilmillä. Nukkatikkunäytteet pakastettiin ensin -20 Celsiusasteeseen, ja seuraavana päivänä näytteet siirrettiin -80 Celsiusasteeseen odottamaan analysointia. Maljat ja mariPOC[®]:kin näyteputket numeroitiin juoksevalla numerolla.



Kuva 3. Viljelymalli (Meriluoto 2012b; mukaeltu).

Viljellyt maljat vietiin Ruiskadun toimipisteen mikrobiologian luokassa olevaan lämpökaappiin kasvamaan. Viivi Liukko luki viljelyt yhden ja kahden vuorokauden kuluttua näytteenotosta. A-ryhmän streptokokki tunnistettiin beetahemolyyysin ja basitrasiiinikiekon ympärille muodostuneen estorengaan ansiosta. Käytössä olleet kiekot eivät aina muodostaneet täydellisen pyöreää estorengasta bakteerikasvustoon, joten positiiviset viljelytulokset varmistettiin vielä latex-agglutinaation avulla.

Sari Soittu analysoi nielunäytteet ArcDian mariPOC[®]-antigeeniosoitustestillä toukokuun lopulla 2012. Ajot suoritettiin ArcDian tiloissa Turussa Lemminkäisenkadulla kahdella laitteella. Näytteet siirrettiin -20 Celsiusasteeseen päivää ennen antigeeniosoitustestin suorittamista, ja pakkasesta jääkaappilämpötilaan sulamaan analysointipäivän aamuna. Analysointi tapahtui testimenetelmän valmistajan ohjeiden mukaan. Näyteputkia varten tulostettiin kaksi viivakooditarraa, joista toinen tarra liimattiin tyhjäan putkeen koneen tekemää laimennosta varten. Näyteputkeen lisättiin kuusi tippaa uutoreagenssi A:ta ja B:tä, minkä jälkeen putkea sekoitettiin (vorteksoimalla) 10 – 15 sekuntia. Tämän jälkeen odotettiin 2 – 10 minuuttia. Putkeen lisättiin vielä 1,3 millilitraa RTI Sample Bufferia, ja sekoitettiin (vorteksoimalla) 10 – 15 sekuntia.

Laitteeseen oli aiemmin aamulla laitettu pharyn -testilevy, joten putket voitiin siirtää laitteeseen kolme kerrallaan automaattianalysointia varten. Laite suoritti jokaisen näytteen kohdalla automaattisesti sisäisen kontrollin. 20 minuutin kuluttua voitiin lukea vahva positiivinen ja positiivinen tulos ja kahden tunnin kuluttua selvisi heikosti positiivinen ja negatiivinen tulos. Analysoinnin jälkeen tulokset kerättiin ylös, ja näyteputket päällystettiin vielä parafilmillä ja siirrettiin takaisin jääkaappiin, josta yöksi -20 Celsiusasteeseen ja seuraavana päivänä -80 Celsiusasteeseen odottamaan analysointia PCR:llä.

Antigeeniosoitustestiä suoritettaessa sattui pieniä poikkeamia. Näytteessä numero 35 huomattiin olevan ruskeaa väriä näytetikussa. Viljelyyn käytetyssä tikussa väriä ei ollut, eikä asiakkaan esivalmisteluissa tai näytteenotossa ollut mitään erikoista. Näytenumerot 31 – 34, 41 – 44, 75 – 78 ja 85 – 88 seisoivat analysoinnin jälkeen yön yli (noin 14 tuntia) huoneenlämmössä, koska putkia ei voitu ottaa laitteesta pois illalla. Näytteet siirrettiin jääkaappiin seuraavana aamuna, ja pakastettiin samalla tavalla kuin muutkin näytteet. Näytteeseen numero 72 lisättiin tuplamäärä reagenssi A:ta ja B:tä annosteluvirheen vuoksi.

Siiri Meriluoto ja Marika Vesalainen suorittivat ajot RT-qPCR:llä lokakuussa 2012. Heidän oman työnsä nimi on Oireettomien A-ryhmän streptokokin kantajien kartoittaminen RT-qPCR-menetelmällä. Analysointi tapahtui Turun ammattikorkeakoulun toimipisteen laboratoriossa Lemminkäisenkadulla. Pakastetut näytteet sulatettiin, ja näyteputkessa olleet solut sentrifugoitiin putken pohjalle. Näin saatu supernatantti laimennettiin, minkä jälkeen näytteet analysoitiin PCR:llä.

4.2 Metodologiset lähtökohdat

Tämä tutkimus oli kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus. Sen tyypillisiä piirteitä ovat ihmisjoukosta kerätty otos yksilöitä, joilta aineisto kerätään. Aineisto kerätään jokaiselta standardoidusti. Kerätyn aineiston avulla ilmiötä pystytään vertailemaan ja selittämään. Keskeistä kvantitatiivisessa tutkimuksessa on muun muassa hypoteesien esittäminen, johtopäätökset aiemmista tutkimuksista ja

kerätyn aineiston mittaaminen määrällisesti. (Hirsijärvi, Remes & Sajavaara 2002.) Tässä tutkimuksessa aineisto oli yksilöiltä kerätyt nielunäytteet. Näytteiden avulla kolmea eri menetelmää pystytään vertailemaan. Tutkimuksen tarkoitus on kartoittava, ja olennaista siinä oli etsiä uusia näkökulmia ja kehittää hypoteeseja (Hirsijärvi ym. 2002).

Antigeeniosoitustestin tulos on kvalitatiivinen eli laadullinen, koska tulos annetaan muodossa positiivinen tai negatiivinen (Tuokko ym. 2008). Tässä opinnäytetyössä käytetty antigeeniosoitustesti laskee tarkan bakteerimäärän näytteestä, mutta laite ilmoitti tuloksen laadullisesti. Tämä johtuu siitä, että vaikka pikatestin tekniikka onkin kvantitatiivinen, ennen testiä eri henkilöiden toimesta suoritettu nielunäytteenotto ei ole. (Koskinen 2012.)

4.3 Eettisten näkökohtien tarkastelu

Tutkimusta tehdessä tulee noudattaa yleistä huolellisuutta, rehellisyyttä, tarkkuutta ja avoimuutta. Muiden tutkijoiden töitä tulee käsitellä asiallisesti ja kunnioittavasti, eikä toisen tekemää työtä tule vähätellä. Hyvä tieteellinen käytäntö edellyttää, ettei tutkimusta tehdessä syyllistytä vilpilliseen tai piittaamattomaan toimintaan. Vilpillinen toiminta on esimerkiksi tutkimustulosten vääristämistä tai muiden tutkijoiden saamien tulosten esittäminen omina. Piittaamattomuus tarkoittaa esimerkiksi tutkimuksen suorittamista holtittomasti tai tulosten esittämistä huolimattomasti. (Hyvä tieteellinen käytäntö 2002.)

Tutkijan on oltava objektiivinen ja yrittää toimia mahdollisimman epäpersoonallisesti. Tutkijan ennakoasenteet tai uskomukset eivät saa vaikuttaa tutkimukseen tai tuloksiin. Aiemmat tutkimustulokset, tutkimuksen rahoittaja tai muut auktoriteetit eivät saa vaikuttaa tutkijaan. (Mäkinen 2006.) Tutkijan on oltava myös kriittinen, ja pystyttävä arvioimaan omaa tutkimustyötään sen eri vaiheissa. Tutkijan tulee olla valmis korjaamaan omia johtopäätöksiään tarvittaessa ja ymmärtää, että hänen saamansa tulokset voivat olla kumottavissa. (Hirsijärvi ym. 2002.)

Aineiston kokoon ja edustavuuteen tulee kiinnittää huomiota tutkimusta suunniteltaessa. Jos koko tutkimuksen kohteena olevaa perusjoukkoa ei pystytä tutkimaan, valitun otoksen perusjoukosta tulee olla edustava. Tämä mahdollistaa sen, että tulosten perusteella voidaan tehdä päätelmiä koko perusjoukosta. Pääsääntönä on, että mitä suurempi valittu otoskoko on, sitä paremmin otos kuvastaa koko perusjoukkoa. Aineiston kokoon vaikuttaa myös tutkijalla käytävissä oleva aika. Aineiston koko ei saa kasvaa mahdottoman suureksi, jotta se pystyttäisiin käsittelemään. (Hirsijärvi ym. 2002.)

Helpoin tapa saada koehenkilöitä tutkimukseen on kysyä heiltä suoraan. Kysyjän tulee kuitenkin olla tasavertainen kysyttävän henkilön kanssa, jotta henkilö osallistuu tutkimukseen puhtaasti omasta vapaasta tahdostaan. Mahdollisuudesta osallistua tutkimukseen voi ilmoittaa myös esimerkiksi sanomalehdissä tai ilmoitustauluilla. Tutkimukseen osallistuvalla voidaan tarjota korvausta, mutta korvauksella houkutteleva mukaan tutkimukseen ei ole asiallista. Ilmoituksessa palkkion tarjoaminen voi laskea tutkimustulosten luotettavuutta, koska osallistujiksi voi hakeutua tietyn tyyppistä vain palkkiota tavoittelevaa väkeä. (Mäkinen 2006.)

Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta (488/1999) edellyttää, että tutkimuksessa täytyy kunnioittaa ihmisarvon loukkaamattomuutta. Tutkimukseen osallistuvan edut ja hyvinvointi on asetettava etusijalle, ja hänelle tutkimuksesta koituvat riskit ja haitat on pyrittävä torjumaan. Osallistujaa tulee informoida tutkimuksen tarkoituksesta ja käytetyistä menetelmistä, sekä mahdollisista riskeistä ja haitoista. Osallistujalle pitää tehdä selväksi, että hän voi keskeyttää milloin tahansa ennen tutkimuksen päättymistä, eikä siitä aiheudu hänelle haittaa. Kun tutkittava on riittävän tietoinen omista oikeuksistaan ja tutkimuksen luonteesta, hänen tulee allekirjoittaa kirjallinen suostumus osallistumisestaan tutkimukseen.

Tutkimukseen osallistuvan tiedot ovat luottamuksellisia, ja tutkijan pitää pystyä takaamaan osallistujan anonymiteetti. Tämä tulee ottaa huomioon aineistoa kerätessä, tuloksia julkistettaessa ja aineistoa säilytettäessä. (Hirsijärvi ym. 2002.) Tutkijan tulee noudattaa osallistujille antamia lupauksia aineiston käytöstä. Esimerkiksi aineistoa ei saa käyttää muihin tutkimuksiin tai luovuttaa muil-

le, ellei tästä ole sovittu koehenkilöiden kanssa. (Mäkinen 2006.) Henkilötietolaki (523/1999) määrää, että henkilötietoja tulee käsitellä laillisesti ja huolellisesti, ettei yksilönsuojaa vahingoiteta. Henkilötietojen käyttö tulee olla perusteltua, ja tapahtua henkilön suostumuksella. Henkilötietoja sisältävää tutkimusaineistoa käsittelevää henkilöä sitoo vaitiolovelvollisuus.

Tehdyn tutkimuksen luotettavuutta tulee arvioida eri tavoin. Reliaabelius eli luotettavuus tarkoittaa mittaustulosten toistettavuutta. Tarkoitus on selvittää, ovatko tulokset sattumanvaraisia vai toistettavia. Jos esimerkiksi kahdessa eri tutkimuksessa päädytään samoihin tuloksiin, voidaan sanoa tulosten olevan luotettavia. Validius eli pätevyys tarkoittaa käytetyn tutkimusmenetelmän kykyä mitata sitä, mitä pitikin mitata. Esimerkiksi kyselylomakkeen kysymys on pätevä, jos tutkija ja vastaaja ymmärtävät kysymykset samalla tavalla. Tutkimuksen pätevyyttä voidaan täsmentää käyttämällä samassa tutkimuksessa eri menetelmiä. (Hirsijärvi ym. 2002.)

Tutkimuksen luotettavuutta kasvattaa lähdekritiikki. Tutkijan tulee työtä tehdessään pohtia onko lähde luotettava, aito, riippumaton, puolueeton ja alkuperäinen. Käytännössä tutkijan tulee kiinnittää huomiota lähdeteoksen kirjoittajaan, tämän käyttämiin lähteisiin ja lähdeviitteisiin. Esimerkiksi ovatko käytetyt lähteet arvovaltaisia ja onko lähdeviitteet merkitty oikein. On myös merkittävää missä käytetty lähde on julkaistu, ja onko se ajankohtainen. Tutkijan ei tulisi käyttää lähteenä tekstiä, jossa viitataan toiseen lähteeseen. Tutkijan pitäisi etsiä tieto alkuperäisestä julkaisusta, koska tieto voi muuttua eri tutkijoiden käsissä. Alkuperäinen lähde on aina aidompi. (Mäkinen 2006).

5 TULOKSET

Kaikki 109 nielunäytettä analysoitiin kaikilla kolmella menetelmällä. Bakteeriviljelyllä löydettiin kaksi positiivista näytettä (1,8 %), mariPOC[®]-antigeeniosoitustestillä löydettiin kuusi heikosti positiivista näytettä (5,5 %) ja RT-qPCR:llä 57 heikosti positiivista näytettä (52,3 %). Positiiviset ja negatiiviset tulokset ovat esitettyinä taulukossa 2.

Taulukko 2. Positiiviset ja negatiiviset tulokset.

		Viljely	Antigeeniosoitustesti	PCR
Positiivisia näytteitä	kpl	2	6	57
	%	1,8	5,5	52,3
Negatiivisia näytteitä	kpl	107	103	52
	%	98,2	94,5	47,7

Viljelyllä ja antigeeniosoitustestillä löytyi yksi yhteinen positiivinen näyte (näyte 43). Antigeeniosoitustesti löysi viisi positiivista näytettä, jotka olivat viljelyn mukaan negatiivisia (näytteet 1, 7, 11, 45 ja 53). Toinen viljelyllä positiiviseksi osoittautunut näyte ei ollut positiivinen antigeeniosoitustestin mukaan (näyte 100).

Antigeeniosoitustestillä ja PCR:llä löytyi neljä yhteistä positiivista näytettä (näytteet 1, 7, 11 ja 45). Antigeeniosoitustesti löysi kaksi positiivista näytettä, jotka olivat negatiivisia PCR:n mukaan (näytteet 43 ja 53). PCR:llä löydettiin 53 positiivista näytettä, jotka olivat negatiivisia antigeeniosoitustestin mukaan.

Viljelyllä ja PCR:llä löytyi yksi yhteinen positiivinen näyte (näyte 100). Toinen viljelyllä positiiviseksi osoittautunut näyte, ei ollut positiivinen PCR:n mukaan.

(näyte 43). PCR:llä löydettiin 56 positiivista näytettä, jotka olivat negatiivisia viljelyn mukaan.

Yksikään näyte ei ollut positiivien kaikilla kolmella menetelmällä. Molemmat viljelypositiiviset näytteet olivat myös positiivia joko antigeeniosoitustestillä tai PCR:llä. Neljä viljelyllä negatiiviseksi osoittautunutta näytettä, oli kuitenkin positiivisia antigeeniosoitustestin ja PCR:n mukaan. Antigeeniosoitustestillä löytyi viisi positiivista näytettä, jotka olivat positiivisia myös joko viljelyllä tai PCR:llä. Yksi antigeeniosoitustestillä löytynyt näyte ei ollut positiivinen viljelyllä eikä PCR:llä. PCR:llä löytyi viisi yhteistä positiivista näytettä joko viljelyn tai antigeeniosoitustestin kanssa, mutta 53 positiivista näytettä, jotka eivät olleet positiivisia muilla menetelmillä. Yhteiset positiiviset tulokset ovat esitettyinä taulukossa 3.

Taulukko 3. Yhteiset positiiviset tulokset.

Näytenro	Viljely	Antigeeniosoitustesti	PCR
1	-	+	+
7	-	+	+
11	-	+	+
43	+	+	-
45	-	+	+
53	-	+	-
100	+	-	+

Lisäksi antigeeniosoitustestillä löydettiin yksi A-streptokokkia sisältävä näyte (näyte 65), mutta sen antigeenimäärä oli kuitenkin niin pieni, että testimenetelmä määritteli näytteen kliinisesti negatiiviseksi. Kyseinen näyte oli positiivinen PCR:n mukaan. Näytteistä löytyi myös muita kuin A-ryhmän streptokokkeja. Antigeeniosoitustestillä löydettiin seitsemän pneumokokkia (näytteet 51, 56, 60,

63, 69, 78 ja 102). Kaikki pneumokokkitulokset olivat hyvin matalia positiivisia. Kolme näistä pneumokokkituloksista oli PCR:n mukaan positiivisia (näytteet 56, 60 ja 78). Lisäksi viljelyllä löydettiin näytteistä yksi C-ryhmän streptokokki (näyte 36) ja yksi G-ryhmän streptokokki (näyte 28). PCR määritteli toisen näistä positiiviseksi (näyte 28). PCR:llä löydetty positiiviset A-streptokokkitulokset, verrattuna muilla menetelmillä löydettyihin toisiin streptokokkituloksiin, ovat esitettyinä taulukossa 4.

Taulukko 4. Muiden streptokokkitulosten vertailua.

Näytenro	Viljely	Antigeeniosoitustesti	PCR
28	G-str.	-	+ (A-str.)
36	C-str.	-	-
51	-	Pneumokokki	-
56	-	Pneumokokki	+ (A-str.)
60	-	Pneumokokki	+ (A-str.)
63	-	Pneumokokki	-
65	-	+ (A-str.)	+ (A-str.)
69	-	Pneumokokki	-
78	-	Pneumokokki	+ (A-str.)
102	-	Pneumokokki	-

6 POHDINTA

Voidaan olettaa, että mariPOC[®]-antigeeniosoitustesti on viljelyä hieman herkempi, kun etsitään A-streptokokin oireettomia nielukantajia. Tosin täyttä varmuutta ei ole siitä, onko osa antigeeniosoitustestin tuloksista vääriä positiivisia tuloksia. PCR:llä saatuihin tuloksiin verratessa antigeeniosoitustestin positiiviset tulokset voisivat olla aitoja positiivisia tuloksia, joita viljelyllä ei vain saatu tuotua esiin. Toisaalta osa PCR:n tuloksista voi olla ristireaktioita toisten streptokokkien kanssa, joten tähänkään ei ehkä voida täysin luottaa.

Positiivisten näytteiden määrä vaihteli kaikilla menetelmillä. Viljelyllä ja antigeeniosoitustestillä löydettiin melko sama määrä positiivisia tuloksia, kun taas PCR:llä näitä oli paljon enemmän. Kirjallisuudessa arvellaan oireettomia A-streptokokin kantajia olevan aikuisväestöstä alle viisi prosenttia (ks. Siljander 2009). Antigeeniosoitustestillä päästiin suunnilleen samoihin lukemiin, koska testillä löydettiin otoksesta noin viisi prosenttia oireettomia A-ryhmän streptokokin kantajia. Viljelyn mukaan kantajia oli otoksessa noin kaksi prosenttia, kun taas PCR määritteli yli puolet osallistuneista nielukantajiksi.

Turun ammattikorkeakoulun Lemminkäisenkadun toimipisteen RT-qPCR:llä käytetty menetelmä ei ollut vertailua suoritettaessa vielä täysin valmis, joten menetelmä ei ehkä ollut täysin spesifi. On mahdollista, että osa PCR:n saamista tuloksista on ristireaktioita muiden streptokokki-ryhmien kanssa. Viljelyllä ja antigeeniosoitustestillä löydetyistä yhdeksästä streptokokista (ei A-ryhmää) PCR määritteli neljä A-ryhmän streptokokiksi. Toisaalta on mahdollista, että osassa näytteistä oli hyvin vähän myös A-streptokokkia, minkä PCR havaitsi. PCR:llä ajetut kontrollit onnistuivat.

Antigeeniosoitustesti löysi viisi positiivista näytettä enemmän kuin viljely. Näytteet otettiin samaan aikaan, ja viljely suoritettiin heti näytteenoton jälkeen, joten bakteeriviljelyyn tulleet näytteet olivat vertailukelpoisia. On mahdollista, että antigeeniosoitustesti olisi esimerkiksi ristireagoanut toisen streptokokki-ryhmän kanssa, ja tulokset olisivat virheellisiä positiivisia tuloksia. (ks. Johnson & Kaplan 2001). Tosin mariPOC[®]:n spesifisyyttä tukee aiemmat tulokset ristireaktii-

visuustutkimuksista. (ks. Koskinen ym. 2010). Viljelyllä löytyi positiivisia tuloksia vähemmän ehkä siksi, että tutkimuksessa etsittiin oireettomia nielukantajia eikä akuutin nieluinfektion aiheuttajaa. Antigeeniosoitustesti löytää bakteerin anti-geenit, kun taas viljelyllä löydetään pelkästään elinkykyiset bakteerit. On mahdollista, että nielukantajalla on A-streptokokkia nielussaan niin vähän, että viljelymaljalla kasvu ei tule esiin esimerkiksi normaaliflooran takia (ks. Tuokko ym. 2008). Neljä näistä viidestä antigeeniosoitustestillä positiiviseksi osoittautuneista näytteistä oli kuitenkin positiivisia myös PCR:llä.

Yksi antigeenitestillä löydetty positiivinen näyte ei ollut positiivinen viljelyn eikä PCR:n mukaan. Kyseessä voi olla väärä positiivinen tulos. Toisaalta on mahdollista, ettei kyseinen bakteeri kasvanut viljelyllä, kuten viisi muuta antigeeniosoitustestillä positiivista näytettä, ja PCR ei ollut riittävän sensitiivinen löytämään sitä. Toinen viljelypositiivisista näytteistä ei kuitenkaan ollut PCR:n mukaan positiivinen, joten testimenetelmän herkkyys herättää kysymyksiä.

Myös antigeeniosoitustestin herkkyys herättää kysymyksiä, koska toinen viljelypositiivisista näytteistä oli negatiivinen antigeeniosoitustestillä, mutta positiivinen PCR:llä. Kyseessä voi olla väärä negatiivinen tulos. Toisaalta on myös pieni mahdollisuus, että kyse on näytteenottovirheestä. Näytteet kerättiin kahdella tikulla samaan aikaan, joten on mahdollista etteivät molemmat tikut koskettaneet näytteenottoa samalla tavalla. Kyseisen näytteen PCR:llä saatu positiivinen tulos olisi tällöin ristireaktio toisen streptokokin kanssa. Myös antigeeniosoitustestillä suoritettavat kontrollit menivät kaikki läpi ensimmäisellä kerralla.

Enemmän vertailukohtaa viljelyn ja antigeeniosoitustestin välille olisi saatu, jos otoskoko olisi ollut suurempi kuin 109 näytettä. Alun perin tavoite oli saada näytteitä enemmän, mutta jos näytemäärä olisi ollut paljonkin suurempi, niiden tutkimiseen olisi tarvittu enemmän aikaa. Näytemäärän alarajaksi asetettiin 100 näytettä. Määrä suhteutettiin arvioon nielukantajien määrästä. Tiedettiin, että kantajia on alle viisi prosenttia (ks. Siljander 2009), joten näytteitä tulisi olla mielellään yli 100, jotta saataisiin positiivisia tuloksia. Tosin oli epävarmaa, että saadaanko edes näin montaa vapaaehtoista osallistumaan tähän tutkimukseen.

Näytteenottajia oli kaksi. Tähän päädyttiin, koska aikaa näytteiden keräämiseen ei ollut runsaasti. Kahdella näytteenottajalla näytteenotto sujui jouhevasti. Kuitenkin näytteenottajasta johtuva vaihtelu haluttiin minimoida, joten useampia näytteenottajia ei haluttu käyttää.

Nielunäytteitä keräsi bioanalytiikan opiskelijat, joiden peruskoulutukseen kuuluu nielunäytteenottoa, ja ennen hanketta annettiin vielä lisäkoulutusta. Kuitenkaan kokemusta nielunäytteenotosta ei kummallakaan ollut kovin paljoa, mikä saattaa osaltaan aiheuttaa yleisesti vaihtelua tuloksiin. Näytteet kerättiin kahdella tikulla samaan aikaan, mikä myös vaikeutti näytteenottoa. Myöskään kaikilta osallistuneilta ei saatu näytettä otettua nielurisojen lisäksi takanielusta, minkä takia näytteet eivät ole täysin verrannollisia. On kuitenkin epäselvää, paljonko tämä vaikuttaa, koska toisen lähteen mukaan nielunäyte otetaan pelkästään nielurisoista (ks. Mikrobiologisten näytteiden ottaminen 2010, vrt. Tuokko ym. 2008).

Osallistuneiden esivalmisteluissa ja näytteenotossa sattuneilla poikkeamilla saattoi myös olla vaikutusta tuloksiin. Kaksi koehenkilöä oli syönyt tai juonut ennen näytteenottoa, ja näytteet olivat negatiivisia viljelyllä, antigeeniosoitustestillä ja PCR:llä. Näytteet olisivat voineet olla positiivisia ilman ravinnon nauttimista. (ks. Mikrobiologisten näytteiden ottaminen 2010.) Yhdellä osallistujalla oli nuuskaa ikenessä ennen näytteenottoa. Näyte oli negatiivinen kaikilla kolmella menetelmällä, mutta on epäselvää häiritseekö nuuskan käyttö tuloksen tulkitsemista. Kolme koehenkilöä tunsu itsensä hieman nuhaisiksi, mutta arveli tai tiesi tämän johtuvan allergiasta. Kaikki kolme näytettä olivatkin negatiivisia viljelyllä ja antigeeniosoitustestillä, mutta yksi näytteistä oli positiivinen PCR:llä. Todennäköistä on, että positiivinen tulos on ristireaktio esimerkiksi normaaliflooran streptokokin kanssa. Jos näyte olisi ollut positiivinen myös viljelyllä tai antigeeniosoitustestillä, ei voitaisi olla varmoja onko kyseessä nielukantaja vai infektio.

Myös yhden koehenkilön kohdalla huomattiin nielun olevan turvoksissa. Osallistuja kertoi myös olleensa hieman flunssainen. Näyte oli viljelyllä negatiivinen, ja antigeeniosoitustestillä näytteestä löydettiin A-streptokokin antigeeniä hyvin

niukasti. Testi määritteli näytteen kuitenkin kliinisesti negatiiviseksi. PCR määritteli näytteen positiiviseksi. Todennäköisesti kyse oli esimerkiksi ohimenevästä infektiosta. Yksi näytteistä kerättiin näytetikuilla peräkkäin, eikä samaan aikaan. Tämä johtui virheestä näytteenotossa. Näyte oli negatiivinen viljelyllä ja antigeeniosoitustestillä, mutta PCR:llä positiivinen. On mahdollista, että viljelyyn käytetyssä näytetikussa olisi ollut hieman eri koostumus bakteereita, ja näyte olisi siksi negatiivinen. Toisaalta antigeeniosoitustesti oli myös negatiivinen, ja testi tehtiin samasta näytteestä. On todennäköistä, että kyse on ristireaktiosta tai näytteessä ollut antigeenimäärä oli niin pieni, että se tuli esiin vain PCR:llä.

Yhteen näytteeseen tuli tuplamäärä reagensseja ennen antigeeniosoitustestillä ajoa annosteluvirheen vuoksi. Liian suuren laimennoksen takia herkkyys näytteessä voi kärsiä. Näyte oli negatiivinen antigeeniosoitustestillä ja viljelyllä. PCR määritteli näytteen positiiviseksi. Ei voida tietää varmasti olisiko näyte ollut positiivinen antigeeniosoitustestillä, jos reagensseja olisi ollut oikea määrä. On mahdollista, että A-streptokokkia oli näytteessä niin vähän, ettei se tullut esiin viljelyllä.

Käytettyjä lähteitä kertyi hyvin. Toisaalta työssä on käytetty muutamaa pelkkää työn tiivistelmää lähteenä, koska koko työtä ei ollut saatavilla. Esimerkiksi mari-POC[®] -antigeeniosoitustestistä oli melko vähän yleisesti saatavilla olevaa tietoa, koska testimenetelmä on melko uusi. Tässä työssä käytetyt tiedot mariPOC[®] -antigeeniosoitustestistä ovat kaikki peräisin testimenetelmän valmistajalta Arc-Dialta. Työn luotettavuutta olisi ehkä parantunut, jos käytössä olisi ollut muutama täysin riippumaton lähde. (ks. Mäkinen 2006).

Julkaisuja on lainattu pääsääntöisesti arvovaltaisista paikoista. Näitä ovat esimerkiksi Suomen Lääkärilehti, Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, Duodecim-lehti ja Journal of Clinical Microbiology. Lähteenä on tosin käytetty myös muutamaa oppimateriaaliksi tarkoitettua käsikirjaa, jotka olivat Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa ja Kliiniset laboratorionäytteet – opas näytteiden ottoa varten. Lähteistä on lainattu harkiten, ja ainoastaan tukemaan muuta tietoa. Tietoa tarvittiin myös nielunäytteenotto-kappaleeseen, jossa käsitellään käytännön työn suoritusta. Pyrkimyksenä oli lainata ajankohtaisista ja tuoreista lähteistä, mutta

tässä ei aina onnistuttu. Esimerkiksi vanhin lähde on vuodelta 1993. Lähdettä käytettiin ainoastaan siksi, ettei tietoa löytynyt muualta, ja lähteestä lainattiin tietoa vain yhteen lauseeseen, jossa käsitellään antigeeniosoitustestien menetelmäperiaatteita. (ks. Mäkinen 2006.)

Jatkotutkimuksena voitaisiin verrata nielunäytteitä toiseen spesifimpään PCR-menetelmään tai kehittää tässä työssä käytettyä PCR-menetelmää spesifisemmäksi. Tällöin voitaisiin ratkaista, onko osa antigeeniosoitustestillä saaduista positiivisista tuloksista väärää positiivisia tuloksia, vai onko antigeeniosoitustesti vain hyvin herkkä.

7 LÄHTEET

- Agricola-hanke. 2011. Projektisuunnitelma osa 1. Hyvinvointipalvelut ja Terveysala, Turun ammattikorkeakoulu.
- Aittoniemi, J. & Vuento, R. 2006. Hengitystieinfektioiden laboratoriodiagnostiikka: bakteerinäyte vai ei? Suomen lääkärilehti (17): 1845 – 1849.
- Baldassarri, L. Creti, R. Recchia, S. Imperi, M. Facinelli, B. Giovanetti, E. Pataracchia, M. Alfaroni, G. & Orefici, G. 2006. Therapeutic Failures of Antibiotics Used To Treat Macrolide-Susceptible *Streptococcus pyogenes* Infections May Be Due to Biofilm Formation. Journal of Clinical Microbiology (8): 2721 – 2727.
- Blomgren, K. 2010. Kurkkupaiseen hoito. Duodecim-lehti (7): 810 – 814.
- Cohen, J. Cohen, R. Bidet, P. Levy, C. Deberdt, P. d'Humieres, C. Liguori, S. Corrad, F. Mariani, P. Chalumeau, M. & Bingen, E. 2012. False-positive Results of Rapid Antigen Detection Tests (RADT) FOR Group A Streptococcus (GAS) Pharyngitis: A Case-Control Study. Tiivistelmä.
- Fox, J. Cohen, D. Marcon, M. Cotton, W. & Bonsu, B. 2006. Performance of Rapid Streptococcal Antigen Testing Varies by Personnel. Journal of Clinical Microbiology (11): 3918 – 3922.
- Gerber, M. & Shulman, S. 2004. Rapid Diagnosis of Pharyngitis Caused by Group A Streptococci. Clinical Microbiology Reviews (3): 571 – 580.
- Halonen, T. 2003. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki. WSOY: 90 – 100.
- Hannuksela, M. 2012. Märkärupi (impetigo contagiosa). Terveyskirjasto. Helsinki. Duodecim. (Viitattu 10.10.2012) http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00456
- Harbeck, R. Teague, J. Crossen, G. Maul, D. & Childers, P. 1993. Novel, rapid optical immunoassay technique for detection of group A streptococci from pharyngeal specimens: comparison with standard culture methods. Journal of Clinical Microbiology (4): 839 – 844.
- Heikkilä, R. & Meurman, O. 2005. Teoksessa Hellsten, S. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. painos. Jyväskylä. Suomen Kuntaliitto: 31 - 50
- Heikkilä, R. & Pastila, S. 2005. Teoksessa Hellsten, S. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. painos. Jyväskylä. Suomen Kuntaliitto: 16 – 19.
- Henkilötietolaki 523/1999. Suomen säädöskokoelma. Helsinki
- Hirsijärvi, S. Remes, P. & Sajavaara, P. 2002. Tutki ja kirjoita. 6. – 8. painos. Helsinki. Tammi.
- Huovinen, P. 2005. Mikrobit – pahaa parempia. Laboratoriolääketiede ja näyttely 2005 – ohjelma. Sivu 9.
- Hänninen, P. Soini, A. Meltola, N. Soini, J. Soukka, J. & Soini, E. 2000. A new microvolume technique for bioaffinity assays using two-photon excitation. Nature Biotechnology (18): 548 – 550. Tiivistelmä.
- Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausten käsitteleminen. 2002. Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2. painos. Helsinki. Edita Prima Oy.

Jalava, J. 2011. Ihmisen normaali mikrobisto ja sen merkitys. Teoksessa Hedman, K. Heikkinen, T. Huovinen, P. Järvinen, A. Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Jyväskylä. Duodecim: 76- 82.

Jansson, M. 2007. Vakavat A-streptokokki-infektiot lisääntyneet. Suomen lääkärilehti (24): 2349.

Johnson, D. & Kaplan, E. 2001. False-Positive Rapid Antigen Detection Test Results: Reduced Specificity in the Absence of Group A Streptococci in the Upper Respiratory Tract. The Journal of Infectious Diseases (7): 1135 – 1137.

Katila, M-L. 2003. Tavallisimmat menetelmät bakteriologian, mykologian ja parasitologian tutkimuksissa. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki. WSOY:. 346 – 357.

Kiiski, J. Kääriäinen, M. & Kuokkanen, H. 2012. Hengenvaarallinen infektio suonikohjuleikkauksen jälkeen. Duodecim-lehti (2): 159 – 163.

Koskinen, J. Vainiopää, R. Meltola, N. Soukka, J. Hänninen, P. & Soini, A. 2007. Rapid Method for Detection of Influenza A and B Virus Antigens by Use of a Two-Photon Excitation Assay Technique and Dry-Chemistry Reagents. Journal of Clinical Microbiology (11): 3581 – 3588.

Koskinen, J. Vuorinen, T. Siro, M-J. & Kelo, E. 2010. Highly sensitive multianalyte antigen test for pharyngitis. Tiivistelmä.

Koskinen, J. 2012. mariPOC®. Suullinen tiedonanto 8.5.2012.

Käypä hoito -suositus. 2012. Nielutulehdus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Yleislääketieteen yhdistyksen, Suomen Otolaryngologiyhdistyksen, Suomen Infektiolääkärit ry:n ja Kliiniset mikrobiologit ry:n asettama työryhmä. Helsinki. Duodecim. (Viitattu 15.10.2012) <http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/naytaartikkeli/tunnus/hoi38020>

Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 488/1999. Suomen säädöskokoelma. Helsinki.

Leung, AK. Newman, R. Kumar, A. & Davies, HD. 2006. Rapid antigen detection testing in diagnosing group A betahemolytic streptococcal pharyngitis. Expert Review of Molecular Diagnostics (5): 761 – 766. Tiivistelmä.

Liukko, V. 2012. Beetahemolyysi verimaljalla.

Lukkarinen, H. Marttila, H. Perttilä, J. Virkki, R. & Ruuskanen, O. 2012. A-ryhmän streptokokin aiheuttama vaikea keuhkokuume. Duodecim-lehti (8): 825 – 829.

Mattila, P. 2005. Nielurisatulehduksen hoito. Duodecim-lehti (17): 1842 – 1848.

Meriluoto, M. 2012a. Nielunäytteenottokohdat. Kuva mukaeltu.

Meriluoto, M. 2012b. Viljelymalli. Kuva mukaeltu.

Mikrobiologisten näytteiden ottaminen. 2010. Tykslab ohjekirja. (Viitattu 16.10.2012) <http://ohjekirja.tykslab.fi/liitteet/MikrobiolNaytteet.pdf>

Mäkinen, O. 2006. Tutkimusetiikan A B C. Helsinki. Tammi.

Nienstedt, W. Hänninen, O. Arstila, A. & Björkqvist, S-E. 2008. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 15. – 17. painos. Helsinki. WSOY.

Nissinen, A. 2006. A-streptokokkiantigeenipikatesti; kierrospalaute. Moodi (1): 31.

Prescott, L. Harley, J. & Klein, D. 2005. Mikrobiology. 6. painos. New York. McGraw-Hill.

- Ruotsalainen, E. 2009. Streptokokkiepidemiat kuriin päiväkodeissa ja kouluissa. Suomen lääkäri-lehti (51 - 52): 4428.
- Sarvikivi, E. Lyytikäinen, O. & Vuopio-Varkila, J. 2009. Muut infektiot. Teoksessa Hulkko, T. Lyytikäinen, O. Kuusi, M. Möttönen, T. & Ruutu, P. (toim.) Tartuntataudit Suomessa 2008. Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos, raportti 10. Helsinki. Edita Prima Oy: 34 – 41.
- Sela, S. Neeman, R. Keller, N. & Barzilai, A. 2000. Relationship between asymptomatic carriage of *Streptococcus pyogenes* and the ability of the strains to adhere to and be internalised by cultured epithelial cells. *Journal of Clinical Microbiology* (6): 499 – 502. Tiivistelmä.
- Siljander, T. 2009. Molecular and Epidemiological Aspects of *Streptococcus pyogenes* Disease in Finland: Severe Infections and Bacterial, Non-necrotizing Cellulitis. Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos, tutkimus 23. Helsinki. University Print: 1 – 90.
- Tapiainen, T. Salo, J. & Uhari, M. 2010. Bakteeribiofilmit infektioitaudeissa. *Duodecim-lehti* (7): 766 – 767.
- Tuokko, S. Rautajoki, A. & Lehto, L. 2008. Kliiniset laboratorionäytteet – opas näytteiden ottoa varten. Helsinki. Tammi.
- Uhl, J. Adamson, S. Vetter, E. Schleck, C. Harmsen, W. Iverson, L. Santrach, P. Henry, N. Cockerill, F. 2003. Comparison of LightCycler PCR, Rapid Antigen Immunoassay, and Culture for Detection of Group A Streptococci from Throat Swabs. *Journal of Clinical Microbiology* (1): 242 – 249.
- Vuopio-Varkila, J. Syrjänen, J. & Kotilainen, P. 2010. A-ryhmän streptokokki. Teoksessa Hedman, K. Heikkinen, T. Huovinen, P. Järvinen, A. Meri, S. & Vaara, M. (toim.) *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 1. Jyväskylä. Duodecim: 102 – 109.

Koehenkilötiedote ja suostumuslomake

Turun ammattikorkeakoulu

Sosiaali- ja terveysala

Koehenkilötiedote ja suostumuslomake

OIREETTOMIEN STREPTOKOKKI-A-KANTAJIEN KARTOIT- TAMINEN VILJELYLLÄ, ANTIGEENIOSOITUSTESTILLÄ JA PCR:LLÄ

TIEDOTE TUTKITTAVILLE JA SUOSTUMUS TUTKIMUKSEEN OSALLIS- TUMISESTA

1 TUTKIJOIDEN YHTEYSTIEDOT

Liukko Viivi, viivi.liukko@students.turkuamk.fi

Meriluoto Siiri, siiri.meriluoto@students.turkuamk.fi

Soittu Sari, sari.soittu@students.turkuamk.fi

Vesalainen Marika, marika.vesalainen@students.turkuamk.fi

2 TUTKIMUKSEN TAUSTATIEDOT

Opinnäytetyöt tehdään Turun ammattikorkeakoulun Agricola-hankkeeseen. Opinnäytetyöt on tarkoitus tehdä kevään ja syksyn 2012 aikana.

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA MERKITYS

Opinnäytetöiden tarkoituksena on kartoittaa nieluviilijelyllä, pikatestillä ja PCR-menetelmällä oireettomien streptokokki-A:n kantajien määrä. Tavoitteena on saada selville menetelmien heikkoudet sekä vahvuudet vertailemalla niitä toisiinsa.

4 MENETTELYT, JOIDEN KOHTEEKSI TUTKITTAVAT JOUTUVAT

Tutkittavilta henkilöiltä otetaan nielunäytteet nieluviiljelyä, pikatestiä ja PCR-menetelmää varten. Näytteistä tutkitaan edellä mainituilla menetelmillä A-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin olemassaolo.

5 TUTKIMUKSEN HYÖDYT JA HAITAT TUTKITTAVALLE

Tutkimuksesta ei koidu näennäistä haittaa tutkittaville. Tutkittavilla on mahdollisuus saada tietoonsa omat tutkimustuloksensa. Positiivinen tulos ilmoitetaan tutkittavalle, jos hän ilmoittaa yhteystietonsa seuraavalle sivulle.

6 MITEN JA MIHIN TUTKIMUSTULOKSIA AIOTAAN KÄYTTÄÄ

Tutkimustuloksia käytetään opinnäytetöihin.

7 TUTKITTAVIEN OIKEUDET

Osallistuminen tutkimukseen on täysin vapaaehtoista. Tutkittavilla on tutkimuksen aikana oikeus kieltäytyä mittauksista ja keskeyttää testit ilman, että siitä aiheutuu mitään seuraamuksia. Tutkimuksen järjestelyt ja tulosten raportointi ovat luottamuksellisia. Tutkimuksesta saatavat tiedot tulevat ainoastaan tutkittavan ja tutkijaryhmän käyttöön ja tulokset julkaistaan tutkimusraporteissa siten, ettei yksittäistä tutkittavaa voi tunnistaa. Tutkittavilla on oikeus saada lisätietoa tutkimuksesta tutkijaryhmän jäseniltä missä vaiheessa tahansa.

TUTKITTAVAN SUOSTUMUS

Olen perehtynyt tämän tutkimuksen tarkoitukseen ja sisältöön, tutkittaville aiheutuviin mahdollisiin haittoihin sekä tutkittavien oikeuksiin ja vakuutusturvaan. Suostun osallistumaan mittauksiin ja toimenpiteisiin annettujen ohjeiden mukaisesti. En osallistu mittauksiin flunssaisena, kuumeisena, toipilaana tai muuten huonovointisena. Voin halutessani peruuttaa tai keskeyttää osallistumiseni tai kieltäytyä mittauksista missä vaiheessa tahansa. Tutkimustuloksiani saa käyttää tieteelliseen raportointiin (esim. julkaisuihin) sellaisessa muodossa, jossa yksittäistä tutkittavaa ei voi tunnistaa.

<hr/>		
Tutkittavan nimi	Tutkittavan syntymäaika	
<hr/>		
Tutkittavan puhelinnumero		
<hr/>		
Päiväys	Tutkittavan allekirjoitus	Paikka
<hr/>		
Päiväys	Tutkijan allekirjoitus	Paikka
<hr/>		
Päiväys	Tutkijan allekirjoitus	Paikka
<hr/>		
Päiväys	Tutkijan allekirjoitus	Paikka
<hr/>		
Päiväys	Tutkijan allekirjoitus	Paikka

OPISKELIJAN TIEDOT

Nimi Sari Soittu
 Osoite Signalistinkatu 19c 26, 20360 Tku
 Puhelin koti - Puhelin työ 044-2032605
 Sähköposti sari.soittu@students.turkuamk.fi
 Koulutusohjelma Bioanalytiikan ko

OPINNÄYTETYÖ

Aihe/ työnimi Oireettomien streptokokki-A-kantajien kartoittaminen antigeenisoitustestillä viljelyllä ja PCR:llä. Nielunäytteet otetaan AMK:n terveysalan toimipisteessä. Viljelyä varten tarvittavat välineet hoituvat koulun puolesta. ArcDia vastaa pikatestiin tarvittavista välineistä. Analysointi tapahtuu ArcDian titoissa.
 Aikataulu Toukokuu- Marraskuu 2012
 TOIMEKSIANTAJA

Organisaatio ArcDia / Turun ammattikorkeakoulu, Ruiskadun toimipiste
 Työn ohjaaja / yhteyshenkilö Janne Koskinen / Leila Tiilikka
 Osoite Lemminkäisenkatu 30, 20520 Tku / Ruiskatu 8 20720 Tku
 Puhelin 050-3774987 Sähköposti janne.koskinen@arcdia.com
050-5985552 leila.tiilikka@turkuamk.fi

OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT

Ohjaava opettaja Mika Venojärvi
 Puhelin 044-9075479 Sähköposti mika.venojarvi@turkuamk.fi



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT

OHJAUS JA VASTUUT

Vastuu opinnäytetyön tekemisestä ja tuloksista on opiskelijalla. Turun ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjauksesta. Toimeksiantaja sitoutuu antamaan opiskelijan käyttöön kaikki opinnäytetyön tekemisessä tarvittavat tiedot ja aineistot sekä ohjaamaan opinnäytetyötä toimeksiantajaorganisaation näkökulmasta.

OIKEUDET

Opinnäytetyön tekijänoikeus kuuluu tekijälle eli opiskelijalle. Tekijänoikeuden lisäksi myös muiden immateriaalioikeuksien osalta noudatetaan kulloinkin voimassa olevaa kyseessä olevaa oikeutta koskevaa lainsäädäntöä.

TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

Mahdollisesta työsuhteesta, työstä maksettavasta palkki-osta ja työstä mahdollisesti aiheutuvien kustannusten korvaamisesta toimeksiantaja ja opinnäytetyön tekijä sopivat erikseen.

TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksiin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

Kirjallinen raportti luovutetaan toimeksiantajalle ja asetetaan kirjaston kokoelmiin tai julkaistaan elektronisessa muodossa verkkokirjastossa.

Julkaistava opinnäytetyöraportti on laadittava niin, ettei se sisällä liike- tai ammattisalaisuuksia tai muita julkisuuslaissa (laki viranomaisten toiminnan julkisuudesta) salassa pidettäväksi määrättyjä tietoja, vaan ne jätetään työn tausta-aineistoon. Opinnäytetyön arvioinnissa otetaan huomioon sekä julkaistava että salassa pidettävä osa.

Opinnäytetyön toimeksiantaja ja opiskelija sitoutuvat pitämään salassa kaikki opinnäytetyön tekemisessä ja sitä edeltävissä tai sen jälkeisissä neuvotteluissa esiin tulevat luottamukselliset tiedot ja asiakirjat.

Toimeksiantajan edustajalle varataan mahdollisuus tutustua opinnäytetyöraporttiin viimeistään neljätoista (14) päivää ennen aiottua julkaisemista. Toimeksiantaja antaa työstä ennen edellä mainittua julkaisemisajankohtaa lausunnon, jossa voidaan määritellä opinnäytetyöraporttiin mahdollisesti sisältyvät liike- tai ammattisalaisuudet, joita ei julkaista.

OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETTYLLÄ TAVALLA

16.5.2012

16.5.2013

Opiskelija

Toimeksiantaja

LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA

Tulosta lomake

Turun ammattikorkeakoulu
Loukahalsenkatu 3 A, 20520 Turku
puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791
sposti: etunimi.sukunimi@turkuamk.fi