

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikan koulutus

Mikrobiologia

2016

Hanna-Kaisa Montonen

VIRTSAN BAKTEERIVILJELY TUTUKSI

- Oppimateriaali virtsan bakteeriviljelystä
Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian
laboratorioon

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikankoulutus | Kliininen mikrobiologia

Kevät 2016 | 23+50

Kirjoita tekstiä napsauttamalla tätä.

Hanna-Kaisa Montonen

VIRTSAN BAKTEERIVILJELY TUTUKSI

- Oppimateriaali virtsan bakteeriviljelystä Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian osastolle

Virtsatieinfektiot ovat hengitystieinfektioiden jälkeen toiseksi yleisimpiä infektioita Suomessa. Vuosittain hoidetaan satojatuhansia virtsatieinfektioita. Tauti todetaan oireiden, liuskapikatestien ja bakteeriviljelyn perusteella. Bakteeriviljelystä bakteeri viljellään maljan kiinteälle agaropohjaiselle elatusaineelle. Yksi lisääntymiskykyinen bakteeri jakaantuu yön yli tapahtuvassa kasvatuksessa miljooniksi jälkeläisiksi ja muodostaa maljalle silmillä nähtäviä pesäkkeitä. Eri bakteerilajit muodostavat erilaisia pesäkkeitä. Näistä pesäkkeistä voidaan tehdä erilaisia tunnistustestejä, jotka perustuvat bakteerin biokemiallisiin ominaisuuksiin.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli valmistaa selkeä ja kattava oppimateriaali virtsan bakteeriviljelystä Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian osastolle. Oppimateriaali on suunnattu pääasiassa harjoitteluun tuleville opiskelijoille ja uusille työntekijöille, mutta on myös hyvä kertausmateriaali pitkään poissa olleille työntekijöille. Oppimateriaalissa käytettiin runsaasti havainnollistavia kuvia virtsan bakteeriviljelyn suorittamisen menetelmistä ja virtsatieinfektioita aiheuttavien bakteerien pesäkkeistä viljelymaljoilla. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli valmistaa yhtenäinen ja selkeä oppimateriaali, joka nopeuttaisi ja selkeyttäisi asioiden oppimista virtsan bakteeriviljelyprosessista.

Opinnäytetyö toteutettiin toimeksiantosopimuksen luvalla Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian osaston kanssa. Tämä opinnäytetyö on toiminallinen kehittämistyö, koska tuotoksena syntyi oppimateriaali ja prosessista tuotettiin raportti. Opinnäytetyö toteutettiin Turun ammattikorkeakoulun opinnäytetyöohjeiden mukaan ja noudattaen hyvää tieteellistä käytäntöä. Lähdekritiikkiin kiinnitettiin tarkkaa huomiota ja lähteet merkittiin tarkasti. Eettisiä ongelmia opinnäytetyössä ei ollut, koska tutkimuksen kohteena olivat ainoastaan virtsan bakteeriviljelymaljat. Maljat kuvattiin niin, että näyteenantajaa ei ole mahdollista selvittää.

Tuotoksena valmistui kirjallinen oppimateriaali Virtsan bakteeriviljely tutuksi-oppimateriaali Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian osastolle. Sivuja tuotoksessa on 50 ja kuvia 30 kappaletta. Tutkimustehtävä suoritettiin onnistuneesti ja tuotoksena syntyi selkeä ja laadukas oppimateriaali, jota voidaan tulevaisuudessa hyödyntää virtsan bakteeriviljelyn opetuksessa Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian laboratoriossa.

ASIASANAT:

Virtsatiet, bakteriologia ja oppimateriaali

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Laboratory Science | Clinical Microbiology

Spring 2016 | 23+50

[Click here to enter text.](#)

Hanna-Kaisa Montonen

URINE CULTURE

- Guidebook for urine cultures for the Clinical Microbiology Laboratory of the Seinäjoki Central Hospital

In Finland urinary tract infections are the second common infections, as the respiratory infections are the most common infections. Yearly hundreds of thousands urinary tract infections are being treated in Finnish hospitals and health care centers. Urinary tract infections can be identified by analysis of the symptoms, rapid tests or with the bacterial culture from patients' urine sample. In bacterial culture bacteria is set to grow plate on a solid agar-based growth medium. One living bacteria can produce millions of offspring when it's set to grow overnight. These bacteria will form visible colonies. Every bacterium will create a different kind of colony and with these colonies it's possible to perform a series of identification tests that are based on the biochemical characteristics of the bacteria.

The objective of this work was to make a simple and comprehensive guidebook of urine cultures culture for Clinical Microbiology Laboratory of Seinäjoki Central Hospital. The material is directed for the students and for the new employees, but it also provides a good informative material for employees that have been absent for a long time. Thesis was built together by using lots of illustrative pictures of urine cultures and colonies of urinary tract infection causing bacteria on culture plates the main objective of this thesis was to create a clear and consistent guidebook that would educate and aid the process of urine culture.

This work is done with the an agreement of the Clinical Microbiology Laboratory department of the Seinäjoki central hospital. The described work is a functional development of the urethral bacterial culture process and as the result of this assignment came the guidebook of the process and also literal report was created of carrying out the assignment. The work was made to meet the standards set by the University of Applied Sciences of Turku and using appropriate scientific methods. Much attention was used for investigating the reliability of the sources and they were listed thoroughly. During the project there were no ethical problems, as the study was based on the information that was gathered from culture plates that were named with a serial number.

As the result of this project came the literal guidebook "Virtsan bakteeri-viljely tutuksi"- The Guidebook of urine culture for the microbiological department of Seinäjoki Central Hospital. The guidebook consists of 50 pages and 30 illustrative pictures. The assignment was carried out successfully and as the outcome came a high-quality guidebook that can be used in education of urine culture at the laboratory of microbiological Clinical Microbiology Laboratory of Seinäjoki Central Hospital.

KEYWORDS:

Urinary tract infections, bacteriology and guidebook urine culture

SISÄLTÖ

1. JOHDANTO	5
2. TEOREETTINEN TAUSTA VIRTSAN BAKTEERIVILJELYPROSESSIN OPPIMISELLE	7
2.1 Virtsateiden rakenne ja virtsan erityys	7
2.2 Kliininen bakteriologia	8
2.3 Oppiminen ja oppimateriaali	10
3. OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄ	12
4. OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	13
4.1 Opinnäytetyön toteutus	13
4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	13
4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	14
5. OPINNÄYTETYÖN TUOTOKSEN TARKASTELU	16
6. POHDINTA	18
LÄHTEET	20

Liitteet

Liite 1. Opinnäytetyön toimeksiantosopimus

Liite 2. Virtsan bakteeriviljely tutuksi- oppimateriaali Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian osastolle

1. JOHDANTO

Virtsatieinfektiot ovat toiseksi yleisimpiä hoitoon johtavia infektioita ja vuosittain suorite- taankin yli miljoona virtsan bakteeriviljelyä. Suomessa hoidetaan vuosittain noin 250 000 potilasta avohoidossa ja sairaalassa noin 20 000 virtsainfektiotapausta.(Käypähoito 2015.) Selvästi yli puolet viljelyyn tulevista näytteistä on kuitenkin negatiivisia (Sarkkinen, Paattiniemi ja Kärpänoja. 2012).

Virtsatieinfektiolla tarkoitetaan mikrobin aiheuttamaa tulehdusta virtsateiden eri osissa. Tavallisimmin infektion aiheuttavat bakteerit mutta myös virukset, mykoplasmat ja sienet voivat aiheuttaa virtsatietulehdusta. Virtsatieinfektiot jaetaan sijainnin ja kliinisen taudin- kuvan perusteella ylempien- ja alempien virtsateiden infektioihin.(Pasternack & Saha 2012.)

Naisilla virtsatietulehdus on miehiä yleisempi vaiva, koska naisilla on lyhyempi virtsaputki kuin miehillä. Infektio aiheutuu tavallisimmin ihon omien bakteerien joutumisesta virtsa- rakkoon. Virtsanäytteen otossa pyritään noudattamaan näytteenotto-ohjeita, jotta näyte olisi mahdollisimman laadukas ja edustava. Näyte voidaan tutkia virtsan bakteeriviljelyllä tai liuskatesteillä. (Luomio 2012.) Virtsan bakteeriviljelyn alustava tulos valmistuu noin vuorokauden sisällä, jolloin bakteerit ovat ehtineet lisääntyä viljelyalustalla muodostaen näkyviä pesäkkeitä. Eri bakteerit muodostavat elatusaineen pinnalle erilaisia pesäkkeitä, jotka helpottavat tunnistusta. Jos virtsaviljelyssä kasvaa bakteereita niin paljon että tu- lehdus on mahdollinen, tutkitaan vielä jatkoviljelyssä bakteerien herkkyys antibiooteille. (Eskelinen 2014.)

Tämä opinnäytetyö on toiminnallinen opinnäytetyö, mutta myös samalla kehittämistyö, jonka tarkoituksena on luoda yhtenäinen oppimateriaali Seinäjoen kliinisen mikrobiolo- gian laboratorioon virtsan bakteeriviljelystä. Materiaali tulee sisältämään ohjeet virtsan bakteeriviljelyn eri työvaiheisiin, bakteerien tunnistusmenetelmien läpikäyntiin sekä ly- hyet teoriakatsaukset ja kuvat yleisimmistä virtsatieinfektioita aiheuttavista bakteereista. Oppimateriaalin tarkoitus on olla mahdollisimman helposti ymmärrettävä, looginen ja kat- tava, jotta virtsaviljelyn periaatteen oppiminen olisi mielekäästä. Valmis oppimateriaali olisi hyvä apu oppijan perehtyessä virtsan bakteeriviljelyn suorittamiseen. Näin oppijan asioiden sisäistäminen virtsan bakteeriviljelystä voisi nopeutua.

Aikaisemmat ohjeet Seinäjoen mikrobiologian laboratorion virtsaviljelytyöpaikassa työskentelyyn perustuvat laatukäsikirjan yleisohjeisiin. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa selkeämmät ja tiivistetyt ohjeet virtsan bakteeriviljelyyn, jotka helpottaisivat ja nopeuttaisivat opetettavan asian ymmärtämistä. Oppimateriaali tulee kuitenkin pohjautumaan aikaisemmin käytössä olleisiin työohjeisiin, koska virtsaviljelyn prosessi ei ole muuttunut. Oppimateriaali julkaistaan painetussa muodossa, josta oppijat voisivat seurata ohjeita työskentelyn ohella.

2. TEOREETTINEN TAUSTA VIRTSAN BAKTEERIVILJELYPROSESSIN OPPIMISELLE

2.1 Virtsateiden rakenne ja virtsan erityys

Tärkein nesteen poistumistie elimistöstä on munuaisten tuottama virtsa, joka poistuu elimistöstä virtsateitä pitkin. Virtsatiet alkavat kahdesta kaarevasta munuaisesta. (Nienstedt & Kallio 2012.) Munuaiset ovat pavunmuotoisia, noin 10–12 cm pituisia. Munuaisista voidaan erottaa kolme osaa: sisimpänä munuaisen ydin, sitä ympäröi kuori-kerros ja uloimpana munuaisen kapseli. (Vierimaa & Laurila 2010.) Munuaiset sijaitsevat selkärangan molemmilla puolilla, vatsaontelon elinten takana. Niiden koveranpuolen keskikohdasta, munuaisportista, kulkevat suuret verisuonet ja imusuonet. (Nienstedt & Kallio 2012.)

Molemmissa munuaisissa on noin miljoona nefronia, jotka erottavat osan valtimoveren veriplasmasta alkuvirtsaksi. Nefronit koostuvat munuaiskeräsestä ja munuaistiehyestä. Munuaiskeräsessä on keräsen kotelon suojissa hiussuonikeräsen eli glomerulus, johon tuojasuoni tuo verta ja viejäsuoni vie sitä pois. Näiden ohuiden valtimoiden välissä on ohuita hiussuonimaisia suonia, jotka suodattavat veriplasmaa. Keräsessä vallitsevan korkean verenpaineen vuoksi vain viidesosa veriplasmasta puristuu keräsen koteloon ja verisolut ja proteiinit jäävät suuren kokonsa vuoksi verisuonistoon. (Nienstedt & Kallio 2012.)

Alkuvirtsa muodostuu munuaiskeräsessä, kun hiussuonikeräsen veriplasmasta suodatuu keräsen koteloon noin 200 litraa alkuvirtsaa vuorokaudessa. Alkuvirtsa siirtyy keräsen kotelosta tubulukseen, joka on pitkä ohut putki. Munuaiskeräsen lähellä mutkittelee proksimaalinen kiemuratiehyt, jossa suurin osa alkuvirtsasta imeytyy takaisin verenkiertoon. (Nienstedt & Kallio 2012.) Tämän jälkeen on Henlen linko, joka suuntautuu aluksi kohti munuaisydintä ja palaa jyrkän mutkan jälkeen takaisin kohti munuaisen pintaa (Duodecim 2016). Seuraavana osana on lähellä glomerulusta kiemurteleva dentaalinen kiemuratiehyt, joka laskee kokoojaputkeen. Kokoojaputki kerää jo melkein lopullisen virtsan useista tubuluksista. Tämän jälkeen kokoojaputkiston kokoama virtsa siirtyy munuaisaltaisiin. Alkuvirtsasta kuitenkin noin 99 % imeytyy takaisin tubuluksissa verenkiertoon ja lopullista virtsaa erittyy vuorokaudessa muutama litra. Normaalisti glukoosi, aminohapot ja osa suoloista imeytyy takaisin verenkiertoon, eivätkä erity virtsaan. (Nienstedt & Kallio 2012.)

Parillisten virtsajohdinten tehtävänä on kuljettaa virtsa munuaisaltaista virtsarakkoon. Virtsanjohtimien laskuaukot sijaitsevat virtsarakon keskiosan alapuolella. Niiden tehtävänä on estää virtsan nouseminen takaisin virtsanjohtimiin. Sileälihaskudoksisen virtsarakon tehtävänä on varastoida valmistettu loppuvirtsa. Virtsarakosta lähtee virtsaputki, joka on naisella noin 3-5 cm ja miehellä 10–15 cm pitkä. (Vierimaa & Laurila 2010.)

2.2 Kliininen bakteriologia

Kliininen bakteriologia tutkii terveyttä uhkaavien bakteerien ominaisuuksia ja niiden taudinaiheuttamiskykyä (Suomen Bioanalytikkoliitto ry. 2016). Bakteerit ovat yksisoluisia organismeja, joita esiintyy kaikkialla ympäristössämme. Bakteerit lisääntyvät jakautumalla sopivissa olosuhteissa. Bakteerit ovat kooltaan mikroskooppisia, mutta laboratorion sopivissa olosuhteissa ne saadaan kasvamaan näkyviksi pesäkkeiksi, jotka sisältävät tuhansia bakteerisoluja. Bakteerit ovat alkeistumallisia solumuotoja, koska niiden perintöainesta ei peitä tumakotelo. Perintöainesta suojaa kuitenkin solukalvo ja sen ulkopuolella on vielä soluseinä. Lisäksi bakteeria suojaa hyytelömäinen kapseli. Bakteereilla voi olla myös liikkumiseen käytettäviä värekarvoja, flagelloja ja tarttumista helpottavia tarttumiskarvoja, fimbrioita. (Heikkilä, Hellsten & Koukkila-Kähkölä. 2005; Karhumäki, Jonsson & Saros. 2005.)

Bakteerit voidaan jaotella niiden soluseinän rakenteen mukaan grampositiivisiksi ja gramnegatiivisiksi. Gramnegatiivisten bakteerien soluseinää peittää ulkokalvo, joka tekee niistä vastustuskykyisempiä antibiootteja kohtaan, verrattuna grampositiivisiin bakteereihin. Grampositiivisilla bakteereilla on kuitenkin gramnegatiivisiin bakteereihin verrattuna paksumpi peptidoglykaani-kerros soluseinämässään, joka antaa bakteereille muodon ja mekaanisen suojan.

Bakteerit voidaan jakaa myös muodon perusteella erilaisiin ryhmiin. Tavallisimmat muodot infektiota aiheuttaville bakteereille ovat pallomaiset kokit ja pitkänomaiset sauvat. Kokkibakteerit voivat esiintyä yksin, pareittain, ryhminä tai ketjuina. Sauvabakteerit voivat myös esiintyä ketjuina. (Heikkilä, Hellsten & Koukkila Kähkölä. 2005.) Muita bakteerien muotoja ovat käyrät vibriot ja kierteiset spirokeetat (Karhumäki, Jonsson & Saros. 2005).

Vaikka noin sata bakteerilajia aiheuttavatkin ihmiselle vakavia infektiota, ovat bakteerit myös välttämättömiä ihmisen terveyden ja hyvinvoinnin kannalta. Ihmisen elimistöön alkaa jo parin tunnin kuluttua syntymästä muodostua mikrobisto eli normaalifloora. Siihen kuuluu ihmiselle vaarattomia bakteereita, joista eräät estävät haitallisten bakteerien lisääntymisen. (Otavan opisto 2015; Karhumäki, Jonsson & Saros. 2005.) Normaaliflooran bakteerit tuottavat myös veren hyytymisessä tarvittavaa K-vitamiinia ja suolistossa tuotettua B-vitamiinia. Normaaliflooran bakteerit tuottavat myös emättimen limakalvoja suojaavaa maitohappobakteereita. Normaaliflooraa esiintyy kehossa eniten iholla taivekohdissa ja elimistön aukkojen ympärillä sekä limakalvoilla. Normaaliflooran bakteerit voivat aiheuttaa myös infektion jouduttuaan muille alueille. Eräitä tavallisimpia suoliston normaaliflooran aiheuttamia infektiota ovat virtsatieinfektiot (Karhumäki, Jonsson & Saros 2005.) Bakteerivapaita alueita kehossa ovat normaalisti kaikki alueet, jotka eivät ole kosketuksissa kehon ulkopuolelle. Tällaisia alueita ovat verenkiertojärjestelmä, sisäelimet ja hermosto. (Heikkilä, Hellsten & Koukila-Kähkölä 2005).

Parhaat kasvuolosuhteet infektiota aiheuttaville bakteereille on ihmisen kehon lämpötila. Jotkin bakteerit sietävät kuitenkin erittäin kylmiä tai erittäin kuumia olosuhteita. Myös ravintonsa suhteen bakteerit ovat erilaisia. Toiset kliiniset bakteerit ovat erittäin vaativia kasvuolosuhteittensa vuoksi ja toiset tyytyvät huomattavasti vähempään. Lisäksi bakteerien hapensieto vaihtelee, ja ne voidaan jakaa happea sietäviin eli aerobisiin ja happea ei-sietäviin eli anaerobisiin bakteereihin. (Heikkilä ym. 2005, 35.) Ympäristön happamuus vaikuttaa myös bakteerien selviytymismahdollisuuksiin (Karhumäki, Jonsson & Saros 2005).

Mikrobiologisista näytteistä etsitään tulehduksen aiheuttaneen bakteerin tai bakteerien lajeja. Mikrobiologisia näytteitä voidaan ottaa kaikista elimistön nesteistä ja eritteistä kuten verestä, virtsasta tai haavoista. Näytteitä otettaessa tarkoituksena on saada infektion aiheuttajamikrobi näytteeseen. Näyte pitäisi ottaa, säilyttää ja kuljettaa niin, että taudinaiheuttaja pysyy lisääntymiskykyisenä. Näytteenotossa tulisi välttää normaaliflooran joutumista näytteeseen, koska se vaikeuttaa taudinaiheuttajabakteerin toteamista. Mikrobiologiset näytteet olisi hyvä saada laboratorioon mahdollisimman pian, jotta bakteerien suhde näytteenottohetkeen pysyisi samana. Jääkaappilämpötila on kuitenkin hyvä useimmille näytteille, joiden kuljetus laboratorioon ei onnistu saman päivän aikana. (Karhumäki, Jonsson & Saros 2005.)

Bakteerien viljely on tärkein diagnostinen menetelmä mikrobiologiassa. Viljely mahdollistaa monipuoliset jatkotutkimukset, erityisesti antibioottien herkkyystutkimukset. Bakteerit voidaan viljellä elatusaineita sisältäville agarmaljoille tai nestemäisessä elatusaineessa. Yksi lisääntymiskykyinen bakteeri jakaantuu yön yli kestävässä kasvatuksessa miljooniksi jälkeläisiksi, jotka näkyvät maljalla pesäkkeinä. Eri bakteerit muodostavat maljalle erinäköisiä pesäkkeitä, jolloin niiden tunnistus helpottuu. Bakteerien tunnistaminen ja nimeäminen perustuu usein niiden biokemiallisiin ominaisuuksiin tai vasta-aineisiin perustuviin immunologisiin reaktioihin. (Heikkilä, Hellsten & Koukila-Kähkönen 2005.)

2.3 Oppiminen ja oppimateriaali

Ihminen on luonteeltaan utelias. Elämän ensihetkestä alkaen tallennamme uutta informaatiota ja rakennamme sitä jo vanhan koetun tiedon päälle. Tämä on oppimista, joka kytkeytyy toimintaan ja edesauttaa sitä. Oppimisen avulla sopeudumme ympäristöön ja saamme pohjan uuden oppimiselle. Oppiminen on aina aktiivista toimintaa, eikä vain tiedon passiivista rekisteröintiä. (Rauste-von Wright. 2003.) Oppimisprosessia kuvataan yhtenä merkittävimpänä määrätietoisena muutosprosessina, jota ihminen pyrkii itse ohjaamaan. Oppimisprosessissa ihminen työstää eri aistikanavilla saatua tietoa tietoisesti sekä alitajuntaisesti. Oppimisella kuvataan opiskelijan henkisen rakenteen kehittymistä, jossa muokataan tietoja ja oppiminen on monitahoista ja muuntuva. (Kauppila 2004.)

Ihmiset oppivat eri tavoilla, ja parhaiten he oppivat, jos saavat itse hankkia tietoa itselle sopivimmalla tavalla. Erilaisia oppimistapoja ovat auditiivinen-, visuaalinen-, taktillinen-, ja kinesteettinen tiedon vastaanottaminen. Visuaalinen oppija oppii parhaiten näköaistin avulla. Visuaaliselle oppijalle kuvat ja värit ovat tärkeitä muistamisen tukena. Auditiiviselle henkilölle taas äänet ovat tärkeitä ja hän selittää asioita mielellään toisille. Kosketus on tärkeä oppimisen muoto taktilliselle ihmiselle. Fyysiset tuntemukset ovat hänelle tärkeitä ja hän on hyvin tunneherkkä. Kinesteettinen henkilö oppii parhaiten kehonliikkeidensä avulla. Tekemällä oppiminen on paras oppimismuoto hänelle. (Laine, Salervo & Siven 2012.)

Tiedon nopea lisääntyminen ja uusiutuminen tekevät opetuksen sisällön jatkuvan uudistamisen pakolliseksi. Myöskin eri ajanjaksoina kohdistetaan opetukseen hyvin erilaisia odotuksia hyvästä oppimisesta. Kuitenkin käsitykset oppimisen luonteesta ja hyvään op-

pimiseen tähtäävistä prosesseista kehittyvät tieteellisten tutkimusten kautta. Opetettavan asian sisältö ratkaisee millaista oppimisen mekanisme käytetään erilaisissa tilanteissa. (Lehtinen & Hiltunen. 2002.)

Opetusvälineiden valinta on yksi osa opetusjärjestelyä, joiden avulla oppija ohjataan kohtaamaan oppiaineksen. On kuitenkin vaikea erottaa toisistaan oppiainesta, oppimateriaalia ja opetusvälineitä.(Hellström, 2008.) Helströmin mukaan (2008) oppiainesta kuvataan tiedonlähteenä, joka oppijalle opetustilanteessa annetaan. Oppiaines ei aina ole vain tietoa, vaan se voi olla myös ääniä, kuvia, asenteita tai motorisia liikkeitä. Oppimateriaali on virike ja ärsyke, joiden avulla oppija pyrkii kehittymään tarkoitettuun suuntaan. Oppimateriaali on yleiskäsite kaikelle materiaalille, jota käytetään oppimisen edistämiseksi opetustilanteissa. Oppimateriaali on väline, jolla oppija kohtaa opetettavan asian. Oppimateriaalina voi olla oppikirjat, pelit, kuvat, videot, tietokoneohjelmat, digitaalinen materiaali yms.(Hellström, 2008.)

3. OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄ

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on luoda käytännönläheinen oppimateriaali Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian yksikköön toiminnallisen opinnäytetyön ohjeistuksen mukaan. Opinnäytetyö sisältää raporttiosuuden ja käytännötoteutuksen. Tuotos on suunnattu bioanalytiikan opiskelijoille ja uusille työntekijöille oppimateriaaliksi, joka helpottaisi virtsan bakteeriviljelytyöpisteessä toimimista. Tässä opinnäytetyössä käytetään materiaalina Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian osaston työohjeita ja laajasti muuta kirjallista sekä sähköistä materiaalia.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa oppimateriaali, joka helpottaisi opiskelijoita ja uusia työntekijöitä sisäistämään virtsan bakteeriviljelyn suorittamisprosessin. Materiaali soveltuu myös kertausvälineeksi pitkään töistä poissaolleille henkilöille. Tavoitteena on myös ohjeiden selkeys, jotta työskentely voisi kaikilla oppijoilla olla yhdenmukaista.

4. OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

4.1 Opinnäytetyön toteutus

Tämän opinnäytetyön toimeksiantaja on Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian osasto, jonka kanssa on tehty toimeksiantosopimus. Toimeksiantosopimus on liitteenä raporttiosan lopussa. Tämän opinnäytetyön tekeminen ei vaatinut tutkimusluvan hakeamista.

Opinnäytetyöprosessi lähti käyntiin syksyllä 2015, jolloin sopiva aihe annettiin Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian laboratorion kautta. Sairaalan mikrobiologilta tiedusteltiin tarvetta virtsan bakteeriviljelyn oppimateriaalille ja aiheesta päätettiin toteuttaa opinnäytetyö. Kun aihe hyväksyttiin myös koulun puolesta, laadittiin toimeksiantosopimus mikrobiologian osaston kanssa. Tuona syksynä hankittiin materiaalia opinnäytetyöhön kuvailemalla bakteerimaljoja ja bakteeriviljelyyn tarvittavia välineitä. Syksyllä aloitettiin lähde- materiaalin hankkiminen.

Keväällä 2016 opinnäytetyöprosessi käynnistettiin tutkimussuunnitelman teolla ja tavoitteeksi otettiin opinnäytetyön valmistuminen viimeistään elokuussa. Opinnäytetyöprosessi kuitenkin eteni hyvin nopeasti ja opinnäytetyö oli jo lähes valmis huhtikuun lopussa, jolloin se esitettiin Turun Ammattikorkeakoulun opinnäytetyöseminaarissa. Tarvittava aineisto hankittiin internetistä käyttäen hyödyksi tiedonhakuohjelmia. Lisäksi käytettiin ammattikirjallisuutta ja tieteellisiä julkaisuja. Oppimateriaalissa hyödynnettiin myös Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian osaston laatukäsikirjaa työohjeiden kirjoitusvaiheessa. Opinnäytetyö sisältää myös paljon kuvia ja kaavioita, jotka opinnäytetyön tekijä on kaikki itse kuvannut tai piirtänyt, käyttäen apuna Paint- ja Word-ohjelmia.

4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Toiminnallinen opinnäytetyö on työelämän kehittämistyö, jonka tarkoituksena on kentällä käytännön toiminnan kehittäminen, ohjeistaminen, järjestäminen tai järjeistämisen. Toimeksiantajana voi olla kohderyhmän mukaan muun muassa kirja, CD tai näyttely mutta

tämän opinnäytetyön toteutustapa oli oppimateriaalin tuottaminen. Toiminnallinen opinnäytetyö on kaksiosainen, sisältäen toiminnallisen osuuden ja opinnäytetyöraportin. Ammattiteoria on pohjana toiminnalliselle opinnäytetyölle ja työ sisältää myös viitekehysosuuden. (Virtuaali ammattikorkeakoulu 2006.)

Opinnäytetyö oli luonteeltaan toiminnallinen, koska tarkoituksena on tuottaa oppimateriaalia käytäntöön ja tarkoituksena oli kehittää työelämän yhtä osa-aluetta mikrobiologian osastolla. Valmista tuotosta voidaan tarvittaessa hyödyntää opetusmateriaalina uusille työntekijöille tai opiskelijoille virtsan bakteeriviljelyn opetusprosessissa.

4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Etiikan peruskysymykset käsittelevät hyvää ja pahaa, oikeaa ja väärää. Arjessa ihmisillä on monia mielipiteitä oikean ja väärän tekemisestä. Myös tutkimuksen tekemiseen liittyy monia eettisiä ongelmia. Eettisesti hyvä tutkimus edellyttää hyvää tieteellistä käytäntöä ja ihmisarvon kunnioittamista. Myös epärehellisyyttä on vältettävä kaikissa opinnäytetyön tekovaiheissa. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009.) Opinnäytetyö valmistettiin eettisten ohjeiden mukaan loukkaamatta kenenkään ihmisarvoa tai tunteita.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry:n eettisten ohjeiden mukaan (2006) näyttemateriaalia on käsiteltävä luovuttajan yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen. Opinnäytetyö sisältää kuvamateriaalia potilasnäytebakteerimaljoista, joista potilastietoja ei voida selvittää.

Tieteellinen tutkimus voi olla hyväksyttävä ja luotettava vain, kun tutkimus on suoritettu hyvän tieteellisen käytännön määräämällä tavalla. Hyvää tieteellistä käytäntöä koskevien ohjeiden soveltaminen on tutkijoiden itsensä vastuulla, joille lainsäädäntö määrää rajat. Hyvä tieteellinen käytäntö on osa tutkimusjärjestöjen laatujärjestelmää. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012- 2014.)

Tutkimusetiikan näkökulmasta hyvän tieteellisen käytännön mukaan tutkimustyössä tulee noudattaa rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta tulosten tallentamisessa, esittämisessä, sekä tulosten arvioinnissa. Tutkimuksessa toteutetaan tieteellisen tiedon mukaista avoimuutta ja vastuullista tiedeviestintää tutkimusten tulosten julkaisussa. Hyvässä tutkimuksessa on myös annettava arvoa muiden tutkijoiden saavutuksille ja viittaukset heidän töihinsä on tehtävä asianmukaisesti. Tutkimuksen eri vaiheet on raportoitava tieteelliselle tiedolle asetettujen vaatimusten edellyttämällä tavalla. Lisäksi tutki-

mukselle täytyy hankkia aina tutkimuslupa ja ennakoarviointi on tehtävä. Hyvän tieteellisen käytännön mukaan kaikkien tutkimuksessa työtä tekevien on sovittava käytännön asioista ennen tutkimuksen alkua. Kaikki rahoituslähteet ja muut sidonnaisuudet on ilmoitettava tutkimukseen osallistuville henkilöille ja raportoitava tuloksien julkaistaessa. Keskeisenä osana tutkimusetiikan näkökulmasta on myös otettava huomioon tietosuojasiat. Lisäksi tutkijoiden on pidättäydyttävä arviointi- ja päätöksenteko tilanteista, jos heidän epäillään olevan esteellisiä. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012- 2014.) Opin- näytetyössä tehtiin viittaukset asianmukaisesti ja vilpintekoa ei työssä ollut.

Hyvän tieteellisen käytännön toteutumisesta vastaa ensisijaisesti jokainen tutkija itse mutta vastuu kuuluu myös koko tiedeyhteisölle. Samat käytännöt koskevat tutkijoita kuin myös erilaisten oppimateriaalien ja julkaisujen valmistamista. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta, 2012- 2014.)

5. OPINNÄYTETYÖN TUOTOKSEN TARKASTELU

Opinnäytetyön tuotos, Virtsan bakteeriviljely tutuksi-oppimateriaali (50 sivua, 30 kuvaa ja 2 kaaviota) luovutetaan Seinäjoen keskussairaalan käyttöön painettuna oppimateriaalina. Oppimateriaali on vapaassa käytössä kaikille sitä tarvitseville, kuten harjoitteluun tuleville opiskelijoille ja uusille työntekijöille, jotka tulevat työskentelemään virtsan bakteeriviljelytyöpisteessä. Tuotos koostuu 5 otsikosta, jotka sisältävät useita alaotsikoita. Oppimateriaali tehtiin Seinäjoen mikrobiologian laboratoriossa käytössä olevia toimintatapoja vastaavaksi.

Oppimateriaalin suunnittelu aloitettiin tutkimussuunnitelman valmistuttua maaliskuussa 2016. Työskentely alkoi perehtymällä Seinäjoella käytössä oleviin työ- ja testiohjeisiin virtsan bakteeriviljelystä ja muun luotettavan lähdemateriaalin hankkimisella. Lähdekriittikiä noudatettiin, jotta lopputulos olisi mahdollisimman luotettava. Tuotoksen tekeminen alkoi suunnittelemalla työohjeiden muotoa ja sisältöä. Työohjeiden loogiseen järjestykseen kiinnitettiin huomiota, jotta ne tukisivat virtsan bakteeriviljelyn suorittamisprosessia. Työohjeiden sisällöksi rajattiin Seinäjoen keskussairaalassa käytettävät virtsan bakteerien tunnistustestit ja työohjeet, joiden teoreettisena pohjana noudatettiin laatukäsikirjan työohjeita. Lisäksi lähteinä käytettiin aihealueen lähdekirjallisuutta ja testien työselosteita. Oppimateriaalissa käydään läpi myös virtsatieinfektioita aiheuttavien bakteerien diagnostiikkaa.

Oppimateriaalin työohjeita kirjoitettiin työohje kerrallaan, jotta kokonaisuudesta tulisi mahdollisimman selkeä ja jäsennelty. Jokainen työvaihe sisältää pienen teoriaosuuden, joka luo teoriapohjaa suoritettavalle työvaiheelle. Tuotos sisältää paljon kuvia ja kaavioita, joiden tehtävänä on selkeyttää asian ymmärtämistä ja helpottaa työvaiheiden suorittamista. Työohjeet pyrittiin pitämään mahdollisimman tiiviinä ja helppolukuisina. Lyhenteitä ei oppimateriaalissa käytetty, koska ne olisivat voineet johtaa väärinkäsityksiin.

Oppimateriaalin valokuvat kuvattiin itse ja muotoiltiin käyttäen apuna Paint-kuvankäsittelyohjelmaa ja Word-tekstinkäsittelyohjelmaa. Oppimateriaali sisältää myös itse tehtyjä kaavioita, jotka pohjautuvat luotettaviin lähteisiin. Kaavioita ei suoraan kopioitu lähteistä, vaan opinnäytetyön tekijä muokkasi niitä Word-tekstinkäsittely ja Paint-kuvankäsittely ohjelmalla. Kuvien muokkaus ja kaavioiden tekeminen vaati paljon aikaa, koska niistä

pyrittiin saamaan mahdollisimman selkeitä ja edustavia. Tuotos on tarkoitettu vain väritulosteena tulostettavaksi, koska bakteerimaljojen kuvien tarkastelu on mahdotonta, jos kuvat ovat mustavalkoisia.

Oppimateriaalin ulkoasusta haluttiin tehdä mahdollisimman helppolukuinen ja materiaalin alkuun laitettiin sisällysluettelo, josta on helppo hahmottaa oppimateriaalissa käsiteltävät asiat. Sivunumerointi helpottaa oppimateriaalissa läpikäytävien asioiden löytämistä.

6. POHDINTA

Virtsan bakteeriviljely tutuksi- oppimateriaalin tarkoituksena oli valmistaa selkeä ja yhtenäinen oppimateriaali Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian osastolle. Tämän tuotos auttaa bioanalyttikko-opiskelijoita ja uusia työntekijöitä perehtymään ja oppimaan virtsan bakteeriviljelyprosessin selkeiden kuvien ja työohjeiden avulla. Materiaali on lisäksi hyvä kertausväline työntekijälle, joka on joutunut olemaan pitkään poissa töistä. Tutkimustehtävä saatiin onnistuneesti suoritettua, koska sen tuloksena syntyi laadukas oppimateriaali Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian osastolle. Opinnäytetyön tekeminen kehitti myös sen tekijää tulevana alansa ammattilaisena.

Opinnäytetyön tuotoksen tekeminen aloitettiin miettimällä läpikäytäviä asioita oppimateriaalissa. Opinnäytetyöntekijä päätyi käsittelemään loogisessa järjestyksessä virtsan bakteeriviljelyn vaiheet ja yleisimmät virtsatieinfektioita aiheuttavat bakteerit. Opinnäytetyötä uhkasi koko ajan liiallinen paisuminen, mutta asioiden ja sivujen tiivistäminen olisi voinut olla epäedullista oppimateriaalin käyttäjille. Oppimateriaalin laatu olisi voinut myös heiketä, jos sivut olisivat olleet täydempiä ja kuvia olisi käytetty vähemmän.

Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian osastolla on käytössä laatukäsikirja, johon opinnäytetyö pitkälti perustuu. Opinnäytetyöntekijän mielestä tuo ohjeistus virtsan bakteeriviljelyprosessista kaipasi päivitystä ja hieman selkeämpiä kuvallisia ohjeita. Opinnäytetyöntekijä muokkasi laatukäsikirjan testiohjeita, hankki lisää tietoa kirjallisuudesta, liitti materiaaliin täydentävää kuvamateriaalia ja käänsi englanninkielistä materiaalia oppimateriaaliin.

Oppimateriaalissa esitetyt kuvat ovat luotettavia. Kaikki taulukot on tehty itse muokkaamalla luotettavien lähteiden esimerkkipuvia. Kaikki oppimateriaalin valokuvat ovat opinnäytetyöntekijän itse kuvaamia Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian laboratoriossa tai Turun Ammattikorkeakoulun mikrobiologian oppitunnilla. Seinäjoella kuvaus tapahtui sairaalajakso-harjoittelun ohella tauoilla ja Turussa kuvaus suoritettiin oppitunnin aikana. Kuvia voidaan pitää luotettavana, sillä Seinäjoen keskussairaalassa kuvatut maljat olivat potilaiden näytteitä, jotka tunnistettiin ja nimettiin huolellisesti potilastuloksina, kun taas Turun ammattikorkeakoululla kuvatut maljat kasvatettiin kontrollikannoista.

Haastavin osa opinnäytetyön teossa oli oppimateriaalin ulkoasun muokkaus, johon kuului kuvien ja kaavioiden asettelua. Hankaluuksia tuotti kuvien asettelu rinnakkain ja kuvatekstien oikeille paikoille saaminen. Myös kaavioiden tekeminen oli aluksi hankalaa, mutta perehtymällä tekstinkäsittelyohjelmien käyttöön niidenkin tekeminen onnistui. Kuvien koon ja värien valinta tuotti lisäksi vaikeuksia, koska valinnanvaraa oli niin paljon ja maljojen kasvuston värit eivät saaneet vääristyä, mutta niiden piti näyttää mahdollisimman selkeitä.

Myös ongelmia opinnäytetyön teossa tuotti englanninkielisten lähteiden käyttäminen. Tekstit olivat ammattisanastoa ja asioiden ymmärtäminen ja käsitteiden suomentaminen oli hankalaa opinnäytetyöntekijälle. Opinnäytetyöntekijä on kuitenkin melko tyytyväinen käännöksiinsä ja luottaa niiden oikeellisuuteen, koska opinnäytetyön on tarkastanut sairaalamikrobiologi ja Turun ammattikorkeakoulun mikrobiologian opettaja.

Tämän opinnäytetyön hyödyllisyyttä tukevat myös aikaisemmin tehdyt tutkimukset. Ruokolaisen (2010) tekemässä tutkimuksessa hyvän oppimateriaalin kriteereistä käy ilmi, että hyvän oppimateriaalin kriteereinä pidetään ammattialakohtaisuutta, sopivan haasteellista ja monipuolista ja selkeää materiaalia. Tämän oppimateriaalin teossa on pyritty noudattamaan näitä edellytyksiä. Tämän lisäksi oppimateriaalin aihe pyrittiin valitsemaan mahdollisimman tärkeästä asiasta. Virtsan bakteeriviljelyn tarpeellisuutta kuvaa Mikstra-työryhmän (ks. Mikstra 2004) tekemässä tutkimuksessa, jossa käy selväksi virtsan bakteeriviljelyn tarpeellisuus naisten komplisoitumattoman kystiitin epäilyissä, huolimatta Käypä Hoito-suosituksen kyseenalaistaessa virtsan bakteeriviljelyn tarpeellisuutta. Lisäksi aiheen tärkeydestä kertoo Turun ammattikorkeakoulun mikrobiologian opintojaksolle tehty oppimateriaali (ks. Ahlroth 2015.) kurssin sisällöstä, jossa virtsan bakteeriviljely on yhtenä läpikäytävänä asiana.

Opinnäytetyö onnistui kokonaisuudessaan hyvin ja sen tekemisen kanssa ei suurempia ongelmia ollut. Oppimateriaali ei kuitenkaan ole testattu käytännössä tiukan aikataulun vuoksi, joten se heikentää oppimateriaalin onnistumisen arviointia.

Opinnäytetyön jatkotutkimusaiheena voisi olla opetusvideo virtsan bakteeriviljelyn suorittamisesta Seinäjoen keskussairaalassa. Lisäksi oppimateriaalin teko Seinäjoen keskussairaalan mikrobiologian toiseen työpisteeseen, kuten veriviljely- tai ulostepisteeseen voisi olla hyvä opinnäytetyön aihe. Jatkotutkimusaiheena voisi myös käsitellä tämän oppimateriaalin hyödyllisyyttä ja toimivuutta käytännössä.

LÄHTEET

Ahlroth, E. 2015. Mikrobiologiaa bioanalyttikko opiskelijoille- Kliinisen mikrobiologian ohjeiden päivittäminen. Opinnäytetyö. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Duodecim Terveyskirjasto. 2016. Henlen linko. Viitattu 12.2.2016. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt01112.

Eskelinen, E. 2014. Virtsan bakteeriviljely (U-BAKTVI). Viitattu 20.2.2016 http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03153.

Heikkilä, R. 2005. Kliininen mikrobiologia tieteenalana. Teoksessa S. Hellsten. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. uudistettu painos. Helsinki: Suomen kuntaliitto.

Heikkilä, R. & Meurman, O. 2005. Laboriodiagnostiikka. Teoksessa S. Hellsten. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. uudistettu painos. Helsinki: Suomen kuntaliitto.

Hellström, M. 2008. Sata sanaa opetuksesta keskeisten käsitteiden käsikirja. Jyväskylä: Ps-kustannus.

Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uudistettu painos. Hämeenlinna: Tammi.

Karhumäki, E.; Jonsson, A. & Saros, M. 2005. Mikrobit hoitotyön haasteena. 1.painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

Kauppila, R. 2004. Opi ja opeta tehokkaasti. 2.painos. Jyväskylä: Ps-kustannus.

Käypä hoito. 2015. Virtsatieinfektiot. Viitattu 20.2.2016 <http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suositukset/suositus?id=hoi10050>.

Laine, A.; Salervo, P. & Siven, T. 2012. Opi ammattiin. 4.uudistettu painos. Helsinki: SanomaPro.

Lehtinen, E. & Hiltunen, T. 2002. Oppiminen ja opettajuus. Turku: Painosalama Oy.

Luomio, J. 2012. Virtsatulehdus aikuisilla, virtsatieinfektio. Duodecim terveyskirjasto. Viitattu 11.2.2016 http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00615.

Mikstra työryhmä. 2004. Virtsatietulehduksen hoitokäytännön muutokset 1998-2002. Suomen Lääkärilehti 30-32/2004. Viitattu 13.2.2016. <http://www.laakarilehti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/tyossa/laakeinfo/virtsatietulehduksen-hoitokaytannon-muutokset-1998-2002/>.

Niensted, W. & Kallio, S. 2012. Luut ja ytimet ihmiselimistö lyhyesti. 10.-13. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Otavan opisto. 2015. Mikrobeista on ihmiselle sekä hyötyä että haittaa. Viitattu 20.2.2016 http://opinnot.internetix.fi/fi/materiaalit/bi/bi5/3_seka_alkeistumallisten_bakteerien_etta_aitotumaisten_elioiden_geenit_ovat_dna-jaksoja/3.2_bakteerit/3.2.3_mikrobeista_hyotya_ja_haittaa?C:D=gr0z.grf4&m:selres=gr0z.grf4.

Pasternack, A. & Saha, H. 2012. Virtsateiden infektiot. Duodecim oppikirjat. Viitattu 11.2.2016 http://www.oppiportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/dtk/oppi/koti?p_selaus=27009&p_artikkeli=mun00500.

Rauste-Von Wright, M.; Von Wright, J. & Soini, T. 2003. Oppiminen ja koulutus. 9.uudistettu painos. Porvoo: WSOY.

Sarkkinen, H.; Paattiniemi, E-L. & Kärpänoja, P. 2012. Virtausytometriä tehostaa virtsatulehduksen laboratorioseuranta. Lääkärelehti 18/2012. Viitattu 20.2.2016. <http://www.laakari-lehti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/tieteessa/katsausartikkeli/virtausytometria-tehostaa-virtsatulehduksen-laboratorioseulontaa/>.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry. 2006. Bioanalytikon, laboratorionhoitajan eettiset ohjeet. Viitattu 25.2.2016 [http://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/220004/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011+\(1\).pdf](http://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/220004/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011+(1).pdf).

Suomen Bioanalytikkoliitto ry. 2016. Kliininen mikrobiologia. Viitattu 6.3.2016 http://www.bioanalytikkoliitto.fi/bioanalytikon_ammatti/erikoisalalat/kliininen_mikrobiologia/.

Ruokolainen, T. 2010. Hyvän oppimateriaalin jäljillä - opttajaharjoittelijan tutkimusmatka ammattikorkeakoulun kielipintojen oppimateriaaleihin. Kieli, koulutus ja yhteiskunta. Viitattu 16.2.2016.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012-2014. Hyvä tieteellinen käytäntö. Viitattu 16.4.2016 <http://www.tenk.fi/fi/htk-ohje/hyva-tieteellinen-kaytanta>.

Työterveyslaitos. 2011. Perehdytä hyvin. Viitattu 13.2.2016 <http://www.ttl.fi/fi/toimialat/soter/vanhusty/osaaminen/perhehdytys/Sivut/default.aspx>.

Vierimaa, H. & Laurila, M. 2010. Kehon anatomia ja fysiologia. 1. painos. Helsinki: WSOYpro Oy.

Virtuaali Ammattikorkeakoulu 2006. Monimuotoinen/toiminnallinen opinnäytetyö. Viitattu 13.2.2016 <http://www2.amk.fi/digma.fi/www.amk.fi/opintojak-sot/030906/1113558655385/1154602577913/1154670359399/1154756862024.ht>.

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPISKELIJAN TIEDOT

Nimi Hanna-Kaisa Montonen
 Osoite _____
 Puhelin koti _____ Puhelin työ _____
 Sähköposti hannakaisa.montonen@gmail.com
 Koulutusohjelma Bioanalytiikan ko.

OPINNÄYTETYÖ

Aihe/ työnimi

Oppimateriaali virtsan bakteeriviljelyyn
 'Päikkään' Seinäjoen keskus-sairaala
 virtsapalkan työpisteeseen

Aikataulu

Syysy 2015 - Syysy 2016

TOINEKSIANTAJA

Organisaatio Etelä-Pohjanmaan shp, Seinäjoen ks, kl. mikrobiologia
 Työn ohjaaja / yhteysthenkilö Kerttu Saha, sairaalamikrobiologi
 Osoite _____
 Puhelin _____ Sähköposti kerthu.saha@epshp.fi

OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT

Ohjaava opettaja Seija Kirkko-Jaakkola
 Puhelin 040 3550425 Sähköposti seija.kirkko-jaakkola@turunamk.fi

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



OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT*

OHJAUS JA VASTUUT

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

OIKEUDET

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

TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

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

TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

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

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

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

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

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksiin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETTYLLÄ TAVALLA

31.10.2015

30.10.2015

Hanna-Kaisa Montonen

Opiskelija

Shetti Salonen

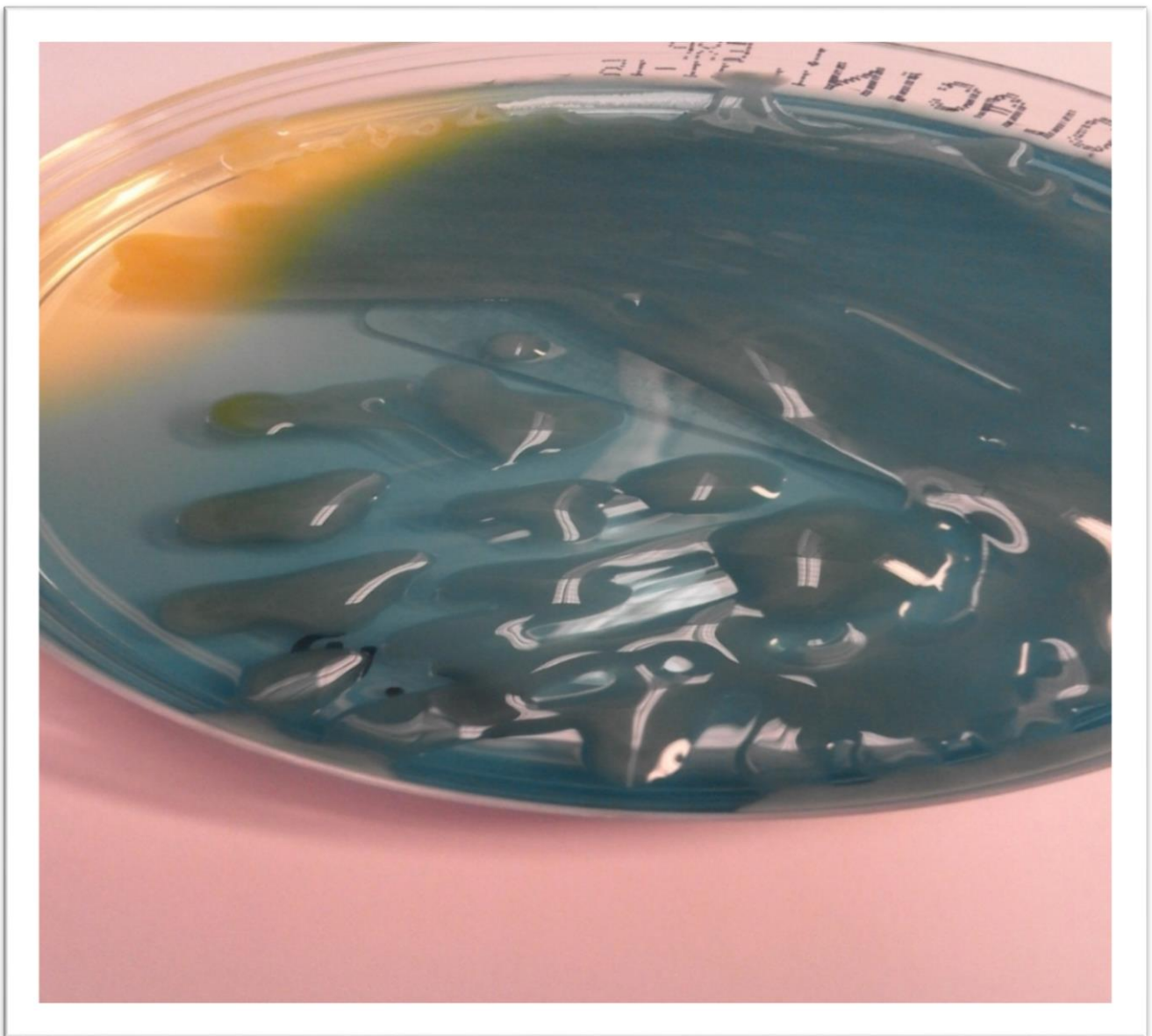
Toimeksiantaja

LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA

* Turun ammattikorkeakoulun toiminnan yhtiöittämistä vuoden 2014 alusta valmistellaan. Osakeyhtiön toiminnan alettua tämä sopimus siirtyy Turun AMK:n toiminnan vastaanottavalle yhtiölle.

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

VIRTSAN BAKTEERIVILJELY TUTUKSI - OPPIMATERIAALI SEINÄJOEN KESKUSSAIRAALAN MIKROBIOLOGIAN OSASTOLLE



SISÄLLYS

1 VIRTSAEINFEKTIOITA AIHEUTTAVAT BAKTEERIT	5
1.1 Gramnegatiiviset sauvabakteerit	5
1.1.1 Enterobakteerit	5
1.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.2 Grampositiiviset kokkibakteerit	10
1.2.1 Stafylokokit	10
1.2.2 Streptokokit	13
1.2.3 Enterokokit	14
2 VIRTSAN BAKTEERIVILJELY	15
2.1 Virtsan bakteeriviljelyä varten otettava näyte virtsatieinfektiota epäiltäessä	15
2.2 Virtsan viljely Cled-maljalle	18
2.3 Puhdasviljely	19
2.4 Bakteerien kasvun määrän arviointi ja alustava bakteerin tunnistus	20
3. VIRTSAEINFEKTIOITA AIHEUTTAVIEN BAKTEERIEN TUNNISTUS	22
3.1 Gramvärjäys	22
3.2 Oksidaasitesti	24
3.3 Katalaasitesti	25
3.4 Bakteerien tunnistus biokemiallisesti	26
3.4.1 Chromagar orientation-malja ("CHROMO")	26
3.4.2 Vitek	27
3.4.3 API 20 E	29
3.5 Novobiosiini-testi	31
3.6 C-390- kiekkotesti	31
3.7 Stafylokokkiagglutinaatiot	32
3.8 Sappieskuliinitesti	33
3.9 Arabinoositesti (Ara)	34
3.10 Nielumaljan hemolyysitesti	35
3.11 Streptokokkiagglutinaatio eli Streptex	36
4. HERKKYYSMÄÄRITYKSET	37
5. VIRTSAVILJELY MALJOJEN TUNNISTAMINEN VAIHEITTAIN	40

5.1 Sauvabakteerien tunnistaminen	40
6.2 Kokkibakteerien tunnistaminen	43
9.1 Grampositiivisten kokkien tunnistuskaavio	45
9.2 Gramnegatiivisten sauvojen tunnistuskaavio	46
Lähteet	47
KUVAT	
Kuva 1. E.coli Cled-maljalla	6
Kuva 2. Enterobacter cloacae Cled-maljalla	6
Kuva 3. Klebsiella Cled-maljalla	7
Kuva 4. Hunnuttava proteus	8
Kuva 5. Proteus vulgaris	8
Kuva 6. Proteus mirabilis	8
Kuva 7. Pseudomonas aeruginosa Cled-maljalla	9
Kuva 8. Staphylococcus aureus Cled maljalla	10
Kuva 9. Staphylococcus saprophyticus Cled- maljalla	11
Kuva 10. Staphylococcus.epidermidis Cled- maljalla	12
Kuva 11. Streptococcus agalactiae Cled- maljalla	13
Kuva 12. Streptococcus hemolyysiä verimaljalla	13
Kuva 13.E.faecalis Cled- ja Arabinoosi- maljalla	14
Kuva 14. E.faecium Cled ja Arabinoosi- maljalla	14
Kuva 15. Virtsanäytteenotto, Seinäjoen keskus- sairaala	16
Kuva 16. Virtsanäytteenotto ohjainpurkin avulla, Seinäjoen keskus-sairaala	17
Kuva 17. Virtsaviljelytekniikka	18
Kuva 18. Virtsan puhdasviljelytekniikka	19
Kuva 19. Gram-värjäys	22
Kuva 20. E.coli Cromo-maljalla	26
Kuva 21. Vitek 2	27
Kuva 22. Densitometri ja Smart Carrier-työasema	27
Kuva 23. API-20E	30

Kuva 24. Sappieskuliinimaljalla positiivisia ja negatiivisia kantoja	33
Kuva 25. Arabinoosimaljalla Ara + positiivisia ja Ara- negatiivisia enterokokkikantoja	34
Kuva 26. Beetahemolyyttisiä ja nonhemolyyttisiä kantoja nielumaljalla	35
Kuva 27. Herkkyysmaljoja ja dreija	37
Kuva 28. Koliforminen sauva	40
Kuva 29. Hunnuttava proteus	41
Kuva 30. Kokkibakteereja Cled-maljalla	43

1 VIRTSATIEINFEKTIOITA AIHEUTTAVAT BAKTEERIT

1.1 Gramnegatiiviset sauvabakteerit

1.1.1 Enterobakteerit

Enterobakteereiksi kutsutaan kaikkia *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvia bakteereita. Useimpien kasvuympäristö on ihmisten tai eläinten suolisto, josta yleisnimitys enterobakteerit tulee. Tärkeimmät virtsatieinfektioita aiheuttavat suvut ovat *Escherichia*-, *Klebsiella*- ja *Enterobacter*-suvut. Virtsatieinfektioita aiheuttavat myös *Serratia*-, *Citrobacter*-, *Proteus*-, ja *Morganella*-sukuihin kuuluvat bakteerit. Kaikki heimon bakteerit ovat gramnegatiivisia sauvoja, joiden rakenne ja kasvutapa muistuttavat toisiaan. Enterobakteerien kasvuolosuhteet ovat vaatimattomat ja niiden viljely on helppoa. Enterobakteerit ovat kuitenkin tehokkaan ulkomembraaninsa vuoksi usein resistenttejä useille antibiooteille.

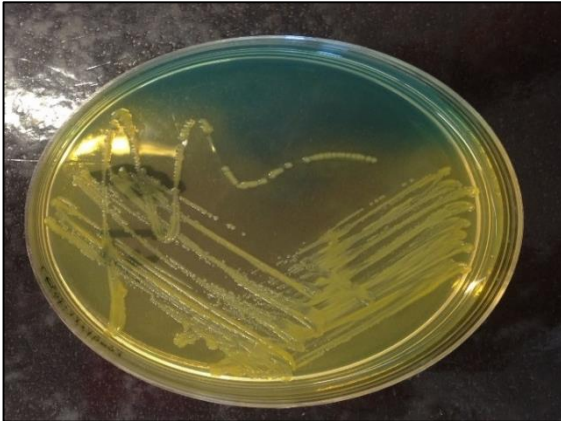
Escherichia coli (E.coli)

E.coli- bakteerikannat ovat aineenvaihdunnaltaan samanlaisia, mutta niiden taudinaiheuttamiskyky vaihtelee. Suoliston normaalifloora sisältää useita erilaisia *E.coli*-kantoja. *E.coli* on gramnegatiivinen sauva. Useilla *E.coli*- kannoilla on liikkumista helpottavia flagelloja ja soluihin tarttumista helpottavia fimbrioita.

E.coli on normaaliflooran yleisin aerobinen bakteeri, joka suojaa elimistöä muilta bakteereilta. Lisäksi tämä bakteeri tuottaa ihmiselle välttämätöntä K-vitamiinia. *E.coli* pystyy kuitenkin aiheuttamaan infektioita päästessään parenteraalitilaan vastustuskyvyn heikessä tai vamman kautta. Virtsatieinfektio on tavallisin *E.colin* aiheuttama infektio, koska yli 90 % virtsatieinfektioista on *E.colin* aiheuttamia. *E.coli* on yleensä herkkä antibiooteille ja siihen yleensä tehoavat gramnegatiivisille bakteereille tarkoitetut antibiootit.

Todennäköisesti lisääntyneen matkailun vuoksi enterobakteerit kuten esimerkiksi *E.coli* ja *Klebsiellat* ovat hankkineet ESBL-resistenssigeenejä, jotka voivat siirtyä bakteerista toiseen, mutta myöskin eri bakteerilajien välillä. Nämä ESBL-geenit aiheuttavat laajakirjoisten beetalaktamaasientsyymien (ESBL= extended spectrum betalactamase) tuoton,

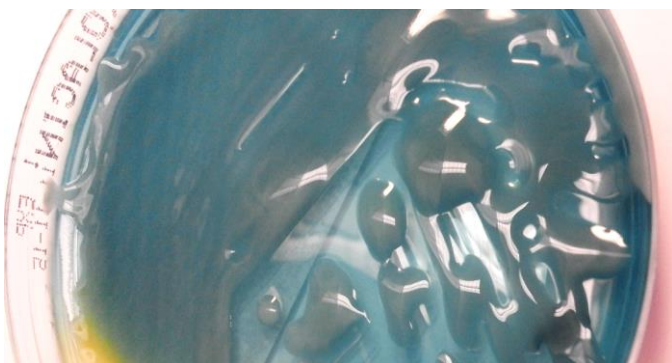
jotka pilkkovat yleisesti käytössä olevia mikrobilääkkeitä ja näin hankaloittavat infektioiden hoidettavuutta.



Kuva 1 E.coli Cled-maljalla.

Klebsiellat

Klebsiellat kuuluvat ihmisen suoliston normaaliflooran bakteerikantaan ja aiheuttavat vain harvoin tauteja perusterveille henkilöille. Nämä bakteerit ovat liikkumattomia, gram-negatiivisia sauvoja. Ne muodostavat virulenssitekijänä polysakkaridikapselin, joka näkyy limaisena pesäkkeinä viljelymaljalla. *Klebsiella*-bakteerilajeja on useita mutta yleisin *Klebsiella pneumoniae* aiheuttaa keuhkokuumetta, virtsatieulehdusta ja haavainfektioita. Klebsiellat ovat luontaisesti resistenttejä ampicilliinille tuottamansa beetalaktamaasin vuoksi



Kuva 3. *Klebsiella* Cled-maljalla.

Enterobacter-lajit

Enterobacter-lajit ovat liikkuvia, eivätkä tavallisesti muodosta paksua polysakkaridikapselia. Nämä bakteerit ovat opportunisteja, eli aiheuttavat infektiota ihmisen vastustuskyvyn heikentyessä. Enterobacter-lajien aiheuttamille sairaalainfektioille altistavat monet vakavat perussairaudet ja kaikki puolustuskykyä vähentävät sairaudet. Yleisin Enterobacter-lajin edustaja kliinisissä näytteissä on *Enterobacter cloacae* ja seuraavaksi yleisin *Enterobacter aerogenes*. Näitä lajeja löytyy tavallisimmin haavoista, hengitysteistä ja virtsasta. Enterobacter-lajit ovat yleensä resistenttejä useille mikrobilääkkeille, kuten ampisilliinille ja ensimmäisen polven kefalosporiineille.



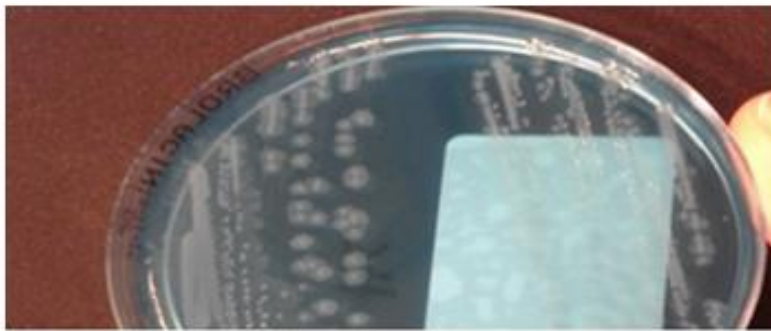
Kuva 2. *Enterobacter cloacae* Cled-maljalla.

Citrobacter-lajit

Citrobacter-lajit ovat gramnegatiivisia, aerobisia bakteereja, joita esiintyy elinympäristössämme vedessä ja maaperässä, sekä ruoassa ja ihmisten ja eläinten suolistossa. *Citrobacter*-infektioille altistaa virtsaputken katetrointi tai muut virtsateihin kohdistuvat toimenpiteet. Lisäksi *Citrobacter*-lajeja esiintyy opportunisteina sairaalapotilaiden hengitystie- ja virtsatieinfektioissa, mutta kolonisoivat myös immuunipuolustukseltaan heikentyneitä potilaita.

Proteukset

Proteaeae-ryhmään kuuluu proteuksen lisäksi myös *Morganella*-lajit, jotka aiheuttavat virtsatieinfektioita. Proteukset ja Morganellat ovat gramnegatiivisia sauvabakteereita. Proteuksen tunnistaa yleensä leviävistä ja hunnuttavasta pesäkkeestä maljalla ja sen rikkivedyn tuotantokyvystä. Nämä bakteerit kolonisoivat usein suolistoa ja ovat taudinaiheuttamiskyvyltään opportunisteja. Bakteerit pystyvät hajottamaan ureaa, joka selittää niiden taipumuksen aiheuttaa virtsatieinfektioita. Proteuksen aiheuttama virtsatieinfektio voi kroonistua ja aiheuttaa munuaisvaurioita. Yleisiä virtsatieinfektioita aiheuttavia *Proteus* lajeja ovat *P.mirabilis* ja *P.vulgaris*, joista *P.vulgaris* on yleensä resistentimpi antibiootteja kohtaan.



Kuva 4. Hunnuttava proteus



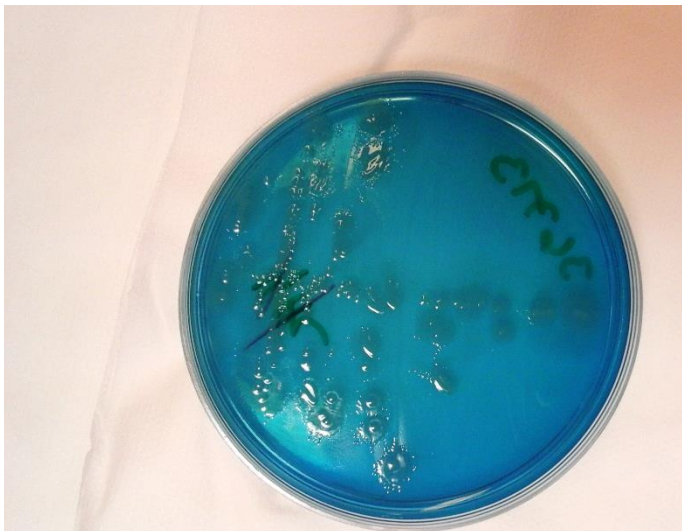
Kuva 5. *Proteus vulgaris*

Kuva 6. *Proteus mirabilis*

1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa on ohut gramnegatiiviseksi värjäytyvä sauvabakteeri, joka aiheuttaa virtsatieinfektioita tavallisesti sairaalapotilaille. Potilailla on usein operoidut virtsatiet tai heillä on katetri. Tällä bakteerilla on liikkumista helpottava flagella. Kasvuvaatimuksiltaan *P.aeruginosa* on vaatimaton, mutta kosteus lisää sen kasvua. Maljoilla sen kasvutapa on helposti tunnistettavissa litteiden metallinhoitoisten pesäkkeiden vuoksi ja sen tuoksua voi verrata tuomenkukkaan tai greippiin. *P.aeruginosa* on infektioiden aiheuttajana opportunisti, joka ei pysty aiheuttamaan infektioita perusterveille henkilöille.

*P.aeruginosa*lla on useita virulenssitekijöitä. Sillä on erilaisia tarttumisrakenteita, joiden avulla se pystyy tarttumaan isäntäeliön soluihin. Sillä on myös bakteerisolua ympäröivä polysakkaridikapseli, joka suojaa sitä elimistön puolustusyrittämiseltä. *P.aeruginosa* on luonnostaan resistentti useille antibiooteille, sillä sen ulkomembraani toimii tehokkaana esteenä ja sen soluseinämässä on antibiootteja ulos kuljettavia pumppuja. Resistenssi tälle bakteerille kehittyy suhteellisen helposti. Avohoidon *P.aeruginosa*-kannat ovat usein herkkiä mikrobilääkkeille, mutta sairaalaympäristön kannat voivat olla hyvinkin resistenttejä kaikille tutkituille antibiooteille.



Kuva 7. *Pseudomonas aeruginosa* Cled-maljalla.

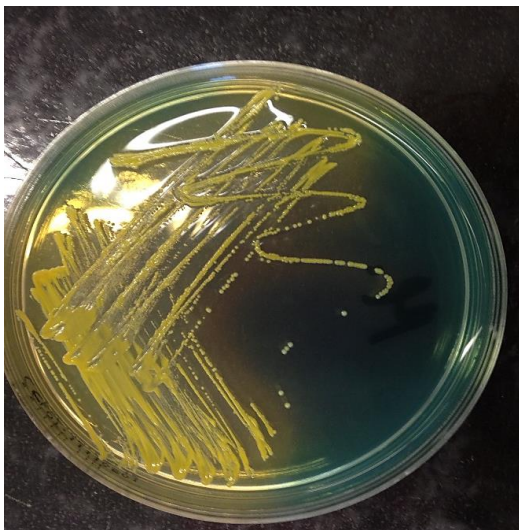
1.2 Grampositiiviset kokkibakteerit

1.2.1 Stafylokokit

Staphylococcus aureus (*S.aureus*)

Staphylococcus aureus on yleisin märkäbakteeri ja taudinaiheuttaja niin terveillä kuin vastustuskyvyltään heikentyneillä sairaalapotilailla. Ainakin puolet ihmisistä kantaa *S.aureusta* normaaliflooran bakteerina. Osa ihmisistä on *S.aureuksen* kantajia, eli tämä bakteeri esiintyy väliaikaisesti normaaliflooran bakteerina. Valtaosa ihmisistä kantaa *S.aureusta* ajoittain nenässä, iholla tai emättimen ja pesäsuolen alueella. Tämä bakteeri on tyypillinen grampositiivinen kokkibakteeri, jolle tyypillistä on kullankeltaiset pesäkkeet maljalla. Sen soluseinän pääraakennekomponentteja ovat peptidoglykaanit ja teikkohapot. *S.aureukselle* ominaista on myös sen koagulaasipositiivisuus, kun taas kaikki muut stafylokokit ovat koagulaasinegatiivisia. *S.aureuksen* tunnistamiseen on kehitetty pika-agglutinaatiotesti, joka tunnistaa *S.aureuksen* luotettavasti muutamassa minuutissa.

Kaikkiaan noin 80 % *S.aureus* kannoista tuottaa penisilliiniä hajottavaa entsyymiä ja osa kannoista on myös resistenttejä stafylokokkipenisilliinille. Nämä niin sanotut metisilliini-resistentit *S.aureukset* (MRSA) ovat resistenttejä myös monelle muulle antibiotille. MRSA- kannat eivät ole taudinaiheuttamiskyvyltään vaarallisempia, vaan infektiot ovat taudinkuvaltaan ja vaikeusasteeltaan samanlaisia. Näiden infektioiden hoito on kuitenkin vaikeampaa mikrobilääkeresistentin vuoksi. Ongelmia aiheuttaa myös MRSA:n kyky levitä sairaaloissa aiheuttaen tartuntaepidemioita.

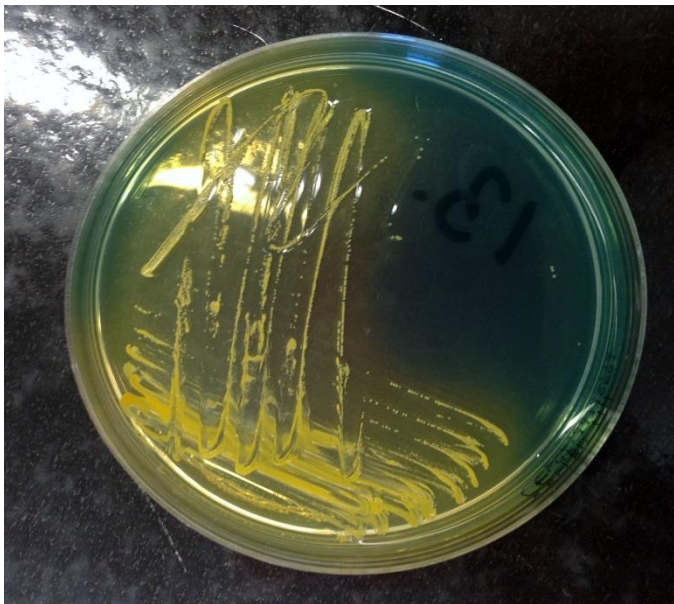


Kuva 8. *Staphylococcus aureus* Cled-maljalla.

Staphylococcus saprophyticus

S.saprophyticus on hyvin yleinen virtsatieinfektioiden aiheuttaja erityisesti nuorilla seksuaalisesti aktiivisilla naisilla. Se aiheuttaa usein oireetonta bakteerivirtsaisuutta mutta voi aiheuttaa myös munuaistulehdusta, verenmyrkytystä ja munuaiskiven muodostumista. *S.saprophyticus* on koagulaasinegatiivinen- stafylokokit, jota voi esiintyä keltaisina tai valkoisina pesäkkeinä.

S.saprophyticus on helppo tunnistaa muista stafylokokkeista sen novobiosiiniresistenssin vuoksi. Tämä bakteeri on yleensä herkkä tavanomaisille virtsatieinfektioiden hoidossa käytettäville lääkkeille, paitsi mesillinaamille se on resistentti.

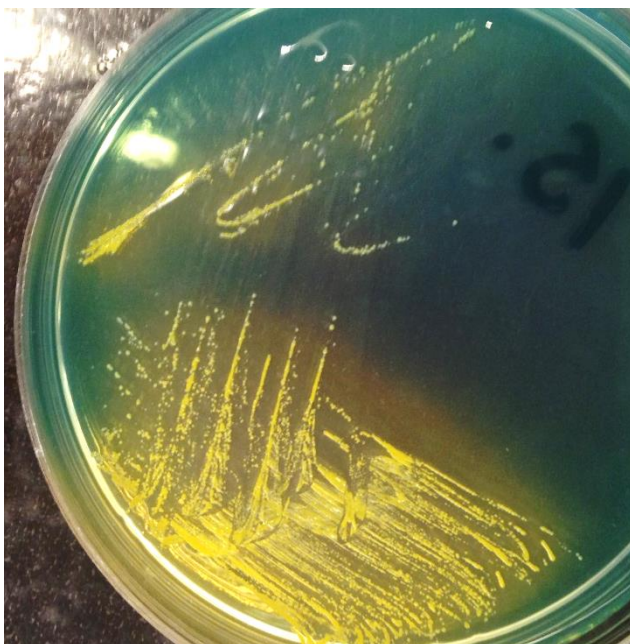


Kuva 9. *Staphylococcus saprophyticus* Cled-maljalla

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus epidermidis on yleisimpiä ihmisen normaaliflooran stafylokokkilajeista. Sitä tavataan erittäin runsaasti muun muassa nenässä, nivusissa ja genitaalialueella. Nämä kannat ovat usein resistenttejä monille mikrobilääkkeille. Ominaista koagulaasinegatiivisille stafylokokkeille on myös niiden kyky kiinnittyä vierasesineiden pintaan ja ympärilleen erittämä klykokalyksiseros, joka suojaa antibioottejen vaikutukselta ja elimistön puolustusmekanismeilta.

S.epidermidis on grampositiivisesti värjäytyvä katalaasiposiitivinen kokkibakteeri. Verimaljalla kasvaessaan ne muodostavat yleensä pieniä valkoisia pesäkkeitä. Lisäksi *S.epidermidis* on myös koagulaasinegatiivinen kokkibakteeri.

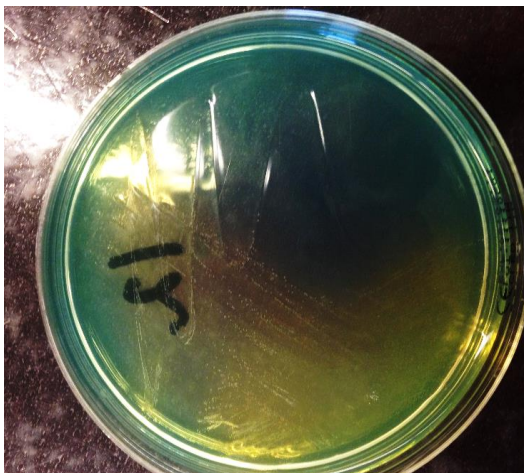


Kuva 10. *Staphylococcus.epidermidis* Cled-maljalla.

1.2.2 Streptokokit

B-ryhmän streptokokki

B-ryhmän streptokokki eli *Streptococcus agalactiae* on yleinen emättimen ja alemman suoliston normaaliflooraan kuuluva bakteeri. B-streptokokki on vastasyntyneiden eräs yleisimpiä taudinaiheuttajia, joka aiheuttaa vakavia yleisinfektioita, kuten sepsistä. Aikuisilla B-streptokokki voi aiheuttaa muun muassa virtsatieulehdusta, sepsistä, niveltulehdusta ja ihoinfektioita. Vakavan infektion taustalla on usein jokin perussairaus. *Str. agalactiae* saadaan helposti tunnistettua latex-agglutinaatiota käyttäen sekä tiettyjä biokemiallisia testejä, kuten Vitek GP:n avulla. Streptokokit kasvavat hyvin tavallisella verimaljalla hiilidioksidipitoisessa ympäristössä. *Str. agalactiae* on herkkä muun muassa penisilliinille ja kefalosporiineille.



Kuva 11. *Streptococcus agalactiae* Cled- maljalla

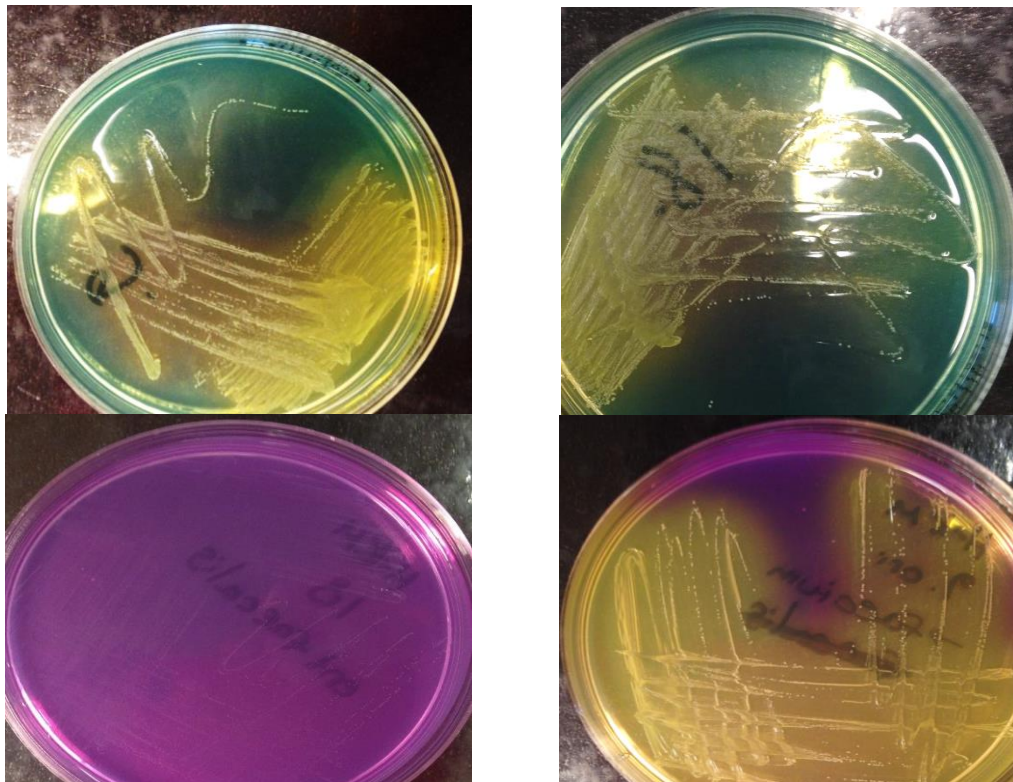


Kuva 12. Beetahemolyysiä (+) ja nonhemolyysiä (-) kantoja nielumaljalla.

1.2.3 Enterokokit

Enterococcus faecalis ja *Enterococcus faecium*

Enterokokit ovat kasvuvaatimuksiltaan hyvin vaatimattomia virtsatieinfektioita aiheuttavia grampositiivisia kokkibakteereita. Ne sietävät sappisuoloja ja pystyvät hajottamaan eskuliinia. Ne kasvavat yleensä nonhemolyyttisinä pesäkkeinä. Bakteeri muodostaa pareja ja lyhyitä ketjumuodostelmia. Entorokokit kuuluvat ihmisen suoliston normaaliflooraan ja aiheuttavat infektoita vasta kun isännän immuniteetti on heikentynyt. Infektioon liittyy kuitenkin usein anatominen poikkeavuus tai katetrisaatio. Perusterveen naisen virtsatietulehduksen aiheuttaja on todella harvoin enterokokki. Enterokokit ovat luontaisesti resistenttejä monille antibiooteille.



Kuva 13. *E. faecalis* Cled- ja Arabinoosi-maljalla Kuva 14. *E. faecium* Cled ja Arabinoosi-maljalla.

2 VIRTSAN BAKTEERIVILJELY

2.1 Virtsan bakteeriviljelyä varten otettava näyte virtsatieinfektiota epäiltäessä

Virtsan bakteeriviljely suoritetaan virtsatieinfektioepäilyissä. Tavoitteena on saada hyvä vakioitu virtsanäyte (ks. kuvat 15 ja 16). Aina kun mahdollista, virtsanäyte pyritään antamaan mahdollisimman vakioiduissa olosuhteissa. Paras aika näytteen ottamiseen on ensimmäinen aamuvirtsa, jolloin paastossa on oltu edellisestä illasta asti. Tällöin virtsa on tarpeeksi väkevää ja parantaa tutkimuksen herkkyyttä. Edellisestä virtsaamiskerrasta olisi hyvä olla vähintään neljä tuntia aikaa, joka parantaa mahdollisten mikrobien löytymistä näytteestä. Näytteenotto-ohjeesta tulee selvittää oikea näytteenottotapa, jotta näyte olisi mahdollisimman vähän kontaminoitunut ihon normaaleille bakteereille. Näytteenottoaika olisi hyvä ajoittaa mahdollisimman lähelle tutkimuksen suorittamista, jotta bakteerit eivät lisääntyisi näytteessä liian paljon. Mikrobilääkkeiden- ja omahoitotuotteiden käyttöä olisi hyvä välttää ennen näytteenottoa, koska ne voivat häiritä määritystä. Lisäksi fyysistä rasitusta on vältettävä ennen näytteenottoa, koska proteiineja voi erittyä virtsaan.

Myös lasten pussi- tai tyynyvirtsanäyte tai katetrilla otettu näyte kelpaa näytteeksi. Virtsanäyte voidaan ottaa tarvittaessa myös rakkopunktiolla. Tällä menetelmällä varmistetaan imeväisikäisten positiiviset pikatestilöydökset mutta rakkopunktiota voidaan käyttää myös aikuisilla. Rakkopunktiolla vältetään virtsan kontaminoituminen perinaaliseen bakteereilla. Näyte otetaan ohuella punktioneulalla häpyliitoksen yläpuolelta virtsarakosta. Näytteeksi pyritään saamaan vähintään 10 ml virtsaa, joka siirretään kahteen 10 ml virtsaputkeen sekä lisäksi aerobiseen ja tarvittaessa anaerobiseen veriviljelypulloon.

Virtsanäytteiden saapuessa laboratorioon, näytteet numeroidaan ja kirjataan mikrobiologian atk-järjestelmään ja lähetteen tiedot tarkastetaan. Jos näytteessä ei ole potilaan tietoja, sitä ei viljellä. Jos näytteen laadussa on puutteita esimerkiksi jos se on otettu vääränlaiseen astiaan tai lähetetiedot eivät ole riittävät, otetaan yhteyttä näytteenottaneeseen yksikköön.

Näytteet otetaan mieluiten säilöntäainetta sisältäviin putkiin. Virtsanäyteputki tulee saada täyteen virtsanäytteestä, jotta kasvuolosuhteet kaikille bakteereille olisivat oikeat. Jos näytemäärä säilöntäaineellisessa putkessa jää vajaaksi, säilöntäaineen suhteellinen

osuus näytteessä kasvaa ja voi estää herkkien bakteerien kasvun. Näytteiden säilyttäminen tapahtuu jääkaappilämpötilassa. Näytteet on viljeltävä vuorokauden sisällä näytteenotosta.



Etelä-Pohjanmaan
sairaanhoitopiiri

Potilasohje

Kliininen kemia

23.2.2016

1 (2)

Virtsanäytteenotto (aamuvirtsa)

Näytteenottotarvikkeet saatte Seinäjoen keskussairaalaan tai kotipaikkakuntanne terveyskeskuksesta.

Virtsanäyte otetaan aamulla siten, että edellisestä virtsaamisesta on kulunut vähintään 4–6 tuntia. Veden juomista on vältettävä yön yli, jotta virtsasta ei tulisi liian laimeaa, ja aamullakin saa juoda enintään lasillisen vettä.

Yölevon jälkeinen aamunäyte on suotava, koska fyysinen rasitus saattaa vaikuttaa virtsan koostumukseen. Naisilla tulee välttää virtsanäytteen ottoa kuukautisten aikana.

Näytteenotto (puhtaasti laskettu virtsa eli PLV) bakteeritutkimuksiin

Bakteeritutkimusta varten virtsanäyte otetaan seuraavasti:

1. Pese kädet ja alapää huolellisesti. Naiset levittävät häpyhuulet erilleen ja miehet vetävät esinahan taakse. Terska tai ulkosynnytin pestään ilman saippuaa käsisuihkulla tai määrällä wc-paperilla. Yhtä wc-paperia saa käyttää vain kerran. Virtsaputken suu pestään edestä taaksepäin vetäen. Toista pesu vähintään neljä kertaa kädenlämpöisellä vedellä ja kuivaa lopuksi kertakäyttöpyyhkeellä.
2. Aloita virtsan laskeminen WC-altaaseen, jotteivät alkusuihkussa mukana tulevat virtsaputken suun bakteerit tule näytteeseen.
3. Vie virtsasuihkua katkaisematta näyteastia virtsasuihkuun, ota n. ½ dl:n näyte ja laske loppuvirtsa WC-altaaseen.
4. Sulje kansi ja siirrä näyte näyteputkiin seuraavalla sivulla olevan ohjeen mukaisesti.

Virtsanäyte lapsilla

Leikki-ikäisiltä lapsilta saadaan PLV-näyte kiinnittämällä näytemuki potan etuosaan, jolloin luonnostaan voimistuva virtsasuihku osuu mukiin virtsaamisen keskivaiheilla. Imeväisikäisiltä näyte otetaan ihoon liimattavalla pussilla.

Virtsanäytteen kuljetus

Toimittakaa näyteputket mahdollisimman pian (saman aamupäivän kuluessa) huoneenlämmössä, muovipussilin pakattuna Seinäjoen keskussairaalan laboratorioon tai kotipaikkakuntanne terveyskeskukseen (samaan paikkaan, missä mahdolliset verinäytteet otetaan).

Palauttakaa tämä ohje näytteen mukana ja täydentäkää näytetiedot:

Nimi _____

Sosiaaliturvatunnus _____

Edellisestä virtsaamisestanne oli kulunut _____ tuntia.

Virtsanäyte saatiin _____ / _____ 20____ klo _____

Kuva 15. Virtsanäytteenotto, Seinäjoen keskus-sairaala

Virtsanäytteenotto ohjainpurkin avulla

1. Näytteenottovälineet:

- Näytepurkki
Kannen suojateipin alla on näyteohjain, jossa on näyteneula.
 - Tyhjiöputki (1-2 kpl)
- Huom! Tyhjiöputken korkkia ei saa avata.**



2. Näytteenanto

- Pese kädet.
- Tee alapesu pelkällä vedellä, kuivaa hyvin.
- Avaa näytepurkin kierrekannellinen kansi.
- Kerää keskivirtsaa n. 2/3 näytepurkin tilavuudesta.
- Sulje purkin kansi tiukasti.



3. Näytteen siirto putkeen

- Avaa purkin kannessa oleva teippi.
- Paina näyteputki korkki edellä näyteohjaimen neulaa vasten pohjaan saakka.
- Anna näyteputken täyttyä virtsalla.
- Kun putki on täynnä, poista se ohjaimesta.



4. Putken käsittely

- Sekoita putki kääntämällä se ylösalaisin 8-10 kertaa.
- Kiinnitä mahdollinen nimitarra putkitarran päälle pitkittäin.
- Toimita putki laboratorioon huoneenlämmössä mahdollisimman pian.

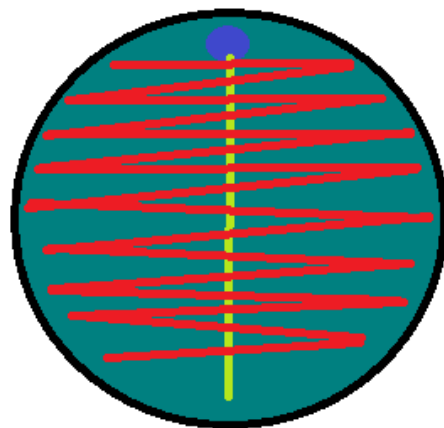


5. Hävitä näytepurkki varovaisuutta noudattaen kodin sekajätteissä.

2.2 Virtsan viljely Cled-maljalle

Tärkein diagnostinen menetelmä bakteriologiassa on mikrobin viljely, joka mahdollistaa monipuoliset jatkotutkimukset. Viljelymenetelmä kuitenkin edellyttää, että maljalle saadaan elinkykyisiä bakteereita, jotka kykenevät lisääntymään kiinteällä agaripohjaisella elatusaine maljalla.

1. Sekoita virtsaputket näytetelineessä kymmenen kertaa kääntelemällä ja lisäksi muutama kerta juuri ennen viljelyä yksitellen.
2. Numeroi huoneenlämpöiset Cled-maljat virtsanäyte putkien numeroilla.
3. Kasta 1 µl:n silmukka virtsaan juuri näytepinnan alapuolelle, jotta silmukkaan jää näytettä. Kosketa silmukalla Cled-maljan yläosaa ja katso että silmukan pisara jää maljalle. Vedä pisarasta suora veto alaspäin mutta älä koske maljan reunaa. Hajota näyte toisella vedolla koko maljalle koskettamatta edellisiä vetoviivoja. Tarkoituksena on saada maljalle kasvamaan erillispesäkkeitä. Varo reunojen koskettamista kontaminaatiovaaran vuoksi.
4. Viljeltyjä maljoja kasvatetaan lämpöhuoneessa +36 °C 16- 18 tuntia ja tarvittaessa lisäkasvatus yksi vuorokausi.

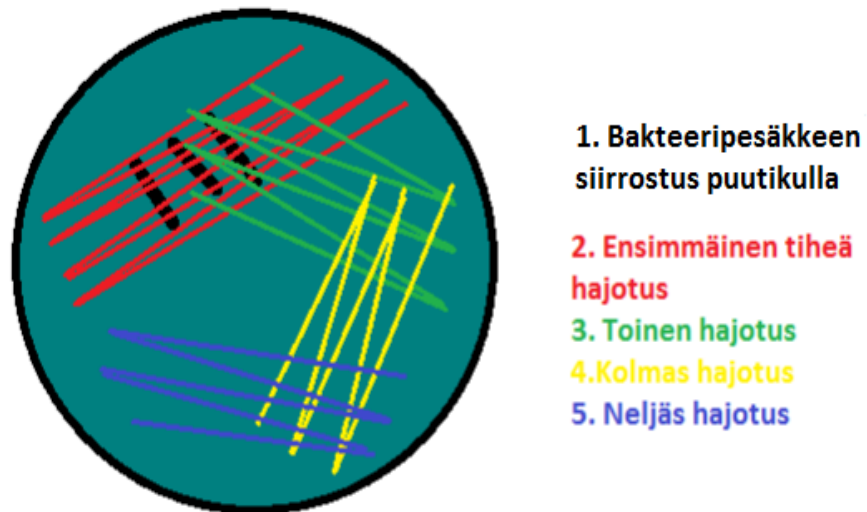


1. Silmukan pisara
2. Ensimmäinen veto
3. Hajotus

Kuva 17. Virtsaviljelytekniikka A. Saarinen, Seinäjoen keskussairaala mikrobiologia, laa-
tukäsikirja, muokannut Hanna-Kaisa Montonen.

2.3 Puhdasviljely

Virtsaviljelymaljoilla kasvaa usein monia bakteerilajeja. Mikäli tutkittavalla virtsan bakteeriviljely maljalla kasvaa kolmea tai useampaa erinäköistä bakteeripesäkettä, jatkotutkimuksia ei ole syytä tehdä, koska kyseessä sekafloora. Jatkotutkimuksia varten bakteerit on saatava erotettua toisistaan käyttämällä puhdasviljelymenetelmää. Puhdasviljelyn tarkoituksena on saada bakteerimassa hajotettua maljalle, jotta maljan pinnalle saataisiin yksittäisiä bakteerisoluja erilleen toisistaan. Tämä onnistuu tekemällä useita hajotuksia vaihtamalla viljelysauvaa hajotusten välissä. Viimeiselle hajotusalueelle tulee vain hyvin pieni osa ensimmäisen hajotuksen bakteereista. Kukin maljan pesäke on lähtöisin yhdestä ainoasta alkumaljan bakteeripesäkkeestä.



Kuva 18. Virtsan puhdasviljelyteknikka, K. Saha, Seinäjoen keskussairaala, muokannut Hanna-Kaisa Montonen.

2.4 Bakteerien kasvun määrän arviointi ja alustava bakteerin tunnistus

Usein bakteerit ovat vuorokauden kasvatuksen jälkeen muodostaneet maljalla näkyviä pesäkkeitä. Maljoja tarkastellaan hyvässä valaistuksessa mahdollisten pesäkkeiden havaitsemiseksi. Jos maljalla kasvaa kolmea tai useampaa erinäköistä pesäkettä, jatkotutkimuksia ei ole syytä tehdä, koska kyseessä on ihon normaaliflooraa, joka on tullut virtsaan iholta huonosti onnistuneen näytteenoton yhteydessä. Mikrobikasvun määrän arviointi tapahtuu silmämääräisesti maljalta ja tulos kirjataan mikrobiologian atk-järjestelmään.

Alustava vastaus:

1. Merkitse viljelykohtaan, onko näyte positiivinen vai negatiivinen, eli kasvaako maljalla pesäkkeitä
2. Arvioi kasvun määrää viljelymaljalta ja merkitse mikrobi-kohdan perään seuraavasti:
 - Ei pesäkkeitä = negatiivinen
 - 1-10 pesäkettä = $< 10^4$ bakt/ml
 - 10–100 pesäkettä = 10^{4-5} bakt/ml
 - >100 pesäkettä = $> 10^5$ bakt/ml

Tarkastele maljan kasvua:

Tutki, onko testattavalla kannalla kykyä laktoosifermentaatioon eli tuottako se beeta-galaktosidaasientsyymiä Cled (cystine-lactose-deficient agar)-maljalla. Positiivinen tulos nähdään maljalla keltaisena värireaktiona. Negatiivisessa tuloksessa keltaista värireaktiota ei muodostu tai Cled-malja värjäytyy muun väriksi

- laktoosipositiiviset (keltainen värimuutos Cled-maljalla), E.colin näköiset: KOLIFORMINENSAUVA
- laktoosinegatiiviset (maljalla ei värimuutosta), ei- E.colin näköiset sauvat: GRAM-NEGATIIVINEN SAUVA
- laktoosinegatiiviset, Pseudomonaksen näköiset, ox+: PSEUDOMONAS SP.
- grampositiiviset kokit: GRAMPOSITIIVINEN KOKKI
- hiiva:HIIVA

Jatkotutkimukset Cled-maljalta on syytä tehdä seuraavissa tilanteissa:

- 1-2 erinäköistä pesäkettä maljalla
- Yli kymmenen samanlaista pesäkettä maljalla, rakko aika yli 4 h
- Alle kymmenen pesäkettä maljalla, rakko aika alle 4 h ja potilaalla oireita
- Rakkopunktionäytteessä yksikin pesäke on merkittävä
- Raskaana olevilla naisilla oireeton bakteeriuria on merkittävä
- Miespotilaan katetrinäytteen pienempi määrä bakteereita on merkittävä löydös. Naisen katetrinäytteessä saa olla yli kymmenen pesäkettä, jotta näyte olisi merkittävä

Bakteerien tunnistus aloitetaan selvittämällä, onko se kokki- vai sauvabakteeri. Grampositiiviset kokit kasvavat usein todella pieninä pesäkkeinä maljalla. Bakteerin tunnistus tapahtuu bakteeripesäkkeitä tarkastelemalla ja jatkotutkimuksia tekemällä. Bakteerin tunnistuksessa on tärkeä arvioida pesäkkeen ulkonäköä. Huomiota kannattaa kiinnittää pesäkkeen kokoon, muotoon, väriin, pesäkkeen pintaan ja reunaan sekä hajuun ja mahdolliseen hemolyysiin. Gramvärjäyksellä voidaan erottaa mikroskooppisesti, onko kyseessä sauva- vai kokkibakteeri (ks. Gramvärjäys). Bakteerien tunnistuksessa käytetään myös erilaisia jatkotutkimuksia, jotka perustuvat bakteerien entsyymien tai aineenvaihduntatuotteiden osoitukseen, resistenssiin tietyille aineille ja kasvutekijävaatimuksiin.

Lopullinen vastaus jatkotutkimusten jälkeen:

- MIKROBI: saatu tunnistustulos + kasvun määrä bakt/ml + herkkyys
- Merkitse aina alustavat tutkimustulokset muistilapulle.
- Lopullinen vastaus mikrobista tallennetaan atk-järjestelmään ja kommentoidaan, jos kanta on ollut resistentti jo käytössä olleille mikrobilääkkeille.

3. VIRTSATIEINFEKTIOITA AIHEUTTAVIEN BAKTEERIEN TUNNISTUS

3.1 Gramvärjäys

Gramvärjäys on yleinen mikrobiologinen menetelmä bakteerien luokittelemiseksi. Gramvärjäyksessä bakteerit värjäytyvät niiden solurakenteen mukaisesti. Värjäyksessä bakteerit käsitellään kristallivioletti-värillä, joka jää pysyväksi bakteereihin kun niitä käsitellään jodilla. Jodi muodostaa kristallivioletin kanssa liukenemattomia partikkeleita, jotka poistuvat bakteerisolusta, jos soluseinä vaurioituu. Grampositiivisilla bakteereilla on paksumpi soluseinä, joten sinivioletti väri jää niiden soluihin ja ne värjäytyvät violeteiksi. Gramnegatiivisilla bakteereilla taas on ohuempi soluseinä ja ulkokalvo, joten alkoholikäsitteily tekee helposti reikiä niiden seinämään ja violetti väri poistuu gramnegatiivisista bakteereista. Lopuksi kaikki bakteerit värjätään punaisella safraniinilla, jolloin gramnegatiiviset bakteerit värjäytyvät punaisiksi.



Kuva 19. Gram-värjäys. Biotieteiden opetuksen keskus Helsingin yliopisto, muokannut Hanna-Kaisa Montonen.

Gramvärjäyksen suoritus:

1. Merkitse objektilasin hiospään vahakynällä näytenumero ja tee ympyrä lasin nurjalle puolelle siihen kohtaan, johon tutkittava bakteerimassa on tarkoitus laittaa.
2. Sekoita hieman bakteerimassaa tippaan aquaa ja levitä kasvusto lasin oikealle puolelle ympyröimällesi alueelle hajotussauvalla.
3. Anna näytelasien kuivaa lämpölevyllä kuivaksi.
4. Kiinnitä näytteet viemällä objektilasi nopeasti 3-4 kertaa bunsenlampun liekin läpi, varoen polttamasta näytettä.
5. Aseta objektilasit värjäystelineeseen ja peitä ne kristallivioletilla 1 min ajan.
6. Huuhtelee kristallivioletti pois Lugolin jodiliuoksella ja peitä lasit sillä 1 min ajan.
7. Huuhto jodiliuos pois vedellä 5 s ajan.
8. Poista laseihin jäänyt väriylijäämä asetoni-etanoli-seoksella, kunne violettia väriä ei enää liukene ja huuhtelee lopuksi vedellä 5 s ajan.
9. Peitä lasit safraniinilla 1 min ajan.
10. Huuhtelee lasit vedellä 5 s ajan.
11. Kuivaa lasit paperin välissä kevyesti painaen.
12. Tarkastele preparaatteja 50x ja 100x öljyimersio-objektiivilla.
13. Puhdista käyttämäsi objektiivit puhdistusaineella käytön jälkeen.
14. Kirjaa tulos atk-järjestelmään.

Tulkintaa voi vaikeuttaa liian paksu preparaatti tai liiallinen kuumennus kiinnityksessä, jolloin värjäytyvyys ja mikrobimorfologia kärsii. Myös liian vähäinen tai voimakas huuhtelu aiheuttaa yli- tai alivärjäytymistä. Tulkinta ei aina ole helppoa ja selkeää.

Kontrollikantana värjätään *Haemophilus influenzae* ja *Streptococcus pneumoniae* kantat aina gramvärien kantaliuosten vaihtuessa.

3.2 Oksidaasitesti

Oksidaasitestiä käytetään gramnegatiivisten sauvabakteerien erottamiseen toisistaan. Oksidaasientsyymit ovat välttämätön vaihe elektroninsiirtoketjua aerobisessa hengityksessä. Bakteerin kyky tuottaa sytokromioksideasia voidaan selvittää oksidaasitestillä. Testi suoritetaan tiputtamalla muutama tippa oksidaasia paperinpalalle ja vetämällä hie- man tutkittavaa bakteerimassaa puutikulla sen päälle. Oksidaasireaktion tuottama väri- reaktio tapahtuu välittömästi muuttamalla siniseksi. Kontrollit tehdään päivittäin valmis- tettavasta uudesta käyttöliuoksesta ja aina uudesta kantaliuoserästä. Positiivisena kont- rollina toimii *N. gonorrhoeae* ja negatiivisena kontrollina *E.coli*. Merkitse tulokset Atk:lle.

Testin suoritus:

1. Tiputa muutama pisara 1 % oksidaasireagenssia imupaperille viljelymaljan kan- nen päällä ja hiero puutikulla tutkittavaa bakteerimassaa tähän kostutettuun imu- paperiin. Positiivisessa tuloksessa värireaktio tulee heti.

Tuloksen tulkinta:

- Sini/violetti väri → Oksidaasi positiivinen → *Pseudomonas*
- Väritön → Oksidaasi negatiivinen → Enterobakteerit tai akinetobakteerit

3.3 Katalaasitesti

Katalaasitestin tarkoituksena on saada erotetuksi enterokokit, streptokokit ja stafylokokit toisistaan. Katalaasitestillä voidaan selvittää, onko bakteerissa katalaasi-entsyymiä. Aerobit ja fakultatiiviset anaerobit bakteerit sisältävät entsyymiä, joka nopeuttaa superoksidin hajoamista hapeksi ja vetyperoksidiksi. Lisäksi ne sisältävät joko katalaasia tai peroksidaasia, jotka katalysoivat vetyperoksidin hajoamista vedeksi ja hapeksi. Entsyymien tehtävänä on suojella solua hapen vaikutuksilta. Anaerobeilla mikrobeilla ei ole happiradikaaleilta suojaavia entsyymejä, ja siksi ne eivät kestä happea. Katalaasi aktiivisuus voidaan todeta lisäämällä bakteerikasvustoon vetyperoksidia. Katalaasitesti saa stafylokokkibakteeri kasvuston kuplimaan. Laadunvarmistus suoritetaan kun otetaan käyttöön uusi käyttöliuos. Positiivisena kontrollina käytetään tunnettua *Stafylococcus aureus*-kanta.

Testin suoritus:

1. Tiputa muutama tippa 3 % vetyperoksidia viljelymaljan kannelle ja siirrosta tähän piisaraan puutikulla tutkittavan bakteerin bakteerimassaa. Sekoita hyvin. Positiivisessa testissä kuplia pitäisi muodostua välittömästi. Jos kuplia alkaa muodostua 20- 30 sekunnin viiveellä, tulos on negatiivinen. Vältä tämän testin tekemistä verimaljalla kasvaneista bakteereista, koska punasolut saavat aikaan kuplintaa.

Tuloksen tulkinta:

- Kuohuu → Katalaasi Pos. → Stafylokokit
- Ei kuohu → Katalaasi Neg. → Enterokokit ja Streptokokit

3.4 Bakteerien tunnistus biokemiallisesti

3.4.1 Chromagar orientation-malja ("CHROMO")

Chromo-malja on kromogeeninen kasvatusmalja virtsapatogeeneille. Maljan elatusaine sisältää erilaisia substraatteja, joita eri bakteerilajit pystyvät hajottamaan. Bakteerit muodostavat erivärisiä pesäkkeitä metabolisen lopputuloksen mukaan. Maljat on suojattava valolta, koska kromogeenit voivat tuhoutua valon vaikutuksesta.

Tulosten tulkinta:

- Punertava/marjapuuron värinen pesäke = *E.coli*. Voidaan vastata *E.colina*.
- Muut värit = Muu kuin *E.coli* (vain alustava tunnistus, vaatii jatkotutkimuksia)
 - Väritön, ruskea halo ympärillä = *Proteus sp.*
 - Metallinsininen = Enterobakteerit, Klebsiellat ja *Citrobacter*
 - Turkoosinsininen = *Enterococcus*
 - Kerma, läpikuultava = *Pseudomonas*
 - Kullankeltainen (läpikuultamaton) = *S.aureus*
 - Pinkki (läpikuultamaton) = *Staph. saprophyticus*



Kuva 20. *E.coli* Chromo-maljalla

3.4.2 Vitek

Vitek 2 on automaattinen bakteerien tunnistus- ja herkkyysautomaatti. Sen toiminta perustuu biokemiallisiin reaktioihin. Laite käyttää bakteerien tunnistukseen reagenssikortteja, jotka koostuvat 64 erilaisesta substraattikaivosta. Alipaineistuksen avulla korttiin saadaan imettyä tutkittavaa bakteerisuspensiota ohuen pillin avulla. Tämän jälkeen Vitek 2 katkaisee pillin, jonka jälkeen laite aloittaa testikortin inkuboinnin. Laite lukee inkuboinnissa olevat testikortit 15 min välein, tarkkaillen substraattien ja bakteerisuspension aiheuttamaa värireaktiota. Vitek 2 tunnistaa bakteerin vertaamalla saatuja tuloksia siihen ohjelmoituun tietokantaan. Testikorteissa on myös kontrollikaivoja, joita laite käyttää vertailukohteena bakteeritunnistuksessa. Laite mittaa bakteeri-identifikaation kolorimetri- sesti ja antibioottilherkkydet käyttäen transmittanssia.

Laite antaa bakteerien tunnistukselle todennäköisyysprosentin esimerkiksi 95 %, jota voidaan pitää suhteellisen luotettavana bakteerin tunnistuksena.



Kuva 21. Vitek 2



Kuva 22. Densitometri ja Smart Carriertyöasema

Testin suoritus:

Vitekin tunnistus GN-kortilla:

1. Numeroi koeputki bakteerimaljan näytenumerolla.
2. Ota tutkittavalta bakteerimaljalta hieman yksittäisiä bakteeripesäkkeitä vanutikkuun tutkittavalta maljalta ja sekoita tikkua 3 ml NaCl koeputkessa. Sekoita putkea vielä mixerissä.
3. Tarkoituksena on saada valmistettua 0.50–0.63 McF vahvuinen suspensio. Mittaa suspension vahvuus sille densiometrillä. Jos suspensio on yli 0.63 McF vahvuinen, poista hieman suspensiota pipetillä ja lisää saman verran puhdasta NaCl-liuosta.
4. Kun suspensio on saatu halutun vahvuiseksi, aseta putki näytekasettiin ja aseta kasetti Smart Carrier-työasemaan.
5. Kirjaa näytteen tiedot Smart Carrier-työasemaan ja lue viivakoodi sinipillisestä GN-kortista, jonka jälkeen aseta kasetti Vitek2-analysaattoriin.
6. Tee perämalja suspensioputkista Vitek-tunnistuksen jälkeen eli viljele suspensiota Cled-maljalle.

Herkkyysmääritykset Vitekillä:

Testi suoritetaan muuten samalla lailla kuin Vitekin tunnistus mutta bakteerisuspensioputken viereen laitetaan näytekasetissa tyhjä putki. Tyhjään putkeen Vitek 2 laimentaa haluamansa vahvuisen suspension. Käytä korttina harmaapillisiä Ast-herkkyys-korttia.

3.4.3 API 20 E

API20E on metaboliaominaisuuksiin perustuva bakteerien tunnistustesti. Testillä voidaan tunnistaa enterobakteereja ja muita kasvatolosuhteiltaan vaatimattomia gram-negatiivisia sauvabakteereita. API20E sisältää 21 biokemiallista testiä, jotka perustuvat muun muassa substraattien hyödyntämiseen, entsyymaattisiin reaktioihin, kemiallisten yhdisteiden tuottoon ja käymiseen.

API 20 E koostuu 20 mikrokaivosta, joissa on erilaisia substraatteja. Näihin kaivoihin laitetaan tutkittavaa bakteerisuspensiota ja inkuboinnin aikana bakteerien aineenvaihduntatuotteet muodostavat erilaisia värireaktioita substraattien kanssa.

Suoritus:

1. Laita noin 5 ml tislattua vettä Api- testikoteloon kosteuden ylläpitämiseksi. Laita testiliuska laatikkoon kaivot ylöspäin. Kirjoita tunnistustiedot kotelon päähän.
2. Ota tutkittavalta maljalta yksi bakteeripesäke ja lisää se 5 ml:aan steriiliä vettä.
3. Täytä kaivot bakteerisuspensiolla kaivon kaulaan asti välttämällä ilmakuplien syntymistä. Ilmakuplien syntymistä voit vähentää pipetoimalla kaivon reunaa pitkin ja kallistamalla koteloa.
 - Pipetoi CIT (trisodium citrate), VP (sodium pyruvate) ja GEL (Gelatin) kaivot täyteen suspensiota.
4. Pipetoi öljyä ADH (L-arginine), LDC (L-lysine), ODC (L-ornithine), H₂S (Sodium thiosulfate) ja URE (urea) kaivoihin, jotta kaivot tulevat täyteen.
5. Sulje kotelo kannella ja inkuboi lämpöhuoneessa yön yli.
6. Viljele vielä perämalja tutkittavasta näytesuspensiosta Cled-maljalle, josta voit tarkistaa viljelmän puhtauden.
 - Kasta pumpulitikku testattavaan bakteerisuspensioon ja viljele Cled-malja puhtasviljelymenetelmällä. Inkuboi maljaa lämpöhuoneessa yön yli.



Kuva 23. API-20E.

Tulosten tulkinta:

1. Kun inkubointiaika on kulunut, lue tulokset paketin mukana tulleen taulukon mukaan. Tarkista perämaljan puhtaus..
2. Testin voi lukea, jos kolme tai useampi kaivoista on positiivisia. Tarvittaessa jatka inkubointiaikaa.
3. Lisää TDA (L-tryptophane) kaivoon tippa TDA (L-tryptophane)-reagenssia. Jos reaktion väri muuttuu punaruskeaksi, on tulos positiivinen. Kirjaa tulos muistiin.
4. Lisää IND (L-tryptophane)-kaivoon James-reagenssia yksi tippa. Väriin muuttuessa pinkiksi on tulos positiivinen. Kirjaa tulos muistiin.
5. Lisää VP (sodium pyruvate) kaivoon yksi tippa VP1 (sodium pyruvate)-reagenssia ja tippa VP2 (sodium pyruvate)-reagenssia. Pinkki tai punainen väri on positiivinen tulos. Jos kaivoon 10 minuutin jälkeen tulee punaista väriä, tulos on silti negatiivinen. Kirjaa tulos muistiin.
6. Lue muiden kaivojen tulokset ohjeen mukaan ja kirjoita tulokset testin kanteen.
7. Syötä tulokset Apiweb-ohjelmaan ja kirjoita tulokset liuskaan ja potilaan tuloksiin mikrobiologian atk-järjestelmään.

3.5 Novobiosiini-testi

Novotestin avulla saadaan helposti tunnistettua *Staphylococcus saprophyticus* muista stafylokokkeista, koska se on novobiosiinille resistentti.

Suoritus:

Katso perusherkkyyismäärityksen suoritus.

Tulosten tulkinta:

- Estorenkään halkaisija >12 mm = negatiivinen, muu stafylokokki kuin *S.saprophyticus*
- Estorenkään halkaisija <16 mm = positiivinen (*S. saprophyticus*)

3.6 C-390- kiekkotesti

Testi C390 (9-chloro-9-4-diethylaminophenyl-10-phenylacridan) on *Pseudomonas aeruginosa* tunnistukseen tarkoitettu kiekkotesti. Testillä voidaan erottaa *Ps.aeruginosa* muista *Pseudomonas*-lajeista.

Suoritus:

1. Dreijaa Mueller-Hinton- malja kuten herkkyyismenetelmissä (ks.herkkyyismenetelmät) ja aseta pinseteillä C-390-kiekko dreijatun maljan pinnalle.
2. Inkuboi maljaa 18-24 tuntia $+35-37$ °C lämpökaapissa.

Tulosten tulkinta:

- Estorenkään halkaisija ≥ 12 mm \rightarrow muu kuin *Pseudomonas aeruginosa*
- Ei estorengasta, kasvusto kiinni C-390-kiekon reunassa \rightarrow *Pseudomonas aeruginosa*

3.7 Stafylokokkiagglutinaatiot

Stafylokokkiagglutinaation tarkoituksena on saada erotetuksi *Staphylococcus aureus* muista stafylokokkeista. Testin periaatteena on bakteerin solusidonnainen koagulaasin ja proteiini A:n saada fibrinogeenilla ja immunoglobuliinilla päällystetyt latex-partikkelit sakkautumaan.

Testin suoritus:

1. Sekoita tippaan testireagenssia tutkittavaa stafylokokkipesäkettä ja sekoita negatiiviseen kontrollitippaan tutkittavaa stafylokokkipesäkettä.
2. Kallistele testialustaa noin 20- 30 sekuntia.

Tulosten tulkinta:

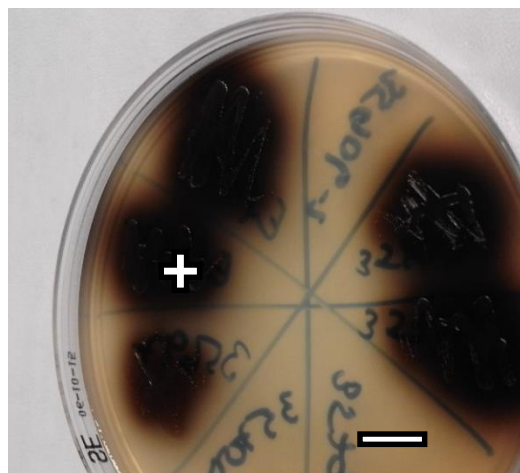
- Positiivinen: Selvä rakeinen kirkastaustainen sininen agglutinaatioreaktio, joka on muodostuu 30 s kuluessa. → *S.aureus*
- Negatiivinen: Tasainen sininen suspensio → Muu kuin *S.aureus*.

3.8 Sappieskuliinitesti

Testi perustuu enterokokkien ja joidenkin streptokokkien kykyyn hydrolysoida eskuliinia saponin läsnä ollessa. Vapautuva eskuliini ilmenee maljalla mustana värinä. Sappieskuliinimaljan eskuliini hajoaa happamiksi aineenvaihduntatuotteiksi, jotka muodostaa tummaa väriä alustan sisältämän raudan kanssa. Vain korkea sappipitoisuutta sietävät mikrobit pystyvät kasvamaan sappieskuliini maljalla. Jokaisen testauksen yhteydessä suoritetaan laadunvarmistus, positiivisena kantana toimii *Enterococcus faecalis* ja negatiivisena kantana *Enterococcus faecium*. Kirjaa tulokset Atk-järjestelmään.

Tuloksen tulkinta:

- Positiivinen (SE+): Bakteri kasvaa maljalla ja aiheuttaa selvän mustan värireaktion → *Enterococcus*, muu D-ryhmän streptokokki
- Negatiivinen(S+E-): Bakteri kasvaa maljalla, ei mustaa värireaktiota → esim. *Streptococcus agalactiae*
- Negatiivinen (SE-): Bakteri ei kasva maljalla, ei mustaa värireaktiota. → Muut streptokokit



Kuva 24. Sappieskuliinimaljalla positiivisia ja negatiivisia enterokokki-kantoja.

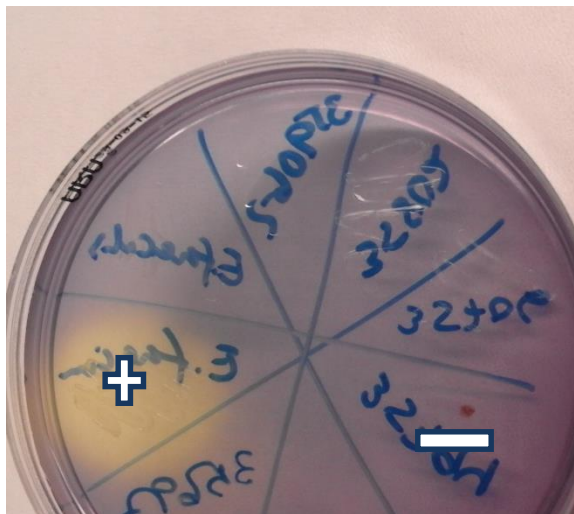
3.9 Arabinoositesti (Ara)

Arabinoositestin tarkoituksena on enterokokkien erottaminen. Maljan elatusaine sisältää L-arabinoosia ja pH-indikaattorina on bronkresolivioletti. Jos tutkittavan bakteerin aineenvaihdunnassa syntyy käymisreaktiota arabinoosin kanssa, maljan väri muuttuu violetista keltaiseksi pH:n muuttuessa. Jokaisen testauksen yhteydessä viljellään arabinooso-maljalle positiivisena kontrollina *E. faecium* ja negatiivisena kontrollina *E. faecalis*.

Tulosten tulkinta:

- Positiivinen: Bakteeri kasvaa Ara-maljalla, keltaista kasvua → esim. *Enterococcus faecium*.
- Negatiivinen: Bakteeri kasvaa maljalla, violetti väri → esim.: *Enterococcus faecalis*.

Negatiivinen: Bakteeri ei kasva maljalla



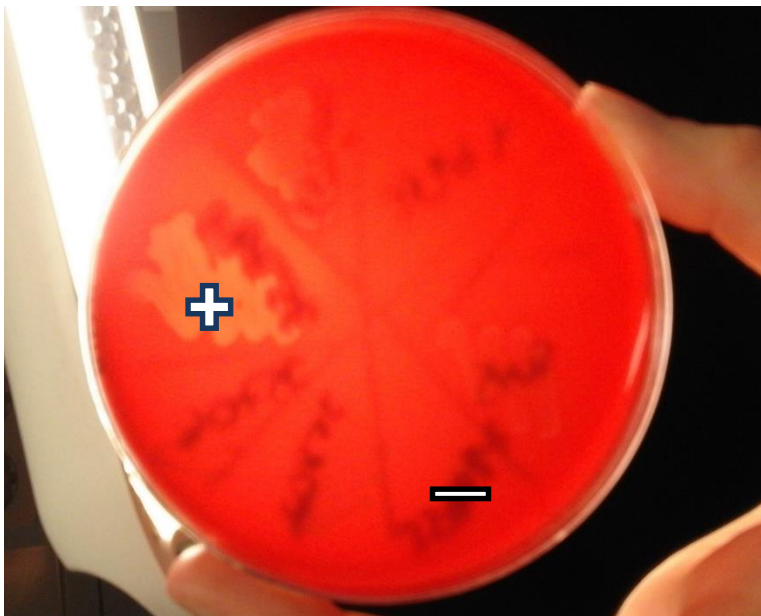
Kuva 25. Arabinoosimaljalla Ara + positiivisia ja Ara- negatiivisia enterokokkikantoja.

3.10 Nielumaljan hemolyysitesti

Streptokokit kasvavat hyvin tavallisella nielumaljalla hiilidioksidipitoisessa ja vähähappisessa lämpökaapissa. Streptokokit voivat hajoittaa punasoluja maljalla tuottamallaan toksiineilla, eli hemolysoida tai olla hemolysoimatta. Streptokokit voidaan jakaa hemolyysin perusteella kolmeen ryhmään: α -, β -, ja non-hemolyysi.

Tuloksen tulkinta

- Kirkas hemolyysi \rightarrow Beetahemolyyttinen streptokokki
- Vihertävä hemolyysi \rightarrow Alfahemolyyttinen streptokokki
- Ei hemolyysiä \rightarrow Nonhemolyyttinen streptokokki



Kuva 26. Beetahemolyysiä (+) ja nonhemolyyttisiä (-) kantoja nielumaljalla.

3.11 Streptokokkiagglutinaatio eli Streptex

Streptokokkiagglutinaation tarkoituksena suorittaa streptokokkien serologinen ryhmittely, jolla saadaan ne alustavasti ryhmiteltyä Lancefieldin ryhmiin A, B, C, D, F tai G. Latexagglutinaatio-kitteihin kuuluu yleensä uuttoentsyymi, jonka tarkoituksena on irroittaa bakteereista pinta-antigeneja ja niiden kanssa spesifisesti reagoivia antiseerumeita.

Suoritus:

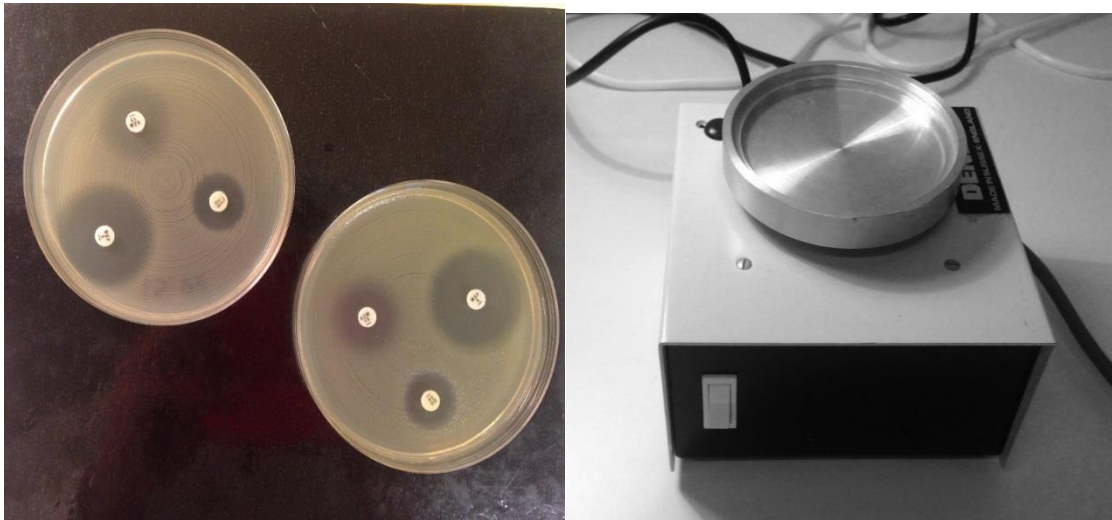
1. Ota testireagenssit ajoissa huoneenlämpöön ja sekoita ravistelemalla niitä kevyesti.
2. Poimi tutkittavia pesäkkeitä ja lisää niitä 0,4 ml:aan entsyymiliuosta. Inkuboi suspensiota +35°C vähintään 10 min ja sekoita välillä.
3. Tiputa muutama tippa latex-reagenssia testikortille ja tiputa tippa testisuspensiota latex-tippaan.
4. Sekoita reagenssi- ja näytetippa hyvin puutikulla.
5. Lue agglutinaatio minuutin kuluessa. Jos bakteerin antigeeni reagoi vasta-aineen kanssa, seoksessa tulee näkyä selkeää sakkautumista noin minuutin kuluttua aineiden sekoituksesta.

Tulosten tulkinta:

- Positiivinen: Rakeiden muodostuminen ja taustaltaan kirkas agglutinaatio
- Negatiivinen: Maitomainen samea seos

4. HERKKYYSMÄÄRITYKSET

Näytteistä eristettyjen bakteerien herkkyys hoidossa käytettäville antibiooteille määritellään herkkyysmääritysten avulla. Bakteerin todellinen herkkyys käytettävälle antibiootille riippuu bakteerien määrästä, kasvunopeudesta ja elimistön olosuhteista kuten pH:sta ja märkäeritteen määrästä. Bakteerilääkkeen tehon arvioinnissa käytetään MIC-arvoa (minimal inhibitory concentration), joka on pienin lääkepitoisuus, joka vielä kykenee estämään bakteerien kasvun. Kudoksissa saavutettavien lääkepitoisuuksien perusteella ja bakteerilajien herkkyystutkimusten perusteella on luotu kliiniseen käyttöön herkkyysluokitus.



Kuva 27. Herkkyysmaljoja ja dreijä.

Herkkyysmäärittelyn tuloksluokkia on kolme: S, I ja R.

S (susceptible) – Bakteri on herkkä antimikrobilääkkeelle, jota voidaan käyttää infektion hoitoon tavanomaisena annoksena.

I (intermediate) – Bakteerin herkkyys on alentunut tai herkkyydestä ei ole täyttä varmuutta.

R (resistant) – Lääke ei tehoa.

Kiekkodiffuusiomenetelmä on yleisimmin käytetty herkkyysmäärittelymenetelmä. Tutkittavasta bakteerikannasta valmistetaan suspensio, joka levitetään dreijällä elatusainemaljalle, johon asetetaan antimikrobilääkkeitä sisältäviä kiekkoja antibioottiannostelijalla. Bakteerit alkavat kasvamaan maljalla ja lääkeaineet levitä kiekkoista elatusaineseen. Kiekon ympärille syntyy estorengas, jonka halkaisija on sitä suurempi, mitä herkempi bakteri mik-

robilääkkeelle on. Resistenteille bakteereille estorengasta ei synny tai estorengas on kovin pieni. Maljoja inkuboidaan 16-18 tuntia ja sen jälkeen mitataan estorengaat. Tällä tiedolla voidaan herkkyyismäärityksessä määrittää SIR-luokitus, jota voidaan hyödyntää potilaan saamaan antibiottihoidon valinnassa. Laadun varmistuksessa käytetään kontrollina tunnettuja kontrollikantoja ja tulokset kirjataan ATK-järjestelmään.

Herkkyyismäärityksen voi tehdä myös E-testin avulla, joka on yksinkertainen menetelmä määrittäessä MIC-arvoa. E-testi on kaupallinen ohut liuska, johon on imeytetty lääkeaine. Liuska sisältää mitta-asteikon MIC-arvon lukemista varten. Arvo luetaan suoraan mitta-asteikolta estovyöhykkeen ja liuskan estopisteen kohdalta. Liuska asetetaan bakteerisuspensiota sisältävälle maljalle ja MIC-arvo luetaan inkuboimisajan jälkeen.

Perusherkkyyismäärityksen suoritus:

1. Poimi viljelymaljalta tutkimasi bakteeri viljelysauvalla koskettamalla muutamaa samanlaista erillispesäkettä.
2. Sekoita viljelysauva 0.9 % keittosuolaliuos koeputkeen, jotta suspension vahvuus vastaisi 0.5 McFarland-standardia.
3. Kasta steriiliä vanutikkua bakteerisuspensioon ja poista tikusta ylimääräinen neste pyörittämällä vanupäätä koeputken reunassa.
4. Vedä bakteerisuspensioon kastetulla vanutikulla viiva Muller-Hinton- maljalle reunasta reunaan ja dreijaa sitten bakteeria koko maljalle. Dreijaus tapahtuu jatkamalla samalla vanutikulla laittamalla sen kärki pyörivälle maljalle ja vetämällä rauhallisesti keskikohdasta kohti reunaa ja samaa reittiä takasin maljan keskelle, jotta saadaan maljalle levitettyä tasainen bakteerisuspensio. Maljalle olisi tarkoitus tulla tasaiset kehän jäljet.
5. Dreijauksen jälkeen kiekota maljat antibioottiannostelijoilla.
6. Tarkista että kiekottaja ei työnnä kiekkoja liian syvälle agariin ja että kiekot jäävät kiinni agarin pintaan. Jos kiekot jäävät poikittain agariin, siirrä ne pinseteillä samaan paikkaan, johon ne ensin osuivatkin.
7. Laita kiekotetut maljat 15 minuutin sisällä lämpökaappiin ja inkuboi yön yli lämpökaapissa.
8. Tarkastele maljaa inkuboinnin jälkeen. Onnistuneessa maljassa kasvu on tasaista koko maljalla ja tiheydeltään jatkuvaa. Malja ei ole lukukelpoinen jos erillisiä pesäkkeitä on havaittavissa.
9. Lue takaa heijastuvan valon avulla tai mustaa taustaa vasten estorenkaiden halkaisijat työntötkillä millimetrin tarkasti. Valitse mittauspiste mahdollisimman

kaukaa naapurikiekosta ja reuna-alueesta. Jos luotettavaa halkaisijaa ei ole, mittaa säde kiekon keskeltä estorenkkaan reunaan ja kerro tulos kahdella.

5. VIRTSAVILJELY MALJOJEN TUNNISTAMINEN

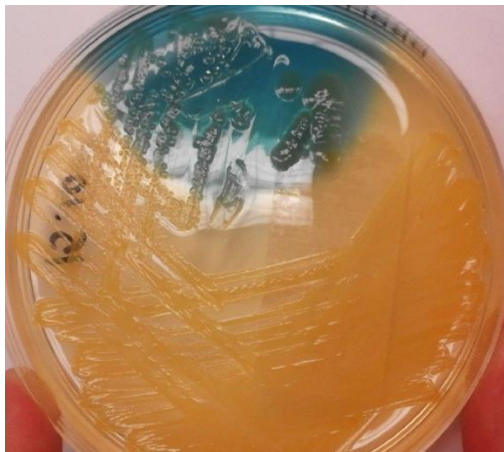
VAIHEITTAIN

5.1 Sauvabakteerien tunnistaminen

Sauvabakteerin pesäkkeet ovat yleensä limaisempia ja kosteampia kuin kokkibakteeri-pesäkkeet. Laktoosiposiitiviset keltaiset sauvapesäkkeet Cled-maljalla ovat koliformisia sauvoja ja laktoosinegatiiviset ei-*E.colin* näköiset ovat gramnegatiivisia sauvoja.

1. Ensin tarkastellaan maljan kasvuston väriä, ovatko pesäkkeet keltaisia vai muun värisiä?

- Keltaiset pesäkkeet eli laktoosia hajottavat bakteerit



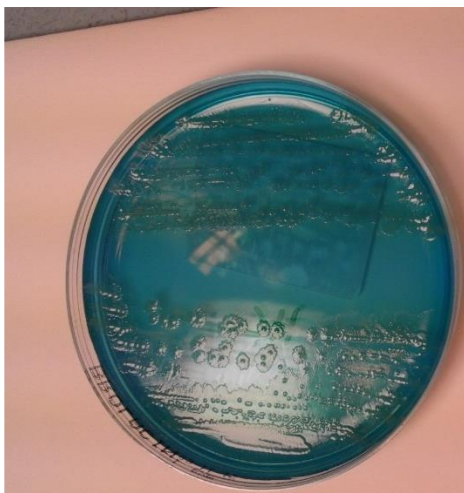
Kuva 28. Koliforminen sauva.

- Sitten katsotaan ovatko pesäkkeet *E.colille* ominaisia vai eivät. Jos pesäkkeet ominaisia *E.colille*: Cled- maljalla keltainen pesäke ja Chromo-maljalla punertava pesäke.
 - Vitekin herkkyys
 - Perämalja chromolle, eli tee Vitekissä olleesta bakteerisuspensiosta viljely chromon yhdelle sektorille
 Jos Chromo-maljalla kasvaa marjapuuron-punainen pesäke → *E.coli*

- Jos Chromo-maljalla kasvaa muun kuin marjapuuron väristä punertavaa pesäkettä:
 - Vitek GN eli tunnistus tai API 20 E-tunnistus → nimetään Vitekin tai API 20 tuloksen mukaan.
 - Pesäke on marjapuuron värinen mutta ei *E.colin* näköinen tai hajuinen niin tehdään Vitekin tunnistus tai Api 20 E → nimetään tunnistuksen mukaan

- 2. Muu gramnegatiivien sauva → ei keltainen sauvapesäke, laktoosi -

- Ensin on mietittävä näyttääkö sininen sauvapesäke proteukselta eli hunnuttaako se? Proteuksen pesäkkeet ovat tunnistettavissa maljalta aaltoilevan hunnutuksen vuoksi. Leviävä hunnutus voi näkyä agarilla säännöllisenä tai epäsäännöllisen muotoisena kasvuna.



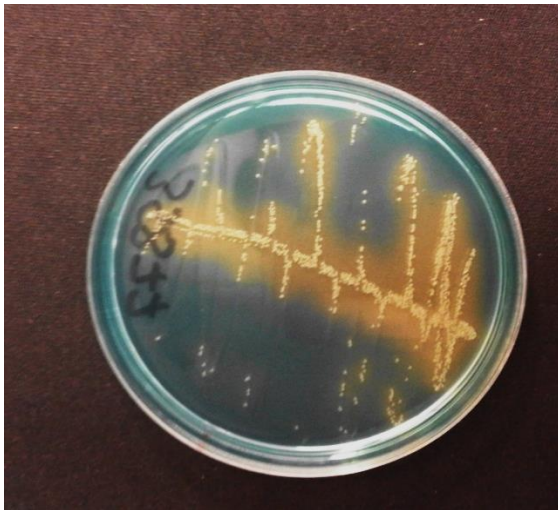
Kuva 29. Hunnuttava proteus.

- Jos pesäkkeet näyttävät proteukselta ja hunnuttavat:
 - Vitekin tunnistus
 - Chromo malja
 - Jos Chromo-maljalla väritön kasvu ja ruskea halo ja herkkä → *Proteus mirabilis* + herkkyys CH
 - Jos Chromo-maljalla ei keltaista kasvua
 - ◆ Vitek tunnistus (vitek GN) tai API 20 → vastataan tuloksen mukaan

- Jos pesäke ei näytä proteukselta ja ei hunnuta
 - Tehdään oksidaasitesti
 - ❖ Jos oksidaasi on positiivinen eli muuttuu siniseksi tehdään C-390-kiekkotesti herkkyysmaljoilla
 - Jos R < 12 mm → *Pseudomonas aeruginosa*
 - Jos S ≥ 12 mm → *Pseudomonas* sp.+ herkkyys HD
 - ❖ Oksidaasi on negatiivinen eli ei muuta väriä
 - Vitekin tunnistus ja Vitekin herkkyys tai API 20 E → tulos testin mukaan
- Jos pesäke on *E.colin* näköinen, mutta laktoosi neg. (sininen) Cled-maljalla
 - Vitekin herkkyys ja Chromo-malja
 - Chromo: pesäke marjapuuron-punainen → *E.coli*
 - Chromo: muu kuin marjapuuron-punainen → tee Vitekin tunnistus tai API 20 E + Vitekin herkkyys → vastaa tulos

6.2 Kokkibakteerien tunnistaminen

Kokkibakteerit ovat pieniä, kuivahkoja pyöreitä pesäkkeitä maljalla. Koko vaihtelee pienstä pesäkkeestä (esim. *Str.agalactiae*) selvästi havaittavaan isompaan pesäkkeeseen (esim. *Staph.saprophyticus*).

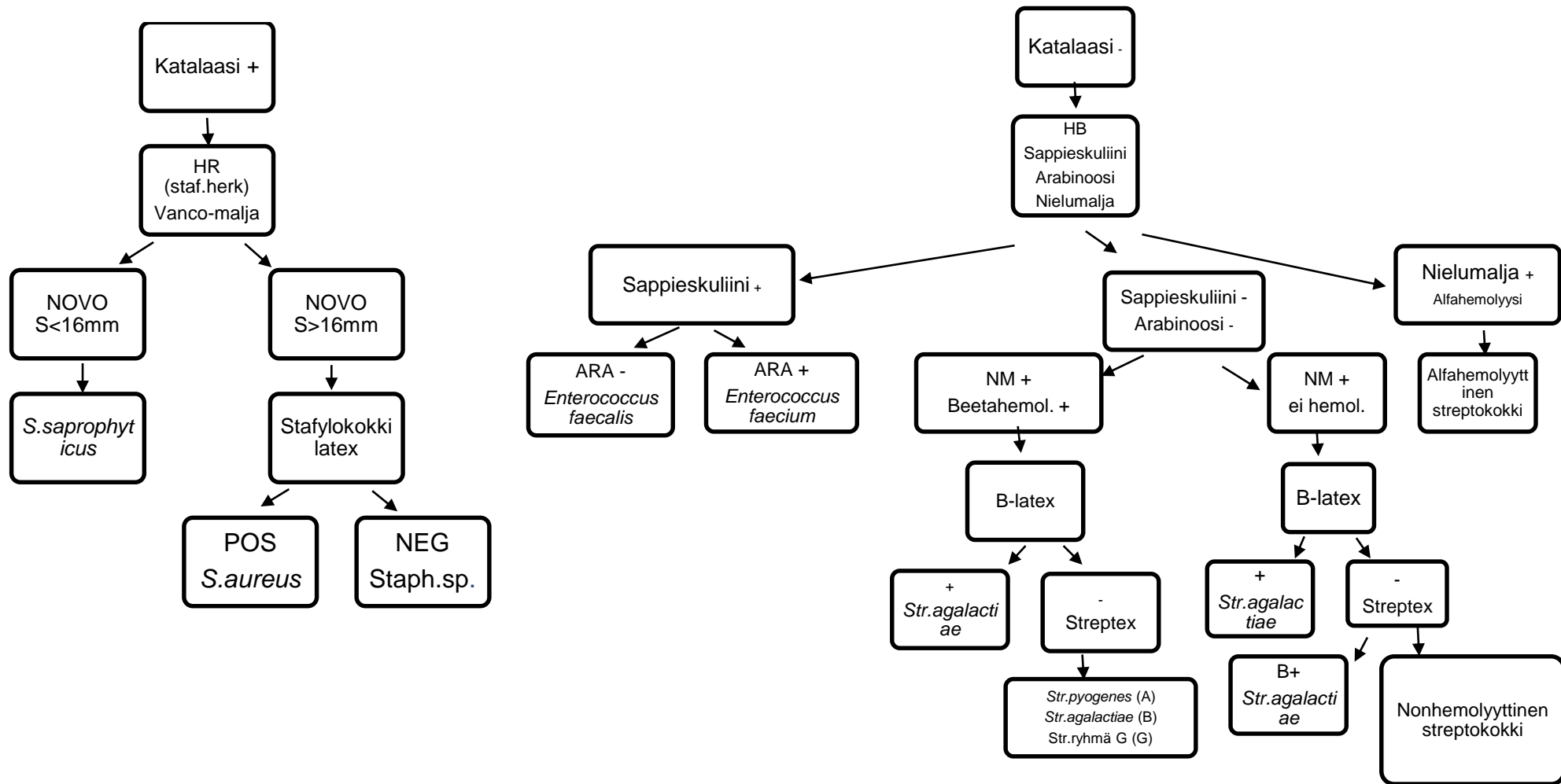


Kuva 30. Kokkibakteereja Cled-maljalla.

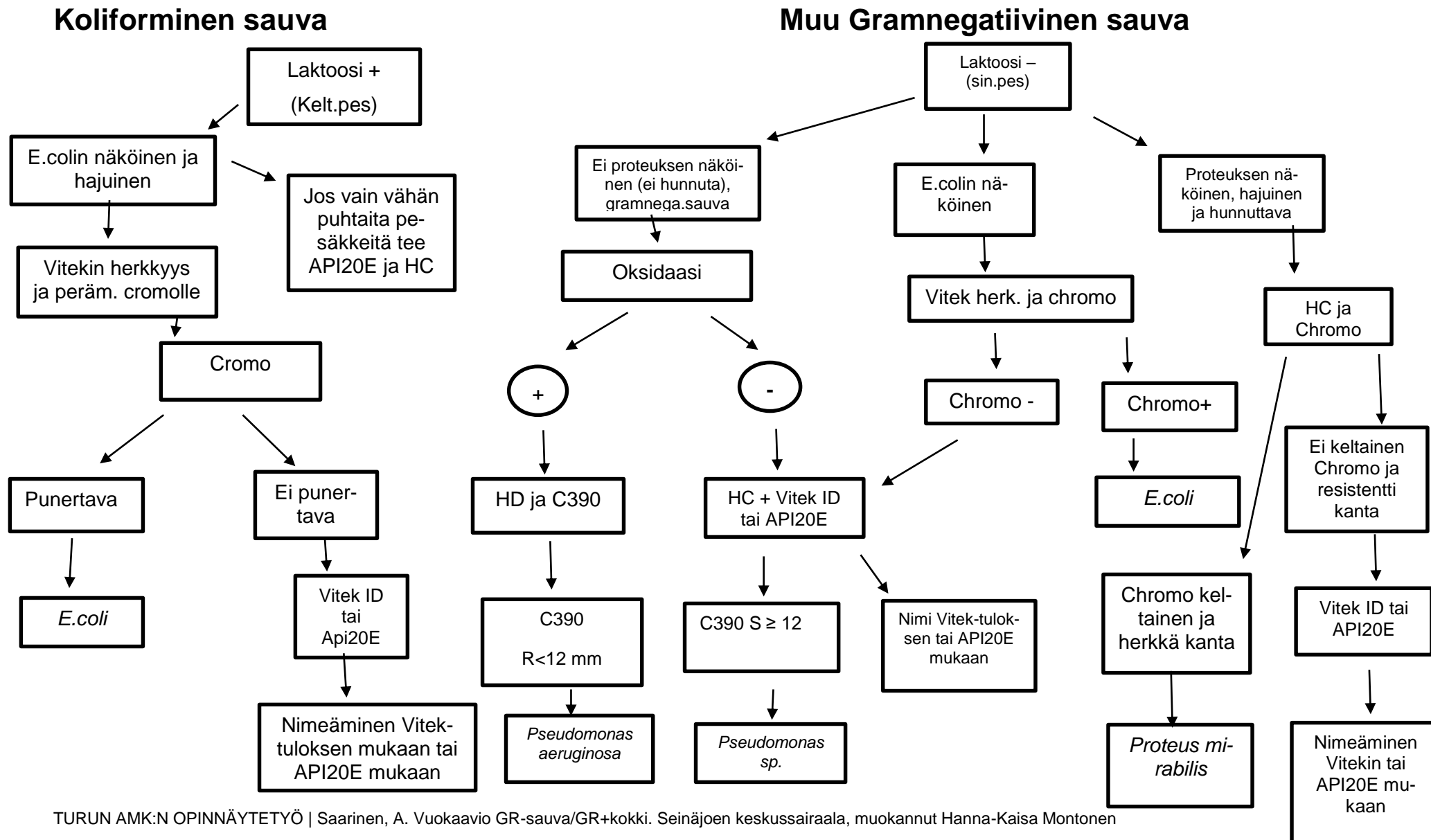
1. Ensin tehdään kokkipesäkkeelle katalaasitesti
 - Katalaasi + (kuohuu) → Stafylokokki
 - Tehdään kokkipesäkkeille herkkyyspaneeli R, jossa mukana NOVO-kiekko. Tee myös Vanco-malja.
 - Jos NOVO-rengas alle 16 mm → *Staph. saprophyticus*
 - Jos NOVO- rengas yli 16 mm
tee Stafylokokkilatex.
 - Jos Staph. latex sakkaa rakeita mustalle kortille → *S.aureus*
 - Jos stafylokokkilatex ei sakkaa → Staph. sp
2. Jos katalaasitesti on negatiivinen (ei muodostu ilmakuplia)
 - Viljele seuraavat maljat:
 - a. HB (herkkyys)
 - b. Sappieskuliini-malja (ruskea)

- c. Arabinoosi-malja (violetti)
 - d. Nielumalja (punainen)
- Ensin tarkastellaan vuorokauden kasvatuksen jälkeen sappieskuliini-maljaa:
 - Jos sappieskuliini-malja positiivinen (kasvaa mustaa kasvustoa) SE+ ja ARA-malja positiivinen (kasvaa keltaista pesäkettä) → *Ent. faecium*
 - Jos sappieskuliini-malja positiivinen (kasvaa mustaa kasvustoa) ja ARA-malja negatiivinen (ei kasva keltaista) → *Ent. faecalis*
 - Jos sappieskuliini-maljalla positiivinen, Ara-malja negatiivinen:
 - ja nielumalja beettahemolyysiä (läpinäkyvyys) tehdään Streptokokki B-latex testi
 - B-latex + → *Str. agalactiae*
 - B-latex – → Tee vielä Streptex joissa tulokset ovat:
 - a. *Str. pyogenes* (A)
 - b. *Str. agalactiae* (B)
 - c. Str.ryhmä G (G)
 - Nielumalja kasvaa mutta ei beettahemolyysiä
 - tee B-latex
 - a. jos + → *Str. agalactiae*
 - b. jos – tee Streptex B
 - jos B + → *Strep. agalactia*
 - jos B - → Nonhemolyyttinen streptokokki
 - Jos sappieskuliini-malja on negatiivinen (-), ARA negatiivinen (-) ja nielumalja alfahemolyyttinen (vihreää hemolyysiä) → Alfahemolyyttinen streptokokki, kommentiksi "Todennäköisesti ihokontaminaatio".
 - Jos bakteerikasvu on stafylokokkimaista, katalaasitesti hidas positiivinen ja kasvusto haisee pullahiivalta, kyseessä voi olla hiiva.

Grampositiivisten kokkien tunnistuskaavio



GRAMNEGATIIVISTEN SAUVOJEN TUNNISTUSKAAVIO



LÄHTEET

BD 2011. BD™ CHROMagar™ Orientation Medium. Viitattu 2.5.2015 <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9020>.

Biomérieux 2002. Api 20E. Identification system for Enterobacteriaceae and other nonfastidious Gram-negative rods. Viitattu 1.4.2016 <http://faculty.fiu.edu/~makemson/MCB3020Lab/API20eInstructions.pdf>.

Biomérieux 2008. Vitek 2 Instrument User Manual. Viitattu 1.4.2016 http://www.frankshospital-workshop.com/equipment/documents/automated_analyzer/user_manuals/Biomerieux%20Vitek%20%20-%20User%20manual.pdf.

Biotieteiden opetuksen keskus Helsingin yliopisto 2015. Gram-värjäys. Viitattu 2.2.2016 http://blogs.helsinki.fi/biopop-keskus/files/2015/09/gram_varjays_biopop.pdf.

Carlson, P. & Koskela, M. 2003. Bakteriologinen diagnostiikka. Teoksessa P. Huovinen; S. Meri; H. Peltola; M. Vaara; A. Vaheri & V. Valtonen. (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 2. Helsinki: Duodecim.

Carlson, P. & Koskela, M. 2011. Bakteriologiset tutkimukset. Teoksessa K.Hedman; T. Heikkinen; P. Huovinen; A. Järvinen; S. Meri & M. Vaara. (toim.) Infektiosairaudet Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. Helsinki: Duodecim.

Cullimore, D.R. 2000. Practical atlas for bacterial identification. Florida: CRP Press LLC. Viitattu 2.5.2016 https://books.google.fi/books?id=Y4tsGVn7kowC&pg=PP6&lpg=PP6&dq=Cullimore,+D.+2000.+Practical+atlas+for+bacterial+identification.+Florida:+CRC+Press+LLC.&source=bl&ots=ucgDkAO5Hc&sig=FirPP_hA5KEosYzhlfW_M-79UNw&hl=fi&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=e.coli&f=false.

Esko, E. 1995. Aerobi-bakteerien tunnistaminen. Moodi 4/1995 erillisjulkaisu.

Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri 2015. Bakteeri, viljely virtsasta. Viitattu 2.2.2016 <http://www.epshp.fi/files/4817/U-BakVi-1155.pdf>.

Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Näytteiden otto laboratoriotutkimuksia varten. Viitattu 3.5.2016 http://www.epshp.fi/1/yksikoiden_sivut/sairaanhoidolliset_palvelut/kliininen_kemia/laboratoriotutkimukset/naytteiden_otto_laboratoriotutkimuksia_varten.

Fimlab 2010. Virtsanäytteen otto. Viitattu 25.4.2016 http://www.fimlab.fi/yleisohjeet/_nayta.tmpl?sivu_id=195;setid=5851;id=1133.

Hallanvuori, S. 2015. *Yersinia enterocolitica*- bakteerin osoittaminen elintarvikkeista. Evira. Viitattu 2.5.2015. https://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehututkimus/mibi/evira_3445_5_yersinia_enteroc.pdf.

Heikkilä, R. & Meurman, O. 2005. Bakteriologia. Teoksessa S. Hellsten. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. uudistettu painos. Helsinki: Suomen kuntaliitto.

Heikkilä, R. & Meurman, O. 2005. Laboratoriodiagnostiikka. Teoksessa S. Hellsten. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. uudistettu painos. Helsinki: Suomen kuntaliitto.

Lyytikäinen, O. Vuopio-Varkila, J. & Kotilainen, P. 2011. Koagulaasinegatiiviset stafylokokit. Teoksessa K. Hedman; T. Heikkinen; P. Huovinen; A. Järvinen; S. Meri & M. Vaara. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim.

Meurman, O. 2010. Gram-värjäykset. Viitattu 27.4.2016 <http://www.labquality.fi/@Bin/2028802/meurman+Gram+nettiin.pdf>.

Nordlab. 2013. Kertavirtsanäytteet. Viitattu 10.5.2016 <http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjeet/Kertavirtsanaytteet.pdf>.

Rantakokki-Jalava, K. & Anttila, V-J. 2011. Muut streptokokit, enterokokit ja muita grampositiivisiä kokkeja. Teoksessa K. Hedman; T. Heikkinen; P. Huovinen; A. Järvinen; S. Meri & M. Vaara. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim.

Raz, P. Colodner, R. & Kunin, C. 2004. Who Are You- Staphylococcus saprophyticus?. Clinical Infectious Diseases. Viitattu 25.3.2016 <http://cid.oxfordjournals.org/content/40/6/896.full>.

Remel 2012. Strep-tex Acid Extraction Kit. Viitattu 20.3.2016 <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/SDG/MBD/MBD%20Documents/Instructions%20For%20Use/Strep-tex/Acid%20Extraction%20Kit/X7827.pdf>.

Saarinen, A. 2002. Katalaasitesti. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatu-käsikirja.

Saarinen, A. 2005. S.Aureus-Latexagglutinaatiotesti. Seinäjoen keskussairaala mikrobiologian laboratorio, laatukäsikirja.

Saarinen, A. 2012. Chromagar orientation-malja. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.

Saarinen, A. 2013. Gramnegatiivinen sauva. Seinäjoen keskussairaalan Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.

Saarinen, A. 2013. Grampositiivinen kokki. Seinäjoen keskussairaalan Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.

Saarinen, A. 2013. Vuokaavio GR-sauva/GR+kokki. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.

Saarinen, A. 2015. Bakteeri, viljely virtsasta. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.

Saarinen, A. 2015. U-Bakteeri, viljely. Seinäjoen keskussairaalan Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.

Saha, K. 2011. Bakteeri, viljely virtsasta. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.

Saha, K. 2011. Gramvärjäys. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.

Saha, K. 2012. Bakteerien tunnistus. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.

Saha, K. 2012. Bakteerin tunnistus. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.

- Saha, K. 2012. Bakteerinäytteiden viljely. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.
- Saha, K. 2012. Bakteerinäytteiden viljely. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.
- Saha, K. 2012. Bakteerinäytteiden viljely. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.
- Saha, K. 2015. Perusherkkyyismääritykset. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.
- Saxén, H. & Vuopio-Varkila, J. 2003. B-ryhmän streptokokki. *Staphylococcus aureus*. Teoksessa P. Huovinen; S. Meri; H. Peltola; M. Vaara; A. Vaheri & V. Valtonen. (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim.
- Seinäjoen keskussairaala, Kliininen mikrobiologia. 2015. Bakteeri, viljely virtsasta. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Viitattu 5.5.2016 <http://www.epshp.fi/files/4817/U-BakVi-1155.pdf>.
- Siitonen, A. & Vaara, M. 2003. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* ja *Yersinia*. Teoksessa P. Huovinen; S. Meri; H. Peltola; M. Vaara; A. Vaheri & V. Valtonen. (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim.
- Siitonen, A. & Vaara, M. 2011. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* ja *Yersinia*. Teoksessa K. Hedman; T. Heikkinen; P. Huovinen; A. Järvinen; S. Meri & M. Vaara. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim.
- Siitonen, A. Vaara, M. 2011. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* ja *Yersinia*. Teoksessa M. Vaara (toim.) Mikrobiologia Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. 1.-2. painos. Helsinki: Duodecim.
- Sojakka, K. & Välimäki, M-L. 2011. Ammatillinen Mikrobiologia. Helsinki: Opetushallitus.
- Solunetti. 2006. Gram-värijäys. Viitattu 27.4.2016 <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/gram-varjays/2/>.
- Strandén, P. 2007. Arabinoositesti. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.
- Stranden, P. 2007. C-390. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.
- Strandén, P. 2007. Oksidaasitesti. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.
- Strandén, P. 2007. Sappieskuliinitesti. Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.
- Suomala, P. 1999. Laktoosifermentaatio (Cled, Onpg). Seinäjoen keskussairaala Mikrobiologian laboratorio, Laatukäsikirja.
- Tankeshwar, A. 2013. Novobiocin Susceptibility Test: Principle, procedure and interpretations. Microbeonline. Viitattu 3.5.2016 <http://microbeonline.com/novobiocin-susceptibility-test-principle-procedure-and-interpretations/>.
- Terveystieteiden tutkimuskeskus. 2015. ESBL. Viitattu 20.3.2016 <https://www.thl.fi/fi/web/infektioaudit/audit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/esbl>.

The Chromagar. 2009. Clinical Mikrobiology. Viitattu 27.4.2016 <http://www.chromagar.com/products-chromagar-orientation-focus-on-urinary-tract-pathogens-25.html#.VyC6LvmLSM8>.

Tissari, P. & Anttila, V-J. 2003. Muu *Enterobacteriaceae*-heimo. Teoksessa P. Huovinen; S. Meri; H. Peltola; M. Vaara; A. Vaehri & V. Valtonen. (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim.

Tissari, P. & Anttila, V-J. 2003. Pseudomonakset, pseudomonaksen kaltaiset sauvat ja akinetobakteerit. Teoksessa P. Huovinen; S. Meri; H. Peltola; M. Vaara; A. Vaehri & V. Valtonen. (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim.

Tissari, P. & Anttila, V-J. 2011. Muu *Enterobacteriaceae*-heimo. Teoksessa K. Hedman; T. Heikkinen; P. Huovinen; A. Järvinen; S. Meri & M. Vaara. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim.

Uhari, M. Saxen, H. & Mertsola, J. 2006. Tyynyllä tarkkuutta lapsen virtsatieinfektion diagnostiikkaan. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Viitattu 2.5.2016 http://www.duodecim-lehti.fi/web/guest/uusinnumero;jsessionid=52CB7F780916D1AA018D9D6930B52CFF?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&_Article_WAR_DL6_Articleportlet_viewType=viewArticle&_Article_WAR_DL6_Articleportlet_tunnus=duo95585.

Urol, A. 2013. Antibiotic resistance in *Citrobacter* spp. isolated from urinary tract infection. NCBI. Viitattu 5.5.2016 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3835999/>.

Välimäki, M-L. & Sojakka, K. 2011. Ammatillinen mikrobiologia. Helsinki: Opetushallitus.

Vita 2015. Suhteellinen tiheys, virtsasta. Kliininen keskuslaboratorio. Viitattu 25.4.2016 <https://vita.fi/laboratoriokasikirja/tutkimus/1992>.

Vuopio-Varkila, J. & Kotilainen, P. 2003. A-ryhmän streptokokki. Teoksessa P. Huovinen; S. Meri; H. Peltola; M. Vaara; A. Vaehri & V. Valtonen. (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim.

Vuopio-Varkila, J. Kuusela, P. & Kotilainen, P. 2003. *Staphylococcus aureus*. Teoksessa P. Huovinen; S. Meri; H. Peltola; M. Vaara; A. Vaehri & V. Valtonen. (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim.

Zoonosikeskus. Laajakirjoisia beetalaktamaasientsyymejä tuottavat bakteerit (ESBL). Viitattu 5.5.2016 http://www.zoonosikeskus.fi/portal/fi/mikrobilaakeresistenssi/zoonosibakteerien_resistenssi/esbl/.