

Streptococcus pneumoniae diagnostiikka

TkK-tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Biotekniikka
Huhtikuu 2024
Susanne Lehtisalo

Turun yliopiston laatujaestelman mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

SUSANNE LEHTISALO: *Streptococcus pneumoniae* diagnostiikka

Biotekniikan kandidaatin tutkielma, 19 s.

Biotekniikka

Huhtikuu 2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Streptococcus pneumoniae, eli pneumokokki, aiheuttaa lieviä, vakavia ja invasiivisia bakteeri-infektioita. Vuonna 2022, vakavien pneumokokki-infektioiden ilmaantuvuus oli 10,5 tapausta per 100 000 suomalaista. Infektioiden hoito laajakirjoisilla antibiooteilla lisää painetta antibioottiresistenssin kehittymiselle. Pneumokokki on myös sopeutunut laajamittaiseen immunisaatioon, ja rokotesuojan ulkopuoliset serotyypit aiheuttavat kasvavan määrän infektioita populaatiossa. Ilmiön seuraamiseksi ja rokotekehityksen tueksi, sekä sopivan hoidon antamiseksi tarvitaan herkkiä, spesifisiä ja nopeita diagnostisia menetelmiä. Tämä tutkielma on katsaus pneumokokin diagnostisia menetelmiä käsittelevään kirjallisuuteen.

Perinteiset, pneumokokin mikrobiologisiin ja biokemiallisiin ominaisuuksiin perustuvat menetelmät, kuten gram-värjäys ja sappisuolaliukoisuustesti, ovat edullisia ja helppoja, mutta hitaita, epäspesifisiä, ja häiriöherkkiä. Molekulaariset menetelmät, kuten qPCR, virtsan C-PS-antigeenitestit, 16S rRNA-geenin sekvensointi ja MALDI-TOF, ovat herkempiä, ja huomattavasti nopeampia kuin perinteiset menetelmät. Niillä voidaan analysoida polymikrobisia näytteitä ja tunnistaa epätyypillisiä pneumokokkeja. Ne voivat kuitenkin olla kalliita, ja epäspesifisiä *mitis*-ryhmän korkean sekvenssihomologian vuoksi. Näillä menetelmillä voidaan suorittaa lajituksen ja antibioottiresistenssin tunnistus.

Serotyypityksen kultainen standardi on Quellung-reaktio, joka on kallis ja erityisasiantuntemusta vaativa, eikä sillä voida tunnistaa kapselittomia variantteja. qPCR-serotyypitysmenetelmät ovat herkkiä, edullisia ja spesifisiä, ja ne tunnistavat myös kapselittomat variantit. MLST on kallis, mutta sillä voidaan tunnistaa pneumokokki lajitasolla, serotyypitasolla ja kantatasolla, sekä tutkia antibioottiresistenssiä ja virulenssigeenejä.

Perinteisten ja molekulaaristen menetelmien yhdistäminen lienee paras vaihtoehto pneumokokin tunnistukseen, serotyypitykseen, sekä tarkempaan karakterisointiin. Pneumokokin diagnostisia menetelmiä tulisi kehittää kuvailtujen haasteiden ylitsepääsemiseksi ja validoida jatkuvasti pneumokokin vahvan transformaatiokyvyn ja sopeutumiskyvyn vuoksi.

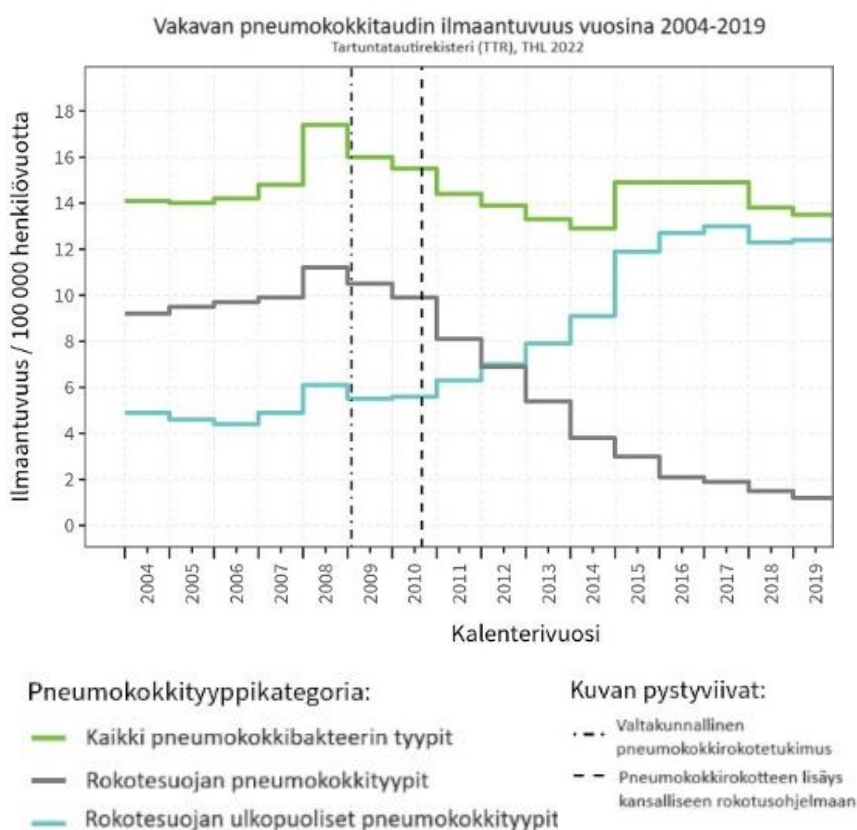
Asiasanat: *Streptococcus pneumoniae*, diagnostiikka, serotyypitys, immunologiset menetelmät, molekulaariset menetelmät, C-polysakkaridi, polysakkaridikapseli

Sisällys

1	Johdanto	2
2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4
3	Kolonisaatio ja infektiio.....	6
4	Diagnostiikka.....	8
4.1	Mikrobiologiset ja biokemialliset menetelmät.....	9
4.2	Immunologiset menetelmät.....	10
4.2.1	Quellung-reaktio ja lateksiagglutinaatio-menetelmä	10
4.2.2	Virtsan C-polysakkaridiantigeeni.....	11
4.3	Molekulaariset menetelmät	12
4.3.1	MALDI-TOF-massaspektrometria.....	12
4.3.2	Monopleksiset PCR-menetelmät.....	12
4.3.3	Multipleksiset PCR-menetelmät	13
4.3.4	Sekvensointi	13
5	Yhteenveto	15
	Lähteet.....	17

1 Johdanto

Streptococcus pneumoniae, eli pneumokokki, on yleinen ylähengitysteiden infektiota aiheuttava bakteeri. Sillä on kyky kolonisoida ihmisen nenänielu oireettomana, aiheuttaa lieviä infektiioireita kuten poskiontelo- ja välikorvatulehduksia, tai vakavia taudinkuvia kuten keuhkokuumeita, aivokalvontulehduksia ja verenmyrkytyksiä. Vakavia pneumokokki-infektioita esiintyi 582 vuonna 2022, ja ennen COVID-19-pandemiaa noin 790 vuosittain (2015–2019). Erityisesti pienillä lapsilla ja vanhuksilla on korkea riski sairastua erilaisiin pneumokokkitauteihin sekä muihin jälkitauteihin. Tämän vuoksi pneumokokkirokote lisättiin Suomen kansalliseen rokoteohjelmaan vuonna 2010. Sen myötä alle yksivuotiaat lapset rokotetaan pneumokokkia vastaan. Yleisimmin käytetty rokote antaa suojan 10 eri pneumokokin variantille. Näiden varianttien kantajuus on vähentynyt sekä rokotettujen, että rokotamattomien keskuudessa. On kuitenkin havaittu, että muiden kuin näiden 10 variantin esiintyvyys on lisääntynyt aikuisissa laajamittaisen immunisaation jälkeen (Kuva 1). (Palmu ja muut 2017; THL 2023a, 2023b).



Kuva 1. Vakavan pneumokokkitaudin ilmaantuvuus Suomessa vuosina 2004–2019. Rokotesuojaan kuuluvien pneumokokkityyppien ilmaantuvuus on laskenut ja rokotesuojan ulkopuolisten pneumokokkityyppien ilmaantuvuus noussut valtakunnallisten pneumokokkirokotusten aloittamisen jälkeen (muokattu lähteestä THL, 2023a).

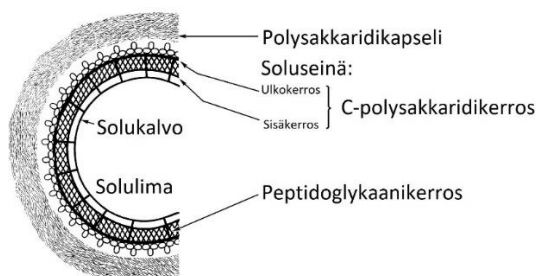
Valtaosassa tapauksista pneumokokki esiintyy oireettomana, tai aiheuttaa lieviä infektiotiloja, jotka hoidetaan antibioottikuurilla kotioloissa, ilman taudinaiheuttajan tarkkaa tunnistusta. Pneumokokki tunnistetaan tyypillisesti vain vakavissa tautitapauksissa, kun potilas otetaan sairaalahoitoon. Silloinkin infektiot hoidetaan usein laajakirjoisilla antibiooteilla. Tällaisten antibioottien käytön tiedetään kuitenkin edesauttavan antibioottiresistenssin kehittymistä, ja siksi taudinaiheuttajan tarkka tunnistus voisi vähentää tällaisten antibioottien käyttötarvetta. Potilashoidon lisäksi pneumokokin tarkkaa diagnostiikkaa tarvitaan populaatiotason tautitaakan arvioimista, rokotusohjelman vaikutusten seuraamista ja rokotekehitystä varten. Tarvitaan siis yksinkertaisia, herkkiä, nopeita ja tarkkoja menetelmiä pneumokokin ja sen eri varianttien ja piirteiden tunnistukseen. Erilaisia diagnostisia testejä onkin kehitetty laaja kirjo. Tässä tutkielmassa tutustutaan näihin diagnostisiin testeihin, niiden toimintaperiaatteisiin ja niiden sovellusmahdollisuuksiin. (Bennett ja muut 2020; Carvalho ja muut 2007; Kim ja muut 2022).

2 *Streptococcus pneumoniae*

Streptokokit ovat suku pallomaisia bakteereja. Streptokokit voidaan jakaa kuuteen ryhmään niiden 16S rRNA-geenisekvenssin mukaan. Pneumokokki kuuluu *mitis*-ryhmään sukulaistensa, *S. pseudopneumoniae*, *S. mitiksen* ja *S. oraliksen* kanssa, joilla heikompi patogeenisuus verrattuna pneumokokkiin. Silti *mitis*-ryhmän jäsenillä on huomattava sekvenssihomologisuus, mikä johtuu niiden välisestä vilkkaasta horisontaalisesta geeninvaihdoksesta ja homologisesta rekombinaatiosta. (Arbique ja muut 2004; Kawamura ja muut 1995; van der Poll ja Opal 2009).

Pneumokokki on gram-positiivinen bakteeri, joten sillä on peptidoglykaanista ja teikohaposta koostuva paksu soluseinä. Soluseinän teikohapot, ja niihin sidotut toistuvat peptidoglykaanipätkät muodostavat C-polysakkarideja (engl. cell wall polysaccharide, C-PS). C-PS:n toistojaksoon kuuluu 2-asetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-galaktoosi (AATGal), D-glukoosi, ribitoli 5-fosfaatti, kaksi *N*-asetyyli-D-galaktosaminyylitähdettä (GalNAc), sekä yksi tai kaksi fosfokoliinitähdettä. Toistojaksojen välissä on α -1,4 glykosidisia sidoksia AATGal- ja GalNAc-tähteiden välillä. Rakenne on hyvin konservoitu, ja se löytyy kaikista pneumokokeista ja vain joistakin streptokokeista. (Bennett ja muut 2020; Vollmer ja muut 2019).

Lähes jokaisella pneumokokki-isolaatilla on havaittu myös soluseinän ympäröivä polysakkaridikapseli (PS) (Bennett ja muut 2020). PS:t koostuvat 1-6 monosakkaridista, sekä mahdollisista sivuketjuista (Paton ja Trappetti 2019). Monosakkaridien tyypit, niiden järjestys, niiden väliset glykosidiset sidokset ja sivuketjujen olemassaolo määrittävät pneumokokin variantin (Ramirez ja muut 2015). Myös joitakin kapselittomia variantteja tunnetaan. PS:n ja C-PS:n sijainnit pneumokokin soluseinässä on esitetty Kuvassa 2.



Kuva 2. *Pneumokokin soluseinän rakenteet. C-polysakkaridi on sidottuna soluseinän peptidoglykaanikerroksen sisä- ja ulkopuolelle. Soluseinän ympäröi polysakkaridikapseli. (muokattu lähteestä Kalin, 1998).*

Yli 90 eri pneumokokin alalajia on tunnistettu näiden PS:n antigeenisten erojen perusteella. Näitä alalajeja kutsutaan serotyypeiksi koska niiden tunnistus perustuu seerumin vasta-aineisiin. Serotyypien nimeämiselle on kaksi eri järjestelmää. Yleisin niistä on tanskalainen järjestelmä, joka jakaa serotyypit 46 numeroituun seroryhmään, ja jokaisessa seroryhmässä on antigeenisesti sukua olevia serotyyppejä. Serotyypit merkitään kirjaimin löytöjärjestyksessä: F (first), A, B, C, jne. Seroryhmään 19 kuuluu siis serotyypit 19F, 19A, 19B ja 19C. Yleisimmät vakavia tauteja aiheuttavat serotyypit Suomessa ovat 19A, 3 ja 6C. (Bennett ja muut 2020; THL 2023b).

3 Kolonisaatio ja infektiio

Kolonisaatio nenänielussa vaatii pneumokokin kiinnittymistä isännän limakalvoon, soluihin ja kudoksiin, sekä kykyä välttää limakalvon immuunivaste ja mukosiliaarinen puhdistuma. Pneumokokki kohtaa ensin nenänielun limakalvon, jossa se voi sitoutua limakalvon musiinien glykaaneihin. Sitoutumista edistää pneumokokin pilit, proteolyysin estävä IgA1 proteaasi, värekarvojen liikkeen estävä pneumolysiini (Ply), sekä komplementin opsonisaatiota häiritsevät pintaproteiinit. Pneumokokki voi myös välttää kiinnittymisen limakalvoon, koska negatiivisesti varautuneet PS:t hylkivät limakalvon polysakkaridien siaalihappoja, päästäen sen hengitysteiden epiteelille. Lisäksi Neuraminidaasi A (Nan A), β -galaktosidaasi (BgaA) ja β -N-asetyyli-glukosaminidaasi (StrH) poistavat liman glykosylaatiota, paljastaen glykaanikohteet, joiden avulla adhesiinit sitovat bakteerin epiteelille. Suuret pneumokokkimäärät nenänielussa on yhdistetty kohonneeseen infektioriskiin. (Bogaert ja muut 2004; Weiser ja muut 2018).

Useimmat pneumokokki-infektiot kehittyvät oireettomasta nenänielun kolonisaatiosta. Nämä infektiot voivat olla joko paikallisia tai invasiivisia, ja vaativat vähintään epiteelin läpäisyn. Yleisin pneumokokin aiheuttama paikallinen infektiio on keuhkokuume, jonka tyypilliset oireet ovat kuume, väsymys, yskä ja hengenahdistus. Keuhkokuume kehittyy, kun bakteeri pääsee keuhkorakkuloille, ja leviää keuhkorakkuloiden septoissa, joissa se aktivoi komplementin, sytokiinituotannon ja reseptorien säätelyn verisuonten epiteelillä. Pneumokokki stimuloi tulehdusreaktion, jolloin plasma-, veri-, ja valkosolut kerääntyvät alveoleihin. Lievät paikalliset infektiot hoidetaan antibioottikuureilla kotiooloissa, mutta ne voivat myös muuttua invasiivisiksi, ja siten sairaalahoitoa vaativiksi. (Bennett ja muut 2020; Weiser ja muut 2018).

Invasiivinen pneumokokki-infektiio on vakava tautitila, joka kehittyy, kun bakteeri on päässyt jollekin kehon tavallisesti steriileistä alueista, kuten vereen, keuhkopussinesteeseen tai aivo-selkäydinnesteeseen. Invasiivisia infektiota ovat esimerkiksi verenmyrkytys ja aivokalvon tulehdus. Pneumokokki pääsee nenänielusta vereen kiinnittymällä nenänielun epiteeliin, ja läpäisemällä sen, sekä verisuonten endoteelin. Kiinnittyminen epiteeliin tapahtuu fosforyylikoliinin (ChoP), koliinia sitovan proteiini A:n (CbpA), liitännäisen pilus alayksikön (rRGa), sitovan virulenssiproteiini A:n (PavA) ja suuren pinta-exposed glykoproteiinin (PsrP) avulla. Invaasio tapahtuu ChoP ja verihiutaleaktivointitekijän sitovan reseptorin (PAFR) välisten, sekä CbpA ja polymerisen

immunoglobuliinireseptorin (PIGR) välisen vuorovaikutusten takia. Tämä heikentää PIGR-kierrätysreittiä indusoiden pneumokokin endosytoosin verisuonten endoteelin läpi verenkiertoon. Vaihtoehtoisesti solujen välinen invaasioreitti avautuu, jos Ply ja vetyperoksidi vaurioittavat epiteeliä, ja soluväliainetta hajottaa CpbE tai hyaluronaattilyaasi (Hyl) ja plasmini. Serotyypeillä 1, 5, 7F, 8, 14, 18C, 33F, ja 38 on erityisen suuri todennäköisyys siirtyä kolonisaatiosta invaasioon. Invasiiviset pneumokokki-infektiot ovat hengenvaarallisia tiloja, jotka vaativat sairaalahoitoa, jolloin täytyy diagnosoida taudinaiheuttaja. (Bennett ja muut 2020; Bogaert ja muut 2004; Weiser ja muut 2018).

4 Diagnostiikka

Pneumokokki-infektiot aiheuttavat oireita, joiden perusteella ei voi luotettavasti päätellä, mikä tai mitkä mikrobi(t) aiheuttavat taudin. Siksi taudinaiheuttajan diagnoosi tehdään kliinisen epäilyksen ja laboratoriotestien avulla. Invasiivisen pneumokokki-infektion diagnoosi tehdään eristämällä bakteeri jostain normaalitilanteessa steriilistä kehonesteestä, kuten verestä tai aivo-selkäydinnesteestä. Paikallisten infektioiden diagnoosiin voidaan käyttää polymikrobisia näytteitä kuten virtsanäytteitä tai yskösnäytteitä. Kaikkien diagnostisten testien tulisi erottaa harmittomat mikrobilajit todennäköisistä taudinaiheuttajista. Lisäksi voidaan pyrkiä erottamaan harmittomat ja patogeeniset serotyypit tai kannat, sekä arvioida antibioottiresistenssiä. Useimmat rutiinikäytössä olevat diagnostiset testit vaativat bakteeriviljelyn, eivätkä ne ole luotettavia antibioottihoidon aloittamisen jälkeen, joten näytteenotto tulisi suorittaa mahdollisimman aikaisin. Taulukossa 1 on yhteenveto tutkielmassa käsiteltyjen diagnostisten testien ominaisuuksista. (Ampofo ja Byington 2018; Bennett ja muut 2020; Varghese ja muut 2017).

Taulukko 1. Diagnostiset testit ja niiden ominaisuudet.

Diagnostinen testi	Kohde	Vaatii viljelyn	Milloin hyödynnettävissä	Serotyypitys
Gram-värijäys (Ampofo ja Byington 2018)	Paksu peptidoglykaanikerros	Ei	Infektio. Ennen antibioottilaitoa	Ei
Sappisuola-liukoisuus (Ramirez ja muut 2015)	<i>N</i> -asetyyylimuramyylilalaniini amidaasi	Ei	Infektio. Ennen antibioottilaitoa	Ei
α -hemolyysi (Bennett ja muut 2020)	Pneumolysiini	Kyllä	Infektio. Ennen antibioottilaitoa	Ei
Optokiini-herkkyys (Ramirez ja muut 2015)	H ⁺ ATPaasi	Kyllä	Infektio. Ennen antibioottilaitoa	Ei
Katalaasi (Bennett ja muut 2020)	Katalaasi	Kyllä	Infektio. Ennen antibioottilaitoa	Ei
Quellung & Lateksiagglutinaatio (Selva ja muut 2012)	Polysakkaridikapseli	Kyllä	Antibioottilaito ei vaikuta	Kyllä
Virtsan C-PS (Kim ja muut 2022)	Soluseinän C-polysakkaridi	Ei	Antibioottilaito ei vaikuta	Ei
MALDI-TOF (Varghese ja muut 2017)	Peptidit	Kyllä	Infektio. Ennen antibioottilaitoa	Ei
qPCR (Bennett ja muut 2020; Brito ja muut 2003; Carvalho ja muut 2007)	<i>cps</i> -geenit: <i>Spn9802</i> ja <i>lytA</i> . Serotyypitykseen esim. <i>wzy</i> , <i>capB</i> , <i>wciY</i> , <i>gct</i> , <i>cpsK</i> , <i>cpsG</i> , <i>cpsB</i> , <i>cpsC</i> ja <i>cpsO</i>	Ei	Infektio. Antibioottilaito ei heikennä luotettavuutta	Kyllä
16S rRNA sekvensointi (Singhal ja muut 2015)	16S rRNA:n geenisekvenssi. Sytosiini positiossa 203	Ei	Infektio. Antibioottilaito ei heikennä luotettavuutta	Ei
MLST (Enright ja Spratt 1998)	housekeeping geenit: <i>ddl</i> , <i>spi</i> , <i>recP</i> , <i>aroE</i> , <i>gdh</i> , <i>gki</i> ja <i>xpt</i>	Kyllä	Infektio. Antibioottilaito ei heikennä luotettavuutta	Kyllä + kannantunnistus

4.1 Mikrobiologiset ja biokemialliset menetelmät

Mikrobiologisia ja biokemiallisia menetelmiä, sekä fenotyypitystä on pidetty pneumokokin kliinisen tunnistuksen kultaisena standardina. Näitä varten tehdään yleensä näytteen maljaus ja bakteeriviljely. Pneumokokit kasvavat ketjumaisesti ja pareissa, ja niiden pesäkkeet ovat napin muotoisia tai limaisia. Nämä morfologiset piirteet eivät kuitenkaan mahdollista luotettavaa pneumokokin tunnistusta. Richter ja muut (2008) havaitsivat, että 23,7 % heidän tutkimistansa pneumokokki-isolaateista ei ollut tällaisia piirteitä. (Reller ja muut 2008; Richter ja muut 2008).

Seuraava askel pneumokokin tunnistuksessa on gram-värjäys. Gram-positiivisten diplokokkien löytyminen viittaa pneumokokkeihin (Ampofo ja Byington 2018). Muita mahdollisia kemiallisia ja mikrobiologisia testejä ovat sappisuola-liukoisuus (Ramirez ja muut 2015), α -hemolyysi (Bennett ja muut 2020), optokiiniherkkyys (Ramirez ja muut 2015) ja Katalaasi (Bennet ja muut 2020) (Taulukko 1). Sappisuolaliukoisuutta on pidetty biokemiallisen pneumokokin tunnistuksen kultaisena standardina. Testi perustuu pneumokokkipesäkkeiden autolyyttiseen liukenemiseen, kun niiden päälle lisätään sappisuoloja. Liukeneminen tapahtuu *N*-asetyylimuramyli-L-alaniini amidaasin aktivaation takia, jota koodaa *lytA*-geeni. α -hemolyysi perustuu pneumokokin kykyyn erittää pneumolysiiniä, joka hajottaa hemoglobiinia. Veriagarilla tämä havaitaan pesäkkeen ympärille muodostuvana vihreänä renkaana. Optokiiniherkkyys perustuu pneumokokin herkkyteen optokiini-antibiootille. Optokiini toimii estämällä H⁺-ATPaasin toiminnan. Katalaasitestin avulla selvitetään, tuottaako bakteeri katalaasientsyymiä. Testi suoritetaan lisäämällä vetyperoksidia pesäkkeen päälle. Katalaasi hajottaa vetyperoksidia vedeksi ja hapeksi, joten kuplien muodostuminen viittaa positiiviseen tulokseen.

Mikrobiologiset ja biokemialliset menetelmät ovat helppoja ja edullisia ottaa käyttöön, niillä voidaan arvioida antibioottiherkkyttä, ja niillä on korkea spesifisyys. Menetelmät ovat kuitenkin hitaita, sillä ne vaativat muutaman päivän kasvatuksen, ja pneumokokin autolyysitaipumus kasvun stationäärivaiheessa aiheuttaa lisähaasteita. Menetelmät eivät myöskään pysty erottamaan pneumokokkia *S. pseudopneumoniaesta* (Wessels ja muut 2012).

4.2 Immunologiset menetelmät

4.2.1 Quellung-reaktio ja lateksiagglutinaatio-menetelmä

Quellung-reaktiota pidetään serotyypityksen kultaisena standardina. Quellung-reaktio parantaa PS:n näkyvyyttä mikroskoopin alla. Reaktiossa käytetään jäniksen seerumivalmisteita, joissa on serotyypeille spesifisiä vasta-aineita. Positiivisessa Quellung-reaktiossa vasta-aineet sitoutuvat PS:ään, kasvattaen sen kokoa (Kuva 3). Kapseli on siten helpommin havaittavissa mikroskoopin avulla. On myös ”omniseerumia”, joka reagoi kaikkien tunnettujen serotyyppien kanssa. Testin herkkyys ja spesifisyys ovat 99,3 % ja 74,4 % vastaavasti. (Richter ja muut 2008; Varghese ja muut 2017).



Kuva 3. Positiivinen *Quellung*-reaktio. Mikroskooppikuva pareittain esiintyvistä pneumokokeista. Serotyypispesifiset vasta-aineet ovat sitoutuneet neljän alimman parin polysakkaridikapseleihin, muodostaen paksuja kehiä. (CDC 1954).

Quellung-reaktio on kuitenkin kallis, ja vaatii mikroskopiaan koulutetun henkilön (Sadowy ja Hryniewicz 2020). Tästä syystä Statens Serum Institut on kehittänyt lateksiagglutinaatiomenetelmän (Ramirez ja muut 2015). Menetelmässä lateksisia mikrohelmiä pinnoitetaan serotyypispesifisillä vasta-aineilla, ja sekoitetaan potilasnäytteeseen. Positiivisessa reaktiossa havaitaan helmien agglutinaatiota. Tällöin näytteessä on testattavan serotyypin antigeenejä. Lateksiagglutinaatiomenetelmän suoritus ei vaadi mikroskopiaan koulutettua henkilöä, mutta ristireagointi muiden samankaltaisten serotyyppien antigeenien kanssa on mahdollista, mikä voi vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Menetelmän herkkyys ja spesifisyys ovat verrattavissa Quellung-reaktion suorituskykyyn. (Arai ja muut 2001; Wanger ja muut 2017).

4.2.2 Virtsan C-polysakkaridiantigeeni

Virtsan antigeenitestit perustuvat pneumokokin soluseinän C-PS-antigeenin tunnistukseen vasta-aineilla. Yleisin näistä on immunokromatografinen membraanitesti (BinaxNow, Abbott, USA), joka oli ensimmäinen FDA:n hyväksymä virtsan antigeenitesti vuonna 1999. Virtsan C-PS-testit ovat edullisia ja nopeita, maksaen noin \$17–30 USD per testi, ja antaen tulokset 15 minuutissa. Näytteenkeruu ei myöskään vaadi kajoavia toimenpiteitä. Virtsan antigeenitesteillä on yli 90 % spesifisyys, mutta vain alle 80 % herkkyys, minkä vuoksi niitä tulisi käyttää muiden testien tukena. Vääriä positiivisia tuloksia voi esiintyä, mikäli potilaalla on ollut keuhkokuume viimeisen kolmen kuukauden aikana, hän on saanut pneumokokkirokotteen viimeisen 48 tunnin aikana, lapsipotilaalla on kroonisia hengitysteiden sairauksia, on kuumeinen, tai oireeton kantaja.

Testeillä on siis rajallinen sovellettavuus lasten infektioiden diagnostiikassa. (Ampofo ja Byington 2018; Kim ja muut 2022).

4.3 Molekulaariset menetelmät

4.3.1 MALDI-TOF-massaspektrometria

MALDI-TOF-analyysillä saadaan massaspektri bakteerin proteiineista ja peptideistä, jota bakteerien tunnistuksessa kutsutaan peptidimassasormenjäljeksi (engl. peptide mass fingerprint). Eri mikro-organismeilla on eri m/z sormenjälkiä, ja tuntemattomat mikro-organismit voidaan tunnistaa referenssikirjaston sormenjälkien avulla. Werno ja muut (2012) vertasivat mitis-ryhmän peptidisormenjälkiä, ja havaitsivat, että *S. pneumoniae* antaa toistuvasti piikit 2937,5 m/z ja 5877 m/z ilman piikkejä m/z 2625, 2911, 5253, 5824 ja 6955. Näiden piikkien avulla pneumokokki voidaan erottaa muista *mitis*-ryhmän streptokokeista. Tulokset tulisi kuitenkin validoida suurilla näytemäärillä. (Singhal ja muut 2015).

MALDI-TOF on nopea, tarkka ja halvempi tunnistusmenetelmä kuin monet molekulaariset ja immunologiset menetelmät, eikä sen käyttö vaadi erityiskoulutusta. Menetelmä vaatii kuitenkin kalliin laitteiston, ja voi siksi olla epäkäytännöllinen, jos laboratoriollla ei ole sitä käytössään. (Singhal ja muut 2015). Diagnostisissa laboratorioissa on usein jo soveltuva laitteisto (Varghese ja muut 2017).

4.3.2 Monopleksiset PCR-menetelmät

Monopleksisellä PCR-menetelmällä tarkoitetaan erilaisiin PCR-menetelmiin perustuvia määrityksiä, jotka tunnistavat pneumokokin hyödyntäen yhtä geneettistä kohdesekvenssiä. Pneumokokki tunnistetaan tutkimalla PS:n synteesiä ohjaavia geenejä, jotka sijaitsevat *cps*-lokuksessa. Yksi merkittävimmistä kohdesekvensseistä on *lytA*-geeni, joka koodaa streptokokin oman soluseinän lyysistä aiheuttavaa autolysiiniä. Center of Disease Control and Prevention, eli CDC on kehittänyt *lytA*-geeniin perustuvan qPCR-menetelmän, jota on pidetty kultaisena standardina bakteeriviljelystä riippumattomassa pneumokokin tunnistuksessa. qPCR-menetelmässä haluttu sekvenssi amplifoidaan bakteerin DNA:lta sopivilla alukkeilla ja DNA-polymeraasilla, sekä deoksinukleosiditriposfaateilla (dNTP). Koettimina käytetään leimattuja fluoroforeja, joiden lähelle on sidottu fluoresenssin vaimentavia yhdisteitä. *lytA* -geeni on löydetty muista streptokokeista, ja siksi pelkästään *lytA*-geeniä hyödyntävä qPCR ei sovellu kliiniseen käyttöön (CDC 2021; Varghese ja muut 2017).

qPCR-menetelmien etu on niiden herkkyys. Ne ovat herkempiä kuin mikrobiologiset menetelmät erityisesti bakteremisen keuhkokuumeen tunnistuksessa. Ne ovat myös nopeita ja hyvin spesifisiä, mikäli kohdesekvenssi on valittu hyvin. Lisäksi menetelmällä voidaan tunnistaa useita eri bakteereja samanaikaisesti, ja se voidaan toteuttaa suljetun putken systeeminä, jolloin kontaminaatoriski on pieni. (Ampofo ja Byington 2018; Carvalho ja muut 2007; Singhal ja muut 2015).

4.3.3 Multipleksiset PCR-menetelmät

Spesifisyyttä voidaan parantaa kehittämällä multipleksisiä qPCR-menetelmiä, joissa hyödynnetään useampaa kohdesekvenssiä. Wessels ja muut (2012) hyödynsivät *Spn9802*- ja *lytA*-geenejä (Taulukko 1). *Spn9802*-geeni koodaa proteiinia, joka on spesifinen pneumokokille, mutta sen funktiota ei tunneta (Suzuki ja muut 2005). Geenillä voitiin erottaa pneumokokki ja *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* sekä ja *S. oralis*. *lytA*-geenillä voitiin tunnistaa vain pneumokokin referenssikannat. Näitä tuloksia verrattiin sappisuolaliukoisuustestin, optokiiniherkkyystestin ja MALDI-TOF-massaspektrometrian tuloksiin. Multipleksinen qPCR suoritui näistä parhaiten. Menetelmällä ei kuitenkaan voida erottaa pneumokokkia ja *S. pseudopneumoniae* toisistaan.

Multipleksisillä qPCR-menetelmillä voidaan myös määrittää pneumokokin serotyyppi amplifioimalla serotyypispesifisiä *cps*-geenejä. Brito ja muut (2003) kehittivät seitsemän multipleksistä qPCR-menetelmää 1-, 3-, 4-, 6B-, 14-, 18C-, 19F- ja 23F -serotyyppien tunnistukseen, hyödyntäen tällaisia geenejä (Taulukko 1). He tutkivat niillä 446 isolaattia lasten nenänielunäytteistä, ja vertasivat tuloksia immunologisen kapselireaktion antamiin tuloksiin. Kaikki qPCR-menetelmien tulokset vastasivat immunologisen menetelmän tuloksia. Menetelmillä ei kuitenkaan pystytty erottamaan 6A- ja 6B-, eikä 18B- ja 18C-serotyyppisiä toisistaan.

qPCR-serotyypitys on halvempaa ja nopeampaa kuin immunologisten menetelmien käyttö, eikä tulosten tulkintaan liity subjektiivisuutta. qPCR-serotyypitys on erityisen hyödyllinen kapselittomille isolaateille, joita ei voi tunnistaa immunologisilla menetelmillä (Brito ja muut 2003; Ramirez ja muut 2015).

4.3.4 Sekvensointi

Sekvensaatioon perustuvan bakteerintunnistuksen kultainen standardi on 16S rRNA sekvensointi. Se soveltuu hyvin bakteerien tunnistukseen, koska sen sekvenssi sisältää

useita korkean vaihtelevuuden alueita, joiden yhteenlaskettu pituus on noin 1500 emäsparia. Pneumokokille spesifinen piirre on sytosiini positiossa 203, jossa *mitis*-ryhmän streptokokeilla on adenosiini. Yoo ja muut (2020) vertasivat 16S rRNA:n Sanger sekvensoinnin ja bakteeriviljelyn tuloksia. 92 % tapauksista bakteeriviljely ja 16S rRNA-sekvensointi antoivat yhdenpitävät tulokset. Sekvensoinnin ja viljelyn yhteinen diagnostinen saanto oli noin 11,2 %, kun pelkän bakteeriviljelyn saanto oli 6,1 %. (Scholz ja muut 2012; Singhal ja muut 2015).

Sekvensointimenetelmän merkittävin heikkous on, että pneumokokin ja *mitis*-ryhmän sekvenssihomologisuus on yli 99 %. Sekvensointi voi myös olla kallista, sen suorittaminen vaatii koulutetun laborantin, ja tulosten tulkintaan tarvitaan sopiva ohjelmisto. Pneumokokin tunnistusta 16S rRNA -sekvensoinnilla on pidetty epäsojivana kliiniseen rutiinikäyttöön näistä syistä. (Kawamura ja muut 1995; Singhal ja muut 2015).

Mitis-ryhmän korkean sekvenssihomologian käsittelemiseksi on esitetty monilokus sekvenssityypitystä (engl. Multilocus Sequence Typing, MLST). Menetelmä perustuu useaan housekeeping-geenin PCR-amplifikaatioon, sekvensointiin ja sekvenssivariaatioiden analyysiin. Jokaiselle alleelille annetaan oma koodi, ja näiden koodien yhdistelmä muodostaa isolaatin sekvenssityypin, josta rakennetaan fylogeneettinen puu (Ing ja muut 2012). Sekvenssityyppejä verrataan kansainvälisen MLST-tietokannan tietoihin (PubMLST 2024). Pneumokokin tunnistuksessa käytetään kuusi tai seisemän geeniä: *ddl*, *spi*, *recP*, *aroE*, *gdh*, *gki* ja *xpt*. Näiden geenien avulla voidaan tunnistaa pneumokokki serotyypin- ja kantatasolla. (Enright ja Spratt 1998).

MLST:n edut ovat mahdollisuus verrata eri laboratorioiden välisiä tuloksia, helppo käyttöönotto, skaalattavuus ja hyvä resoluutio. Sitä voidaan käyttää myös antibioottiresistenssin määrittämiseen ja epidemiologiin tutkimuksiin. Menetelmä on kuitenkin kallis ja vaatii viljelyn. Hyvin konservoituneet housekeeping-geenit voivat myös vaikeuttaa kantatason erottelua, jolloin voidaan käyttää koko genomien sekvensoinnin (engl. Whole Genome Sequencing, WGS) dataa ja analysoida virulenssia ohjaavia genejä (Multi-Virulence-Locus Sequence Typing, MVLST). Tämä kuitenkin lisää kustannuksia, ja siksi MLST soveltuu parhaiten epätyypillisten pneumokokkien, kuten optokiini-resistenttien ja kapselittomien kantojen tunnistukseen. (Hanage ja muut 2006; Ing ja muut 2012).

5 Yhteenveto

Pneumokokin tarkka tunnistus on tunnetusti haastavaa, johtuen sen korkeasta sekvenssihomologiasta lähisukulaisensa kanssa, sekä sen vahvasta kyvystä kehittyä transformaation avulla. Silti diagnostisten menetelmien kuuluisi erottaa pneumokokit *mitis*-ryhmän lähisukulaisista, sekä näytteen ei-patogeenisista mikrobeista. Lisäksi tarvitaan tarkkoja ja nopeita menetelmiä, joilla voidaan määrittää pneumokokkien serotyypit, kannat ja antibioottiresistenssit. (Varghese ja muut 2017).

Perinteiset bakteeriviljelymenetelmät, kuten optokiiniherkkyys ja sappisuolaliukoisuus, ovat edelleen lajitason tunnistuksen kultainen standardi, mutta niiden keskeisimmät haasteet ovat niiden hitaus, häiriöherkkyys ja epäspesifisyys (Wessels ja muut 2012). Näihin haasteisiin on pyritty vastaamaan molekulaarisilla tunnistusmenetelmillä. Niitä voidaan käyttää sekä isolaattien, että näytteessä olevien bakteerien tunnistukseen ja serotyypitykseen. Yksi tällainen testi on virtsan C-PS-testi, jolla on hyvä spesifisyys, mutta heikko herkkyys ja korkea väärin positiivisten tulosten suhde lapsipotilaiden infektiodiagnostiikassa (Bennett ja muut 2020). MALDI-TOF olisi nopea ja helppo työkalu, mutta sen käyttö vaatii validointia suuremmilla näytemäärillä (Werno ja muut 2012). Lisäksi on kehitetty erilaisia PCR menetelmiä, kuten *lytA*- ja *Spn9802*-geenejä hyödyntävä qPCR. Kyseisten geenikohteiden spesifisyys on osoittautunut puutteelliseksi, mutta menetelmä on silti nopeampi kuin mikrobiologiset menetelmät, ja sillä voidaan suorittaa serotyypitys, sekä tunnistaa piirteiltään epätyypillisiä pneumokokkeja (Varghese ja muut 2017). Myöskään 16S rRNA-geenin sekvenssianalyysi ei ole riittävän luotettava tunnistusmenetelmä *mitis*-ryhmän korkean sekvenssihomologian vuoksi (Kawamura ja muut 1995). MLST-menetelmällä voidaan käsitellä tätä homologiaa paremmin, ja tunnistaa isolaatit jopa kantatasolla, mutta sen korkea hinta rajoittaa sen sovellusmahdollisuuksia (Hanage ja muut 2006). Pneumokokin serotyypityksen kultainen standardi on Quellung-reaktio, joka on kallis ja vaati erityskoulutusta. Vaihtoehtoinen lateksiagglutinaatiomenetelmä on halvempi, ja herkkyydeltään ja spesifisyydeltään verrattavissa Quellung-reaktioon, ilman tulosten tulkinnanvaraisuutta (Ramirez ja muut 2015). Nämä menetelmät perustuvat kapselireaktioon, minkä vuoksi ne eivät sovellu kapselittomien serotyyppien tunnistukseen, toisin kuin qPCR-serotyypitys.

Kaikilla käsitellyillä diagnostisilla menetelmillä on siis vahvuuksia ja heikkouksia, ja siksi parhaat tunnistusmenetelmät saadaan yhdistämällä yksi tai useampi kultaisen standardin menetelmä johonkin molekulaariseen menetelmään. Lajitason, serotyypitason ja kantatason diagnostisia menetelmiä tarvitaan hoitoa, rokotekehitystä ja epidemiologisia tutkimuksia varten. Menetelmien tulisi olla tarkkoja ja nopeita, jotta voidaan valita sopivat antibiootit, ehkäistä resistenssin kehittymistä, sekä minimoida hoidon sivuvaikutukset ja parantaa potilaiden selviytymismahdollisuuksia. Infektioita halutaan myös ennaltaehkäistä kehittämällä rokotteita, jotka sisältävät suojan populaatiossa laajasti esiintyville serotyypeille. Tarkoille ja luotettaville pneumokokin diagnostisille testeille on siis suuri tarve, ja siksi nykyisiä testejä tulisi kehittää keskeisten ongelmien ylitsepääsemiseksi. Pneumokokin vilkkaan geeninvaihdoksen takia niiden spesifisyyttä täytyy myös arvioida jatkuvasti.

Lähteet

- Ampofo, K. & Byington, C. L. (2018) Streptococcus pneumoniae. Teoksessa S. S. Long, C. G. Prober, & M. Fischer (Toim.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (5. p., ss. 737–746). Elsevier.
- Arai, S., Konda, T., Wada, A., Matsunaga, Y., Okabe, N., Watanabe, H. & Inouye, S. (2001) Use of Antiserum-Coated Latex Particles for Serotyping Streptococcus pneumoniae. *Microbiology and Immunology* **45**:159–162.
- Arbique, J. C., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Quesne, G., Carvalho, M. da G. S., Steigerwalt, A. G., ... Facklam, R. R. (2004) Accuracy of Phenotypic and Genotypic Testing for Identification of Streptococcus pneumoniae and Description of Streptococcus pseudopneumoniae sp. Nov. *J Clin Microbiol* **42**:4686–4696.
- Bennett, Dolin, Raphael, & Blaser, Martin J. (2020) *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. (9. p.). Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier.
- Bogaert, D., de Groot, R. & Hermans, P. (2004) Streptococcus pneumoniae colonisation: The key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases* **4**:144–154.
- Brito, D. A., Ramirez, M. & Lencastre, H. de (2003) Serotyping Streptococcus pneumoniae by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **41**:2378–2384.
- Carvalho, M. da G. S., Tondella, M. L., McCaustland, K., Weidlich, L., McGee, L., Mayer, L. W., ... Sampson, J. S. (2007) Evaluation and Improvement of Real-Time PCR Assays Targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* Genes for Detection of Pneumococcal DNA. *Journal of Clinical Microbiology* **45**:2460–2466.
- CDC (1954) ID: 2113—Public Health Image Library(PHIL). <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=2113> (Luettu 26.11.2023)
- CDC (2021) Pneumococcus Streptococcus Lab Resources and Protocols. <https://www.cdc.gov/streplab/pneumococcus/resources.html> (Luettu 5.10.2023)
- Enright, M. C. & Spratt, B. G. (1998) A multilocus sequence typing scheme for Streptococcus pneumoniae: Identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* **144**:3049–3060.
- Hanage, W. P., Fraser, C. & Spratt, B. G. (2006) Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **361**:1917–1927.
- Ing, J., Mason, E. O., Kaplan, S. L., Lamberth, L. B., Revell, P. A., Luna, R. A. & Hulten, K. G. (2012) Characterization of Nontypeable and Atypical Streptococcus pneumoniae Pediatric Isolates from 1994 to 2010. *Journal of Clinical Microbiology* **50**:1326–1330.
- Kalin, M. (1998) Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. *Thorax* **53**:159–162.

- Kawamura, Y., Hou, X. G., Sultana, F., Miura, H. & Ezaki, T. (1995) Determination of 16S rRNA Sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and Phylogenetic Relationships among Members of the Genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **45**:406–408.
- Kim, P., Deshpande, A. & Rothberg, M. B. (2022) Urinary Antigen Testing for Respiratory Infections: Current Perspectives on Utility and Limitations. *IDR* **15**:2219–2228.
- Palmu, A. A., Toropainen, M., Kaijalainen, T., Siira, L., Lahdenkari, M., Nieminen, H., ... Jokinen, J. (2017) Direct and Indirect Effectiveness of the 10-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Against Carriage in a Cluster Randomized Trial. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **36**:1193–1200.
- Paton, J. C. & Trappetti, C. (2019) *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharide. *Microbiology Spectrum* **7**.
- PubMLST (2024) *Streptococcus pneumoniae*.
<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pneumoniae> (Luettu 5.4.2024)
- Ramirez, M., Carriço, J. A., van der Linden, M. & Melo-Cristino, J. (2015) Molecular Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. Teoksessa J. Brown, S. Hammerschmidt, & C. Orihuela (Toim.), *Streptococcus Pneumoniae* (ss. 3–19). Amsterdam: Academic Press.
- Reller, L. B., Weinstein, M. P., Werno, A. M. & Murdoch, D. R. (2008) Laboratory Diagnosis of Invasive Pneumococcal Disease. *Clinical Infectious Diseases* **46**:926–932.
- Richter, S. S., Heilmann, K. P., Dohrn, C. L., Riahi, F., Beekmann, S. E. & Doern, G. V. (2008) Accuracy of Phenotypic Methods for Identification of *Streptococcus pneumoniae* Isolates Included in Surveillance Programs. *J Clin Microbiol* **46**:2184–2188.
- Sadowy, E. & Hryniewicz, W. (2020) Identification of *Streptococcus pneumoniae* and other Mitis streptococci: Importance of molecular methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **39**:2247–2256.
- Scholz, C. F. P., Poulsen, K. & Kilian, M. (2012) Novel Molecular Method for Identification of *Streptococcus pneumoniae* Applicable to Clinical Microbiology and 16S rRNA Sequence-Based Microbiome Studies. *J Clin Microbiol* **50**:1968–1973.
- Selva, L., del Amo, E., Brotons, P. & Muñoz-Almagro, C. (2012) Rapid and Easy Identification of Capsular Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by Use of Fragment Analysis by Automated Fluorescence-Based Capillary Electrophoresis. *J Clin Microbiol* **50**:3451–3457.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. & Viridi, J. S. (2015) MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* **6**:791.
- Suzuki, N., Seki, M., Nakano, Y., Kiyoura, Y., Maeno, M. & Yamashita, Y. (2005) Discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from viridans group streptococci by genomic subtractive hybridization. *J Clin Microbiol* **43**:4528–4534.

THL (2023a) Vakavan pneumokokkitaudin (IPD) ilmaantuvuus Suomessa serotyypin- ja ikäryhmittäin. <https://thl.fi/fi/tutkimus-ja-kehittaminen/tutkimukset-ja-hankkeet/pneumokokkikonjugaattirokotteen-vaikuttavuuden-arviointi/vakavan-pneumokokkitaudin-ipd-ilmaantuvuus-suomessa-serotyypin-ja-ikaryhmittain> (Luettu 13.9.2023)

THL (2023b) Pneumokokin esiintyvyys Suomessa. <https://thl.fi/aiheet/infektioaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/pneumokokki/pneumokokin-esiintyvyys-suomessa> (Luettu 3.4.2024)

van der Poll, T. & Opal, S. M. (2009) Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *The Lancet* **374**:1543–1556.

Varghese, R., Jayaraman, R. & Veeraraghavan, B. (2017) Current challenges in the accurate identification of *Streptococcus pneumoniae* and its serogroups/serotypes in the vaccine era. *J Microbiol Methods* **141**:48–54.

Vollmer, W., Massidda, O. & Tomasz, A. (2019) The Cell Wall of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology Spectrum* **7**.

Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S. P., Wahed, A., Actor, J. K. & Dasgupta, A. (2017) Antigen and Antibody Testing. Teoksessa A. Wanger, V. Chavez, R. S. P. Huang, A. Wahed, J. K. Actor, & A. Dasgupta (Toim.), *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology* (ss. 221–232). Elsevier.

Weiser, J. N., Ferreira, D. M. & Paton, J. C. (2018) *Streptococcus pneumoniae*: Transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol* **16**:355–367.

Werno, A. M., Christner, M., Anderson, T. P. & Murdoch, D. R. (2012) Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from Nonpneumococcal *Streptococci* of the *Streptococcus mitis* Group by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **50**:2863–2867.

Wessels, E., Schelfaut, J. J. G., Bernards, A. T. & Claas, E. C. J. (2012) Evaluation of Several Biochemical and Molecular Techniques for Identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pseudopneumoniae* and Their Detection in Respiratory Samples. *J Clin Microbiol* **50**:1171–1177.

Yoo, I. Y., Kang, O. K., Lee, M. K., Kim, Y. J., Cho, S. Y., Huh, K., ... Lee, N. Y. (2020) Comparison of 16S Ribosomal RNA Targeted Sequencing and Culture for Bacterial Identification in Normally Sterile Body Fluid Samples: Report of a 10-Year Clinical Laboratory Review. *Ann Lab Med* **40**:63–67.