



B-RYHMÄN STREPTOKOKKIA OSOITAVIEN MENETELMIEN VERTAILU

Bakteeriviljely ja nukleiinihappo-osoitus

Emmi Martinmäki

Hanne Palomäki

Opinnäytetyö
Tammikuu 2015
Bioanalytiikan
koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Seinäjoen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

EMMI MARTINMÄKI & HANNE PALOMÄKI:
B-ryhmän streptokokkia osoittavien menetelmien vertailu
Bakteeriviljely ja nukleiinihappo-osoitus

Opinnäytetyö 51 sivua, joista liitteitä 6 sivua
Tammikuu 2015

B-ryhmän streptokokki (Group B Streptococcus, GBS, *Streptococcus agalactiae*) on ihmisen normaaliflooraan kuuluva bakteeri ja sen oireeton kantajuus on yleistä. Bakteeri voi tarttua synnytyksen aikana äidistä vauvaan ja aiheuttaa vastasyntyneelle vakavia infektioita (GBS-tauti), jotka pahimmassa tapauksessa johtavat lapsen vammautumiseen tai jopa kuolemaan. Suomalaisena suosituksena on tällä hetkellä yleinen B-streptokokkiseulonta kaikilta raskaana olevilta raskausviikoilla 35 - 37. Vastasyntyneen infektio pyritään estämään antamalla mikrobilääkeprofylaksi synnytyksen käynnistyttyä äideille, joiden B-streptokokkikantajuus on todettu.

Opinnäytetyön toimeksiantajana oli Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian toimintayksikkö, jonne haluttiin nopeampi testimenetelmä B-streptokokin osoittamiseen. Tarkoituksena oli vertailla tällä hetkellä käytössä olevaa bakteeriviljelyä Cepheidin GeneXpert GBS -nukleiinihappotestiin. Vertailun avulla pyrittiin selvittämään, ovatko näillä menetelmillä saadut tulokset yhteneviä ja voidaanko uutta polymeeraasiketjureaktioon (PCR) pohjautuvaa menetelmää käyttää kiireellisissä tapauksissa B-ryhmän streptokokin osoittamiseen.

Tutkimuksen kokeellinen osio koostui 40 potilasnäytteestä. Sekä bakteeriviljelyn että PCR-menetelmän tuloksista yhdeksän oli positiivisia ja 31 negatiivisia. Tulosten perusteella laskettiin sensitiivisyys, spesifisyys, positiivinen ennustearvo ja negatiivinen ennustearvo. Niiden perusteella todettiin, että GeneXpert GBS on herkkä ja tarkka menetelmä osoittamaan B-ryhmän streptokokin kantajuutta.

Opinnäytetyön tulokset osoittivat, että GeneXpert GBS -testiä voidaan käyttää B-ryhmän streptokokin kliiniseen diagnostiikkaan. Sillä saadaan nopeasti osoitettua äidit, jotka ovat GBS-bakteerin kantajia. Synnytyksen aikaisesta testauksesta hyötyvät erityisesti naiset, jotka eivät ole olleet äitiyshuollon piirissä, jotka synnyttävät ennenaikaisesti tai joiden GBS-seulonnan tulokset eivät ole tiedossa synnytyksen alkaessa. Testaus mahdollistaa hoidon nopean aloittamisen ja vastasyntyneen GBS-taudin paremman ehkäisyn sekä vähentää tarpeettomien antibioottihoitojen määrää.

Asiasanat: B-ryhmän streptokokki, GBS, bakteeriviljely, nukleiinihappo-osoitus

ABSTRACT

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

EMMI MARTINMÄKI & HANNE PALOMÄKI:
Comparison of Bacterial Culture and Nucleic Acid Test for the Detection of Group B Streptococcus

Bachelor's thesis 51 pages, appendices 6 pages
January 2015

Group B Streptococcus (GBS, *Streptococcus agalactiae*) is a bacterium which belongs to the human normal microbial flora and is a common asymptomatic colonizer of healthy adults. The baby can be infected by bacteria during labor. The infection can cause a severe neonatal disease and in the worst case lead to disabilities or even death. It is recommended that all pregnant women in Finland should be screened for Group B Streptococcus during 35 - 37 weeks of gestation. The aim is to prevent neonatal infections by giving an intrapartum antimicrobial prophylaxis to mothers who are colonized by Group B Streptococcus.

The topic of this thesis was provided by the Department of Clinical Microbiology of Seinäjoki Central Hospital where a more rapid test procedure was needed to identify Group B Streptococcus. The purpose was to compare two different techniques, bacterial culture and Cepheid GeneXpert GBS nucleic acid test. The aim was to find out if the results of these two techniques are identical and if the new polymerase chain reaction (PCR) based test can be used to identify Group B Streptococcus in emergencies.

The experimental part of the study consisted of 40 clinical specimens. Nine of the results were positive and 31 negative in both techniques. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were calculated based on results. It was confirmed that GeneXpert GBS is a sensitive and specific test to identify women who are colonized by Group B Streptococcus.

The results of the thesis showed that GeneXpert GBS test is useful in clinical diagnostics of Group B Streptococcus. It enables rapid identification of GBS-colonized women. Especially the women who have had no prenatal care, who might deliver preterm or whose GBS test results are unknown at the time of the delivery will benefit from intrapartum testing. Because of the intrapartum testing, it is possible to start treatment rapidly and prevent neonatal GBS disease. It also decreases the use of unnecessary antibiotic treatments.

Key words: Group B Streptococcus, GBS, bacterial culture, nucleic acid test

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	B-RYHMÄN STREPTOKOKKI.....	7
2.1	Streptokokkien luokittelu.....	7
2.2	B-ryhmän streptokokin ominaisuudet ja virulenssitekijät	8
2.3	Vastasyntyneen GBS-tauti.....	9
3	MENETELMÄT GBS-KANTAJUUDEN TUNNISTAMISEKSI.....	12
3.1	Seulontamallit	12
3.2	Seulontakäytännöt Suomessa.....	13
3.3	Tutkimuksia seulontaohjelmien vaikutuksista.....	14
3.4	GBS-seulonnan haasteet ja tulevaisuudennäkymät	15
4	NÄYTTEENOTTO B-STREPTOKOKIN OSOITUSTA VARTEN	18
5	VERTAILTAVAT TESTIMENETELMÄT	20
5.1	B-ryhmän streptokokin osoittaminen bakteeriviljelyn avulla.....	20
5.2	B-ryhmän streptokokin nukleiinihappo-osoitus.....	22
5.2.1	PCR:n periaate	22
5.2.2	Cepheid Xpert GBS	24
6	AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET	26
7	TUTKIMUKSEN TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT.....	28
8	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	29
9	TUTKIMUKSEN KOKEELLISEN OSION TOTEUTUS	32
9.1	Näyttemateriaali ja sen käsittely	32
9.2	Testin suoritus.....	32
9.3	Tulosten tulkinta	34
10	TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	37
11	EETTISYYS JA LUOTETTAVUUS	39
12	POHDINTA.....	40
	LÄHTEET.....	42
	LIITTEET	46
	Liite 1. Näytteenotto-ohje.....	46
	Liite 2. Testilomake näytteiden kirjaamista varten	48
	Liite 3. Positiivinen testiraportti	48
	Liite 4. Negatiivinen testiraportti	50
	Liite 5. Tulostaulukko	51

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön aiheena on bakteeriviljelyn ja nukleiinihappo-osoituksen vertailu B-ryhmän streptokokin osoittamisessa. B-ryhmän streptokokin eli GBS-bakteerin kantajuus on yleistä ja se voi tarttua synnytyksen aikana äidistä vauvaan. Vastasyntyneellä B-ryhmän streptokokki voi aiheuttaa vakavia infektoita, jotka pahimmassa tapauksessa johtavat lapsen vammautumiseen tai jopa kuolemaan. (Uotila & Lyytikäinen 2012, 3768; THL 2014.)

Toimeksiantajana on Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian toimintayksikkö. Mikrobiologian laboratoriossa tehdään tartuntatautien toteamiseen ja hoitoon liittyviä tutkimuksia. Kyseessä on keskussairaalasoinen laboratorio, jossa työskentelee noin 20 henkilöä. Yksikkö tarjoaa palveluita keskussairaalan lisäksi myös Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin alueella toimiville terveystieteille. Vuosittain mikrobiologian laboratoriossa tutkitaan noin 100 000 näytettä. (Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri 2014.)

Tällä hetkellä yksikössä käytetään B-ryhmän streptokokin tunnistamiseen bakteeriviljelyä. Menetelmänä viljely on luotettava, mutta päivystystapauksissa, riskiraskauksissa ja ennen aikaisten synnytysten yhteydessä se on liian hidas. Mikrobiologian toimintayksikkö onkin ottamassa käyttöön uuden PCR -tekniikkaan eli polymeerasiketjureaktioon pohjautuvan testimenetelmän B-streptokokin osoittamiseen. Kyseessä on Cepheidin GeneXpert -analysointilaitteella suoritettava nukleiinihappotesti, jolla pystytään helposti ja nopeasti osoittamaan äidin mahdollinen B-streptokokkikantajuus.

Valitsimme aiheen, sillä se on ajankohtainen ja mielestämme hyvin mielenkiintoinen. Tietoisuus vastasyntyneen B-streptokokki-infektion aiheuttamista seurauksista on lisääntynyt ja toimintatapoja on alettu yhtenäistää. Syksyllä 2013 julkaistun äitiysneuvolaoppaan asiantuntijaryhmä suosittelee, että Suomessa tulisi seuloa kaikilta raskaana olevilta B-ryhmän streptokokki loppuraskauden aikana. (Hakulinen-Viitanen & Klemetti 2013, 124–125).

Tulevaisuuden suuntauksena mikrobiologian laboratorioissa on tutkimusten automatisoitavuus ja siirtyminen käsityöpainotteisesta työstä uusiin tekniikoihin. Testivalikoiman laajetessa päivystysaikainen mikrobiologinen diagnostiikka lisääntyy, tehokkuus

paranee ja kliinikot saavat nopeammin vastauksia hoitopäätösten tueksi. Opinnäytetyön aihe on sidoksissa mikrobiologian erikoisalalla käynnissä olevaan murrokseen ja myös siinä mielessä merkittävä.

Opinnäytetyössä kerrotaan, mikä on B-ryhmän streptokokki, mitä se aiheuttaa, ja mitä menetelmiä voidaan käyttää sen diagnosoimiseksi. Lisäksi kerrotaan, kuinka vastasyntyneen B-streptokokki-infektiota voidaan ehkäistä ja mitkä ovat diagnostiikan tulevaisuudennäkymät. Tarkoituksena on selvittää potilasnäytteiden avulla, ovatko bakteeriviljelyn ja uuden PCR -menetelmän tulokset yhteneviä. Tulosten avulla voidaan päätellä, soveltuuko uusi PCR -testi käytettäväksi B-streptokokin osoittamiseen kiireellisissä tilanteissa.

2 B-RYHMÄN STREPTOKOKKI

2.1 Streptokokkien luokittelu

Streptokokit ovat saaneet nimensä siitä, että ne ovat ketjuissa (strepto) kasvavia ja muodoltaan pyöreitä kokkibakteereita. Streptokokit jaetaan hemolyysin perusteella alfa-, beeta- ja nonhemolyyttisiin (eli gammahemolyyttisiin) kantoihin (kuva 1). Viljeltäessä bakteeria verimaljalla, beetahemolyysi saa aikaan punasolujen täydellisen hajoamisen. Tällöin pesäkkeen ympärille muodostuu kirkas, väritön ja läpikuultava alue. Alfahemolyysissä punasolut hajoavat vain osittain, jolloin kasvualusta muuttuu harmaaksi tai vihertäväksi. Nonhemolyyttiset kannat eivät hajota punasoluja lainkaan eivätkä siten muuta kasvualustan väriä. Hemolyysi voi kuitenkin vaihdella bakteerikannasta toiseen, joten se yksistään ei ole riittävä peruste lajin tunnistamiseen. (Mentula 1998, 5-6.)



KUVA 1. Hemolyysin eri muodot: alfa- (α), beeta- (β) ja gammahemolyysi (γ). (ASM MicrobeLibrary 2014, muokattu)

Beetahemolyyttiset streptokokit luokitellaan soluseinän polysakkaridien antigeenirakenteiden perusteella Lancefieldin ryhmiin. Ihmisestä eristetyt streptokokit kuuluvat useimmiten ryhmiin A, B, C, D, F tai G. Ryhmitystä varten on saatavilla kaupallisia pika-agglutinaatiotestejä, jotka perustuvat antigeenien ja niille spesifisten vasta-aineiden sitoutumiseen toisiinsa. Mikäli beetahemolyyttisestä bakteeripesäkkeestä otetusta näyt-

teestä saadaan Lancefieldin ryhmityksessä tulos B, on kyseessä *Streptococcus agalactiae*. (Mentula 1998, 6; Spellerberg & Brandt 2011, 339.)

2.2 B-ryhmän streptokokin ominaisuudet ja virulenssitekijät

B-ryhmän streptokokki (Group B Streptococcus, GBS, *Streptococcus agalactiae*) on ihmisen normaaliflooraan kuuluva bakteeri ja sen oireeton kantajuus on yleistä. Aikuisilla GBS-bakteeria esiintyy tautia aiheuttamatta ruoansulatuskanavassa, emättimessä, virtsarakossa, nielussa tai iholla. Raskaana olevista naisista 10–30 % on B-ryhmän streptokokin oireettomia kantajia, jolloin maha-suolikanava, vagina tai molemmat ovat kolonisoituneet GBS-bakteerilla. B-ryhmän streptokokki tarttuu kosketuksen välityksellä. Mikäli äiti on GBS-kantaja, voi lapsi saada tartunnan synnytyksen yhteydessä. (Lyytikäinen ym. 2002, 4913; THL 2014.)

Ominaisuuksiltaan B-ryhmän streptokokki on beetahemolyyttinen, grampositiivisesti värjäytyvä bakteeri, jonka soluseinä koostuu pääosin polysakkarideista. Polysakkaridiseinän ulkopuolella on taudinaiheuttamiskyvylle merkittävä polysakkaridikapseli. Kapselin rakenteen perusteella GBS-bakteerikannat voidaan jakaa eri antigeenityyppeihin. Lisäksi bakteerista voidaan tunnistaa erilaisia pintaproteiineja, joiden avulla kantoja voidaan tyypittää vielä edelleen. Tyypitys antaa mahdollisuuden kantojen vertailuun ja on avuksi esimerkiksi B-streptokokki -rokotteen kehittämisessä. (Saxén & Vuopio-Varkila 2011, 110; Madzivhandila ym. 2011, 1.)

B-ryhmän streptokokilla on useita virulenssitekijöitä, joiden avulla se pystyy aiheuttamaan infektion isäntäorganismilleen. Soluseinän ulkopuolella olevan polysakkaridikapselin avulla bakteeri pystyy kiinnittymään ympäristöönsä. Lisäksi kapseli suojaa bakteeria tehokkaasti elimistön puolustusmekanismeilta kuten fagosytoosilta ja komplementitekijöiltä sekä muilta ympäristön haittavaikutuksilta. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2011, 30.) B-ryhmän streptokokki tuottaa useita toksiineja, jotka muodostavat reikiä kohdesolun pintaan. Toksiinien vaikutuksesta isäntäsolu vapauttaa sisältöään ja solu kuolee. Eräs toksiineista on *Streptococcus agalactiae* – bakteerin *cfb* – geenin koodaama pinta-proteiini, CAMP-faktori, joka pystyy aiheuttamaan hemolyysiä yhdessä tiettyjen muiden bakteerien kanssa. Eräs merkittävä virulenssitekijä on myös se, että B-streptokokki voi muuttaa geeniekspressiotaan eli geenien tuottamien proteiinien koodaamista. Näin

se pystyy sopeutumaan ulkoisen ympäristönsä muutoksiin kuten happikonsentraation tai lämpötilan vaihteluihin. Virulenssitekijöidensä avulla bakteeri pystyy selviytymään kohde-elimistössään ja levittäytymään systemaattisesti ympäri kehoa. (Rajagopal 2009, 3, 15; Chuzeville ym. 2012, 1; Udo, Boswihi & Al-Sweih 2013, 454.)

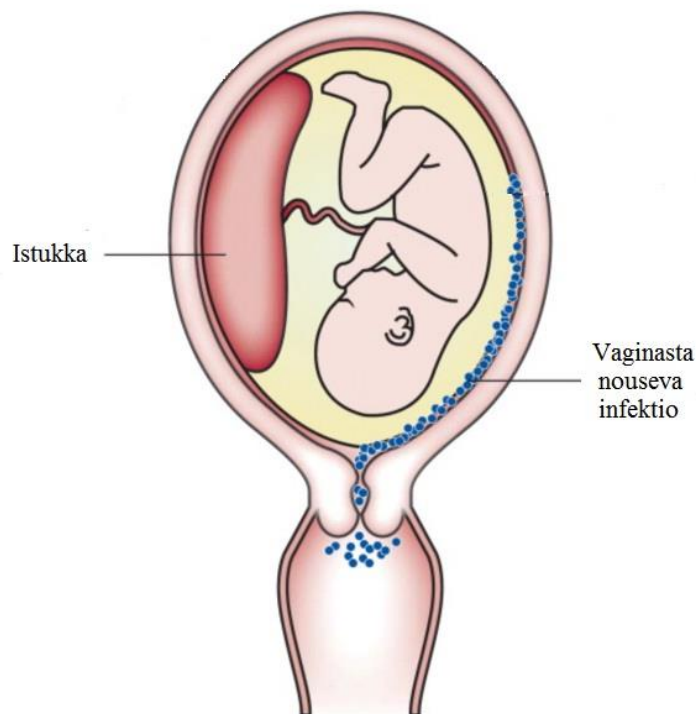
2.3 Vastasyntyneen GBS-tauti

B-streptokokki voi aiheuttaa monenlaisia infektioita, kuten esimerkiksi virtsatieinfektioita, iho- ja pehmytkudosinfektioita, sepsistä, niveltulehdusta, keuhkokuumetta sekä aivokalvontulehdusta. Aikuisilla vakavan infektion taustalla on yleensä jokin perussairaus, kuten diabetes, syöpä, maksasairaus tai HIV-infektio. GBS-bakteeri voi aiheuttaa vakavan infektion myös vanhuksille, raskaana oleville sekä juuri synnyttäneille naisille. Erityisen merkittävä B-streptokokki on kuitenkin vastasyntyneiden vakavien infektioiden aiheuttajana. (Saxén & Vuopio-Varkila 2011, 110–111; Uotila & Lyytikäinen 2012, 3768.)

Keskimäärin yksi sadasta GBS-kantajaäidin vastasyntyneestä vauvasta saa oireisen infektion. Heistä suurin osa sairastuu ensimmäisen elinvuorokautensa aikana. Vastasyntyneellä GBS-taudin oireita ovat mm. uneliaisuus, käsittelyarkuus, kellastuminen, lämmön nousu tai alilämpö. Vauva saattaa myös syödä huonosti. Vastasyntyneen sairastuvuutta voidaan tehokkaasti ehkäistä tai ainakin vähentää mikrobilääkeprofylaksin eli ennalta ehkäisevän lääkehoidon avulla. Lääkitys annetaan synnytyksen aikana suonensisäisesti äideille, joilla B-streptokokkikantajuus on todettu. Mikrobilääkeprofylaksi tulisi aloittaa viimeistään neljän tunnin kuluessa synnytyksen käynnistymisestä. Profylaksin on todettu olevan erittäin tehokas sen kestäessä vähintään neljä tuntia. Myös lyhyempi profylaksi (2-4 tuntia) voi antaa tyydyttävän suojan infektiota vastaan. (Uotila & Lyytikäinen 2012, 3769; Di Renzo ym. 2014, 14; THL 2014.)

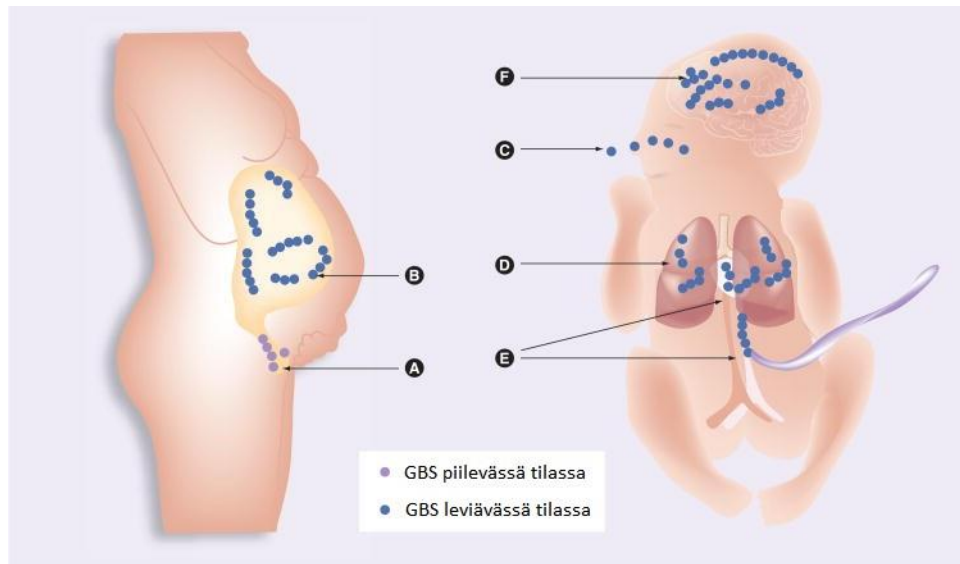
Vastasyntyneiden GBS-infektiot jaetaan kahteen muotoon. Varhaisinfektio (early onset) aiheuttaa sepsistä, keuhkokuumetta ja aivokalvontulehdusta ensimmäisen elinviikon aikana. Tartunta voi tapahtua joko kohdussa bakteerin siirtyessä istukan läpi tai synnytyksen aikana vaginaaritteen joutuessa lapsen hengitysteihin (kuva 2). Käytännössä kaikki varhaisinfektioon sairastuneet lapset ovat saaneet tartunnan äitinsä synnytyskanavasta, jossa bakteerin kolonisaatio on yleensä oireeton ja äidin kannalta vaaraton.

Riskitekijöitä varhaisinfektion saamiselle ovat esimerkiksi keskosuus, ennenaikainen lapsivedenmeno ja äidin runsas B-streptokokkikolonisaatio emättimessä. Myöhäisinfektiota (late onset) esiintyy 7-90 vuorokauden ikäisillä lapsilla ja se aiheuttaa yleisimmin aivokalvontulehdusta tai sepsistä. Myöhäisinfektion tarkkaa tartuntalähdettä ei vielä tunneta, mutta ilmeisesti lapsi saattaa saada tartunnan esimerkiksi sairaalaympäristöstä. Lapsella saattaa olla myös synnynnäinen infektio, joka alkaa oireilla vasta ensimmäisen elinviikon jälkeen. (Maisey, Doran & Nizet 2008, 1; Saxén & Vuopio-Varkila 2011, 110; Spellerberg & Brandt 2011, 334; Lanotte & Seme 2012; Uotila & Lyytikäinen 2012, 3768.)



KUVA 2. Varhaisinfektion tartuntareitti (Rimawi 2014)

Kuvasta 3 nähdään GBS bakteerin kulku vastasyntyneen patogeeninä. GBS kolonisoit naisten genitaalialueita sekä suoliston alaosa (A). Bakteri pystyy tunkeutumaan oireettomien raskaana olevien naisten kohdun sisälle (B). Vastasyntynyt hengittää bakteeria synnytyksen aikana (C). GBS tunkeutuu vastasyntyneen keuhkoihin aiheuttaen keuhko-kuumeen (D). Keuhkoista GBS etenee verenkiertoon aiheuttaen verenmyrkytyksen ja jatkaa kulkuaan useisiin elimiin kuten esimerkiksi sydämeen (E). GBS pystyy myös läpäisemään veri-aivoesteen aiheuttaen vastasyntyneen aivokalvontulehduksen (F). (Rajagopal 2009, 26.)



KUVA 3. GBS-bakteerin kulku vastasyntyneen patogeeninä (Rajagopal 2009, 26, muokattu)

Vastasyntyneen GBS-infektio voidaan todeta viljelemällä bakteeri verestä, virtsasta, aivo-selkäydinnesteestä tai muusta yleensä steriilistä näytteestä. Mikäli vastasyntyneellä epäillään olevan GBS-infektio, aloitetaan hoito välittömästi ennen bakteeriviljelytuloksen valmistumista. Infektiota hoidetaan penisilliinillä tai ampisilliinilla. Infektio vaatii usein laskimonsisäisesti annettavaa antibioottia sekä sairaalahoitoa. Tehokkaasta hoidosta huolimatta vastasyntyneen tauti saattaa olla vaikeaoireinen ja siihen liittyy vammautumisen riski. Vaikea GBS-infektio voi aiheuttaa vauvalle esimerkiksi kuulon tai näön heikkenemistä tai kehityshäiriöitä. B-ryhmän streptokokki on maailmanlaajuisesti merkittävin vastasyntyneiden infektiokuolleisuuden aiheuttaja. Keskimäärin 4-7 % GBS-infektion saaneista vastasyntyneistä menehtyy taudin oireisiin. (Uotila & Lyytikäinen 2012, 3768; THL 2014.)

3 MENETELMÄT GBS-KANTAJUUDEN TUNNISTAMISEKSI

3.1 Seulontamallit

Seulonta on osa ehkäisevää terveydenhuoltoa, ja seulonnoilla voidaan etsiä tauteja, joiden varmistamiseen tarvittavat tutkimukset ja hoidot ovat terveydenhuollossa saatavilla. Raskauden ajan seulontatutkimuksien tarkoituksena on etsiä sairauksia, jotka uhkaavat äidin, sikiön tai vastasyntyneen terveyttä. (Hovi ym. 2007, 26; Hakulinen-Viitanen & Klemetti 2013, 113.)

GBS-kantajuuden tunnistamiseen on kolme eri seulontamenetelmää. Riskin arviointiin perustuvassa seulontamallissa raskaana olevaa naista voidaan epäillä GBS-kantajaksi aiemman synnytyshistorian tai synnytyksen aikana todettujen oireiden perusteella. Toinen vaihtoehto on myöhäisraskauden (viikot 35–37) GBS-seulonta bakteeriviljelyllä kaikille raskaana oleville. Kolmas vaihtoehto on GBS-seulonta synnytyksen alkaessa DNA-menetelmään perustuvalla pikatestillä. (Hovi ym. 2007, 28.)

Riskin arviointiin perustuvassa seulontamallissa äidin kantajuuden todennäköisyys arvioidaan äidin aikaisemman historian tai kliinisten oireiden perusteella. Jos aikaisemmalla lapsella on todettu vastasyntyneenä GBS-tauti tai jos nykyisen raskauden aikana virtsassa on todettu B-ryhmän streptokokkeja, pidetään äitiä todennäköisenä GBS-kantajana. Tällöin hänelle tarjotaan mikrobilääkitystä synnytyksen aikana. Vastasyntyneiden B-streptokokkitaudeista noin 40 % esiintyy riskiryhmissä, eli ennenaikaisesti syntyvillä lapsilla (ennen raskausviikkoa 37 syntyvät) tai lapsilla, joiden synnytyksen yhteydessä kalvojen puhkeaminen on tapahtunut yli 18 tuntia ennen synnytystä. Tunnettu riskitekijä on myös synnytyksen aikainen kuume. Kaikissa näissä tapauksissa äidille tarjotaan synnytyksen aikaista mikrobilääkeprofylaksia, joka estää bakteerin tarttumista syntyvään lapseen. (Hovi ym. 2007, 28; Uotila & Lyytikäinen 2012, 3769.)

Myöhäisraskauden bakteeriviljelyn kohderyhmänä ovat odottavat äidit 35–37 raskausviikolla. Vaginan alaosasta ja rectumin suulta otetusta näytteestä tehdään maljaviljely, jota kasvatetaan yön yli mahdollisen GBS-bakteerin havaitsemiseksi. Mikäli bakteeri osoitetaan kasvustosta seuraavana päivänä laboratorion käyttämällä standardimenetelmällä, ilmoitetaan positiivinen tulos välittömästi neuvolaan. Mikäli elatusmaljoilla ei ole

GBS-bakteeriksi sopivia pesäkkeitä, negatiivinen viljelylöydös varmistetaan viljelemällä näytettä vielä yhden vuorokauden ajan. (Hovi ym. 2007, 30.)

Kolmas vaihtoehto seulontaan on pikatesti, jolla voidaan todeta GBS-kantajuus synnytyksen alkaessa tai lapsiveden mentyä. Tämän vaihtoehdon edellytyksenä on, että pikatestit ovat sensitiivisyydeltään eli herkkyydeltään ja spesifisyydeltään eli tarkkuudeltaan viljelyn tasoisia. Lisäksi tulokset täytyy saada riittävän nopeasti, jotta kantajille voidaan antaa mikrobilääkitys synnytyksen aikana. Näytteenotto tapahtuu kuten bakteeriviljelyä varten. Testimenetelmän on myös sovelluttava laboratorion rutiinikäyttöön, tai oltava toteutettavissa synnytyssalissa, jossa kätilö suorittaa pikatestin. Testimenetelmän tulee olla käytettävissä ja tulosten tulee olla saatavilla vuorokauden ympäri ja kaikkina viikon päivinä. (Hovi ym. 2007, 30.) Mikäli menetelmä on yksinkertainen ja helppo suorittaa myös osastolla, on se selvä etu, sillä kaikissa synnytyssairaaloissa ei ole esimerkiksi yöaikaan laboratoriota käytettävissä (Vahla 2008).

3.2 Seulontakäytännöt Suomessa

Suomessa on viime vuosiin saakka puuttunut yhtenäinen valtakunnallinen suositus yleisestä B-streptokokkiseulonnasta. Vuonna 2006 annettiin asiantuntijaryhmän suositus, jossa todettiin, että GBS-infektion ehkäisemiseksi voidaan käyttää kahta strategiaa: raskeana olevien naisten GBS-seulontaa tai riskisynnytysten tunnistamista. Suositus sisälsi myös ohjeet mikrobiologisista menetelmistä, joilla GBS-kantajaäidit voidaan tunnistaa. Vuonna 2009 sosiaali- ja terveysministeriön kansallinen seulontatyöryhmä puolsi seulonnan aloittamista. Saadakseen tietoa Suomessa käytetyistä diagnostiikkamenetelmistä, Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (THL) toteutti mikrobiologian laboratorioden kanssa kyselyn, jossa vertailtiin kahta eri viljelymenetelmää. Kysely osoitti, että seulontakäytännöt Suomessa ovat epäyhtenäiset. (Uotila & Lyytikäinen 2012, 3770–3771; Kauppila ym. 2013, 96–98.)

Osa sairaanhoitopiireistä ja yksittäiset kunnat ovat oma-aloitteisesti aloittaneet seulonnan alueellaan. Helmikuussa 2012 tehdyn kyselyn mukaan suurin osa sairaanhoitopiirien gynekologian ylilääkäreistä tai synnytystoiminnasta vastaavista ylilääkäreistä kannatti B-streptokokin seulontaviljelyä. Strategiaa pidettiin selkeänä ja tehokkaana. Myös mm. Yhdysvalloissa, Australiassa ja suurimmassa osassa Euroopan maista käytetään

yleistä B-streptokokkin seulontaviljelyä. Britanniassa, Alankomaissa ja Ruotsissa puolestaan kehoitetaan antamaan mikrobilääkeprofylaksi riskiryhmiin kuuluville. (Uotila & Lyytikäinen 2012, 3770–3771; Kauppila ym. 2013, 96–98.)

Syksyllä 2013 julkaistun äitiysneuvolaoppaan asiantuntijaryhmä suosittelee, että Suomessa tulisi tällä hetkellä seuloa kaikilta raskaana olevilta B-streptokokki emättimen ulkosuulta ja peräaukosta. Seulonta tulisi tehdä raskausviikoilla 35+0 - 36+6. Raskausaikaista antibioottihoitoa B-ryhmän streptokokkin häätämiseksi ei suositella. Vastasyntyneen infektio pyritään estämään antamalla mikrobilääkeprofylaksi synnytyksen käynnistettyä äideille, joiden B-streptokokkikantajuus on todettu. (Hakulinen-Viitanen & Klemetti 2013, 124–125.)

3.3 Tutkimuksia seulontaohjelmien vaikutuksista

Finohta ja Kansanterveyslaitos (nykyisin THL) ovat vuonna 2007 tutkineet varhaisen GBS-taudin ehkäisyyn soveltuvien vaihtoehtoisten seulontaohjelmien vaikutuksia ja kustannuksia Suomessa. Tuolloin ehkäiseviä toimia ei vielä ollut käytössä ja haluttiin vertailla kolmea eri seulontamallia: riskisynnytysten tunnistamista, myöhäisraskauden GBS-seulontaa sekä GBS-seulontaa synnytyksen alkaessa. Vaikuttavuutena otettiin huomioon, kuinka monta vaikeaa tautia, vammaa tai kuolemaa seulontaohjelmat pystyvät estämään ja kustannuksia tarkasteltiin terveydenhuollon näkökulmasta. Raportin mukaan kaikki seulontaohjelmat vähensivät sairastuvien lasten määrää sekä vammoja ja kuolemia. Vaikuttavuudeltaan paras oli myöhäisraskauden seulonta. Synnytyksen aikainen seulonta oli lähes yhtä vaikuttava. Riskitekijälähtöinen seulontamalli oli kustannuksiltaan edullisin, mutta samalla heikkotehoisin. (Hovi ym. 2007, 4-5; Lyytikäinen & Uotila 2012, 3770.)

Yhdysvalloissa on tehty laaja tutkimus, joka kattoi kaikki bostonilaisessa sairaalassa vuosina 1997–2003 syntyneet lapset. Tutkimuksen mukaan vastasyntyneiden varhaisten B-streptokokki-infektioiden määrä on dramaattisesti laskenut sen jälkeen, kun GBS-tautia on alettu ehkäisemään ja hallitsemaan seulontojen avulla. Tutkimustuloksissa korostui se, että valtaosa varhaisista B-streptokokki-infektioista todettiin lapsilla, joiden äidit olivat saaneet seulonnassa negatiivisen tuloksen. Tämän vuoksi naisten, joilla on merkkejä ja oireita sikiökalvotulehduksesta, tulisi saada ripeästi synnytyksen aikainen

antibioottihoito riippumatta seulonnasta saadusta tuloksesta. Tutkimuksen mukaan tehokkain tapa GBS-taudin ehkäisyyn on nopea ja tarkka seulonta juuri ennen synnytystä. (Puopolo, Madoff & Eichenwald 2005, 1240–1245.)

Australiassa 2002 suoritetun tutkimuksen mukaan seulonta vähentää merkittävästi vastasyntyneiden B-streptokokki-infektioita verrattuna riskipohjaiseen kartoitukseen. Tulosten perusteella suositellaan seulontaa 34–37 raskausviikolla. (Angstetra, Ferguson & Giles 2007, 378.) Yhdysvalloissa uusimmat CDC:n (Centers for Disease Control and Prevention) ohjeet suosittavat käyttämään seulonnassa sensitiivisiä PCR-menetelmiä. Menetelmän tulee olla myös spesifinen sekä riittävän nopea. (Ahmadzia, Heine & Brown 2013, 42.)

Kesäkuussa 2013 Italiassa kokoontui 16 asiantuntijaa eri maista arvioimaan toimintatapoja ja uusia tekniikoita GBS-taudin ehkäisyssä. Tarkoituksena oli kehittää yhteisiä käytäntöjä Euroopan maihin. Asiantuntijaryhmän laatimassa artikkelissa suositellaan synnytyksen aikaista mikrobilääkeprofylaksia, joka perustuu synnytyksen alkaessa PCR-testillä suoritettavaan GBS-seulontaan. Mikäli PCR-testiä ei ole käytettävissä, tulee seulonta tehdä loppuraskaudessa bakteeriviljelyn avulla. Asiantuntijaryhmän mukaan käytettävän PCR-testin tulee olla riittävän sensitiivinen ja spesifinen. Prosessin tulisi olla täysin automatisoitu sekä riittävän helppokäyttöinen myös muun kuin laboratoriohenkilökunnan käyttöön. Testiaika ei saisi ylittää tuntia ja testin tulisi olla saatavilla ympäri vuorokauden. (Di Renzo ym. 2014, 10–11.)

3.4 GBS-seulonnan haasteet ja tulevaisuudennäkymät

GBS-seulontatutkimuksiin liittyy joitakin erityispiirteitä. Ensinnäkin seulontaohjelmat eivät sisällä jatkotutkimuksia, vaan mikrobilääkitys aloitetaan kantajuuden toteamisen tai riskiryhmään kuulumisen perusteella. Toisaalta GBS-seulonnassa hoito, eli suonensisäinen mikrobilääkitys, tähtää vastasyntyneen sairastumisriskin pienemiseen, eikä niinkään kliinisen taudin hoitoon. Kantajien tai riskiryhmään kuuluvien äitien vastasyntyneistä vain pieni osa sairastuisi, ja täten mikrobilääkkeen saajien määrä on huomattavasti suurempi, kuin niiden raskaana olevien määrä, joiden vastasyntyneet todellisuudessa sairastuisivat GBS-tautiin. Lääkitykselle altistuvat sekä raskaana oleva että sikiö, joille molemmille mikrobilääkitys voi aiheuttaa haittavaikutuksia. (Hovi ym. 2007, 26.)

Lisääntyvä mikrobilääkkeiden käyttö huolestuttaa lääkäreitä ja toisaalta pohditaan, uh-rataanko Suomessa esiintyvyydeltään matalan taudin ehkäisyyn liikaa voimavaroja suh-teessa siitä saatavaan hyötyyn (Lyytikäinen & Uotila 2012, 3771). PCR-testit ovat no-peita, joten niiden avulla mikrobilääkitys voidaan kohdentaa todetuille GBS-kantajille ja välttää turhien antibioottien käyttöä. On mahdollista, että altistus antibioottihoidoille aiheuttaa sikiöille ja vastasyntyneille myöhemmällä iällä esimerkiksi allergiaa, astmaa ja ylipainoa. (Poncelet-Jasserand ym. 2013, 1107.)

Suunnitelmallisella antibioottien käytöllä voidaan myös vähentää bakteerien resistenssiä mikrobilääkkeitä kohtaan. Tällä hetkellä profylaksissa suositetaan beetalaktaameja kuten penisilliinejä niiden kapeakirjoisuuden vuoksi. Vaikka *Streptococcus agalactiae* on vie-lä tällä hetkellä herkkä beetalaktaameille, sen resistenssi esimerkiksi klindamysiinille ja erytromysiinille on viime vuosina lisääntynyt, mikä voi vaikeuttaa penisilliiniallergisille äideille annettavaa antibioottiprofylaksia. Tämän vuoksi lääkkeen oikea valinta, sen kohdentaminen sitä tarvitsevalle ja annostuksen optimointi on erityisen tärkeää. (Pon-celet-Jasserand ym. 2013, 1107; Di Renzo ym. 2014, 13.)

Vaikka PCR-testi on nopea suorittaa synnytyksen käynnistyttyä, voi ongelmaksi muo-dostua se, että synnytyksen kesto on liian lyhyt riittävälle antibioottihoidolle (Speller-berg & Brandt 2011, 336). On myös pohdittu odottavien äitien reaktioita, kun laajempaa informaatiota GBS-taudista aletaan jakaa: tuleeko mahdollisesti paineita selektiivisiin sektioihin tai halutaanko lähteä aikaisemmin synnyttämään, jolloin kantajuuden varmis-taminen ja lääkityksen aloittaminen pystytään tekemään ajoissa (Vahla 2008).

Tulevaisuudessa PCR-pohjaiset seulontamenetelmät synnytyksen yhteydessä tulevat todennäköisesti kehittymään ja samalla niiden hinta laskee. Kehitys viime vuosina on ollut huimaa. Vuonna 2006 GBS-osoitus PCR:n avulla kesti 18 tuntia, kun nykyään vastauksen saa alle tunnissa. Useat tutkimukset osoittavat synnytyksen aikaisen B-streptokokkiseulonnan olevan parempi menetelmä kuin myöhäisraskaudessa tehdyn viljelyn, joten nukleiinihappo-osoitustesteistä saattaa tulla vallitseva seulonnan mene-telmä. Joissakin Suomen sairaaloissa PCR-menetelmä GBS:n tutkimiseksi on jo käytös-sä. PCR-pohjaisille osoitus- tai seulontatesteille olisi käyttöä ainakin ennaikaisten synnytysten yhteydessä, vaikka suurin osa täysiaikaisista synnytyksistä seulottaisiin yleisellä viljelyllä. (Uotila & Lyytikäinen 2012, 3772; Poncelet-Jasserand 2013, 1106.)

B-streptokokkia vastaan on myös kehitteillä rokote. Rokotteen avulla olisi mahdollista ehkäistä paitsi vastasyntyneen varhaisinfektio, myös myöhäisinfektio, johon seulonnan ja mikrobilääkeprofylaksin avulla ei voida vaikuttaa. Rokote vähentäisi myös GBS-tautiin liittyviä keskenmenoja, kohtukuolemia ja odottavien äitien infektoita. Mikäli väestön rokottaminen onnistuisi, tulisi B-streptokokkibakteerin seulonta ja synnytyksen aikainen mikrobilääkeprofylaksi tarpeettomiksi. (Uotila & Lyytikäinen 2012, 3772; Di Renzo ym. 2014, 9.)

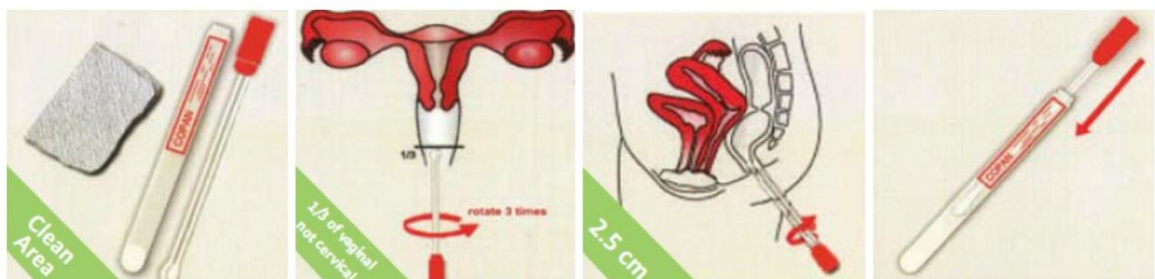
4 NÄYTTEENOTTO B-STREPTOKOKIN OSOITUSTA VARTEN

Näyte B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin osoitusta varten tulee ottaa joko yhdellä tai kahdella bakteerinäytteenottoon tarkoitettulla tikulla. Mikäli näyte otetaan GeneXpert -analysointilaitteella tehtävää GBS PCR -testiä varten, tulee näyte ottaa aina erityisellä kaksoisnäytteenottotikulla (kuva 4). Toinen tikusta käytetään GBS PCR -testiin ja toinen viljelyyn. Näyte tulee ottaa ennen sisätutkimusta, sillä mahdollisesti käytettävät geelit, vaseliini tai antiseptiset aineet voivat häiritä tutkimuksen suoritusta. Näytteenotossa ei tule käyttää tähystintä. Näytteenottoalue tulee puhdistaa huolellisesti limasta ja muista eritteistä, koska ne saattavat häiritä erityisesti PCR-testin onnistumista. (Hovi ym. 2007, 29; Uotila & Lyytikäinen 2012, 3769; Saha 2014.)



KUVA 4. Kaksoisnäytteenottotikku (Copan 2012)

Näyte otetaan ensin vaginan alaosaan pyörittäen tikkaa kolme kertaa vaginan seinämien ympäri, jotta näyte tarttuu tikkuun tasaisesti. Tämän jälkeen näyte otetaan samalla tikulla rectumista 2,5 cm syvyydestä tikkaa varovasti pyörittäen. Mikäli näyte otetaan kaksoisnäytteenottotikulla, otetaan näytteet aina molempia tikkuja yhtä aikaa käyttäen, ensin vaginasta ja sitten rectumista. Näytteenoton jälkeen tikku laitetaan kuljetusputkeen (kuva 5). Jos tikussa näkyy näytteenoton jälkeen veristä eritettä tai limaa, ne voi pyyhkiä kevyesti steriilillä harsotaitoksella. Näyte toimitetaan laboratorioon mahdollisimman nopeasti. Tarvittaessa näytettä voidaan säilyttää lyhytaikaisesti jääkaappilämpötilassa ennen testausta. (Hovi ym. 2007, 29; Uotila & Lyytikäinen 2012, 3769; Saha 2014.)



KUVA 5. Näytteenottovälineet ja -tekniikka (Cepheid 2014)

Kohdunkaulan, rectumin ympäristön, peräsuolen tai välilihan sivelynäytteet eivät käy näytteeksi. On todettu, että kohdunkaulasta otetuista näytteistä saadaan 40 % vähemmän viljelypositiivisia tuloksia kuin vaginasta otetuista näytteistä. Lisäksi tutkimusten mukaan näytteenotto sekä vaginasta että rectumista yhdessä tuottaa merkittävästi korkeamman määrän viljelyllä osoitettuja GBS-kolonisaatioita. GBS-kantajuuden löytymisen herkkyys paranee 40 %, jos viljelynäytteet otetaan vaginan lisäksi myös rectumin suulta. Oikea näytteenotto on kriittinen tekijä seulontadiagnostiikan herkkyyden kannalta. Se ei oleellisesti vaikuta diagnostiikan kustannuksiin, joten laboratorioden tulisi päivittää näytteenotto-ohjeistuksensa suositusten mukaisiksi. (Ahmadzia, Heine & Brown 2013, 42; Kauppila ym. 2013, 98.)

5 VERTAILTAVAT TESTIMENETELMÄT

5.1 B-ryhmän streptokokin osoittaminen bakteeriviljelyn avulla

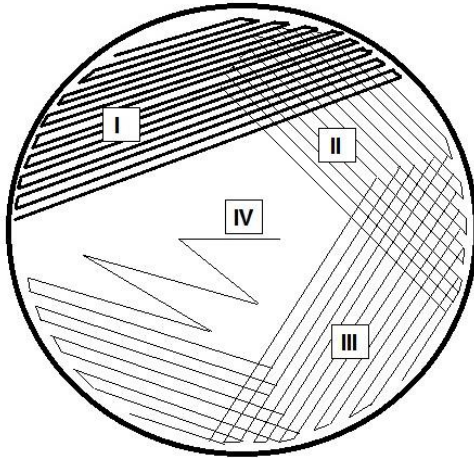
Mikrobiologian laboratorioissa bakteeriviljelyä käytetään perusmenetelmänä bakteerien tunnistukseen. Viljelyn etuja ovat tarvittavien välineiden edullisuus ja viljelymenetelmän yksinkertaisuus. Viljeltyjen bakteerikantojen ominaisuuksia on helppo tarkastella käyttäen erilaisia tunnistustestejä. Myös mikrobilääkeherkkyys voidaan määrittellä viljellyistä bakteerikannoista. Bakteeriviljelmien käsittely sekä luotettava tulkinta vaatii kokenutta ja erikoiskoulutettua henkilöstöä. (Carlson & Koskela 2011, 40.)

Bakteereita voidaan viljellä joko kiinteillä maljoilla tai nestemäisissä elatusaineissa, kuten veriviljelypulloissa. B-ryhmän beetahemolyyttistä bakteeria tutkittaessa näyte viljellään pyöreälle muoviselle maljalle, joka sisältää kiinteää elatusainetta. Elatusaineessa on bakteereille välttämättömiä ravintoaineita sekä agaria, joka hydyttää elatusaineen kiinteään muotoon. (Hellstén 2005, 95; Carlson & Koskela 2011, 41.)

Streptokokit vaativat runsaasti erilaisia kasvutekijöitä lisääntyäkseen viljelymaljalla. Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian laboratoriossa B-streptokokin viljelyyn käytetään nielumaljaa. Siinä on Blood Agar Base -elatusainepohja, joka verellä rikastettuna pystyy kasvattamaan vaativiakin bakteereita. Verenä käytetään yleensä lampaan verta, koska sen avulla voidaan tarkastella luotettavasti bakteerien mahdollisesti aikaansaamaa hemolyysiä eli punasolujen hajoamista. Hemolyysi tai sen puuttuminen bakteeripesäkkeen ympärillä helpottaa bakteerien lajitunnistusta. Blood Agar Base sisältää agarin lisäksi tryptonia, soijapeptonia, hiivauutetta ja natriumkloridia. Lisäaineena käytetään streptokokkeja suosivaa kolistiini-oksoliinihappoa. Bakteeriviljelyssä käytettävät nielumaljat valmistetaan laboratorioissa erillisen työohjeen mukaan. (Saha 2010.)

Bakteerinäytteiden viljelyssä käytetään primaariviljelyä eli hajotusmenetelmää, jonka avulla bakteerikannat saadaan erotettua toisistaan (kuva 6). Kaikki lähtömateriaalissa olevat bakteerit saadaan siis kasvamaan samalla elatusainemaljalla yksittäisinä pesäkkeinä. Alkuperäistä näytettä levitetään ensin vain pienelle osalle elatusainemaljaa (I) bakteerikuljetusputkessa olevalla näytteenottotikulla. Tämän jälkeen näytettä levitetään asteittain koko maljan pinnalle (II-IV) steriiliä viljelysauvaa apuna käyttäen. Viimeiselle

hajotusalueelle tulee näin ollen vain murto-osa näytteen bakteereista. (Carlson & Koskela 2011, 41.)



KUVA 6. Primaariviljelytekniikka

Yksi lisääntymiskykyinen bakteeri jakaantuu yön yli kasvatuksessa miljooniksi jälkeläiksi. Koska bakteerit eivät pysty liikkumaan kiinteällä alustalla vapaasti, niistä muodostuu pesäkkeitä, jotka voidaan havaita silmin. Jokainen pesäke on lähtöisin yhdestä ainoasta bakteerisolusta. Eri bakteerit muodostavat maljalle erinäköisiä pesäkkeitä, jolloin ne voidaan erottaa toisistaan. (Hellstén 2005, 95; Carlson & Koskela 2011, 41.)

Viljeltyä nielumaljaa kasvatetaan vuorokauden ajan +35 °C lämpötilassa hiilidioksidilämpökaapissa, jonka jälkeen maljalta etsitään beatahemolyyttisiä tai nonhemolyyttisiä pesäkkeitä. Mikäli bakteeriviljelmältä löytyy epäiltyjä pesäkkeitä, niistä tehdään streptokokkityypitys latexagglutinaatio-menetelmällä. Menetelmä perustuu bakteerin pinnalla olevien antigeenirakenteiden ja niille spesifisten vasta-aineiden sitoutumiseen toisiinsa. Latex-partikkeleihin kiinnitetyt vasta-aineet reagoivat bakteerin antigeenirakenteiden kanssa muodostaen pahviselle testikortille sakan, joka on havaittavissa paljain silmin. (Hellstén 2005, 96; Saarinen 2013; Saha 2014.)

Beatahemolyyttisistä pesäkkeistä testataan Streptokokki A- ja B-ryhmät ja nonhemolyyttisistä pesäkkeistä ainoastaan Streptokokki B-ryhmä. Beatahemolyysi voi olla *Streptococcus agalactiae* -kannoilla erittäin niukka tai puuttua kokonaan. Sen vuoksi kaikille tyypillisille, suhteellisen kookkaille ja harmaille streptokokkimaisille pesäkkeille tulisi tehdä jatkotutkimukset. (Saarinen 2013.)

Laboratorioilla on raskaana olevien GBS-seulonnan bakteeriviljelyä varten oma tutkimuspyyntö *Streptococcus agalactiae* (B), viljely (FI-StrBVi). Vaginasta ja rectumista otettu näyte toimitetaan laboratorioon mahdollisimman nopeasti. Näytettä tulee säilyttää jääkaappilämpötilassa, mikäli sitä ei voida heti toimittaa tutkittavaksi. Liian lämpimässä säilytetty näyte voi aiheuttaa väärän negatiivisen viljelytuloksen. B-streptokokkiviljely voi antaa väärän negatiivisen tuloksen myös silloin, jos näyte on otettu potilaalta antimikrobilääkehoidon aikana. (Hovi ym. 2007, 29; Saarinen 2013; Saha 2014.)

5.2 B-ryhmän streptokokin nukleiinihappo-osoitus

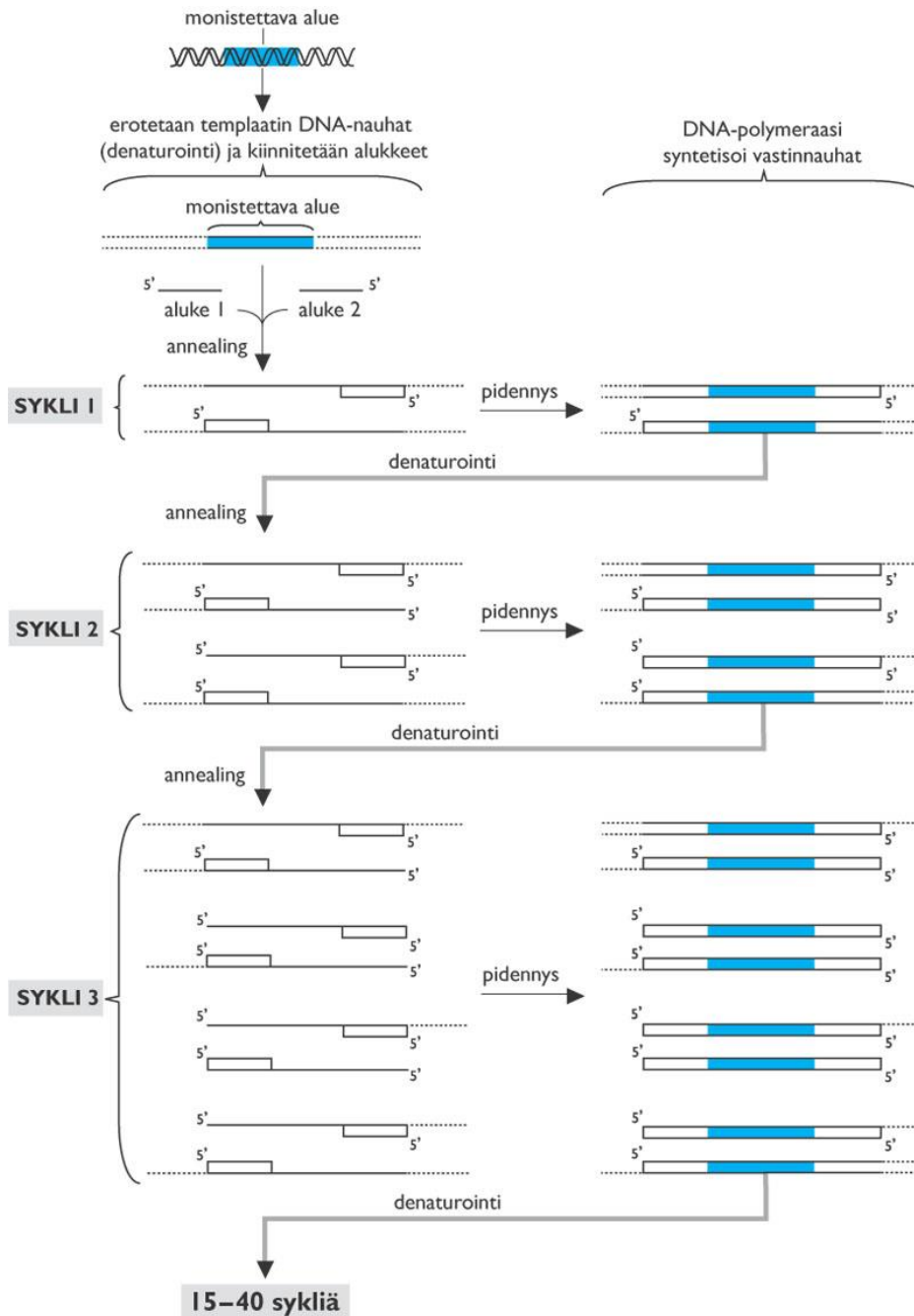
5.2.1 PCR:n periaate

PCR eli polymeerasiketjureaktio (polymerase chain reaction) on yksinkertainen kemiallinen reaktio, jota voidaan käyttää DNA:n kopiointiin. Sillä pystytään monistamaan DNA-jaksoja, jotka sijaitsevat kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. PCR:n perusajatuksena on käyttää korkeaa lämpötilaa kestävää, kuumien lähteiden bakteereista eristettyä DNA-polymeerasia, joka mahdollistaa DNA:n eksponentiaalisen monistamisen. (Suominen ym. 2010, 153; Nolte & Caliendo 2011, 29.)

PCR:n periaate esitetään kuvassa 7. PCR:ssä tarvitaan kaksi erilaista, tarkalleen tunnettua aluketta (englanniksi primer). Ne suunnitellaan siten, että ne kiinnittyvät kaksinauhaisen DNA:n eri juosteisiin, monistettavan DNA-alueen vastakkaisiin päihin. Alukkeiden välissä oleva DNA-jakso on se, jota halutaan monistaa. Templaattina eli monistusreaktion kohteena toimii yleensä kaksijuosteinen DNA. Jotta alukkeet voivat sitoutua templaattiin, on se ensin denaturoitava noin 95 °C kuumennuskäsittelyllä. Tällöin juosteet irtoavat toisistaan. Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan hetkellisesti niin, että alukkeet pystyvät kiinnittymään templaattiin. Tätä kutsutaan annealing-vaiheeksi. Koska alukkeet ovat pienikokoisia, ne kykenevät tämän vaiheen aikana kiinnittymään vastinjuosteeseen, mutta templaatti itse ei ehdi ainakaan täysin renaturoitumaan eli sitoutumaan takaisin kaksijuosteiseksi tämän lyhyen ajan kuluessa. (Suominen ym. 2010, 154.)

Alukkeiden kiinnittyttyä nostetaan jälleen lämpötilaa noin 72 °C:een. Lämpötila on DNA-polymeeraasin toiminnalle optimaalinen, joten se alkaa liittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja alukseen 3' – päästä lähtien noudattaen templaatin mallia. Tätä vai-

hetta kutsutaan pidennysreaktioksi (ekstensio, englanniksi extension). Templaatin kummallekin nauhalle syntyy vastinnauhat. Kun synteesi on valmis, nostetaan lämpötila jälleen noin 95 °C:een, jolloin kaikki nauhat irtoavat toisistaan. Toisiaan seuraavia vaiheita denaturointi-annealing-pidennys kutsutaan sykliksi. Kun syklejä toistetaan useita peräkkäin (yleensä noin 15–40 kertaa), saadaan alun perin hyvin pienestä määrästä templaatti-DNA:ta eksponentiaalisesti monistettua tarkalleen määrätyn pituisia DNA-jaksoja. (Suominen ym. 2010, 154–156.)



KUVA 7. PCR:n periaate (Suominen ym. 2010, 157)

Reaaliaikaisessa PCR:ssä (englanniksi real-time PCR) voidaan syntyvän tuotteen määrää seurata reaaliaikaisesti reaktion edetessä. Seuranta perustuu fluoresoivan merkkiaineen käyttöön. Kun väriaine sitoutuu valmistuvaan kaksinauhaiseen PCR-tuotteeseen, sen fluoresenssisignaali moninkertaistuu. Reaaliaikainen PCR nopeuttaa PCR-prosessia ja pienentää ristikontaminaatoriskiä, koska lopputuotetta ei tarvitse monistamisen jälkeen käsitellä ja mitata laboratoriossa. Laitteet ovat kuitenkin kalliimpia kuin perinteisen PCR:n laitteet. (Suominen ym. 2010, 166–167; Nolte & Caliendo 2011, 31, 34.)

Saatu PCR-tuote on yleensä puhdistettava, mutta on myös sovelluksia, joissa PCR-tuotetta ei puhdisteta lainkaan. Esimerkiksi kliinisessä diagnostiikassa on PCR-tuote pystyttävä käyttämään ilman puhdistusta. PCR-reaktioiden oikeat tulokset varmistetaan kontrollireaktioiden avulla. Diagnostisissa sovelluksissa tehdään negatiivinen kontrolli, jolla selvitetään mahdolliset epäspesifiset eli väärät positiiviset tulokset. Diagnostiikassa tulee kiinnittää erityistä huomiota myös kontaminaatioihin. PCR:ää sovelletaan sairauksien in vitro -diagnostiikassa. Esimerkiksi infektiosairauksia voidaan todeta PCR:n menetelmän herkkyuden ansiosta erittäin pienestä näytemäärästä. Alukkeet suunnitellaan tällöin siten, että ne tunnistavat vain tietystä taudinaiheuttajamikrobista peräisin olevan, sille ominaisen DNA-alueen. (Suominen ym. 2010, 154–156, 165, 176.)

5.2.2 Cepheid GeneXpert GBS

Cepheidin GeneXpert GBS on kvalitatiivinen in vitro -diagnostiikkaan käytettävä PCR-testi B-ryhmän streptokokin osoittamiseen vagina ja/tai rectum-näytteistä. PCR-reaktion aikana alukkeet ja koetin tunnistavat *Streptococcus agalactiae* -bakteerille spesifisen *cfb*-geenin 3' -pään vieressä olevan DNA-alueen. Testissä hyödynnetään automatisoitua reaaliaikaista PCR-reaktiota ja detektio perustuu monistuvan DNA:n fluoresointiin. Menetelmässä näytteen hajoaminen, nukleiinihappojen puhdistus ja monistus, sekä kohdesekvenssin detektio on automatisoitu ja yhdistetty. Järjestelmä koostuu laitteesta, tietokoneesta ja ohjelmistosta. Lisäksi tarvitaan jokaista näytettä varten reagenssit sisältävä testikasetti, jonka sisällä PCR-prosessi tapahtuu. Näytekasetteihin laitetut näytteet ajetaan laitteella ja ohjelmisto tekee tulkinnan tuloksista. (Cepheid 2011; Kimura ym. 2013, 547.)

Sisäiset kontrollit SPC (sample processing control), IC (internal control) ja probe check eli koettimen testaus tapahtuvat jokaisen näytteen yhteydessä. SPC varmistaa, että näyte on prosessoitu oikein. IC varmistaa, ettei näytteessä ole PCR:ää inhiboivia tekijöitä ja tarkistaa reagenssien toimivuuden. Probe Check:n avulla mitataan koettimien fluoresenssisignaali ennen PCR-reaktion alkua ja näin varmistetaan koettimien toimivuus. (Cepheid 2011; Saha 2013.)

Kun näytteen sisältävä testikasetti on asetettu laitteen reaktiokammioon, laite eluoi eli uuttaa näytteen tikusta, sekoittaa näyttereagenssin SPC:n ja käsittelyreagenssin kanssa, kiinnittää solumateriaalin suodattimeen, hajottaa solut ja uuttaa DNA:n. Tämän jälkeen DNA-liuos sekoitetaan kuivien PCR-reagenssien kanssa ja siirretään integroituun reaktioputkeen reaaliaikaista PCR-prosessia ja detektiota varten. Fluoresenssisignaalit mitataan ja tulokset lasketaan sisäisten algoritmien avulla. Tulokset ovat tämän jälkeen nähtävissä laitteeseen kytketyn tietokoneen näytöltä. Koko testiprosessi kestää enintään noin 50 minuuttia. (Cepheid 2011.)

6 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET

GBS-diagnostiikkaan liittyviä vertailevia tutkimuksia on tehty jonkin verran. Esimerkiksi El Helalin ym. vuonna 2009 tekemässä tutkimuksessa verrataan GBS-viljelyä ja Cepheidin GeneXpert GBS-nukleiinihappo-osoitusta. Tutkimuksen kohderyhmä koostui ranskalaisessa sairaalassa synnyttäneistä naisista. Heiltä otettiin synnytyksen aikainen näyte, josta tehtiin sekä viljely että PCR-testi. PCR-testin tulokset saatiin 863 naiselta, ja niiden perusteella testin herkkyys on 98,5 %, tarkkuus 99,6 %, positiivinen ennustearvo 97,8 % ja negatiivinen ennustearvo 99,7 %. Ennen synnytystä tapahtuneen viljelyn positiivinen ennustearvo synnytyksen hetkisen kolonisaation osoittamisessa oli alhainen (58,3 %) ja negatiivinen ennustearvo puutteellinen (92,1 %). (El Helali ym. 2009, 417.)

El Helalin ym. (2009) tutkimuksen tulokset osoittavat, että PCR-testi on hyvin herkkä ja tarkka testi synnytyksen aikaisen GBS-kantajuuden tunnistamiseen. Sen käyttö mahdollistaa niiden synnyttäjien tunnistamisen, jotka tarvitsevat synnytyksen aikaisen mikrobiolääkeprofylaksin, mukaan lukien ennenaikaiset synnyttäjät ja synnyttäjät, joilta lapsivesi on mennyt ennenaikaisesti. Testi todettiin myös helppokäyttöiseksi, nopeaksi suorittaa, ja päivystysaikaiseen käyttöön soveltuvaksi. Aikaisempien PCR-testien kohdalla rajoitteena on ollut se, että ne vaativat käyttäjältä erikoisosaamista ja erityisiä laboratoriovälineitä. Nämä rajoitteet eivät koske GeneXpert -testiä. Tämän vuoksi GeneXpert -testin käyttö synnytyksen aikana voisi vähentää GBS-infektioiden määrää. (El Helali ym. 2009, 417.)

Myös brasilialainen tutkijaryhmä (de-Paris ym. 2011) on saanut omassa tutkimuksessaan vastaavia tuloksia. Tosin tässä tutkimuksessa PCR-testi suoritettiin toisen kaupallisen valmistajan, Qiagenin menetelmää käyttäen. Myös tässä tutkimuksessa PCR-menetelmän herkkyys (100 %) ja tarkkuus (86,88 %) olivat korkeat ja se todettiin nopeaksi ja käyttökelpoiseksi menetelmäksi GBS-seulontaan ja hoidon oikeaan kohdentamiseen vastasyntyneiden infektioiden vähentämiseksi. (de-Paris ym. 2011, 323.)

Suomessa GeneXpert GBS -menetelmää on testattu Turun yliopistollisessa keskussairaalassa. Vuonna 2010 toteutettiin testikokeilu 141 näytteellä. GeneXpert GBS -testin sensitiivisyydeksi saatiin 94 % ja spesifisyydeksi 98 %. Myöhemmin, vuodenvaihteessa

2012 – 2013 tehtiin uusi testikokeilu 37 näytteellä kättilöiden suorittamana. Myös tästä saatiin hyviä tuloksia ja synnytyssalissa alettiin valmistella oman laitteen hankintaa. Toukokuusta 2013 lähtien GeneXpert GBS -testaus on ollut mahdollista Turun yliopistollisen keskussairaalan synnytyssalissa. (Rantakokko-Jalava 2013a, 2013b.)

Vuonna 2013 julkaistussa ranskalaistutkimuksessa selvitettiin GeneXpert PCR -testin merkitystä tarpeettomien antibioottihoitojen vähentämisessä. Tutkimuksen mukaan synnytyksen aikaisen PCR-testin käyttö vähensi merkittävästi turhien antibioottihoitojen määrää. Vertailukohteenä oli viikoilla 34–38 suoritettu bakteeriviljely. Lisäksi tutkimuksessa pohdittiin PCR-testin aiheuttamia lisäkustannuksia suhteutettuna sen tuomaan kliiniseen hyötyyn. Ensinnäkin hoitotyöhön kuluva aika vähenee ja mikrobilääkkeiden kulutus pienenee. On myös odotettavissa, että PCR-testien käytön myötä sairastuneiden vauvojen määrä ja heidän hoitoonsa kuluvat kustannukset vähenevät. Vähentyminen johtuu siitä, että loppuraskauden viljelytulos voi antaa negatiivisen, mutta PCR-testi positiivisen tuloksen synnytyksen aikana. PCR-testin avulla äidille osataan aloittaa antibioottiprofylaksi ajoissa. (Poncelet-Jasserand ym. 2013, 1098, 1106–1107.)

7 TUTKIMUKSEN TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT

Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian toimintayksikölle työelämässä hyödynnettävää tietoa arvioimalla Cepheidin GeneXpert GBS -testin toimivuutta B-ryhmän streptokokin osoittamisessa. Tarkoituksena on verrata kahdesta eri tutkimusmenetelmästä eli tällä hetkellä käytössä olevasta bakteeriviljelystä ja uudesta PCR-menetelmästä saatuja GBS-tuloksia keskenään.

Opinnäytetyön tutkimusongelmat ovat seuraavat:

- Ovatko bakteeriviljelyn ja PCR-menetelmän tulokset yhteneväiset?
- Voidaanko PCR-menetelmää käyttää B-streptokokin osoittamiseen?

Tällä hetkellä kliinisen mikrobiologian toimintayksikössä käytetään bakteeriviljelyä B-ryhmän streptokokin osoittamiseen. Tämä menetelmä on kuitenkin hidas kiireellisissä tilanteissa kuten riskiraskauksissa, ennenaikaisissa synnytyksissä ja muissa päivystystilanteissa, joten mikrobiologian laboratorio haluaa selvittää, voidaanko PCR-menetelmää käyttämällä luotettavasti todeta GBS-positiivisuus. Mikäli opinnäytetyöstä saatavat tulokset osoittavat PCR-menetelmän toimivuuden viljelyyn verrattuna, laboratorio pystyisi jatkossa PCR-menetelmää käyttämällä nopeammin toteamaan B-ryhmän streptokokin kantajuuden. Tämä nopeuttaisi mahdollisten kantajien hoitoa antimikrobilääkkeellä ja siten ehkäisisi tartuntoja vastasyntyneisiin.

8 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Opinnäytetyössä käytetään kvantitatiivista tutkimusmenetelmää. Hirsjärven, Remeksen ja Sajavaaran (2009, 140) mukaan kvantitatiivisessa tutkimuksessa on keskeistä aieman teorian ja tutkimusten perusteella tehdyt johtopäätökset, sekä aineiston keruu ja sen saattaminen tilastollisesti käsiteltävään muotoon. Opinnäytetyössä verrataan kahta eri menetelmää keskenään, joten tutkimuksessa voidaan käyttää kvantitatiivisen tutkimuksen erästä tutkimustyyppiä, vertailevaa tutkimusta. Vertailevan tutkimuksen avulla voidaan ymmärtää paremmin tarkasteltavaa asiaa kahden tai useamman tutkimuskohteen avulla sekä tuoda selkeämmin esille asioiden välisiä eroja (Vilkkä 2007, 21).

Opinnäytetyöhön sisältyy myös kokeellinen osuus. Heikkilän (2008, 21) mukaan kokeellisessa tutkimuksessa oleellista on, että siinä pyritään tutkimaan vain tutkittavan muuttujan vaikutusta vakioimalla kaikki muut tekijät. Tietystä populaatiosta valitaan näyte, jota analysoidaan erilaisten koejärjestelyjen avulla systemaattisesti ja kontrolloidusti (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 134).

Opinnäytetyössä tutkitaan GeneXpert GBS -menetelmän toimivuutta B-ryhmän streptokokin osoittamisessa bakteeriviljelyyn verrattuna. Ennen testimenetelmän käyttöönottoa laboratoriossa tulee tehdä menetelmän validointi. Validointi tarkoittaa menetelmän kelppoisuuden osoittamista. Validoinnin avulla menetelmä testataan ja osoitetaan sen olevan pätevä suunnitelluissa käyttöolosuhteissa. Olennaista validoinnissa on sekä menetelmän suorituskyvyn arviointi, että sen soveltuvuus tarkoitettuun mittaukseen. Eräs usein käytetty menetelmä validoinnissa on kahden mittausmenetelmän vertailu ja yhteneväisten tulosten osoitus. Yleensä uuden menetelmän tuloksia verrataan edelliseen, laboratoriossa jo käytössä olevaan menetelmään. Validoinnin tuloksena syntyvä tieto dokumentoidaan. Mahdollisesti olemassa oleva muu tieto tai tausta-aineisto kootaan yhteen validoinnin tulosten kanssa ja niiden perusteella todetaan menetelmän luotettavuus. (Liimatainen 2002, 12; Jaarinen & Niiranen 2008, 11; Hiltunen ym. 2011, 24, 27.)

Mikrobiologian erikoisalalla validoinnin käytännön toteuttamiselle ei ole olemassa yleisesti hyväksytyjä suosituksia. Tutkittavien näytteiden minimilukumäärää ei ole yleisesti määritetty. Esimerkiksi kliinisessä mikrobiologiassa positiivisia näytteitä saattaa olla niukasti eikä niitä kerry tutkimusaineistoon riittävästi. Toisaalta omassa laboratoriossa

voidaan tyytyä suppeampaan validointiin, mikäli käyttöön otettavalle menetelmälle on jo olemassa luotettava puolueeton validointi. Jotta menetelmän toimivuus omassa laboratoriossa ja näyttemateriaalissa saadaan selville, on jonkinlainen validointi kuitenkin tehtävä. Uuden testin validointi on tehtävä omassa työyksikössä niiden henkilöiden toimesta, jotka testiä jatkossa tulevat käyttämään. (Ikäheimo 2002, 12; Liimatainen 2002, 13.)

Testin sensitiivisyys eli herkkyys voidaan lyhyesti määrittellä positiivisen testituloksen saaneiden sairaiden osuudeksi kaikista sairaista. Se kuvaa siis testin kykyä määrittää sairautta. Testin spesifisyys eli tarkkuus voidaan määrittellä negatiivisen testituloksen saaneiden terveiden osuudeksi kaikista terveistä. Se kuvaa testin kykyä määrittää terveyttä. Käytännön työssä diagnostisia testejä käytetään ennustearvojen perusteella. Ennustearvojen avulla kuvataan sitä, millä todennäköisyydellä positiivinen tai negatiivinen tulos on oikea. (Ikäheimo 2002, 13; Kairisto 2010, 41–43; Uhari & Nieminen 2012, 47.)

Sensitiivisyyden ja spesifisyyden sekä positiivisen ja negatiivisen ennustearvon laskentaan voidaan käyttää nelikenttätaulukkoa (taulukko 1), johon saadut testitulokset sijoitetaan.

TAULUKKO 1. Nelikenttätaulukko (Kairisto 2010; Uhari & Nieminen 2012, muokattu)

	Testin antamat positiiviset tulokset	Testin antamat negatiiviset tulokset	
Sairaat	Oikea positiivinen a	Väärä negatiivinen b	a+b
Terveet	Väärä positiivinen c	Oikea negatiivinen d	c+d
	a+c	b+d	

Testitulosten ja yllä olevan nelikenttätaulukon avulla voidaan taulukossa 2 olevia kaavoja käyttäen edelleen määrittää kliinisessä päätöksenteossa käytettävät tunnusluvut. Niiden avulla kliinisessä työssä voidaan arvioida saadun testituloksen luotettavuutta ja ennustearvoa. (Uhari & Nieminen 2012, 47–48.)

TAULUKKO 2. Kaavat sensitiivisyydelle, spesifisyydelle ja ennustearvoille (Uhari & Nieminen 2012, muokattu)

Sensitiivisyys =	$a / (a+b)$
Spesifisyys =	$d / (c+d)$
Positiivinen ennustearvo =	$a / (a+c)$
Negatiivinen ennustearvo =	$d / (b+d)$

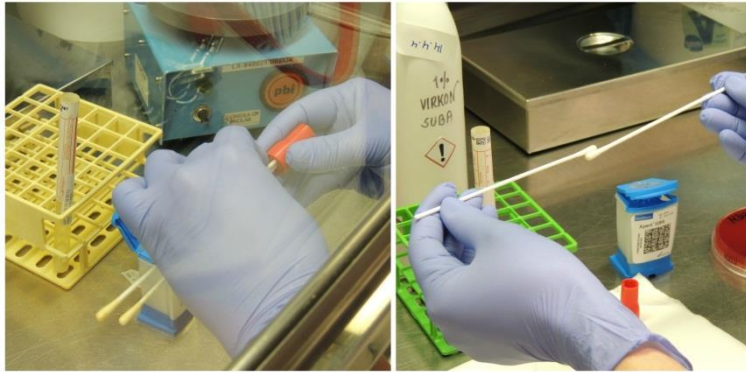
9 TUTKIMUKSEN KOKEELLISEN OSION TOTEUTUS

9.1 Näyttemateriaali ja sen käsittely

Opinnäytetyön kokeellinen osio suoritettiin Seinäjoen keskussairaalan klinisen mikrobiologian toimintayksikössä. Tutkimusaineisto koostui Fl-StrBVi -tutkimuspyynnöllä saapuneista potilasnäytteistä, joista suoritettiin sekä viljely että PCR-testi B-ryhmän streptokokin toteamiseksi. Näytteistä 30 kpl saapui aikavälillä 7.4.–31.5.2014. Lisäksi tutkimukseen otettiin mukaan 8.2.–28.2.2013 aiempaa testikokeilua varten kerätyt 10 näytettä. Näin otos saatiin suuremmaksi, kokonaismäärä oli yhteensä 40 näytettä. Näytteitä kerättiin synnytysosalissa ja äitiyspoliklinikalla pääosin lääkäreiden toimesta. Synnytysosalissa myös kätilöt osallistuivat näytteenottoon. Näytteiden keräystä varten oli laadittu kirjallinen ja kuvallinen näytteenotto-ohje (liite 1). Laboratorion henkilökunta analysoi näytteet heti niiden saavuttua yksikköön anonyymisti näytenumeroita käyttäen. Sekä viljelyn että PCR-testin tulokset kirjattiin tutkimusta varten suunnitellulle testilomakkeelle (liite 2).

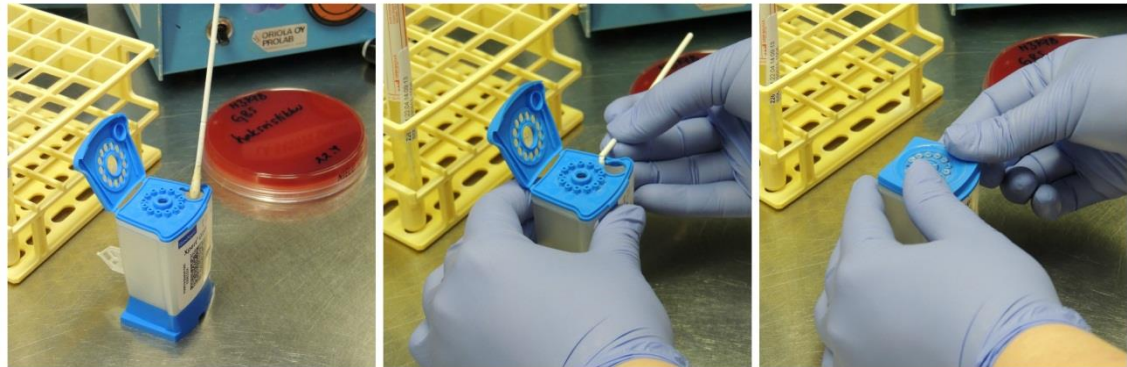
9.2 Testin suoritus

Näytteiden käsittely B-ryhmän streptokokin toteamiseksi viljelyllä ja PCR-menetelmällä tehtiin vetokaapissa kontaminaatioiden välttämiseksi. Ensin kaksoistikkunäytteestä tehtiin PCR-testikasetin valmistelu. Kaksoisnäytteenottotikku poistettiin bakteerinkuljetusputkesta ja molemmat tikut irrotettiin punaisesta pidikkeestä. Tikkuja hangattiin pyörittävin liikkein kevyesti toisiaan vasten näyttemateriaalin mahdollisimman tasaisen jakaantumisen varmistamiseksi (kuva 8). Toinen tikkuista jätettiin kuljetusputkeen viljelyä varten.



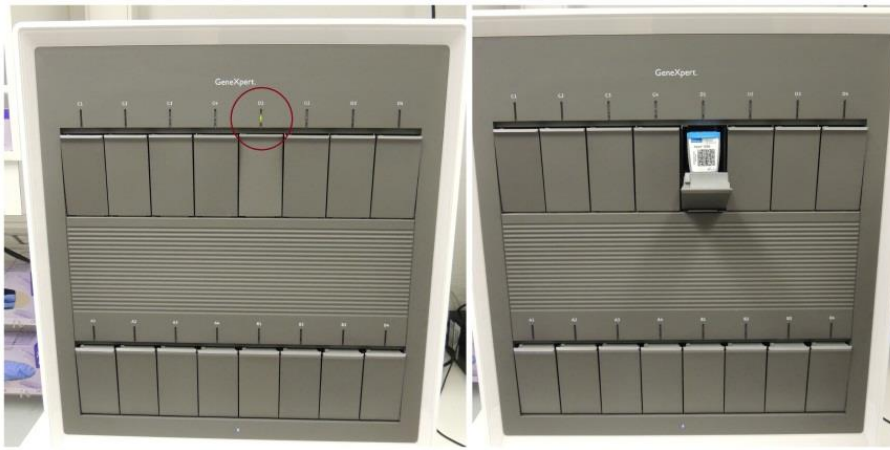
KUVA 8. Kaksoistikun käsittely (Kuva: Martinmäki & Palomäki 2014)

Testikasetin kansi avattiin ja toinen näytteenottotikuista asetettiin testikasetissa olevaan aukkoon. Tämän jälkeen tikku katkaistiin testikasettiin tikussa olevan katkaisukohtan avulla. Lopuksi testikasetin kansi suljettiin (kuva 9).



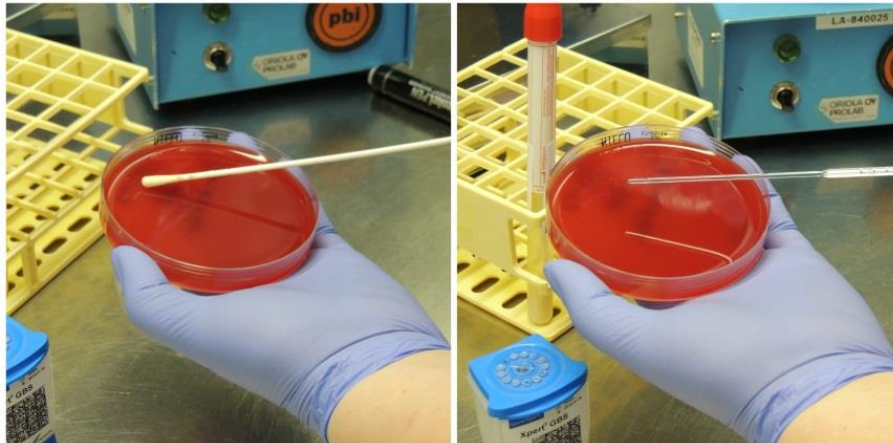
KUVA 9. Testikasetin käsittely (Kuva: Martinmäki & Palomäki 2014)

Analysaattoriin liitetystä tietokoneelta avattiin GeneXpert -ohjelma ja valittiin ”Create Test” (luo testi). Tämän jälkeen näyttekasetin tiedot luettiin viivakoodinlukijan avulla. Sample ID -kohtaan laitettiin näyttenumero, jonka jälkeen painettiin ”Start” (aloita). Laite osoitti vilkkuvan vihreän valon avulla, mihin reaktiokammioon testikasetti tuli asettaa (kuva 10). Testikasetti asetettiin reaktiokammion pöydälle ja reaktiokammion ovi työnnettiin yhdellä painalluksella kunnolla kiinni. Tämän jälkeen näytteen prosessointi alkoi ja ohjelma ilmoitti jäljellä olevan testiajan tietokoneen näytöllä. Kun määrittäminen oli valmis, näytepaikan luukku avautui. Tulokset saatiin näkyviin tietokoneen näytölle painamalla ”View results” (näytä tulokset) ja sitten ”View test” (näytä testi), jolloin näytölle avautui luettelo testatuista näytteistä. Valitsemalla oikean tuloksen kohta ja painamalla ”Ok”, tulokset avautuivat näytölle ja olivat myös tulostettavissa. (Saha 2013.)



KUVA 10. GeneXpert analysaattorin reaktiokammiot (Kuva: Martinmäki & Palomäki 2014)

Kaksoisnäytteenottotikun toisella tikulla suoritettiin hajotusviljely nielumaljalle. Näyte levitettiin näytetikulla maljan yläosaan pienehkölle alueelle ja hajotussauvaa apuna käyttäen asteittain koko maljan pinnalle (kuva 6; kuva 11). Näytteet kasvatettiin hiilidioksidilämpökaapissa +35 °C yhden vuorokauden ajan, jonka jälkeen maljalta etsittiin beetahemolyttisiä tai nonhemolyttisiä pesäkkeitä.



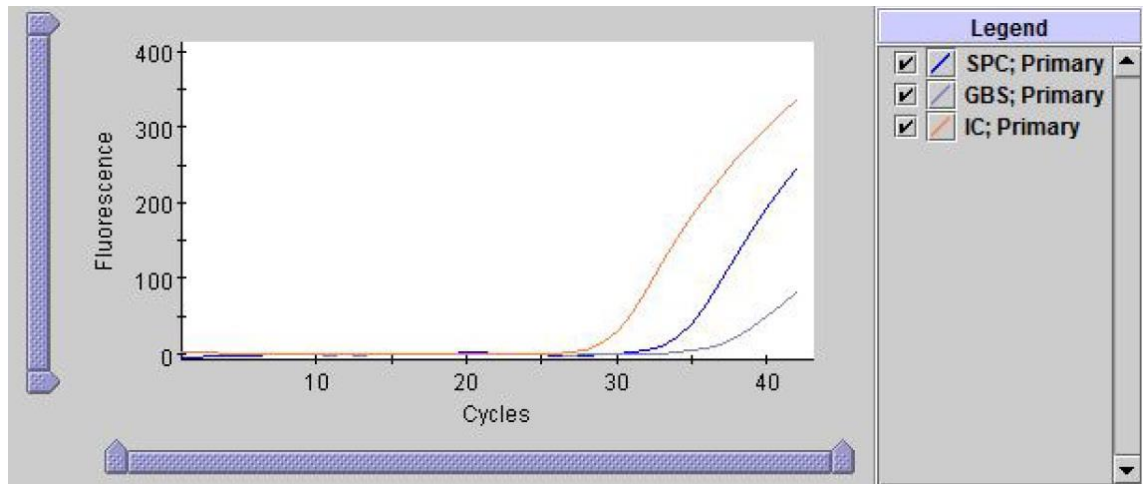
KUVA 11. Bakteerin viljely ja hajotus (Kuva: Martinmäki & Palomäki 2014)

9.3 Tulosten tulkinta

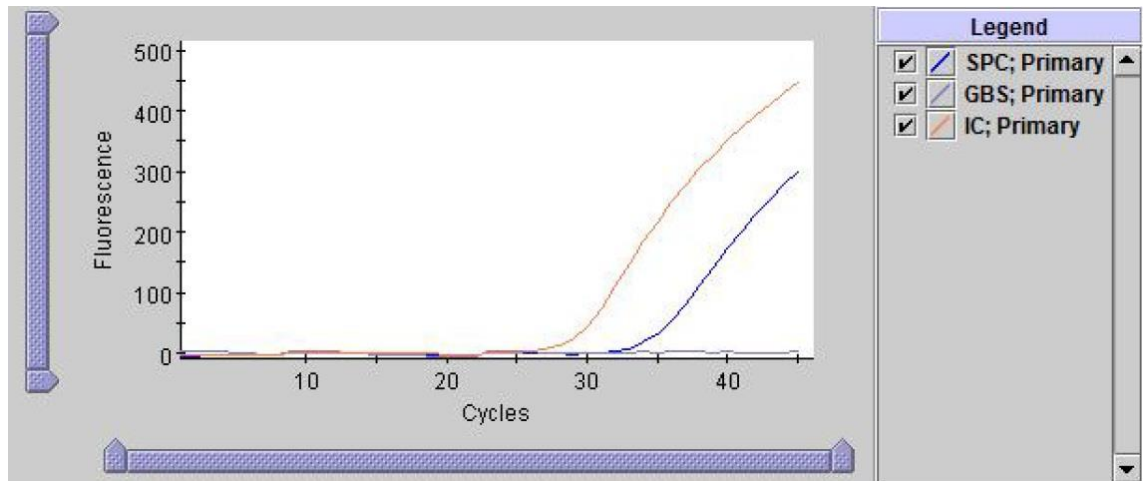
GeneXpert GBS -testin valmistuttua testistä tulostui testiraportti, jossa näkyi positiivinen tai negatiivinen tulos (liitteet 3 ja 4). Testiraportista tarkistettiin myös sisäiset kontrollit SPC (Sample Processing Control) ja IC (Internal Control) sekä Probe Check. Näillä kontroleilla varmistettiin näytteen oikea prosessointi, reagenssien ja koettimien toi-

mivuus sekä suljettiin pois inhiboivien tekijöiden mahdollisuus. Mikäli testitulos oli negatiivinen tuli tarkistaa, että SPC sekä IC ovat positiiviset. Testituloksen ollessa positiivinen voivat SPC ja IC arvot olla myös negatiiviset. (Cepheid 2011; Saha 2013.)

Testiraportin lisäksi ohjelmasta voitiin tulostaa erillinen graafinen raportti, jonka avulla voitiin visuaalisesti nähdä PCR:n kulku monistussykliä osoittavien käyrien avulla (kuvat 12 ja 13).



KUVA 12. GeneXpert – ohjelman antama graafinen raportti positiivisesta tuloksesta



KUVA 13. GeneXpert – ohjelman antama graafinen raportti negatiivisesta tuloksesta

Mikäli viljelymaljalla oli kasvatuksen jälkeen havaittavissa epäiltyjä pesäkkeitä, tehtiin niistä streptokokkityypitys käyttäen latexagglutinaatiomenetelmää. Sen perusteella var-

mistui, oliko kyseessä B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki vai jonkin muun ryhmän streptokokki.

10 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän opinnäytetyön kokeellinen osio sisälsi 40 näytettä. Näytteistä yhdeksän oli *Streptococcus agalactiae* (B) -viljelyssä positiivisia ja 31 viljelynegatiivisia (liite 5). GeneXpert GBS -testin tulokset olivat yhteneväiset viljelytulosten kanssa eli myös niistä yhdeksän oli positiivisia ja 31 negatiivisia.

Maljaviljelyn ja GeneXpert GBS -testin tulokset koottiin tarkoitusta varten laaditulle testilomakkeelle (liite 2). Oikeana tuloksena määrytyksissä pidettiin maljaviljelystä saatua vastausta, johon GeneXpert GBS -testin tulosta verrattiin. Tulokset sijoitettiin Excel-taulukkoon (taulukko 3), jonka avulla laskettiin sensitiivisyys, spesifisyys, positiivinen ennustearvo ja negatiivinen ennustearvo (taulukko 4).

TAULUKKO 3. Tulokset nelikenttätaulukossa (Kairisto 2010; Uhari & Nieminen 2012, muokattu)

	GeneXpert positiiviset	GeneXpert negatiiviset	
Viljelypositiiviset	a 9	b 0	a+b
Viljelynegatiiviset	c 0	d 31	c+d
	a+c	b+d	

TAULUKKO 4. Sensitiivisyyden, spesifisyyden ja ennustearvojen laskenta (Uhari & Nieminen 2012, muokattu)

Sensitiivisyys =	$9 / (9+0) \times 100$	= 100 %
Spesifisyys =	$31 / (0+31) \times 100$	= 100 %
Positiivinen ennustearvo =	$9 / (9+0) \times 100$	= 100 %
Negatiivinen ennustearvo =	$31 / (0+31) \times 100$	= 100 %

Tulosten perusteella testin sensitiivisyys on 100 %. GeneXpert GBS -testi on tämän pienen otoksen perusteella herkkä osoittamaan GBS-positiiviset näytteet. Testi antaa siis luotettavasti positiivisen tuloksen äideillä, jotka ovat GBS-bakteerin kantajia. Myös spesifisyydeksi saatiin 100 %, joten testi on myös tarkkuudeltaan erinomainen. Näin ollen testi antaa negatiivisen tuloksen äideille, joilta otetuissa näytteissä GBS-bakteeria ei ole. Myös sekä positiivinen että negatiivinen ennustearvo oli 100 %. Tämä osoittaa todennäköisyyden sille, että positiivisen tuloksen saaneilla GBS-kolonisaatio on ja negatiivisen tuloksen saaneilta se puuttuu.

Tässä opinnäytetyössä pyrittiin saamaan vastaus seuraaviin tutkimusongelmiin: Ovatko bakteeriviljelyn ja PCR-menetelmän tulokset yhteneväiset ja voidaanko PCR-menetelmää käyttää B-streptokokin osoittamiseen? Tutkimuksessa saatiin B-ryhmän streptokokkien toteamisessa yhtenevät tulokset bakteeriviljelystä ja GeneXpert GBS -testistä. Saatujen tulosten perusteella GeneXpert GBS -menetelmää voidaan käyttää B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin osoittamisessa.

11 EETTISYYS JA LUOTETTAVUUS

Tutkimuksen eettisyydellä tarkoitetaan sitä, että tutkimuksen teossa noudatetaan hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkijan on otettava tutkimusta tehdessään huomioon monia eettisiä kysymyksiä, ja periaatteiden tunteminen sekä niiden mukaan toimiminen on tutkijan itsensä vastuulla. (Hirsjärvi ym. 2009, 23.) Opinnäytetyömme eettisyyteen vaikutti mm. potilasnäytteiden käsittely siten, ettei potilaita voitu tunnistaa tutkimuksen missään vaiheessa. Koska näytteiden keruu oli osa mikrobiologian toimintayksikön testivalidointia, ei erillistä tutkimuslupaa tarvinnut hankkia. Tutkimusaineisto koostui FI-StrBVi - tutkimuspyynnöllä saapuneista potilasnäytteistä, joten potilailta ei kerätty näytteitä erikseen tätä tutkimusta varten. Tutkimus tehtiin hyvän tutkimustavan mukaisesti eli huolellisesti, tarkasti ja rehellisesti käyttäen eettisesti kestäviä tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmiä. Tiedot kerättiin ja käsiteltiin luottamuksellisesti ja tulokset esitettiin avoimesti.

Kaikissa tutkimuksissa on pyrittävä arvioimaan tehdyn tutkimuksen luotettavuutta. Arviointiin voidaan käyttää käsitteitä tutkimuksen reliaabelius ja validius. Reliaabelius tarkoittaa mittaustulosten toistettavuutta, eli sen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Reliaabelius voidaan todeta esimerkiksi siten, että kaksi arvioijaa päätyy samanlaiseen tulokseen. Tulokset voidaan todeta reliaabeleiksi myös silloin, jos samaa henkilöä tutkitaan eri tutkimuskerroilla ja saadaan sama tulos. Validius eli pätevyys puolestaan tarkoittaa mittarin tai tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri sitä, mitä sen on tarkoituskin mitata. (Hirsjärvi ym. 2009, 231.)

Opinnäytetyömme luotettavuuteen vaikuttivat käyttämiemme lähteiden laatu ja määrä sekä se, että tutkimustuloksemme olivat samansuuntaisia aikaisempien tutkimusten kanssa. Näytteenoton luotettavuutta paransi kuvallinen näytteenotto-ohje ja näytteiden keräys niiden henkilöiden toimesta, jotka näytteitä tulevat jatkossakin ottamaan. Laboratorion henkilökunta suoritti analysoinnin, mikä oli tarkoituksenmukaista validoinnin kannalta ja paransi osaltaan myös tutkimuksen luotettavuutta. Kuvasimme opinnäytetyömme kokeellisen osion toteutuksen yksityiskohtaisesti ja esitimme tulokset todennukaisesti, mikä myös parantaa tutkimuksen luotettavuutta.

12 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla kahta eri tutkimusmenetelmää, bakteeriviljelyä ja polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvaa nukleiinihappotestiä B-ryhmän streptokokin osoittamisessa. Vertailun avulla pyrittiin selvittämään, ovatko näillä menetelmillä saadut tulokset yhteneviä ja voidaanko uutta Cepheidin GBS PCR -menetelmää käyttää kiireellisissä tapauksissa B-ryhmän streptokokin osoittamiseen Seinäjoen keskussairaalassa.

Tutkimuksen kokeellinen osio koostui 40 potilasnäytteestä. Sekä bakteeriviljelyn että PCR-menetelmän tuloksista yhdeksän oli positiivisia ja 31 negatiivisia. Tulosten perusteella laskettiin sensitiivisyys, spesifisyys, positiivinen ennustearvo ja negatiivinen ennustearvo. Niiden perusteella todettiin, että GeneXpert GBS on herkkä ja tarkka menetelmä osoittamaan B-ryhmän streptokokin kantajuutta.

Opinnäytetyömme aineisto oli suhteellisen pieni. Aiempien tutkimusten ja kokemusten perusteella voitiin kuitenkin jo ennalta olettaa, että Cepheidin GeneXpert PCR -menetelmä on vähintään yhtä luotettava kuin bakteeriviljely B-ryhmän streptokokin osoittamisessa. Opinnäytetyömme otoksen koko määräytyi näiden ennakkotietojen sekä kustannusten ja ajan asettamissa rajoissa. Otoksen kokoa voidaan pitää riittävänä menetelmän toimivuuden alkutestaukseen. Aineisto on kuitenkin niin pieni, että tutkimuksen yleistettävyydessä on rajoituksia. Aineiston koon kasvattamiseksi GBS PCR -testin validaatio jatkuu Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian laboratoriossa. Bakteeriviljelyä jatketaan edelleen PCR-testin ohella, kunnes aineisto on riittävän suuri ja PCR-tutkimusta varmistava viljely voidaan jättää pois.

Opinnäytetyön tulokset olivat samansuuntaiset aikaisempien tutkimusten kanssa. Sekä kansainvälisissä tutkimuksissa että Suomessa toteutetuissa testikokeiluissa GeneXpert GBS -menetelmälle on saatu erittäin hyvä spesifisyys, sensitiivisyys ja ennustearvot. Tässä tutkimuksessa saatiin samankaltaiset tulokset kuin aikaisemmissa laajemmalla tutkimusmateriaalilla tehdyissä tutkimuksissa. Tämä tukee saamiemme tutkimustulosten luotettavuutta.

Opinnäytetyön tulokset osoittivat, että GeneXpert GBS -testiä voidaan käyttää B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin kliiniseen diagnostiikkaan. Sillä saadaan nopeasti osoitettua äidit, jotka ovat GBS-bakteerin kantajia. Synnytyksen aikaisesta testauksesta hyötyvät erityisesti naiset, jotka eivät ole olleet äitiyshuollon piirissä, jotka synnyttävät ennenaikaisesti tai joiden GBS-seulonnan tulokset eivät ole tiedossa synnytyksen alkaessa. Testaus mahdollistaa hoidon nopean aloittamisen ja vastasyntyneen GBS-taudin paremman ehkäisyn.

GeneXpert GBS -testin kaltaiset reaaliaikaiset nukleiinihappo-osoitusmenetelmät ovat helppokäyttöisiä, testin suoritus on nopeaa ja tulokset ovat helposti tulkittavissa. Tämän vuoksi testaus olisi mahdollista suorittaa myös ympärivuorokautisesti hoitoyksikköön sijoitetun analysaattorin avulla. Tällöin tulisi huolehtia siitä, että näytteitä ottava henkilökunta on riittävästi koulutettu ja perehdytetty testien suorittamiseen. Mikäli testejä tehdään hoitoyksikössä, on kliinisen mikrobiologian laboratorion toimittava tukilaboratoriona työntekijöiden perehdyttämisessä ja koko testiprosessin laadunvarmistuksessa.

Uuden testin käyttöönottoa suunniteltaessa on vertailtava testauksesta koituvia laboratoriokustannuksia nopean diagnostiikan ansiosta saataviin taloudellisiin hyötyihin. Tämä on usein vaikeaa, koska hyötyjen taloudellinen määrittely ja laskeminen on monimutkaista. Taloudellinen kannattavuus päivystysluonteiselle pikatestille edellyttää riittävää näytemäärää. Vaikka taloudellinen kannattavuus todettaisiin hyväksi, siirtyminen käyttämään pikatestiä riippuu sairaalan toimintatavoista ja päätöksenteosta. Tällä hetkellä nukleiinihappo-osoitustestien kustannukset ovat kalliimmat kuin selektiivisen maljaviljelyn. On odotettavissa, että testi- ja laitevalikoiman laajetessa sekä menetelmien nopeudessa PCR-testien hinta tulee laskemaan.

Viime vuosien aikana tietoisuus vastasyntyneen GBS-taudista ja sen riskeistä on lisääntynyt sekä hoitohenkilökunnan että odottavien äitien keskuudessa. Samanaikaisesti ollaan huolestuneita lisääntyvästä antibioottien käytöstä. Seulottaessa bakteerin kantajuutta pelkästään myöhäisraskauden bakteeriviljelyn avulla, ei GBS-tautia ehkäisevää antibioottihoitoa osata välttämättä kohdentaa sitä tarvitseville äideille. GeneXpert GBS -testin ja vastaavien nukleiinihappo-osoitustestien avulla voidaan sekä ehkäistä vastasyntyneen GBS-tautia että vähentää tarpeettomien antibioottihoitojen määrää. Nopealle synnytyksen aikaiselle B-ryhmän streptokokin osoitustestille on siis selkeä tarve.

LÄHTEET

Ahmadzia, H., Heine, P. & Brown, H. 2013. GBS screening. An update on guidelines and methods. *Contemporary OB/GYN* 58 (7), 40–48.

Angstetra, D., Ferguson, J. & Giles, W.B. 2007. Institution of universal screening for Group B streptococcus (GBS) from a risk management protocol results in reduction of early-onset GBS disease in a tertiary obstetric unit. *Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology* 47 (5), 378–382.

ASM MicrobeLibrary. 2014. Blood Agar Plates and Hemolysis: Streptococcus and Other Catalase Negative Gram-Positive Cocci. Luettu 8.10.2014.

<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2881-blood-agar-plates-and-hemolysis-streptococcus-and-other-catalase-negative-gram-positive-cocci>

Carlson, P. & Koskela, M. 2011. Bakteriologiset tutkimukset. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) *Infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Cepheid. 2011. Xpert GBS. Ref GXGBS-100N-10. Käyttöohje.

Cepheid. 2014. Vaginal/Rectal Specimen Collection Protocol for use with Xpert™ GBS and Smart GBS.

Chuzeville, S., Puyme`ge, A., Madec, J-Y., Haenni, M. & Payot, S. 2012. Characterization of a New CAMP Factor Carried by an Integrative and Conjugative Element in *Streptococcus agalactiae* and Spreading in Streptococci. *Plos One* 7 (11), 1–9.

Copan. 2012. M40 Transystem Swab Line. Luettu 7.10.2014.

<http://www.copanusa.com/products/m40transystem/>

Di Renzo, G. C., Melin, P., Berardi, A., Blennow, M., Carbonell-Estrany, X., Donzelli, G. P., Hakansson, S., Hod, M., Hughes, R., Kurtzer, M., Poyart, C., Shinwell, E., Stray-Pedersen, B., Wielgos, M. & El Helali, N. 2014. Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis: a European consensus conference. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. Early online. London: Informa Healthcare.

de-Paris, F., Machado, A., Gheno, T., Ascoli, B., Oliveira, K. & Barth, A. 2011. *Braz J Infekt Dis* 15 (4), 323–327.

El Helali, N., Nguyen, J-C., Ly, A., Giovangrandi, Y. & Trinquart, L. 2009. Diagnostic Accuracy of a Rapid Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Universal Intrapartum Group B Streptococcus Screening. *Clinical Infectious Diseases* 2009 (49), 417–423.

Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. 2014. Kliininen mikrobiologia. Luettu 22.10.2014.

http://www.epshp.fi/1/yksikoiden_sivut/sairaanhoidolliset_palvelut/kliininen_mikrobiologia/tilat_ja_toiminta

- Hakulinen-Viitanen, T. & Klemetti, R. (toim.) 2013. Äitiysneuvolaopas. Suosituksia äitiysneuvolatoimintaan. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Tampere: Juvenes Print – Suomen Yliopistopaino Oy.
- Hellstén, S. (toim.) 2005. Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2., uudistettu painos. Helsinki: Suomen Kuntaliitto.
- Hiltunen, E., Linko, L., Hemminki, S., Hägg, M., Järvenpää, E., Saarinen P., Simonen S. & Kärhä, P. 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. Espoo: Mittatekniikan keskus MIKES.
- Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15., uudistettu painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Hovi, S-L., Lyytikäinen, O., Autti-Rämö, I., Laitinen, R., Mäkelä, M. & asiantuntijaryhmä. 2007. B-ryhmän streptokokkitaudin ehkäisy vastasyntyneillä: Toimintamallien vertailu. Finohtan raportti 2007; 31. Helsinki: Stakes.
- Ikäheimo, I. 2002. Käytännön esimerkkejä kliinisen mikrobiologian menetelmien validoinnista ja verifiointista. Moodi 1/2002 vsk 26, 13.
- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita Publishing Oy.
- Kairisto, V. 2010. Laboratoriotuloksen tulkinta. Kliininen herkkyys, tarkkuus ja todennäköisyysuhde. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. 3.painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 35–48.
- Kauppila, J., Kerttula, A-M., Kärkkäinen, U., Lyytikäinen, O., Siljander, T., Vuento, R., Vuopio, J. & Vähäkuopus, S. 2013. GBS-seulontakäytännöt Suomessa epäyhtenäiset. Moodi 3/2013, 96–98.
- Kimura, K., Yanagisawa, H., Wachino, J-i., Shibayama, K. & Arakawa, Y. 2013. Rapid and Reliable Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Detecting Streptococcus agalactiae. Japanese Journal of Infectious Diseases 66 (6), 546-548.
- Lanotte, P. & Seme, K. 2012. Perinatal infections. Teoksessa Cornaglia, G., Courcol, R., Herrmann, J-L., Kahlmeter, G., Peigue-Lafeuille, H. & Vila, J. (ed.) European Manual of Clinical Microbiology. Paris: Société Française de Microbiologie, 241–247.
- Liimatainen, O. 2002. Menetelmien validointi ja verifiointi kliinisen mikrobiologian laboratoriossa: yleisiä periaatteita. Moodi 1/2002 vsk 26, 12.
- Lyytikäinen, O., Nuorti, P., Halmesmäki, E., Carslon, P., Uotila, J., Vuento, R., Ranta, T., Sarkkinen H., Ämmälä, M., Kostiala, A. & Järvenpää, A-L. 2002. Invasiiviset B-ryhmän streptokokki-infektiot Suomessa vuosina 1995–2000. Suomen Lääkärilehti 48/2002 vsk 57, 4913–4917.
- Madzivhandila, M., Adrian, P. V., Cutland, C. L., Kuwanda, L., Schrag, S. J. & Madhi, S. A. 2011. Serotype Distribution and Invasive Potential of Group B Streptococcus Isolates Causing Disease in Infants and Colonizing Maternal-Newborn Dyads. PLoS One 6 (3), 1–6.

- Maisey, H., Doran, K. & Nizet, V. 2008. Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10, 1–18.
- Mentula, S. 1998. Streptococcus Milleri-ryhmä: Tunnistus lajitasolle ja esiintyvyys tietyissä infektoissa. Helsingin yliopisto. Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. Pro gradu -tutkielma.
- Nolte, F. & Caliendo, A. 2011. Molecular Microbiology. Teoksessa Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Versalovic, J. & Warnock, D. W. (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington, D.C.: ASM Press.
- Poncelet-Jasserand, E., Forges, F., Varlet, M-N., Chauleur, C., Seffert, P., Siani, C., Pozzetto, B. & Ros, A. 2013. Reduction of the use of antimicrobial drugs following the rapid detection of *Streptococcus agalactiae* in the vagina at delivery by real-time PCR assay. *BJOG* 120, 1098–1109.
- Puopolo, K., Madoff, L., & Eichenwald, E. 2005. Early-onset group B streptococcal disease in the era of maternal screening. *Pediatrics* 115 (5), 1240–1246.
- Rajagopal, L. 2009. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiology* 4 (2). Luettu 10.3.2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2691590/pdf/nihms114724.pdf>
- Rantakokko-Jalava, K. 2013a. GBS-seulontakokemuksia Tyksistä. Luettu 4.11.2014. http://www.nordlab.fi/sites/default/files/pdf_uploads/strb-seulonta_kiertokoulu_2013_krj.pdf
- Rantakokko-Jalava, K. 2013b. Geenitekniikan rooli tämän päivän päivystysluontoisessa diagnostiikassa: Kohdennettu MRSA-seulonta ja B-streptokokin osoittaminen geenitekniikan keinoin. Luettu 4.11.2014. <http://www.labquality.fi/labquality-paivat/historia/labquality-paivat-2013/luennot/>
- Rimawi, B. 2014. Infectious Comorbidities Encountered in Obstetrics and Neonatology. OMICS Group eBooks. Luettu 27.11.2014. <http://esciencecentral.org/ebooks/infectious-comorbidities/pdf/neonatal-meningitis.pdf>
- Saarinen, A. 2013. Streptococcus agalactiae (B), viljely. Tutkimuskohtainen ohje. Seinäjoen keskussairaala. Mikrobiologian laboratorio.
- Saha, K. 2010. Nielumalja. Elatusaineohje. Seinäjoen keskussairaala. Mikrobiologian laboratorio.
- Saha, K. 2013. Streptococcus agalactiae (B), nukleiinihappo. Tutkimuskohtainen ohje. Seinäjoen keskussairaala. Mikrobiologian laboratorio.
- Saha, K. 2014. Streptococcus agalactiae (B), nukleiinihappo vagina- ja rectumnäytteistä. Tutkimuskohtainen ohje. Seinäjoen keskussairaala. Kliininen mikrobiologia. Luettu 8.10.2014. <http://www.epshp.fi/files/6666/FI-StrBNhO-8591.pdf>

- Saxén, H. & Vuopio-Varkila, J. 2011. B-ryhmän streptokokki. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) *Mikrobiologia*. 1.-2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 110–111.
- Spellerberg, B. & Brandt, C. 2011. Streptococcus. Teoksessa Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L. & Warnock, D. W. (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington, D.C.: ASM Press, 331–349.
- Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. *Geenitekniikka*. Turun ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 52. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- THL. 2014. B-ryhmän streptokokki. Luettu 5.2.2014.
http://www.thl.fi/fi_FI/web/infektiotaudit-fi/b-ryhman-streptokokki
- Udo, E., Boswihi, S. & Al-Sweih, N. 2013. Genotypes and Virulence Genes in Group B Streptococcus Isolated in the Maternity Hospital, Kuwait. *Medical Principles and Practice* 22, 453–457.
- Uhari, M. & Nieminen, P. 2012. *Epidemiologia ja biostatistiikka*. Helsinki: Duodecim Oy.
- Uotila, J. & Lyytikäinen, O. 2012. Vastasyntyneen varhaisen B-ryhmän streptokokki-infektion ehkäisy. *Suomen Lääkärilehti* 50-52/2012 vsk 67, 3768–3772.
- Vaara, M., Skurnik, M. & Sarvas, M. 2011. Bakterisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) *Mikrobiologia*. 1.-2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 14–40.
- Vahla, L. 2008. Vastasyntyneen GBS-tartunta on ehkäistävissä. *Sairaanhoitaja-lehti* 2/2008.
- Vilkka, H. 2007. *Tutki ja mittaa*. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

LIITTEET

Liite 1. Näytteenotto-ohje

1 (2)


 Etelä-Pohjanmaan
 sairaanhoitopiiri
 Seinäjoen sairaala
 Kliininen mikrobiologia

Laatija: K.Saha Pvm: 04.02.2013

GBS (Streptococcus agalactiae (B) näytteenotto vaginasta ja peräaukosta GeneXpert-testiä varten

Näytteet GeneXpertillä tehtävää GBS-PCR -testiä (ja StrepB-viljelyä) varten tulee aina ottaa erityisillä kaksoisnäytteenottotikuilla (Cepheid Swab Collection Kit, 900-0370)



1. Vaginanäytteenotto ennen sisätutkimusta, sillä mahdollisesti käytettävät geelit, vaseliini tai antiseptiset aineet tms. voivat häiritä testiä.
2. Ennen näytteenottoa puhdista näytteenottoalue puhtaaksi verestä, limasta tai muusta erillisellä vanutikulla.
3. Ota näytteet aina molempia tikkuja yhtä aikaa käyttäen. Toinen tikusta käytetään GBS-PCR-testiin ja toinen StrepB-viljelyyn .
4. Ota kaksoistikkunäyte ensin vaginasta ja sitten samoilla tikuilla peräaukosta (ks. Liite: Näytteenotto-ohje vaginasta). Jos tikussa näkyy näytteenoton jälkeen selkeästi veriklimppejä tai limaa, niin ne voi pyyhkäistä kevyesti steriilillä pienellä sideharson taitoksella ennen kuljetusputkeen laittamista. Laita molemmat tikut näytteenoton jälkeen kuljetusputkeen.
5. Säilytä näytteet jääkaapissa ennen testausta.

Vaginal/Rectal Specimen Collection Protocol

for use with Xpert™ GBS and Smart GBS

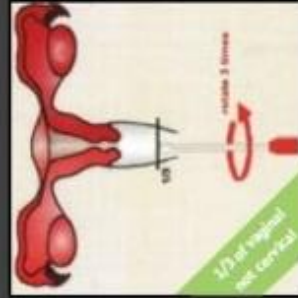
Xpert™ GBS

Vagina -ja peräaukon eritenäytteet *Streptococcus agalactiae* (B)-PCR- javiijelytuksesta varten. Näytteet tulee ottaa ennen sisätutkimuksen tekoa, sillä mahdollisesti käytettävät geelit, vaseliini, antiseptiset aineet voivat häiritä tutkimusta.



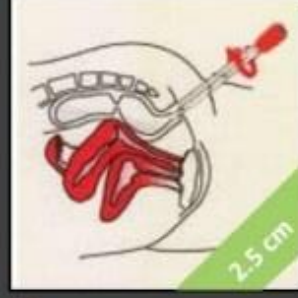
1

Poista ylimääräinen erite (veri, lima tms) erillisellä vanutikulla vaginan tai peräaukon alueelta ennen näytteenottoa. Näyte tulee ottaa Cepheidin kaksoistikkua käyttäen.



2

Työnnä kaksoistikut vaginan alimpaan kolmasosaan ja kerää eritettä limakalvoilta pyörittäen tikkuja 3 kertaa, että saat riittävästi näytettä. Näytettä ei tule ottaa kohdunkaulasta.



3

Ota näytettä samaa kaksoistikkua käyttäen myös peräaukosta. Työnnä noin 2.5 cm syvyydeltä peräaukkoon ja pyöritä varovasti saadaksesi näytettä peräaukon poimuista.



4

Laita molemmat tikut samaan putkeen ja sulje kunnolla.



5

Säilytä näyte mieluiten jääkaappilämpötilassa. (Näyte säilyy 24 h huoneenlämmössä)

defining *on-demand* molecular diagnostics.



For Technical Assistance please contact: Cepheid Technical Support: 888-838-3222, Option 2

Liite 3. Positiivinen testiraportti

GeneXpert PC

17/04/14 07:37:56

Test Report

Sample ID: 14M3050
 Test Type: Specimen
 Sample Type:

Assay Information

Assay	Assay Version	Assay Type
Xpert GBS G3	3	In Vitro Diagnostic

Test Result: **POSITIVE**

Test and Analyte Result

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	33.8	244.0	NA	PASS
GBS	38.6	83.0	POS	PASS
IC	29.3	335.0	NA	PASS

User: Seinajoen keskussairaala
 Status: Done
 Expiration Date*: 26/10/14
 S/W Version: 4.4a
 Cartridge S/N*: 48181625
 Reagent Lot ID*: 06101
 Notes:
 Error Status: OK

Start Time: 14/04/14 15:23:35
 End Time: 14/04/14 16:10:01
 Instrument S/N: 711234
 Module S/N: 643180
 Module Name: D1

Errors
 <None>

 Tech. Initial/Date

 Supervisor Initial/Date

* indicates that a particular field is entered using a barcode scanner

For In Vitro Diagnostics Use Only.

Liite 4. Negatiivinen testiraportti

GeneXpert PC

17/04/14 10:53:35

Test Report

Sample ID: 14M3032
 Test Type: Specimen
 Sample Type:

Assay Information

Assay	Assay Version	Assay Type
Xpert GBS G3	3	In Vitro Diagnostic

Test Result: **NEGATIVE**

Test and Analyte Result

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	34.1	299.0	PASS	PASS
GBS	0.0	3.0	NEG	PASS
IC	28.7	447.0	PASS	PASS

User: Seinajoen keskussairaala
 Status: Done
 Expiration Date*: 26/10/14
 S/W Version: 4.4a
 Cartridge S/N*: 48181631
 Reagent Lot ID*: 06101
 Notes:
 Error Status: OK

Start Time: 14/04/14 14:17:30
 End Time: 14/04/14 15:06:55
 Instrument S/N: 711233
 Module S/N: 642976
 Module Name: C1

Errors
 <None>

 Tech. Initial/Date

 Supervisor Initial/Date

* indicates that a particular field is entered using a barcode scanner

For In Vitro Diagnostics Use Only.

Liite 5. Tulostaulukko

NR.	PVM	Näyttenumero	GBS GeneXpert	FI-StrBVi nielumaljalle
1	8.2.2013	M1034	Negatiivinen	Negatiivinen
2	8.2.2013	M1043	Positiivinen	Positiivinen
3	8.2.2013	M1044	Negatiivinen	Negatiivinen
4	8.2.2013	M1046	Negatiivinen	Negatiivinen
5	8.2.2013	M1061	Negatiivinen	Negatiivinen
6	14.2.2013	M1201	Negatiivinen	Negatiivinen
7	14.2.2013	M1202	Negatiivinen	Negatiivinen
8	14.2.2013	M1203	Negatiivinen	Negatiivinen
9	15.2.2013	M1230	Positiivinen	Positiivinen
10	28.2.2013	M1595	Positiivinen	Positiivinen
11	7.4.2014	M2821	Negatiivinen	Negatiivinen
12	8.4.2014	M2873	Negatiivinen	Negatiivinen
13	9.4.2014	M2907	Negatiivinen	Negatiivinen
14	9.4.2014	M2926	Negatiivinen	Negatiivinen
15	10.4.2014	M2945	Negatiivinen	Negatiivinen
16	11.4.2014	M2978	Negatiivinen	Negatiivinen
17	11.4.2014	M2990	Negatiivinen	Negatiivinen
18	14.4.2014	M3032	Negatiivinen	Negatiivinen
19	14.4.2014	M3050	Positiivinen	Positiivinen
20	17.4.2014	M3129	Negatiivinen	Negatiivinen
21	22.4.2014	M3198	Negatiivinen	Negatiivinen
22	23.4.2014	M3252	Negatiivinen	Negatiivinen
23	28.4.2014	M3367	Positiivinen	Positiivinen
24	29.4.2014	M3427	Negatiivinen	Negatiivinen
25	29.4.2014	M3438	Negatiivinen	Negatiivinen
26	29.4.2014	M3440	Positiivinen	Positiivinen
27	3.5.2014	M3551	Negatiivinen	Negatiivinen
28	5.5.2014	M3567	Positiivinen	Positiivinen
29	5.5.2014	M3574	Negatiivinen	Negatiivinen
30	5.5.2014	M3575	Negatiivinen	Negatiivinen
31	8.5.2014	M3694	Positiivinen	Positiivinen
32	12.5.2014	M3793	Negatiivinen	Negatiivinen
33	12.5.2014	M3795	Negatiivinen	Negatiivinen
34	13.5.2014	M3237	Negatiivinen	Negatiivinen
35	19.5.2014	M3998	Positiivinen	Positiivinen
36	20.5.2014	M4055	Negatiivinen	Negatiivinen
37	26.5.2014	M4246	Negatiivinen	Negatiivinen
38	28.5.2014	M4383	Negatiivinen	Negatiivinen
39	31.5.2014	M4418	Negatiivinen	Negatiivinen
40	31.5.2014	M4424	Negatiivinen	Negatiivinen