

Opinnäytetyö AMK

Bioanalytiikan koulutusohjelma

2020

Oona Krautsuk, Tuomas Lindqvist

KAHDEN ERI VALMISTAJAN NÄYTEPUTKEN VERTAILU KAHDEKSALLA BAKTEERIKANNALLA

OPINNÄYTETYÖ AMK| TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikan koulutusohjelma

2020 | 35 sivua

Oona Krautsuk, Tuomas Lindqvist

KAHDEN ERI VALMISTAJAN NÄYTEPUTKEN VERTAILU KAHDEKSALLA BAKTEERIKANNALLA

Mikrobien ominaisuudet kärsivät helposti elimistön ulkopuolelle jouduttuaan, koska niiden otolliset elinolosuhteet muuttuvat radikaalisti lämpötilan vaihtelun ja kuivuuden myötä. Oikeanlaisen hoidon ja diagnoosin kannalta potilasnäytteistä on tärkeää löytää kliinisesti merkittävät taudinaiheuttajat ja saada ne säilytettyä mahdollisimman elinkykyisinä kehon ulkopuolella analyysin suorittavaan laboratorioon asti. Kuljetukseen ja lyhytaikaiseen säilytykseen käytetään erilaisia näyte- tai kuljetusputkia, joiden tarkoituksena on turvata taudinaiheuttajien elinkyky mahdollisimman samanlaisena, kuin se ihmiskehossa on esiintynyt näytteenottohetkellä. Tässä työssä vertailtiin kahta eri anaerobibakteerien kuljettamiseen suunniteltua näyteputkea toisiinsa. Tutkimuksessa käytetyt näyteputket olivat Becton Dickinsonin Port-a-cul-näyteputki ja Turun yliopistollisen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratoriossa nykyisin käytössä oleva BioMérieux'n Portagerm-näyteputki. Tutkimuksessa käydyt bakteerikannat olivat ATCC-kontrollikannat *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Clostridium perfringens*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus anginosus*, sekä *Bacteroides thetaiotaomicron*. Tavoitteena oli tuottaa raportti Yliopistollisen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian osastolle siitä, kumpi näyteputki säilyttää tutkittavat bakteerit elinkykyisinä pisimpään. Tämän lisäksi osasto sai käytännön käyttökokemusta täysin uudesta näyteputkesta, Port-A-Cul:ista. Tutkimuksen tulokseksi saatiin vaihtelevaa dataa, mutta laskennallisesti vertailussa paremmaksi näyteputkeksi osoittautui BioMérieux'n Portagerm-näyteputki. Bakteerien säilyvyys riippui pitkälti ulkoisista tekijöistä, kuten lämpötilasta ja säilytysajasta.

ASIASANAT:

Bakteeri, näyteputki, säilytys, näyte

BACHELOR'S | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Laboratory Science

2020 | 35 pages

Oona Krautsuk, Tuomas Lindqvist

COMPARING SAMPLETUBES FROM TWO DIFFERENT MANUFACTURERS WITH EIGHT STRAINS OF BACTERIA

The properties of microbes easily suffer when they get outside the body because their favorable living conditions change radically with temperature fluctuations and drought. From the point of view of proper treatment and diagnosis, it is important to find clinically significant pathogens in patient samples and to keep them as viable as possible outside the body until in the laboratory performing the analysis. Various sampletubes are used for transport and short-term storage in order to ensure the viability of the pathogens as similar as possible to the human body at the time of sampling. In this work, two sampletubes designed to transport different anaerobic bacteria were compared with each other. The sampletubes used in the study were the Becton Dickinson Port-a-cul sampletube and the BioMérieux Portagerm sampletube currently in use at the Clinical Microbiology Laboratory of Turku University Central Hospital. The bacterial strains used in the study were ATCC control strains *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Clostridium perfringens*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus anginosus*, and *Bacteroides thetaiotaomicron*. The aim was to produce a report to the Department of Clinical Microbiology of the University Central Hospital on which bacterial sampletube would keep the bacteria under study viable for the longest time. In addition, the department gained hands-on experience with a completely new sampletube, Port-A-Cul. The study resulted in variable data, but BioMérieux's Portagerm transport container proved to be a better sampletube in comparison. Bacterial survival depended largely on external factors such as temperature and shelf life.

KEYWORDS:

Bacteria, sampletube, storage, sample

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT	7
2.1 Bakteerit	Virhe. Kirjanmerkkiä ei ole määritetty.
2.1.1 Haemofilus influenzae	9
2.1.2 Streptococcus pneumoniae	9
2.1.3 Fusobacterium nucleatum	10
2.1.4 Porphyromonas gingivalis	10
2.1.5 Clostridium perfringes	11
2.1.6 Prevotella melaninogenica	11
2.1.7 Streptococcus anginosus	11
2.1.8 Bacteroides thetaiotaomicron	12
2.2 Mikrobiologiset näytteet	12
2.2.1 Pu-BaktVi 1, (anaerobi + aerobiviljely, syvämärkä)	13
2.2.2 Punktionäytteet	13
2.3 Viljely	13
2.4 Aikaisemmat tutkimukset ja taustaa	14
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET	16
4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	VIRHE. KIRJANMERKKIÄ EI OLE MÄÄRITETTY.
4.1 Opinnäytetyön toteutus	17
4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	21
4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	22

5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	23
5.1 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	23
5.2 <i>Clostridium Perfringens</i>	24
5.3 <i>Prevotella melaninogenica</i>	25
5.4 <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	26
5.5 <i>Haemophilus influenzae</i>	28
5.6 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	29
5.7 <i>Streptococcus anginosus</i>	30
6 POHDINTAA	31
LÄHTEET	33

TAULUKOT

Taulukko 1. Bakterit, kontrollikantatunnukset, inkubointiajat ja lukuajankohdat	17
Taulukko 2. Työn suoritusjärjestys; minä päivänä kukin kanta on viljelty ja luettu	20

KUVIOT

Kuvio 1. Suunnitelma laimennosten valmistamiseksi	19
Kuvio 2. Laimennoksen viljely aikapisteiden mukaan ja inkubointiajat	19
Kuvio 3. <i>Fusobacterium nucleatum</i> 2 vrk inkubaatio	23
Kuvio 4. <i>Fusobacterium nucleatum</i> 4 vrk inkubaatio	24
Kuvio 5. <i>Clostridium Perfringens</i> 2 vrk inkubaatio	24
Kuvio 6. <i>Clostridium Perfringens</i> 2 vrk inkubaatio	25
Kuvio 7. <i>Prevotella melaninogenica</i> 2 vrk inkubaatio	25
Kuvio 8. <i>Prevotella melaninogenica</i> 4 vrk inkubaatio	26
Kuvio 9. <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 2 vrk inkubaatio	27
Kuvio 10. <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 4 vrk inkubaatio	27
Kuvio 11. <i>Haemophilus influenzae</i> 1 vrk inkubaatio	28
Kuvio 12. <i>Haemophilus influenzae</i> 2 vrk inkubaatio	28
Kuvio 13. <i>Streptococcus pneumoniae</i> 1 vrk inkubaatio	29
Kuvio 14. <i>Streptococcus pneumoniae</i> 2 vrk inkubaatio	29
Kuvio 15. <i>Streptococcus anginosus</i> 1 vrk inkubaatio	30
Kuvio 16. <i>Streptococcus anginosus</i> 2 vrk inkubaatio	30

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys
FAA	Fastidious Anaerobic Agar (Jousimies-Somer 2002)
Kokkobasilli	Bakteeri, joka on muodoltaan hyvin lyhyt sauva. Sekoittuu helposti kokkibakteeriin (Tankeshwar 2016)

1 JOHDANTO

Potilaan hoidon kannalta on tärkeää, että otetusta näytteestä saadut mikrobit säilyvät samankaltaisina, kuin ne ovat näytteenottohetkellä. Mikrobin säilyvyys on täten suoraan verrannollinen potilaan diagnoosiin ja diagnoosin jälkeiseen hoitoon. Mikrobin optimaalisessa elinympäristössä tulisi olla sopiva määrä lämpöä, kosteutta, ravintoa, happea ja happamuutta. Ihmiskeho on mikrobeille olosuhteiltaan varsin optimaalinen kasvualusta, ja elimistön ulkopuolelle jouduttuaan ne kärsivät helposti mm. lämpötilanvaihtelun ja kuivuuden takia. Näytteenoton ongelmana on näytteenottoaikojen ja laboratorioden pitkät välimatkat ja tämän vuoksi pitkät säilytysajat, jolloin näyteputkella on suuri merkitys säilyvyyden kannalta. (Jousimies-Somer & al. 2002.)

Tässä opinnäytetyössä vertailun kohteena on Tyksissä käytössä oleva Portagerm-anaerobinäyteputkea, jossa kuljetetaan neulalla ja ruiskulla otettavat märkänäytteet esimerkiksi abskessista, vatsaontelosta, pleuraontelosta ja nivelnesteestä. Näyteputkien tarkoituksena on säilyttää mikrobit elinkykyisinä siihen asti, että ne käsitellään laboratoriossa. (TYKS laboratoriot 2018.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla bakteerien (sekä aerobisten että anaerobisten) säilymistä elinkykyisinä Becton Dickinsonin Port-a-cul-näyteputkessa ja Turun yliopistollisen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratoriossa (myöhemmin laboratorio) nykyisin käytössä olevassa BioMérieux'n Portagerm-näyteputkessa. Näitä pulloja käytetään nestemäisten syvämärkäbakteeriviljelynäytteiden (Pu-BaktVi1) säilytykseen ja kuljetukseen. Tällaisia näytteitä ovat esim. abskessimärkä ja erilaiset punktio-nesteet ja kyseisiä näytteitä tulee laboratorioon erityisesti leikkaussaleista.

Tässä opinnäytetyössä tutkimuksen tarkoitus on selvittää kumpi verrattavista näyteputkista säilyttää tutkittavat mikrobit paremmin elinkykyisinä ajallisesti ja määrällisesti. Tavoitteena on antaa laboratoriolle vertailukelpoista tietoa kuljetusastioista, jota osasto voi käyttää hyödyksi tulevaisuudessa näyteputkien kilpailutuksissa.

2 TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT

2.1 Bakteerit

Bakteerit ovat yksisoluisia organismeja, prokaryootteja. Prokaryooteilla ei ole varsinaista tumaa, vaan niiden perintöaines, DNA on kiinnittyneenä bakteerien solukalvorakenteisiin. Niitä puuttuvat tumalliselle solulle tärkeät soluelimet, kuten mitokondriot, kloroplastit ja golgin laite. Bakteerit jaetaan soluseinän rakenteen perusteella gram-negatiivisiin ja gram-positiivisiin lajeihin. Bakteerit jaetaan myös muodon perusteella erilaisiin ryhmiin. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2012.)

Lisäksi bakteerit voidaan jakaa hapentarpeensa perusteella anaerobeihin ja aerobeihin. Anaerobeilla tarkoitetaan sellaisia bakteerija jotka kykenevät elämään ja lisääntymään hapettomissa olosuhteissa ja aerobeilla puolestaan tarkoitetaan sellaisia bakteereita, jotka tarvitsevat happea elääkseen ja lisääntyäkseen. Edellä mainittu jaottelu on varsin karkea. Hapentarpeen perusteella bakteerit jaotellaan tarkemmin seuraavasti; bakteerit, jotka tarvitsevat ehdottomasti happea elääkseen ovat obligatorisesti aerobeja. Ne bakteerit, jolle happi on toksista, eli eivät siedä happea lainkaan, kutsutaan obligatorisesti anaerobeiksi. Bakteereja, jotka pystyvät sopeutumaan hapelliseen ja hapettomaan elinympäristöön kutsutaan fakultatiivisesti aerobeiksi ja anaerobeiksi. Mikroaerofiiliset bakteerit puolestaan pystyvät elämään pienissä happipitoisuuksissa, mutta eivät kestä normaalia happipitoisuutta. Kapnofiiliseksi bakteereiksi kutsutaan sellaisia bakteereita, jotka tarvitsevat elääkseen 10% hiilidioksidipitoisuuden ilmaan. (Rehn, Kuusela & Vaara 2010; Koneman ym. 2016.)

Ihmisellä kuuluu normaalimikrobistoon, eli normaaliflooraan lukuisia bakteerilajeja, jotka eivät aiheuta tautia, eli ovat apatogeenisiä. Tällaiset mikrobit ovat ihmisen elintoimintojen kannalta välttämättömiä ja tuottavat isännälleen elintoimintojen kannalta tärkeitä yhdisteitä tai esimerkiksi suojaa. Ihmisellä normaalia bakteeristoa on esimerkiksi iholla, ruuansulatuskanavassa ja genitaalialueilla. (Rehn, Kuusela & Sarvas 2010.)

Tautia aiheuttavat, eli patogeeniset bakteerit nimensä mukaisesti aiheuttavat infektioita ja tuhoavat kudosta. Pystyäkseen infektoimaan ja lisääntymään isännässä, täytyy bakteerin omata tekijöitä, jotka edesauttavat sen kasvua ja lisääntymistä. Näitä ominaisuuksia kutsutaan virulenssitekijöiksi. Aiheuttaakseen tautia tulee bakteerien pystyä kolonisoimaan, väistää elimistön suojamekanismit, tunkeutua kudoksiin ja aiheuttaa vauriota

kudoksessa tuhoamalla ympäröiviä soluja. Jotta bakteerilla olisi riittävä taudinaiheuttamiskyky, tulee bakteerilla olla sopiva yhdistelmä kyseisiä virulenssitekijöitä. Näiden virulenssitekijöiden tutkimus muodostaa merkittävän osan lääketieteellisen mikrobiologian perustutkimuksesta. (Rehn, Kuusela & Vaara 2010.)

2.1.1 Haemophilus influenzae

H.influenzae on gramnegatiivinen kokkobasilli, jonka rakenne on kapselillinen tai kapseliton. Bakteerin taudinaiheuttamiskyky määräytyy pitkälti sen rakenteen mukaan. Kapselittomat H.Influenzae-bakteerit aiheuttavat mm. korvatulehdusta, keuhkoputkentulehdusta, sidekalvotulehdusta ja keuhkokuumetta. Nämä infektiot ovat yleisiä ja harvoin henkeä uhkaavia. Kapselillisilla bakteereilla on pinnallaan polysakkaridikerros ja se suojaa bakteeria mm. vasta-aineilta. Näin ollen kapselilliset H.Influenzae-bakteerit pystyvät aiheuttamaan huomattavan paljon vaarallisempia infektoita, koska niillä on suuremmat mahdollisuudet puolustautua ulkoisia tekijöitä vastaan. Kapselilliset H.Influenzae-bakteerit aiheuttavat Suomessa harvinaisia, mutta henkeä uhkaavia infektoita, kuten aivokalvontulehdusta, kurkunkansitulehdusta, keuhkokuumetta ja septistä niveltulehdusta. (Käyhty & Peltola 2010)

2.1.2 Streptococcus pneumoniae

S.Pneumoniae, eli pneumokokki on grampositiivinen kokkibakteeri, joka on fakultatiivisesti anaerobinen. Pneumokokkeja tunnetaan yli 90 erilaista tyyppiä (THL 2019) ja ne aiheuttavat ylähengitystieinfektioita, kuten poskiontelontulehdusta, välikorvantulehdusta ja keuhkokuumetta. Vakavimmissa tapauksissa se voi aiheuttaa aivokalvontulehdusta ja sepsistä. Useat terveet ihmiset kantavat pneumokokkia nenänielussaan ja voivat näin pisaratartuntana levittää bakteeria eteenpäin. Kantajalleen pneumokokki on useimmiten harmiton. (THL 2019; Kauma & Virolainen-Julkunen 2010.).

Pneumokokin soluseinä koostuu peptidoglykaanista ja siihen liittyneistä polysakkarideista, joka estää tehokkaasti fagosytoosia ja on keskeinen tekijä pneumokokin virulenssin kannalta. Pneumokokki on elinoloiltaan varsin vaativa bakteeri ja se hajoaa, eli autolysoituu sille epäedullisissa elinolosuhteissa. Haluttu näyte tulisi ottaa ja kuljettaa mahdollisimman nopeasti infektion havaitsemisen jälkeen. Pneumokokki on myös herkkä mikrobilääkitykselle, joten näyte tulisi ottaa ennen lääkityksen aloitusta. Pneumokokin kasvatus tapahtuu yleisimmin verimaljalla. Malja sijoitetaan inkubointiatmosfääriin, jossa on n. 5% hiilidioksidipitoisuus. Maljalla kasvavat pesäkkeet ovat alfahemolyttisiä ja katalaasinegatiivisia. (Kauma & Virolainen-Julkunen 2010; Koneman ym. 2016.)

2.1.3 *Fusobacterium nucleatum*

Fusobacterium nucleatum on ihmiskehon normaaliflooraan kuuluva gramnegatiivinen sauvabakteeri ja fusobakteereista yleisin kliinisten infektioiden aiheuttama. Tätä bakteerilajia esiintyy suun, ylihengitysteiden, suoliston ja genitaalialueen normaalifloorassa. Ilman isännän heikentynyttä puolustusmekanismia se ei pysty tautia aiheuttamaan. Infektioita aiheuttaessaan se ilmenee yleisimmin pään, kaulan ja keuhkojen alueen infektoita (Rautio & Vuento 2010.)

2.1.4 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis on anaerobinen gramnegatiivinen sauvabakteeri, jota löytyy suuontelosta ja aiheuttaa infektoita ikenissä, ruuansulatuskanavassa ja sitä on löydetty myös naisilla bakteerivaginoosin aiheuttajana (Africa ym. 2014). Tautia aiheuttaakseen bakteeri tarvitsee sille suotuisat olosuhteet. Bakteerin vaikutuksesta ienkudoksessa vapautuu tulehdusvälittäjäaineita, jotka aiheuttavat paikallista kudostuhoa. Kudoksen tuhoutuessa ientasku syvenee ja näin ollen luo anaeroobeille bakteereille paremmat olosuhteet kasvun kannalta. Infektion levitessä muutkin, kuin suun alueen tulehdukset ovat mahdollisia. (How ym. 2016.)

2.1.5 Clostridium perfringens

Klostridien sukuun kuuluvia bakteereja esiintyy ihmisten ja eläinten suoliston normaali-floorassa ja niitä on huomattavasti myös ympäristössä, elottomilla pinnoilla niiden kestävien itiöiden ansiosta. Pelkästään ihmisen ulosteesta voidaan eristää kymmeniä eri Clostridium-lajeja. (Rautio 2010.)

C.Perfingens on gram-negatiivinen sauvabakteeri, jota esiintyy suoliston normaalifloorassa ja on tavallinen löydös kliinisissä näytteissä. Pahimmillaan se voi aiheuttaa vakavaa kudosekroosia, eli kuoliota. C.Perfingensin aiheuttamaan nekroosiin liittyy kaasujen, kuten metaanin ja typen kertyminen infektoituneeseen kudokseen. Yleensä ko. bakteeri aiheuttaa myonekroosia, eli lihaskuoliota tai nekrotisoivaa faskiittia, joka puolestaan on lihaksen faskiakalvossa etenevä tulehdus. Tila on usein hengenvaarallinen. Tavallisimmin Clostridium perfringens on yksi yleisimmistä ruokamyrkytyksen aiheuttajista, joka johtuu usein huonosti kypsennetystä lihasta. Ruuan mukana, elimistön ulkopuolelta, suolistoon päästyään se tuottaa ohutsuolessa enterotoksiinia. Ruokamyrkytys on yleensä tautina lievä ja vain harvoissa tapauksissa, kuten immuunipuuteisilla ihmisillä voi johtaa kuolemaan. (Rautio 2010; Koneman ym 2016; Murray ym. 2015.)

2.1.6 Prevotella melaninogenica

Prevotella melaninogenica on anaerobinen gramnegatiivinen sauvabakteeri, joka vaatii isäntäsolun puolustusmekanismien heikkenemistä. Bakteeria esiintyy ylähengitysteiden ja suuontelon normaalifloorassa ja aiheuttaa muunmusassa haavainfektioita. (Jousimies-Somer & Vuento 2005; Baron ym. 1994.) Tunnettu aiemmin nimellä Bacteroides melaninogenica (Shah & Collins 1990).

2.1.7 Streptococcus anginosus

Streptococcus anginosus -ryhmä (tunnettu aiemmin myös nimellä S. milleri-ryhmä) on viridans streptococcus -alaryhmä, joka koostuu kolmesta erillisestä streptokokkilajista: S. anginosus, S. intermedius ja S. constellatus. (Rantakokko-Jalava ja Anttila 2012.)

S. anginosuksella on kaksi alalajia: *S. anginosus* subsp *anginosus* ja *S. anginosus* subsp *whileyi*. *S. anginosuksella* on kolmas alalaji, jota alustavasti ehdotetaan nimellä *S. anginosus* subsp *vellorensis*; tällä organismilla on superantigeeniä ja solunulkoista DNAasia koodaavia geenejä, jotka ovat identtisiä *Streptococcus pyogenes*issa esiintyvien geenien kanssa. (Babbar ym 2017.)

S. constellatusella on kolme alalajia: *S. constellatus* subsp *constellatus*, *S. constellatus* subsp *pharyngis* ja *S. constellatus* subsp *viborgensis*. (Jensen, Hoshino ja Kilian 2013.)

Näitä ei-hemolyyttisiä viridans-streptokokkeja kuvasi Guthof ensimmäisen kerran vuonna 1956 sen jälkeen, kun ne oli eristetty hampaiden paiseista. Hän nimesi nämä organismit "Streptococcus milleriksi" mikrobiologi W D Millerin kunniaksi. (Ruoff 1988.)

Organismit tunnistettiin myöhemmin normaaliflooraan kuuluviksi (suuontelon, kurkun, ulosteen ja emättimen viljelmät ovat kaikki tuottaneet *S. milleri* -kantoja), jotka kykenevät aiheuttamaan paiseita ja systeemisiä infektioita. *S. anginosus* -ryhmän ainutlaatuinen ominaisuus, joka erottaa nämä streptokokit muista patogeenisistä streptokokkeista, kuten *S. pyogenes* (ryhmä A Streptococcus) ja *S. agalactiae* (ryhmä B Streptococcus), on niiden kyky aiheuttaa paiseita (Ruoff 1988). Toisin kuin vähemmän virulentit viridans streptokokit, *S. anginosus* -ryhmän jäseniä tulisi pitää todellisina patogeeneinä, kun ne on eristetty ihmisistä, mukaan lukien lapset (Belko ym 2002)

2.1.8 Bacteroides thetaiotaomicron

Bacteroides thetaiotaomicron on gram-negatiivinen, obligatorinen anaerobi. *B.thetaiotaomicron* kuuluu oleellisena osana suoliston normaaliflooraan ja sitä pidetäänkin komensalistisena tai jopa symbioottisena. Kuitenkin liiallinen määrä sitä saattaa edistää muiden, patogeenisten bakteereiden kasvua suolistossa. (Xu ym. 2003.)

2.2 Mikrobiologiset näytteet

Erilaisia bakteerinäytteitä voidaan ottaa ihmiskehon eritteistä, onkaloista ja haavoista. Bakteerinäytteitä voidaan kerätä myös elottomilta pinnoilta, kuten katetreista ja muista kehoon asetetuista vierasesineistä. (Linné & Ringsrud 1992.)

Bakteereita tutkitaan kasvattamalla niitä keinotekoisissa elatusaineissa ja bakteerin lisääntyä riittävästi, tarkoituksena on selvittää, mikä bakteeri on kyseessä (Kaukua & Mustajoki 2020).

2.2.1 Pu-Bakteeri, viljely 1 (anaerobi + aerobiviljely, syvämärkä)

Pu-Bakteeri, viljely 1 on käytössä oleva tutkimusnimike jota käytetään kun halutaan selvittää näytteessä mahdollisesti olevat anaerobiset bakteerit. Bakteereita pyritään kasvattamaan niitä varta vasten tehdyissä keinotekoisissa elatusaineissa. Kun bakteeri on lisääntynyt elatusaineessa riittävästi, selvitetään, mikä bakteeri on kyseessä ja onko se herkkä vai vastustuskykyinen tavallisille antibiooteille. (Eskelinen 2016.) Tutkimuspyyntö sisältää tutkittavasta näytteestä sekä aerobiviljelyn että anaerobiviljelyn. Tutkimuksiin kuuluu antibioottiherkkyyismääritys mahdolliseksi patogeeneiksi tulkituista aerobisista bakteereista. Anaerobisista patogeeneista tehdään herkkyyismäärityksiä harkinnan mukaan, muulloin vastataan tilastoherkkyys. Antibioottiherkkyyismääritystä ei tehdä normaaliflooran bakteereista, jotka tulkitaan kliinisesti merkityksettömiksi. (TYKS Laboratoriot 2020.)

2.2.2 Punktionäytteet

Punktionäyte on neulalla pistämällä, eli punktoimalla, otettu näyte keho-ontelosta, nivelestä taikka tulehduspesäkkeestä. Punktionäytteet ovat yleensä nestemäisiä tai lähes nestemäisiä. Yleisimmin näistä puhutaankin ottopaikkansa mukaan nimettyinä ja nesteinä, esim. likvorneste, ascitesneste, nivelneste, pleuraneste yms. (Duodecim 2020.)

2.3 Viljely

Bakteeriviljely on menetelmä, jossa tutkittavaa mikrobia halutaan kasvattaa antamalla niiden lisääntyä ennalta määrättyssä elatusaineessa kontrolloiduissa laboratorio-olosuhteissa. Näitä mikrobiviljelmiä käytetään bakteerityypin ja -määrän määrittämisessä. Se on yksi ensisijaisista mikrobiologian diagnostisista menetelmistä ja sitä käytetään tartuntatautien syyn määrittämisessä. (Linné & Ringsrud 1992.)

2.4 Aikaisemmat tutkimukset ja taustaa

Hindiyeh, Acevedo & Carroll (2001) vertailivat kolmen eri valmistajan kuljetusputkia. Tutkimuksessa käytettiin yhdeksää eri anaerobikantaa (*Clostridium perfringens*, *Eubacterium lentum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium acnes*, *Prevotella bivia*, *Prevotella melaninigenica*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*), kolmea aerobikantaa (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*), sekä yhtä fakultatiivisesti aerobia bakteerikantaa (*Streptococcus milleri*). Tutkimuksessa käytettävät bakteerikannat ovat kaikki ATCC-kontrollikantoja.

Tutkimuksessa käytettiin Starpex Scientificin valmistamia StarSwab II kuljetusputkia, BBL:n valmistamia Port-A-Cul putkia, sekä Copan Diagnosticsin valmistamia Vi-Pak geelikuljetusputkia. Säilytysaikoja vertailtiin 0h, 6h, 24h ja 48h aikapistein. Näytteet säilytettiin huoneenlämmössä. Tutkimuksen perusteella anaerobien säilyvyys oli heikko vuorokauden säilytyksen jälkeen. Myös aerobit menettivät huomattavasti elinkykyään vuorokauden jälkeen. Kuuden tunnin aikapisteen kohdalla lähes kaikki tutkittavat kannat olivat säilyneet elinkykyisinä. Parhaiten anaerobit säilyivät elinkykyisinä Copanin kuljetusputkessa. Kokonaisvertailussa Copanin kuljetusputki säilytti kaikki bakteerit parhaiten elinkykyisinä yli kuuden tunnin säilytyksen jälkeen. Kahden muun valmistajan kohdalla, yli kuuden tunnin säilytyksen jälkeen ei ollut montaa elinkykyistä pesäkettä.

Vuonna 2005 julkaistussa tutkimuksessa (Drake, Barenfanger, Lawhorn & Verhulst 2005) verrattiin kahden valmistajan kuljetusputkia toisiinsa. Vertailun kohteena olivat Copan Diagnosticsin Liquid Stuart-putki ja Starplex Scientificin Stuart-putki. Vertailu tehtiin neljällä eri bakteerikannalla (*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ja *Streptococcus pneumoniae*), joista tehtiin kolme laimennosta. Bakteerien elinkykyisyyttä mitattiin 0h, 6h, 24h ja 48h aikapisteillä huoneenlämmössä ja jääkaapissa 4-asteessa. Tutkimuksen tuloksena saatiin merkittävät erot kahden valmistajan välillä. Kuten edellä mainitussa tutkimuksessa, oli tämänkin tutkimuksen kohdalla Copanin kuljetusputki selkeästi parempi säilyttämään tutkimuksessa käytetyt kannat elinky-

kyisinä. Ainoastaan *N.Gonorrhoea*en kohdalla tulos oli tasaisempi. Kummankin kuljetusputken kyky säilyttää kannat elinkykyisinä heikkeni huomattavasti 6h aikapisteen jälkeen.

Jälleen vuonna 2008 tehdyssä, hyvinkin samankaltaisessa tutkimuksessa (Van Horn, Audette, Sebeck, & Tucker 2008) verrattiin Copan Diagnosticsin ESwab-kuljetusputkea Betcon Dickinson Cultureswab- kuljetusputkeen, sekä Thermo Fisher Scientificin Remel BactiSwab- kuljetusputkeen. Tutkimuksessa käytettiin kymmentä eri bakteerikantaa (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogenica*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium acnes*.) Säilytysaikoja vertailtiin 0h, 6h, 24h ja 48h huoneenlämmössä ja jääkaapissa. Tutkimuksessa haluttiin saada selville vastaako uusi nailonkärkinen Copan Diagnosticsin ESwab-kuljetusputki CLSI M40-A dokumentin kriteerejä. Tuloksena oli, että ESwab vastasi kriteerejä kaikilta osin. *P.Melaninogenica* kanta ei kuljetusputkessa enää 24h ja 48h aikapisteen jälkeen. Mainittakoon, että kyseinen kanta ei näillä aikapisteillä säilynyt enää kahden muun valmistajan kuljetusputkessa, joita käytettiin tutkimuksessa vertailukohteina.

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla bakteerien (sekä aerobisten että anaerobisten) säilymistä elinkykyisinä Becton Dickinsonin Port-a-cul-näyteputkessa ja laboratoriossa nykyisin käytössä olevissa BioMérieux'n Portagerm-näyteputkessa. Vertailtava tutkimus suoritetaan kahdeksalla eri ATCC-kontrollikannalla. Tutkimuksessa käytettävät bakteerikannat ovat *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Clostridium perfringens*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus anginosus*, sekä *Bacteroides thetaiotaomicron*. Opinnäytetyön tutkimustehtävän tarkoituksena on säilyttää kuljetuspulloihin suspensioituja bakteereja yhteensä kahden vuorokauden, eli 48h. Kuljetuspullot säilytetään huoneenlämmössä ja 48h aikana, viiden aikapisteen välein pulloista viljellään bakteerit ja kasvatetaan 1-2vrk ajan. Lopuksi lasketaan kasvaneiden pesäkkeiden lukumäärät, jolloin voidaan vertailla näitä kahta kuljetuspulloa keskenään. Lopputuloksena voidaan esittää raportti, jossa julkaistaan tulokset opinnäytetyön toimeksiantajalle.

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää ja raportoida opinnäytetyön toimeksiantajalle kumpi kahdesta näyteputkesta pitää bakteerit mahdollisimman edustavina ja elinkykyisinä (Drake, Barenfanger & Lawhorn 2005). Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa raportti laboratoriolle siitä, kumpi bakteerinkuljetuspullo säilyttää tutkittavat bakteerit elinkykyisinä pisimpään. Tämän lisäksi he saavat käyttökokemusta osastolle täysin uudesta näyteputkesta, Port-A-Cul:ista. Kaikki tieto, mitä opinnäytetyöllä saadaan kerättyä, on osastolla vapaasti käytettävissä tulevissa hankintakilpailutuksissa. Näin voidaan taata, että anaerobiviljelyt saadaan parhaimmalla mahdollisella tavalla kuljetettua näytteenotopisteestä analysoivaan laboratorioon taaten potilaan kannalta elintärkeää tietoa hänen tilastaan.

4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

4.1 Opinnäytetyön toteutus

Tutkimus toteutettiin laboratoriossa tammikuussa 2020. Ohjaajana tutkimuksessa toimi laboratorion sairaalamikrobiologi. Tämän opinnäytetyön tekemiselle laadittiin toimeksiantosopimus lokakuussa 2020. Tulosten raportointi suoritettiin loppuvuodesta 2020.

Tutkimusaineistona käytettiin ohjaajan kanssa yhdessä valittuja kontrollikantoja (ATCC, American Type Culture Collection tai NCTC, The National Collection of Type Cultures), jotka ovat kaikki erikseen numeroituja. Tutkimuksessa käytetyt bakteerit ovat esitetty taulukossa 1 yhdessä kannalle valikoidun maljatyyppin, inkubointiajan ja maljojen lukuajan kohtien lisäksi.

BAKTEERI	ATCC	ELATUSAINE	KASVATUSAIKA	LUKUPISTET
Haemofilus infulenzae	ATCC 49766	MCL Suklaa agar	2 vrk	1 vrk, 2 vrk
Streptococcus pneumoniae	ATCC 49619	Veriagar	2 vrk	1 vrk, 2 vrk
Fusobacterium nucleatum	ATCC 25586	FAA	4 vrk	2 vrk, 4 vrk
Porphyromonas gingivalis	ATCC 33277	FAA	4 vrk	2 vrk, 4 vrk
Clostridium perfringens	ATCC 13124	FAA	4 vrk	2 vrk, 4 vrk
Prevotella melaninogenica	ATCC 25845	FAA	4 vrk	2 vrk, 4 vrk
Streptococcus anginosus	NCTC 10713	Veriagar	2 vrk	1 vrk, 2 vrk
Bacteroides thetaiotaomicron	ATCC 29741	FAA	4 vrk	2 vrk, 4 vrk

Taulukko 1. Bakteerit, kontrollikantatunnukset, inkubointiajat ja lukuajankohdat

Nämä bakteerit on valittu siksi, että ovat merkittäviä ja yleisiä märkäviljelynäytteistä löytyviä taudinaiheuttajia, ja myös siksi, että kuolevat helposti kuljetuksen aikana, jos olosuhteet kuljetusputkessa eivät ole optimaaliset

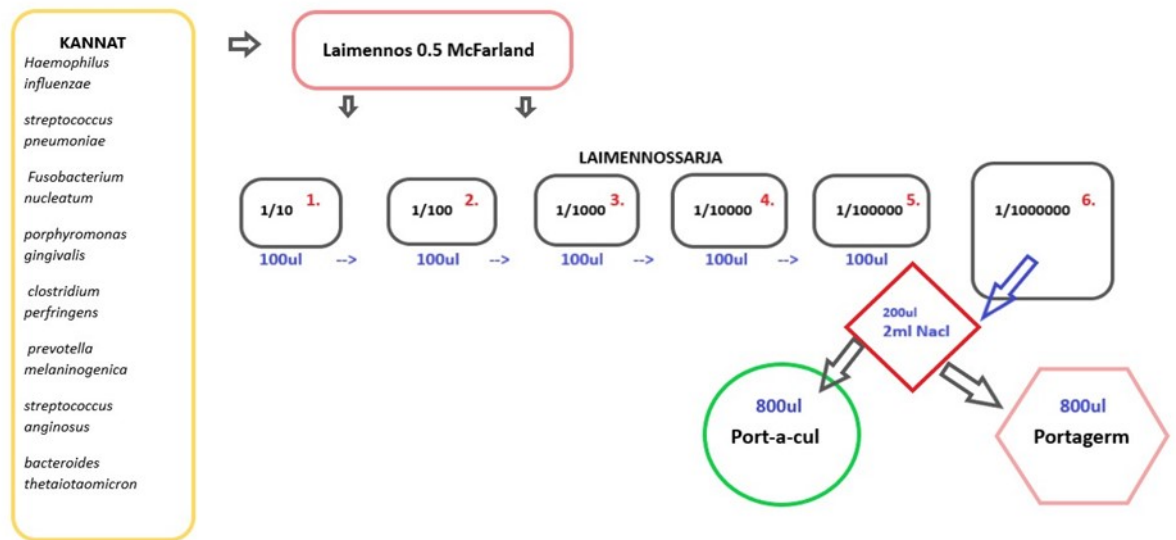
Tutkimukseen valitut bakteerit otettiin laboratorion kontrollikantanäytteistä ja niistä tehtiin ensin viljelyt maljolle, jotta voitiin varmistaa että kanta oli elinkelpoinen. Tästä puhtasviljelmästä tehtiin työssä käytetyt alkuperäiset samennokset juuri siksi, että voitiin varmentaa kannan olevan kasvukykyinen ennen työn aloittamista.

Tutkimukseen käytettiin kahden eri valmistajan bakteerinäytteen kuljetukseen tarkoitettuja pulloja. Käytössä olivat Becton, Dickinson ja Companyn (BD:n) Port-A-Cul ja BioMérieux'n Portagerm.

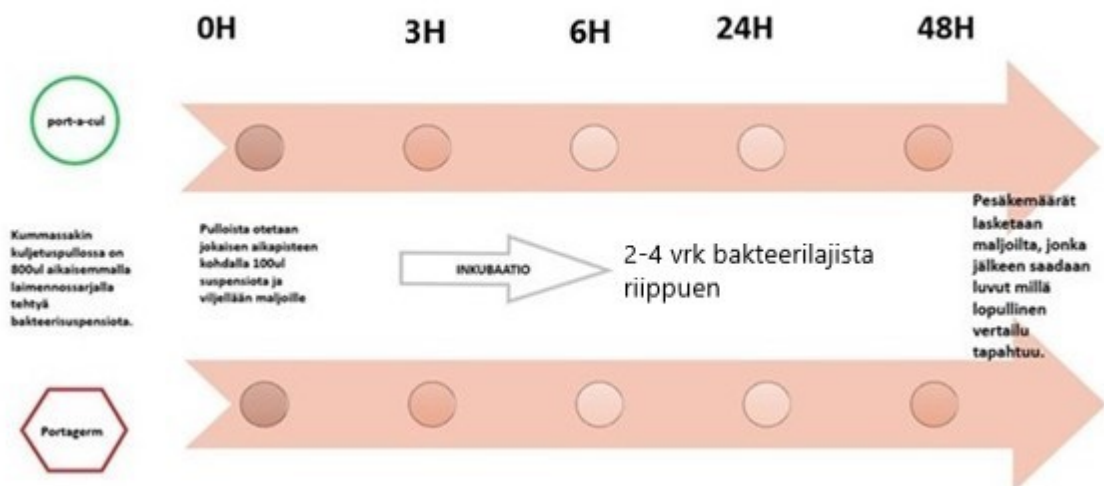
Varsinainen tutkimusaineisto kuten ATCC-kontrollikannat toimitettiin osastolta. Kantoja säilytetään laboratoriossa. Kuljetuspullot, maljat ja muut tarvikkeet annettiin opinnäytetyötä tekevien opiskelijoiden käyttöön laboratoriosta.

Työ käynnistettiin suunnitelman mukaisesti siten, että tutkittavista bakteereista tehtiin 0,5 McFarland- vahvuiset suspensiot. Nämä suspensiot sarjalaimennettiin 10^{-6} vahvuiseksi ottamalla aina 100 μ l ja siirtämällä se 1 ml 0,9% NaCl:iä. Viimeistä, 10^{-5} laimennosta laitettiin 200 μ l 2 ml 0,9% NaCl, jolloin saatiin haluttu määrä halutun vahvuista laimennosta. Sarjalaimennettua suspensiota laitettiin kumpaankin näyteputkeen (Port-A-Cul, P-A-C, ja Portagermiin) 800 μ l. Tämän jälkeen suoritettiin varsinainen viljely kullekin kannalle sopivalle maljalle. Työn kulun helpottamiseksi ja aikatauluttamiseksi päätettiin ensimmäiseksi tehdä aerobikannat ja seuraavana päivänä anaerobikannat. Tästä saatiin myös lisähyötynä nopeammin todistettua konseptin toimiminen, koska aerobimaljat luetaan yhden vuorokauden kasvatuksen jälkeen, kun taas anaerobimaljat luetaan vasta 2 vuorokauden kuluttua.

Opinnäytetyössä suunniteltiin tarkasti laimennosten tekeminen. Kaikkien kantojen kanssa toimittiin samalla tavalla laimentaen ne 10^{-6} vahvuiseksi. Kuviossa 1 esitetään laimennoksen valmistamisen periaate. Laimennosten inkubointi ja viljelyajankohdat puolestaan on esitetty kuviossa 2.



Kuvio 1. Suunnitelma laimennosten valmistamiseksi



Kuvio 2. Laimennoksen viljely aikapisteiden mukaan ja inkubointiajat

1. päivänä laimennettiin ja viljeltiin suunnitelman mukaisesti aerobikannat (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ja *Streptococcus anginosus*) ja sijoitettiin näin tehdyt maljat lämpökaappiin kasvamaan.

Viljelyn aluksi todettiin ongelmaksi septumien läpi pääseminen ja laimennoksen tarkan määrän saaminen ulos kummastakin näyteputkesta ilman, että astioihin pääsisi ilmaa. Päädyttiin menemään septumin läpi neulalla joka kerta ja aina ennen pistoa desinfioimaan kuljetusastioiden septumi 80% etanolilla. Tällä pyrittiin välttämään kontaminaatioiden syntyä. Laimennoksen tarkka mittaaminen ruiskuun oli käytännössä mahdotonta,

koska käytössä ei ollut mitään välineitä, jolla olisi päässyt sekä septumin läpi ja otettua sieltä vakioitua määrää. Siksi jouduttiin arvioimaan otettu määrä ruiskun mitta-asteikon mukaan. Havaittiin myös, että 800 µl vaikuttaa hyvin vähäiseltä määrältä koko työtä varten, vaikka sen laskennallisesti pitäisikin riittää.

2. päivän aluksi tarkastettiin eilistä työtä eikä maljoilla ollut havaittavaa kasvua. Päätettiin aloittaa työ uudestaan alusta, mutta tehtiin kuljetusastioihin siirrettävää laimennosta siten, että kumpaankin näyteputkeen voisi laittaa sitä 4 ml, mutta samalla vahvuudella kuin aiemmassakin laimennoksessa. Näin pystyttiin kiertämään muutamiakin ongelmia, joita ensimmäisen päivän viljelyssä todettiin. Lisäksi muutettiin viljelypisteitä siten, että alkuperäisen 0h, 4h, 8h, 24h ja 48h kohtien sijaan käytettiin 0h, 3h, 6h, 24h ja 48h aikapisteitä. Tämä siksi, että työn rytmittäminen sujuisi huomattavasti paremmin. Molemmat muutokset hyväksyttiin opinnäytetyön ohjaajalla. Hyväksymisen jälkeen tehty laimennokset aerobikannoista, viljelty 0h, 3h, ja 6h aikapisteiden maljat ja laitettu lämpökaappiin kasvamaan.

3. päivänä todettiin, että uuden sarjan maljoilla on kasvua. Kasvua oli sopiva määrä, jotta yksittäiset pesäkkeet pystyttiin laskemaan eikä maljalle ollut muodostunut bakteerikasvusta mattoa. Tämä todisti konseptin toiminnan. Kuviossa 4 on esitetty viljelyiden ajankohdat ja lukupäivät.

Aerobit	0h,3h,6h	24h	48h	Anaerobit	0h,3h,6h	24h	48h
Viljelty	15.1	16.1	17.1	Viljelty	16.1	17.1	18.1
1 vrk:n luku	16.1	17.1	18.1	2 vrk:n luku	18.1	19.1	20.1
2 vrk:n luku	17.1	18.1	29.1	4 vrk:n luku	20.1	21.1	22.1

Taulukko 2. Työn suoritusjärjestys; päivät, jolloin kannat on luettu ja viljelty

Tämän opinnäytetyön tekeminen aiheutti minimaallisia kustannuksia opinnäytetyötä tarjoavalle organisaatiolle mm. tarvikekulujen muodossa, sillä työssä käytettiin laboratoriossa päivittäisessä käytössä olevia kulutustarvikkeita. Becton Dickinsonin Port-A-Cul näyteputket Varsinais-Suomen Sairaanhoidopiiri on saanut maksutta näytteenottotarvikkeiden kilpailutukseen liittyvään testaukseen.

Opinnäytetyö on bioanalytikkokoulutuksen käynnissä olevan hankkeen, työelämäyhteistyön ja opetusmenetelmien kehittäminen bioanalytikkokoulutuksessa (TurkuCRC T12/022/19), osatutkimus. Opinnäytetyö on tämän hankkeen osatutkimus, jonka toimeksianto on saatu Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiriltä.

Opinnäytetyössä suoritettavat bakteeriviljelystä tehtiin bakteerilaboratorion laminaarikaapissa hyviä mikrobiologisia toimintamalleja toteuttaen. Bakteeriviljelystä suoritettiin kullekin kannalle optimaaliselle elatusmaljalle. Aerobikannoille veriagar-malja, poislukien *Haemophilus influenzae*, joka viljeltiin suklaa-agarmaljalle. Anaerobikannat viljeltiin kaikki FAA-maljalle. Kaikki edellä mainitut maljatyypit ovat päivittäisessä käytössä bakteriologian ja mykologian laboratoriossa ja ovat kontrolloituja laboratoriossa.

4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivisella eli määrällisellä tutkimuksella tarkoitetaan tutkimusta, joka vastaa lukumääriin ja prosentiosuuksiin liittyviin kysymyksiin. Edellytyksenä tutkimukselle on riittävän suuri ja edustava otos. Tutkimuksessa numeeristen suureiden avulla selvitetään eri asioiden välisiä muutoksia tai riippuvuuksia. (Heikkilä 2014.)

Tutkimuksellisessa opinnäytetyössä etsitään vastauksia työelämän kysymyksiin tai ongelmiin tekemällä kokeita, mittauksia, kyselyjä tai haastatteluja. Kyse voi olla esimerkiksi jonkin asian kartoittamisesta, tutkimisesta, kehittämisideoista työelämän käytäntöjen parantamiseksi tai uuden toimintamallin kehittämisestä. (Tanskanen 2016.)

Tutkimuksellisessa opinnäytetyössä tuotetaan uutta tietoa rajatusta tutkimuskysymyksestä. Uusi tuotettu tieto perustetaan olemassa olevaan tietoon luotettaviin lähdeaineistoihin perustuen. (Tanskanen 2016.)

Tämä opinnäytetyö on tutkimuksellinen ja kvantitatiivinen, eli tutkittava aineisto perustuu määrälliseen mittaamiseen, tarkoituksena tuottaa luotettavaa ja vertailukelpoista dataa toimeksiantajalle. Kvantitatiivisessa, eli määrällisessä tutkimuksessa on keskeistä käsitteiden määrittely, perusjoukon hankinta, sekä tulosten saattaminen tilastolliseen muotoon. (Hirsijärvi, Remes ja Sajavaara 2009.)

Tässä opinnäytetyössä tutkimuksellisuus näkyy vastaamalla suoraan kysymykseen, kumpi vertailtavista astioista on parempi. Kvantitatiivisuus puolestaan näkyy saatujen

tulosten laskettavuudella. Eli voidaan suoraan laskea, montako pesäkettä maljalla kasvaa kunkin aikapisteen kohdalla.

4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Kliinisessä tutkimuksessa noudatettavia keskeisiä lakeja ovat laki lääketieteellisestä tutkimuksesta (488/1999, muutokset 295/2004 ja 794/2010), laki potilaan asemasta ja oikeuksista (785/1992), lääkelaki (395/1987, muutos 296/2004), potilasvahinkolaki (585/1986), henkilötietolaki (523/1999), geeniteknikkalaki (377/1995) ja -asetus (928/2004) sekä laki ihmisen elinten ja kudosten lääketieteellisestä käytöstä (kudoslaki 101/2001). (Suomen Lääkäriliitto, 2004)

Yksilöön kohdistuva lääketieteellinen tutkimus voidaan toteuttaa ainoastaan, kun tutkimuksesta odotettava hyöty ja sen tavoite ovat suurempia, kuin tutkimuskohteelle mahdollisesti aiheutuvat riskit. Biolääketieteellinen tutkimus, jossa tutkimuskohteena on ihminen, on eettisesti oikeutettu vain siinä tapauksessa, että sen lopputuloksen odotetaan edistävän ihmisen tai ihmisryhmän terveyttä. (CIOMS 2002.)

Tässä opinnäytetyössä ei ole potilaisiin tai potilastietoihin kohdistuvia eettisiä ongelmia, koska näyttemateriaalina käytetään ATCC-kontrollikantoja. Tutkimusta tehdään samoissa tiloissa, jossa käsitellään potilastietoja, jolloin varmistetaan, että valokuvat ja raportoitu materiaali eivät näitä sisällä. Osastolla työskennellessä opinnäytetyön tekijät noudattavat salassapitovelvollisuutta.

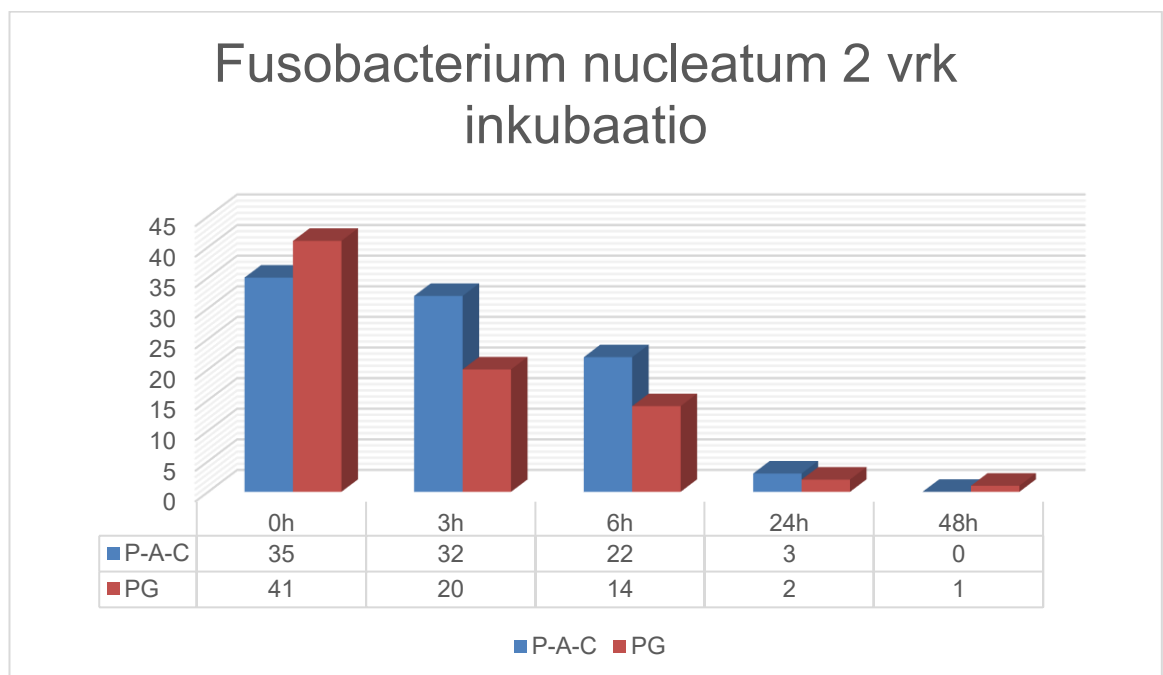
Tämä tutkimus tehdään parhaiden tietojen ja taitojen mukaan hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen rehellisesti, huolellisesti ja tarkasti. Tulokset esitetään ja arvioidaan niitä vääristelemättä ja vähättelemättä. Opinnäytetyön tekemisessä noudatetaan hyvää tieteellistä käytäntöä koskevia ohjeita, jolloin opinnäytetyö on eettisesti hyväksyttävä.

5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

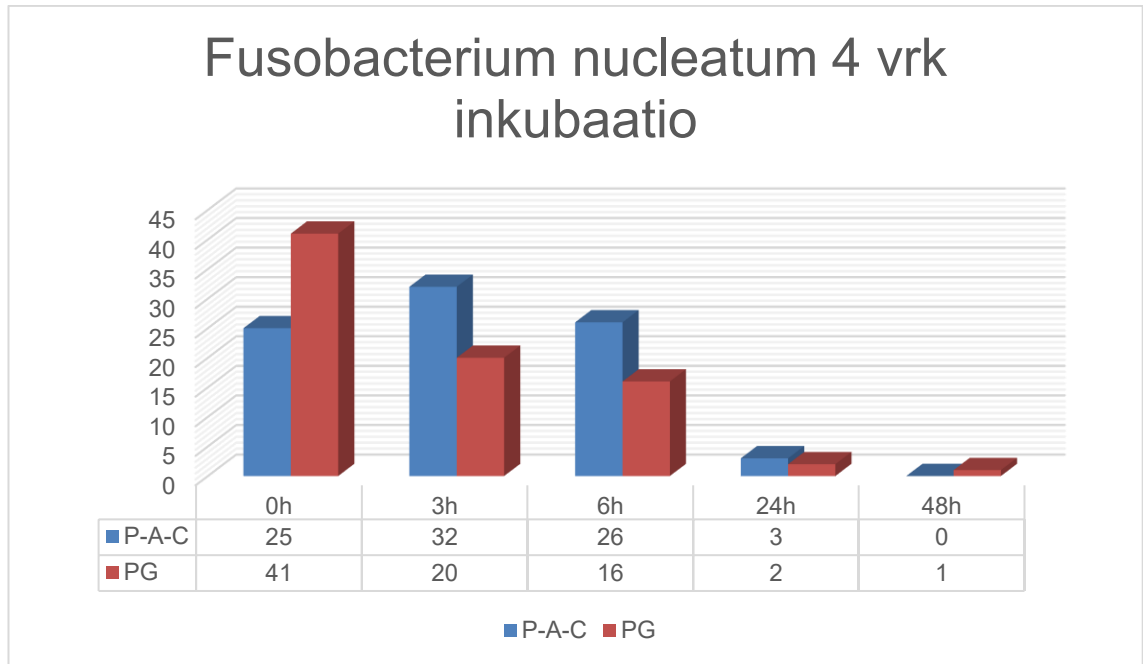
Laskettavia tutkimutuloksia saatiin kaikista muista kannoista, paitsi Porphyromonas gingivaliksesta. Syitä tähän voi olla useita, kuten epäonnistunut sarjalaimennos, liian laiha laimennos tai kannan kuoleminen hapen seurauksena. Tutkimuksessa saadut tulokset taulukoitiin bakteerikohtaisesti, sekä kaikki bakteerit yhdessä taulukossa ja niistä tehtiin graafiset esitykset kuvaamaan kantojen säilymistä kahden eri valmistajan kuljetuspulloissa.

5.1 Fusobacterium nucleatum

Kuvioissa 5 ja 6 näytetään maljoille ilmaantuneet pesäkkeiden määrät kunkin aikapisteen kohdalla viljelty näyte näyteputkesta. Kuvioissa näkyy selkeästi laskeva trendi mitä kauemmin näyte on ollut näyteputkessa ennen viljelyä. Inkuboinnin määrällä ei ollut kuin nimellinen vaikutus pesäkkeiden määrään. Suurempi tekijä näyttäisi nimenomaan se, kauanko näytemateriaali on näyteputkessa ennen viljelyä.



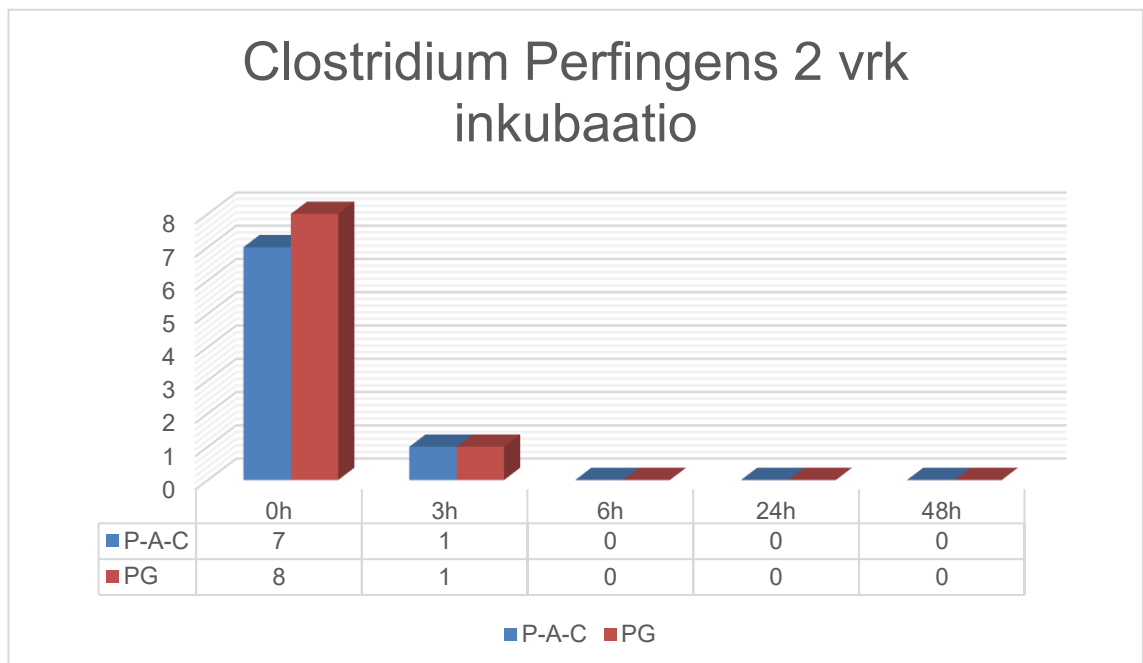
Kuvio 3



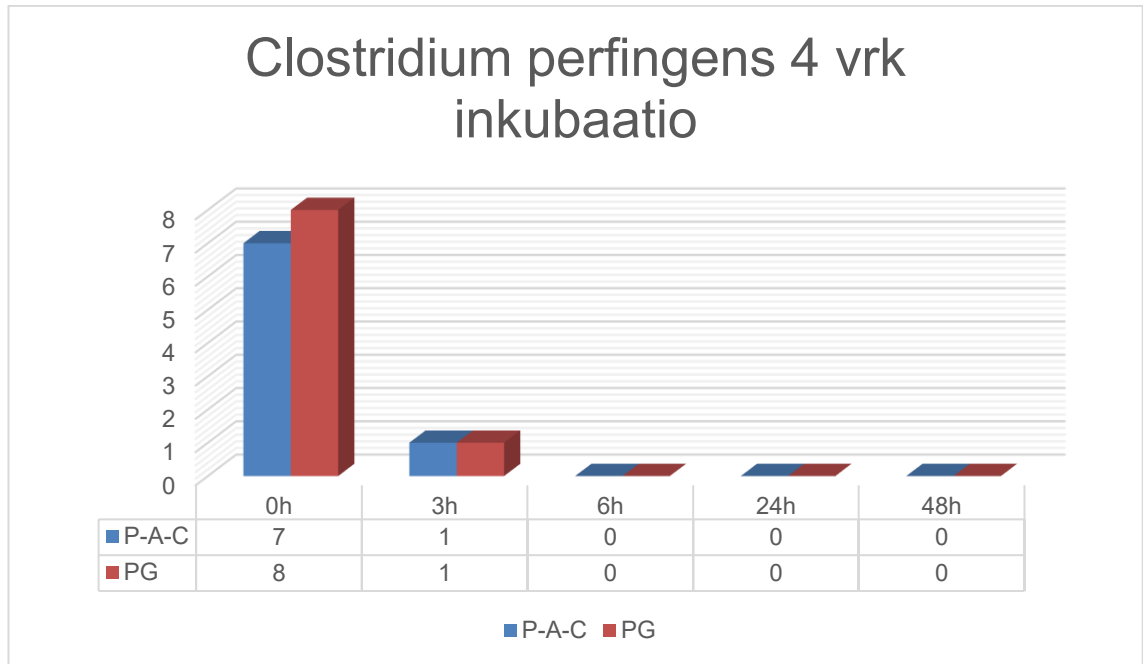
Kuvio 4

5.2 Clostridium Perfringens

Kuvioissa 7 ja 8 näkyy selvä jyrkkä pudotus pesäkkeiden määrässä jo näytteen ollessa kolme tuntia vanha. Tämä näin voimakas pudotus selittyyneen enemmänkin laimennoksella tai muulla tekijällä kuin näyteputkivalinnalla. Koska molemmilla näyteputkilla on samankaltainen pesäkemäärä.



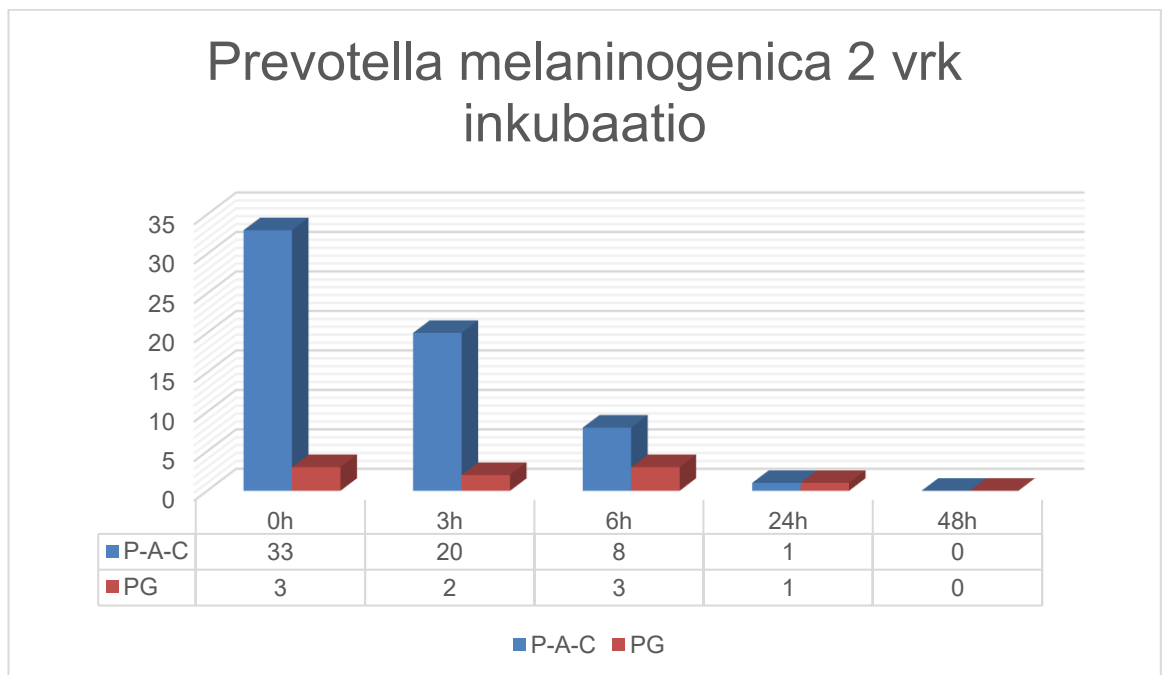
Kuvio 5



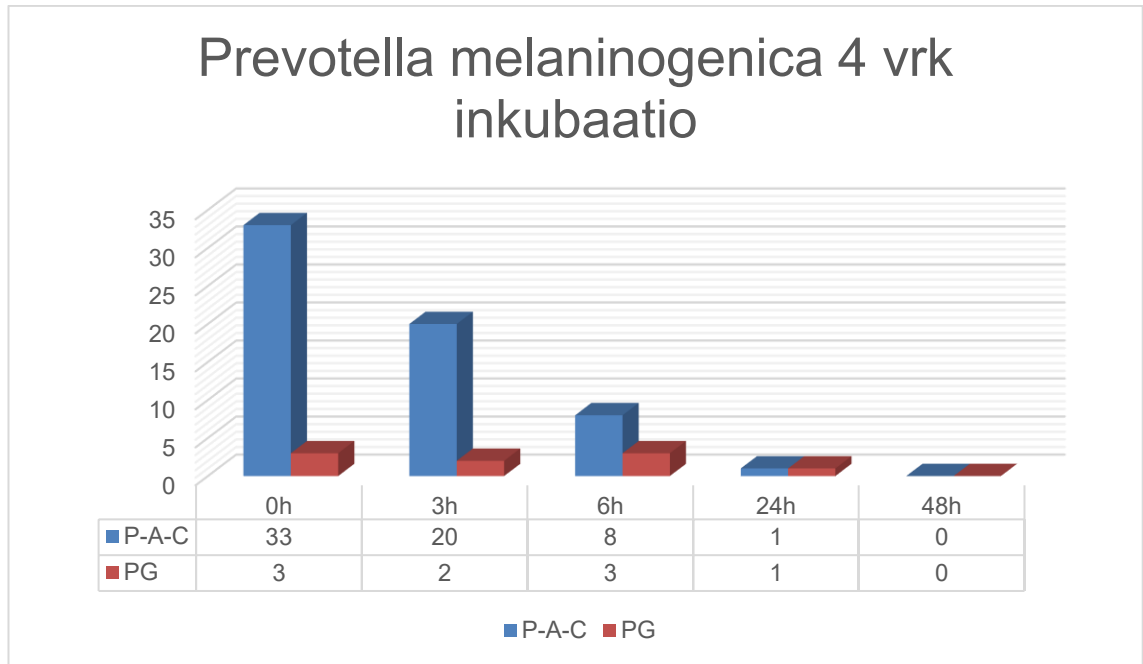
Kuvio 6

5.3 Prevotella melaninogenica

Prevotella osoittaisi kuvioiden 9 ja 10 mukaan suosivan vahvasti Port-A-Cul:ia. Bakteeria esiintyi huomattavasti enemmän tästä otetulla viljelyllä. Mutta kuitenkin Portagermissä oli myös laskettavia pesäkkeitä yhtä pitkällä aikavälillä kuin mitä oli Port-A-Cul:ista viljelyssä.



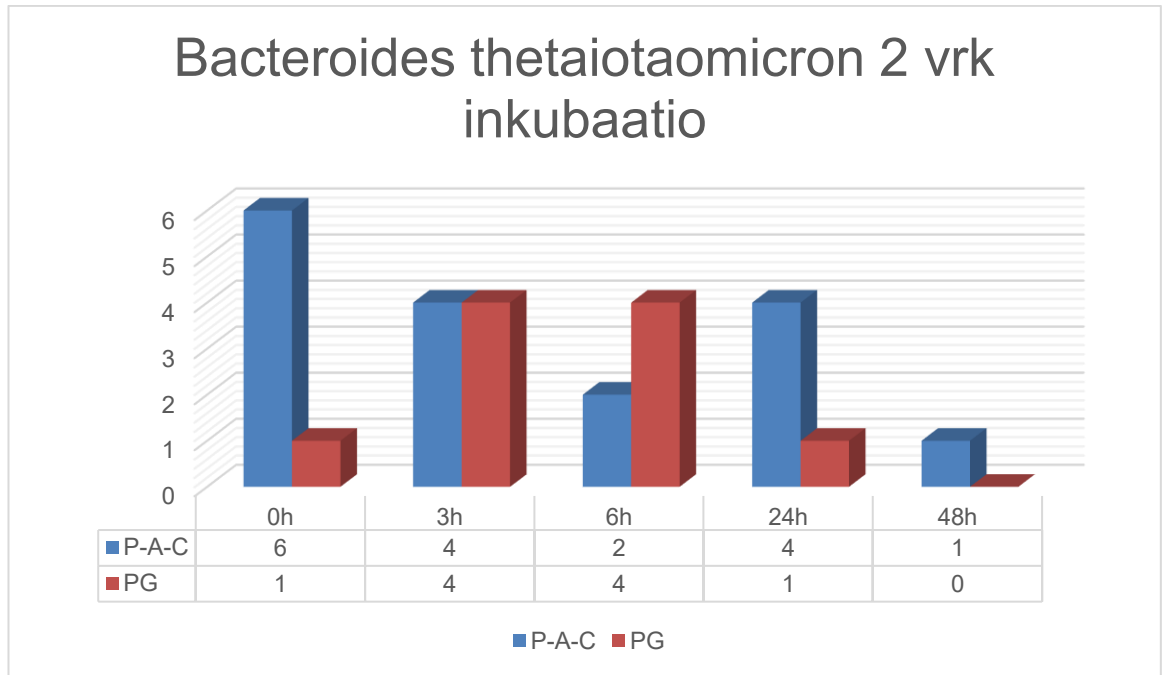
Kuvio 7



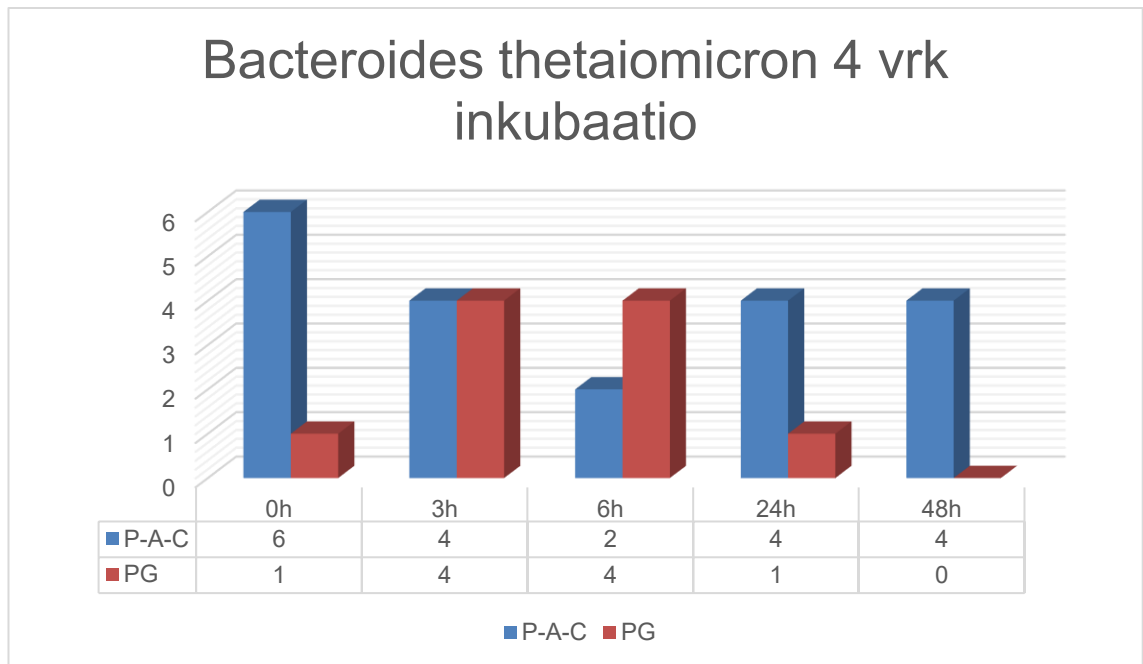
Kuvio 8

5.4 Bacteroides thetaiotaomicron

Kun aiemmissa, esim. *Fusobacterium nucleatum*issa oli selkästi laskeva käyrä, jossa pesäkkeiden määrä oli suoraan verrannollinen laimennoksen näyteputkessa vietetyn määrän kanssa. Kuvioden 11 ja 12 mukaan tuloksissa oli hajontaa ja myöhemmin viljelyillä maljoilla saattoi olla jopa enemmän pesäkkeitä kuin mitä aiemmin viljelyssä maljassa. Mutta oleellisin asia toteutui; maljoilla oli laskettavia pesäkkeitä vielä viimeiselläkin viljelyllä maljalla, kun laimennos oli jopa 48 tuntia vanha. Tästä syystä tulosta voidaan pitää validina.



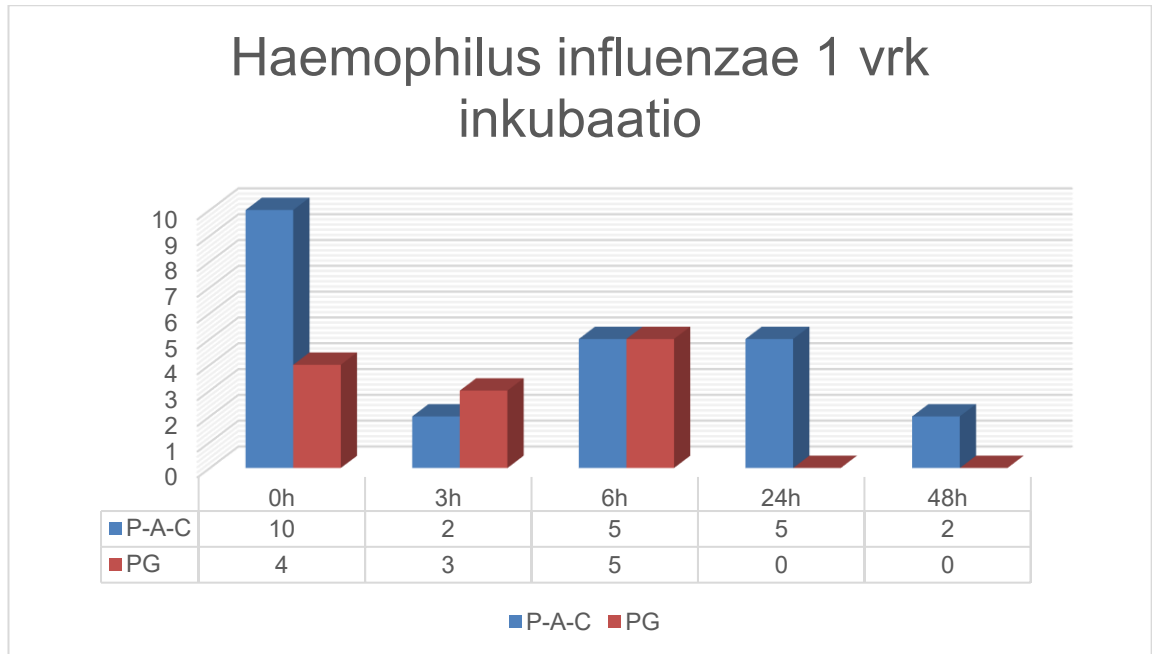
Kuvio 9



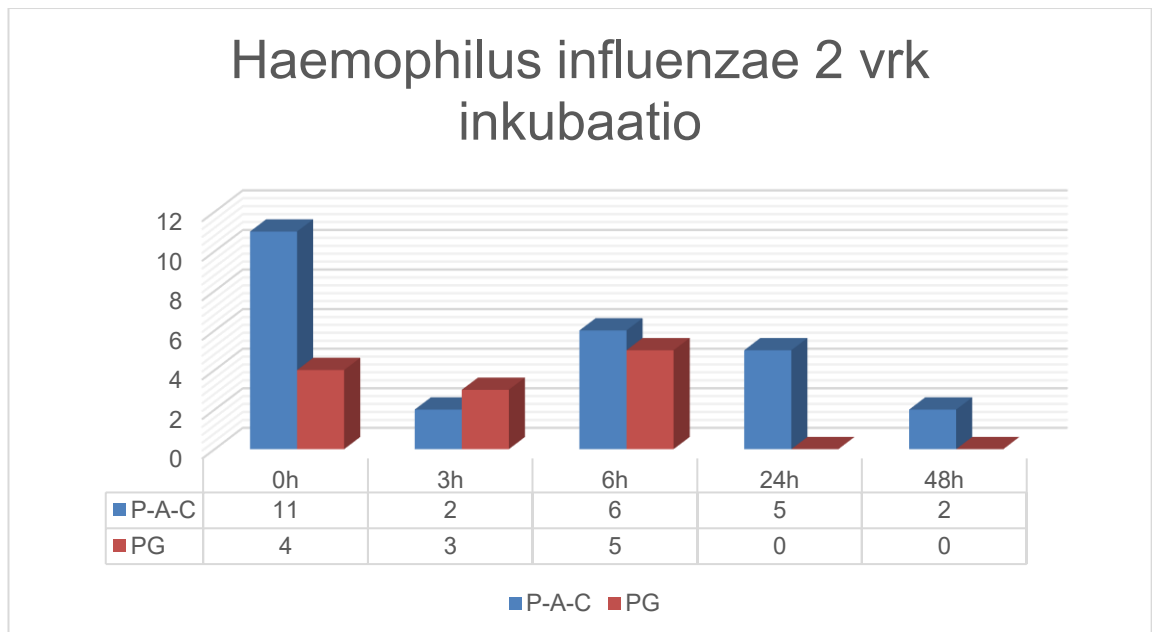
Kuvio 10

5.5 Haemophilus influenzae

Kuvioista 13 ja 14 voi päätellä, että molemmissa kuljetusastioissa näyte pysyi hyvin viljelykelpoisena vielä 6 tunnin kohdalla, mutta 24 tunnin kohdalla ei Portugermistä tehdyistä viljelyistä saatu enää kasvavia pesäkkeitä. Huomattavaa oli myös, että viljelyissä oli taas hajontaa, eikä näyteputkessa vietetty aika suoraan korreloinut pesäkkeiden määrää.



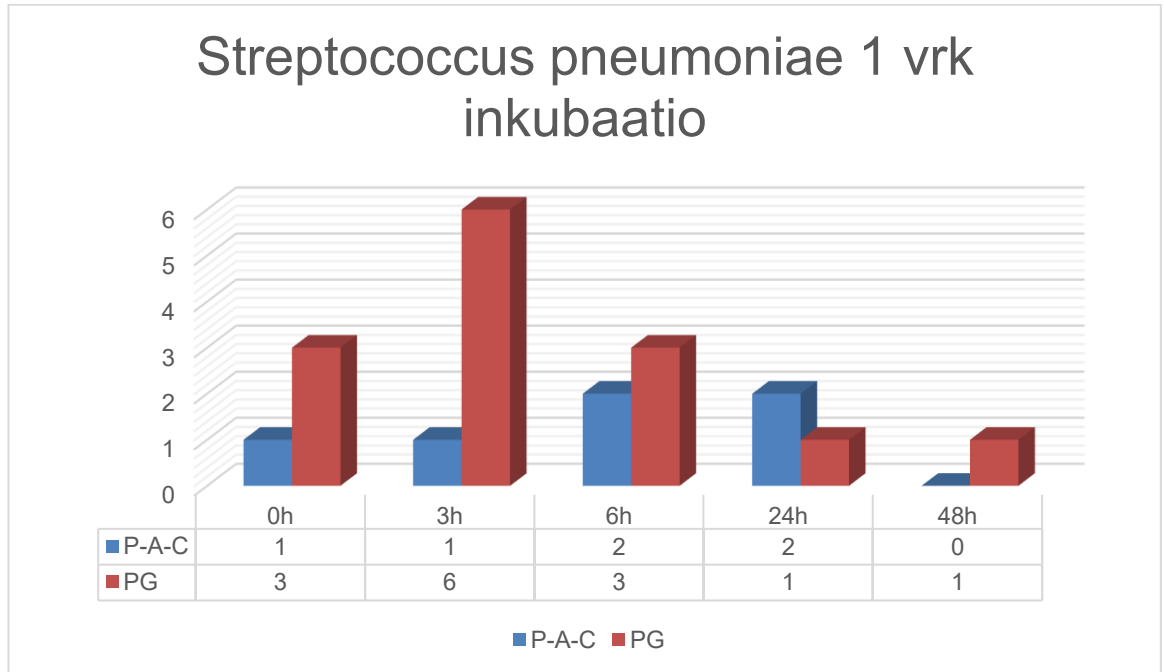
Kuvio 11



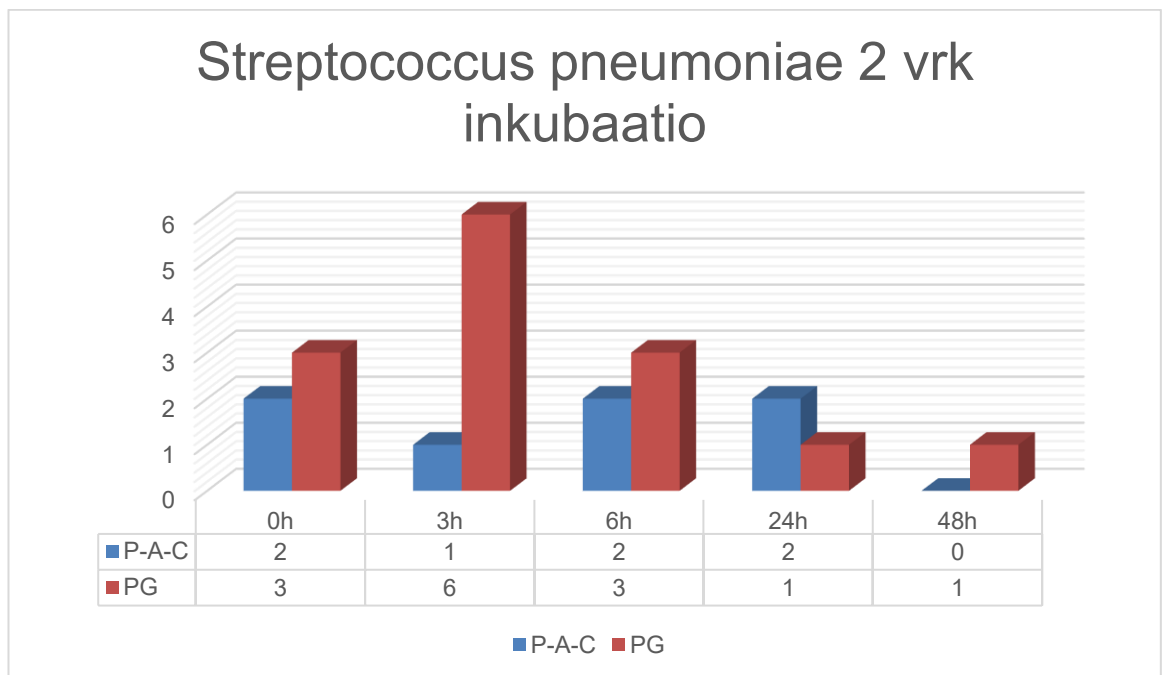
Kuvio 12

5.6 Streptococcus pneumoniae

Kuvioissa 15 ja 16 osoitetaan, että pesäkkeitä tuli Portagermilla kaiken kaikkiaan enemmän ja myös siitä sai 48 tunnin kohdalla tehtyä pesäkkeellisen viljelyn. Inkubointi toisen vuorokauden ajan ei vaikuttanut tulosten mukaan oikeastaan laisinkaan.



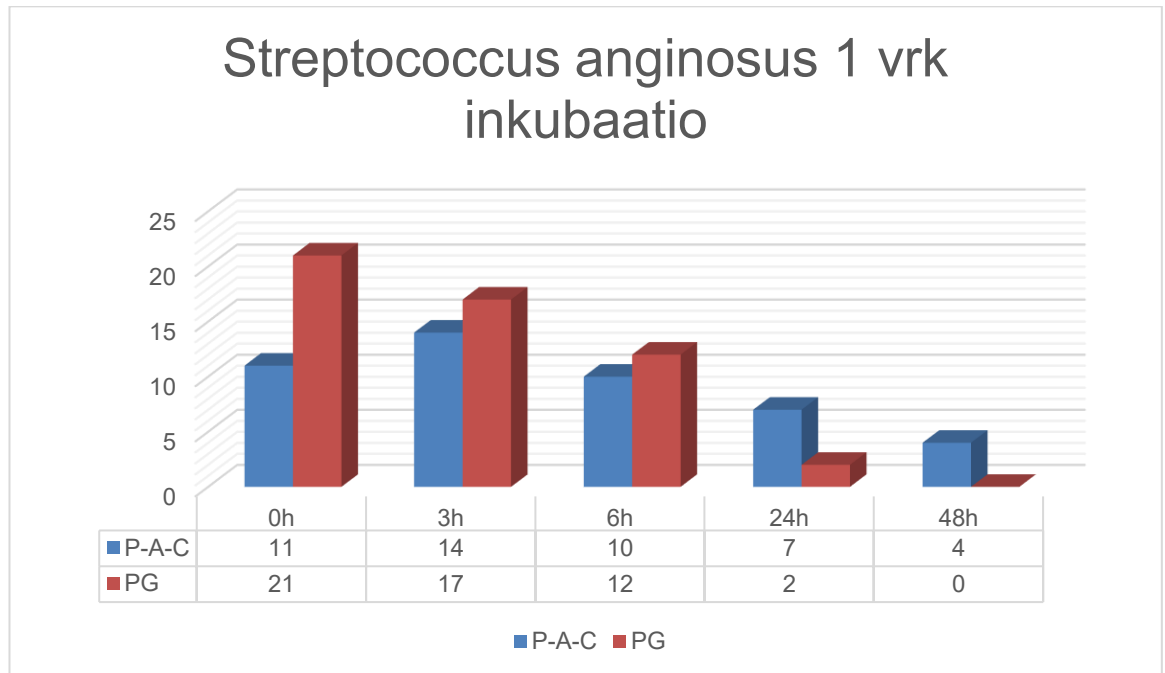
Kuvio 13



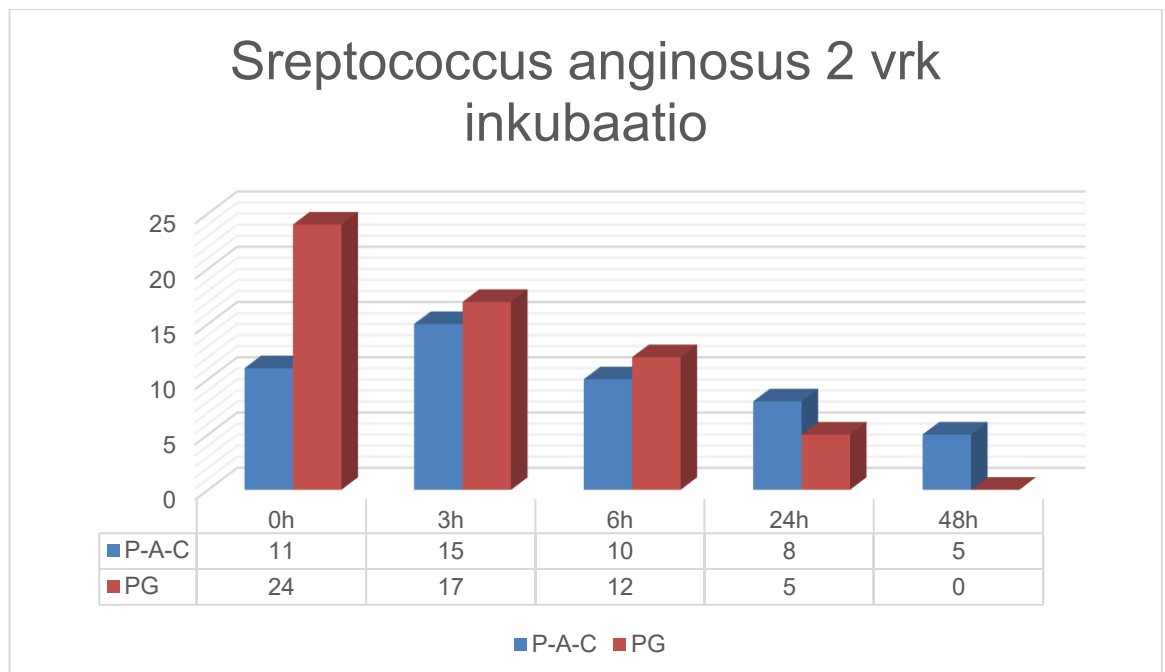
Kuvio 14

5.7 Streptococcus anginosus

Kuvioissa näkyy taas selkeä käyrä Portagermissa ja hieman erikoisempi käyrä Port-A-Cul:illa. Vertailtuna kuvioita 17 ja 18 huomaa jälleen, että inkubointiaika lisäsi pesäkkeiden määrää vain hieman. Oleellisempaa olikin, että pesäkkeitä löytyi Port-A-Cul:in tapauksessa vielä 48 tuntia vanhan näytteen viljelystä.



Kuvio 15



Kuvio 16

6 POHDINTAA

Tämän työn tarkoituksena oli vertailla näitä kahta näyteputkea keskenään ja tämän työn tavoitteena oli tuottaa laboratoriolle dataa kumpi näyteputkista säilyttää bakteerit pidempään elinkykyisinä sekä antaa laboratoriolle käyttökokemuksia heille uudesta näyteputkesta.

Kuten edellä todettiin, niin aluksi havaittiin ongelmia niin septumin läpäisemisessä tarkalla instrumentilla ja laimennoksen mittaamisessa tarkasti viljelyyn. Tämä ongelma ratkaistiin tekemällä laimennosta enemmän kuin alkuperäisessä suunnitelmassa oli tarkoitus ja otettiin ruiskulla mahdollisimman vakioidulla tavalla kaikilla kerroilla kustakin näyteputkesta.

Teoreettisella puolella jäi hieman harmittamaan että Prevotella melaninogenicasta ja Bacteroides thetaiotaomicronista oli hyvin hajanaisesti tietoa tarjolla. Tämä ei oikeastaan työhön sinänsä vaikuttanut, mutta olisi ollut mielekkäämpää lisätä näistä enemmän tietoa työhön.

Työn aikana huomattiin myös, että käytössä ollut Port-A-Cul oli huomattavan vaikea avata. Vaikkakin sitä ei välttämättä tarvitse tehdä normaalikäytössä, niin kokemus on osoittanut sen olevan tarpeellista. Samassa yhteydessä havaittiin, että kun septumin ympäriltä avataan sitä paikallaan kiinni pitävä metallikaulus, niin kumiseptumi on hyvinkin löysä. Eikä kaulusta enää saa paikalleen avaamisen jälkeen. Portagermissä tämä on ratkaistu huomattavasti elegantimmin; korkki on kierrekorkki, jonka saa helpolla auki, mutta myös uudelleen kiinni. Portagermissä kuminen septumi taas on hyvin jäykkä eikä se kovinkaan helposti irtoa, vaikka tämä kierrekorkki puuttuisikin. Tähän kuitenkin löytyi syy myöhemmin asiaa tutkittaessa; Port-A-Cul -sarjassa on erilliset tuotteet nesteille, joka siis oli käytössämme, ja kiinteille näytepaloille. Tätä avattavaa versiota meillä ei ollut työtä tehdessämme käytössä. Kuitenkin jos kentällä olisi käytössä testaamamme malli ja se pitäisi avata, niin metallikauluksen avaaminen muodostaa työtaturmariskin. Kuitenkin Portagerm tuntui työtä tehdessä myöskin viimeistellymmältä, ja sitä oli mielekkäämpi käyttää.

Työssä jouduttiin käyttämään tavallista ruiskua ja neulaa laimennoksen ottamiseen näyteputkesta. Nämä eivät kuitenkaan ole kovinkaan tarkkoja mittausvälineinä, joten ei voida olla täysin varmoja työn mittaustarkkuuksista. Tämä ongelma ratkaistiin tekemällä

liuosta kuljetusastioihin enemmän kuin alkuperäisessä suunnitelmassa oli suunniteltu (800 mikrol) ja näyte otettiin mahdollisimman vakioidulla tavalla.

Kummassakaan näyteputkessa ei kumina septumi kestänyt toistuvaa neulalla läpäisyä. Loppuvaiheessa septumit olivat hyvin riekaleisia. Bakteerit pyrittiin saada laimennoksissa pysymään hengissä käyttämällä parafilmiä näyteputken sulkemisessa heti näytteen oton jälkeen.

Jostain syystä *Streptococcus pneumoniae*ta sisältäneessä Portagermissä oli näyteputken sisällä oleva geeli siirtynyt. Tämä saattoi vaikuttaa tulokseen.

Loppupäätelmänä tulimme siihen tulokseen, että vaikka molemmat näyteputket ajavat asiansa melko tasaisesti, niin Portagerm olisi vertailun voittaja. Molemmat suoriutuvat tehtävästään hyvin, Port-A-Cul jopa joissain tapauksissa paremmin kuin mitä Portagerm, varsinkin jos ainoa huomioitava kriteeri on puhtaasti näyteputkesta saatu, laskettavissa oleva pesäkemäärä. Mutta Portagermilla on muita etuja Port-A-Cul:iin nähden. Näistä suurimpana valttina Portagermillä on se, että se on jo käytössä kentällä ja tuttu näyteputket niin hoitohenkilöstölle kuin laboratoriossa työskenteleville. Lisäksi käytössä oleva Portagerm on ns. yhden mallin ratkaisu. Samassa näyteputkessa voi kuljettaa kudoksenäytettä kuin nestettäkin. Port-A-Cul:ia pitäisi olla molempia varastossa tarpeen mukaan. Tämä taas tuo lisää ongelmia logistisesti; säilytykseen, varastointiin, vanhenemiseen ja kuljettamiseen. Ja kuten työn aikana tuli havainnollistettua, niin työssä käytössä ollut Port-A-Cul on työtaturmariski, mikäli sitä erehdytään avaamaan voimakeinoin.

Vaikkakin tekemäämme testausta voi pitää luotettavana, niin se ei ole mielestämme suoraan verrattavissa aiempiin tutkimuksiin, mukaan lukien niihin, joita tässä opinnäytetyössä käytiin läpi. Tämä johtuu siitä, että vaikkakin kaikki testit ovat hyvin samankaltaisia ja sisältävät vain pieniä variaatioita mm. aikapisteiden ja bakteerien suhteen, niin kuitenkin emme löytäneet toista testausta jossa olisi ollut käytössä molemmat käyttämistämme näyteputkista.

Mutta vaikkakin tutkimustyömme antoi hyvin testituloksia niin, jotta asiasta voitaisiin tehdä lopullinen ratkaisu, olisi selvitettävä uudella, laajemmalla tastauskella erot näiden kahden välillä. Olisi testattava molemmista saman tyyppin näyteputket, eli Portagerm ja Port-A-Cul:in kiinteiden näytteiden näyteputket ja vielä Port-A-Cul:in nesteiden näyteputket. Lisäksi astioita olisi varattava riittävästi, jotta voitaisiin tehdä tuplakappaleet kaikista kannoista ja siten, että jokaista aikapistettä kohden olisi oma näyteputki. Näin saataisiin varmistettua että jokaisesta kannasta saataisiin luotettavaa dataa.

LÄHTEET

Belko, J., Goldman, D., Macone, A. ja Zaidi, A. Clinically significant infections with organisms of the *Streptococcus milleri* group, *The Pediatric Infectious Disease Journal*, August 2002, vol. 21, iss. 8 p. 715-723.

Drake, C., Barenfanger, J., Lawhorn, J. & Verhulst, S. 2005. Comparison of Easy-Flow Copan Liquid Stuart's and Starplex SwabTransport Systems for Recovery of Fastidious Aerobic Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*.

Heikkilä, R. 2002. *Bakteriologia*. Heikkilä R., Hellsten S., Koukila-Kähkölä, P., Kurkinen, T., Meurman, O., Nummelin, R., Pastila, S., Richardson, M. & Ylönen, P., *Teoksessa Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa*. Kuntaliitto. Gummerus Kirjapaino OY: Jyväskylä. 31-40.

Hindiyyeh, M., Acevedo, V. & Carrol, K.C 2001. Comparison of Three Transport Systems (Starplex StarSwab II, the New Copan Vi-Pak Amies Agar Gel Collection and Transport Swabs, and BBL Port-A-Cul) for Maintenance of Anaerobic and Fastidious Aerobic Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 39.1:337-380.

Jensen, A., Hoshino, T. ja Kilian, M. 2013. Taxonomy of the Anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 63.

Jousimies-Somer, H., Summanen, P., Citron, D., Baron, E., Wexler, H. & Finegold, S. 2002. *Anaerobic Bacterial Manual* 6th edition, Wadsworth – KTL

Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schereckenberger, P. & Winn, W, Jr. 1997 *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th Edition. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. USA. 4-30, 700-712.

Linné, J., Ringsrud, K. 1992. *Basic techniques in Clinical Laboratory Science*, 3rd edition. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. USA. 440-441

Rantakokko-Jalava, K. ja Anttila, V.-J. 2012. Muut streptokokit, enterokokit ja muita grampositiivisia kokkeja, *S. anginosus* -ryhmä. *Teoksessa Mikrobiologia, immunologia*

ja infektiosairaudet 1. Hedma, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. ja Vaara, M. (toim.) Duodecim. Gummerus Kirjapaino Oy: Jyväskylä.

Rehn, M., Kuusela, P. & Vaara M. 2010. Bakteerien virulenssitekijät. Teoksessa Huovinen, P., Meri, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet 1. Duodecim. Gummerus Kirjapaino Oy: Jyväskylä.

Ruoff, K. 1988. *Streptococcus anginosus* ("Streptococcus milleri"): The Unrecognized Pathogen, *Clinical Microbiology Reviews*, January 1988, vol. 1, No. 1. p. 102-108.

Vaara, M., Skurnik, M., & Sarvas, M. 2012. Eubakteerit ja arkkibakteerit: prokaryoottinen kehityslinja Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 1. Duodecim. Bookwell Oy: Porvoo 14-30

Van Horn, K., Audette, C., Sebeck, D. & Tucker K. 2008. Comparison of the Copan ESwab System with Two Amies Agar Swab Transport Systems for Maintenance of Microorganism Viability. *Journal of Clinical Microbiology*.

Xu, J., Magnus, K., Bjursell, J., Himrod, S., Lynn K. Carmichael, H., Chiang, Lora V., Hooper, J. ja Gordon 2003. A Genomic View of the Human-Bacteroides thetaiotaomicron Symbiosis, *Science* 28 Mar 2003:Vol. 299, Issue 5615, pp. 2074-2076 DOI: 10.1126/science.1080029.

Africa, C., Nel, J. ja Stemmet, M. Anaerobes and Bacterial Vaginosis in Pregnancy: Virulence Factors Contributing to Vaginal Colonisation, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2014, <https://doi.org/10.3390/ijerph110706979>

Babbar, A., Naveen Kumar, V., Bergmann, R., Barrantes, I., Pieper, D., Itzek, A. ja Nitsche-Schmitz, D. 2017. Members of a new subgroup of *Streptococcus anginosus* harbor virulence related genes previously observed in *Streptococcus pyogenes*, *International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 307, Iss. 3, April 2017, p. 174-181. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438422116302144?via%3Dihub>

Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS). International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects. 2002: Geneva. https://cioms.ch/wp-content/uploads/2016/08/International_Ethical_Guidelines_for_Biomedical_Research_Involving_Human_Subjects.pdf

Duodecim terveyskirjasto, Lääketieteen sanasto, artikkelin tunnus Itt02813 (02813). Viitattu 6.11.2020 https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Itt02813&p_hakusana=punktio

Eskelinen, S., Bakterinäytteet, Duodecim terveyskirjasto. 6.5.2016. Viitattu 6.11.2020 https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk02050&p_hakusana=bakteeriviljely

How, K., Song K. ja Chan, K. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line, Frontiers in Microbiology 9.2.2016, viitattu 24.11.2020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746253/>

Shah, H. ja Collins, D., Prevotella, a New Genus To Include Bacteroides melanogenicus and Related Species Formerly Classified in the Genus Bacteroides, International Journal Of Systematic Bacteriology 4/1990, p. 205-208. <https://www.microbiology-research.org/docserver/fulltext/ijsem/40/2/ijsem-40-2-205.pdf?expires=1604668866&id=id&accname=guest&checksum=BF65E8EB64238C10FD4012A902B00445>

Suomen Lääkäriliitto. Eettiset periaatteet kliinisessä tutkimustyössä- tutkijaa Suomessa sitovat säädökset. 2004. Viitattu 19.9.2020 <https://www.laakariliitto.fi/laakarinetikka/koulutus-ja-tutkimus/eettiset-periaatteet-kliinisessa-tutkimustyossa/>

Tankeshwar, A. 11.4.2016, Gram-Negative Cocci and Coccobacilli of Medical Significance; List of Bacteria and Diseases, Learn Microbiology Online. Viitattu 8.12.2020 <https://microbeonline.com/gram-negative-cocci-coccobacilli-medical-significance-list-bacteria-diseases/>

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, THL. Infektiotaudit ja Rokotukset- Pneumokokki. 2019. Viitattu 4.12.2019 <https://thl.fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/pneumokokki>

Turun AMK. Tutkimuksellinen opinnäytetyö. Tanskanen Ilona, 2016. Muokattu 2019. Viitattu 19.9.2020 <https://messi.turkuamk.fi/opiskelu/9/Sivut/Opinn%C3%A4ytety%C3%B6n-vaiheet.aspx>

TYKS Laboratoriot, Tutkimusohjekirja. Pu-Bakteeri, viljely 1 (anaerobi+aerobiviljely, syvämärkä). Päivitetty 7.10.2020. Viitattu 6.11.2020 webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/index.php?test=3491

Julkaisemattomat lähteet

BioMérieux'n Portagerm-kuljetuspullo. Ohjekirja.

Becton Dickinsonin Port-a-cul-kuljetuspullo. Ohjekirja.