

Olga Hautala & Anna Johansson

# Streptokokkien säilyvyys nestekuljetusputkessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikka  
Opinnäytetyö  
17.4.2012

Tekijät Otsikko	Olga Hautala, Anna Johansson Streptokokkien säilyvyys nestekuljetusputkessa
Sivumäärä Aika	34 sivua + 2 liitettä 17.4.2012
Tutkinto	Bioanalytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Tuula Kurkinen Laboratoriohoitaja Risto Hilla
<p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, vaikuttaako säilytysaika tai -lämpötila nielurisanäytteistä eristettyjen A-, C- ja G-ryhmän beetahemolyyttisten streptokokkien säilyvyyteen ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputkessa. Lisäksi haluttiin saada selville, vaikuttaako nielurisojen normaaliflooran mukana olo streptokokkien säilyvyyteen nestekuljetusputkessa. Työ tehtiin HUSLA-Bin bakteriologian osastolle.</p> <p>Tutkittavana aineistona oli 40 streptokokkikantaa, jotka oli eristetty nielurisanäytteistä. Näiden lisäksi aineistona käytettiin seitsemää A-ryhmän beetahemolyyttistä streptokokkikantaa ja nielurisojen normaaliflooraa sisältävää näytettä sekä kolmea ominaisuuksiltaan tunnettua ATCC- kantaa. Näytteet säilytettiin huoneenlämmössä ja jääkaappilämpötilassa ja viljeltiin elatusainemaljoille 0, 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua siitä, kun näytteet oli siirretty ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputkeen.</p> <p>Puhtaat A-, C- ja G-ryhmän beetahemolyyttiset streptokokit lisääntyivät huoneenlämmössä säilytetyissä putkissa huomattavasti ensimmäisen säilytysvuorokauden aikana ja lisääntyminen jatkui myös tämän jälkeen. Jääkaappilämpötilassa bakteerimäärän muutokset olivat vähäisiä, eikä säilytysajalla ollut suurta vaikutusta viljelystä saataviin tuloksiin. Huoneenlämmössä säilytettyjen nielurisojen normaaliflooraa sisältävien näytteiden bakteerimäärä väheni suurimmassa osassa näytteitä tutkimuksen aikana. Jääkaappilämpötilassa säilytettyjen näytteiden bakteerimäärä pysyi samana koko tutkimuksen ajan.</p> <p>ATCC- kannoista tehdyissä viljelyissä bakteeripesäkkeitä kasvoi maljoilla runsaasti jo ensimmäisen viljelyn jälkeen joten yksittäisiä pesäkkeitä oli mahdotonta laskea. Huoneenlämpötilassa säilytettyjen näytteiden pesäkemäärien laskeminen oli mahdotonta kaikissa aikapisteissä pesäkkeiden suuren lukumäärän vuoksi. Jääkaappilämpötilassa bakteerimäärä vähentyi hieman toisen säilytysvuorokauden aikana, mutta kolmannen vuorokauden jälkeen tehtyjen viljelyjen tuloksissa bakteerimäärät olivat taas ennallaan.</p> <p>Työn tulosten perusteella voidaan todeta jääkaappilämpötilan soveltuvan parhaiten A-, C- ja G-ryhmän beetahemolyyttisiä streptokokeja sisältävien ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputkien säilytyslämpötilaksi. Tutkittujen näytteiden määrä oli suppea, joten tuloksia voidaan pitää suuntaa antavina.</p>	
Avainsanat	streptokokki, säilyvyys, ESwab <sup>®</sup> - nestekuljetusputki

Authors Title	Olga Hautala, Anna Johansson The Preservation of Streptococci in Liquid Transport Medium
Number of Pages Date	34 pages + 2 appendices 17 April 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Tuula Kurkinen, Principal Lecturer Risto Hilla, Laboratorian
<p>The purpose of our study was to determine how the storage temperature and storage time affected on the stability of beta-haemolytic streptococci groups A, C and G in the ESwab<sup>®</sup>-transport system. The purpose was also to determine how the normal throat flora affected the stability of streptococci in ESwab<sup>®</sup>.</p> <p>The material for our study was collected from patient specimens that were positive to beta-haemolytic streptococci group A, C or G. The streptococci were isolated from the samples and transferred to the ESwab<sup>®</sup> transport system. The effect of the normal throat flora was examined with seven samples containing group A streptococci and normal throat flora. Also three known streptococci ATCC samples were examined. After the transfer, the samples were cultured to maintenance medium after 0, 24, 48 and 72 hours. The specimens were stored both at the room temperature and refrigerator temperature.</p> <p>The isolated group A, C and G streptococci stored at the room temperature increased heavily during the first day of preservation and continued to increase during the second day. The isolated group A, C and G streptococci stored at the refrigerator temperature stayed close to the baseline through the entire study.</p> <p>The bacteria level in specimens with normal throat flora and group A streptococci stored at the room temperature decreased evenly during the study in most samples. On the contrary, the specimens containing normal throat flora and group A streptococci stored at the refrigerator temperature stayed close to the baseline the entire study.</p> <p>The streptococci ATCC samples stored at the room temperature gave high levels of bacteria from the first culture and stayed the same during the entire study. The streptococci ATCC samples stored at the refrigerator temperature stayed relatively steady during the study.</p> <p>The results of our study indicated that the ESwab<sup>®</sup> transport systems containing throat specimens for streptococci culture should be stored at the refrigerator temperature. The sample material of our study was relatively small, so the results were indicative.</p>	
Keywords	streptococcus, preservation, ESwab <sup>®</sup> transport system

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Nestekuljetusputki	1
3	WASP®- viljelyautomaatti	3
4	Beetahemolyttiset streptokokit	4
5	Maljaviljely	6
6	Tutkimusasetelma	8
7	Työn suorittaminen	10
8	Tulokset	11
8.1	A-, C- ja G-ryhmän streptokokkikannat huoneenlämmössä	13
8.2	A-, C- ja G-ryhmän streptokokkikannat jääkaappilämpötilassa	15
8.3	Nielurisojen normaaliflooraa sisältävät näytteet huoneenlämmössä	17
8.4	Nielurisojen normaaliflooraa sisältävät näytteet jääkaappilämpötilassa	19
8.5	ATCC- kantojen viljelytulokset	21
8.6	Yhteenvedo tuloksista	22
9	Luotettavuus, toistettavuus ja eettisyys	24
10	Pohdinta	27
	Lähteet	33
	Liitteet	1-2

## 1 Johdanto

Opinnäytetyömme aiheena on nielurisoista eristettyjen beetahemolyyttisten streptokokkien säilyvyyden testaaminen nestemäisessä kuljetusaineessa. Aihe liittyy bakteriologisen viljelyprosessin automatisointiin HUSLABin bakteriologian laboratoriossa. Viljelyautomaatit viljelevät näytteet ainoastaan nestemäisestä kuljetusaineesta, joten automaattien käyttöönoton myötä geelikuljetusputkista tullaan osittain luopumaan ja käyttöön otetaan nestemäistä kuljetusainetta sisältäviä putkia. Tämän vuoksi on tärkeää varmistua nestemäisen kuljetusaineen soveltuvuudesta nielurisojen streptokokkien säilytykseen.

Opinnäytetyömme liittyy nestemäistä kuljetusainetta sisältävien putkien (ESwab<sup>®</sup>) verifiointiin HUSLABin kliinisen mikrobiologian toimialan bakteriologian laboratoriossa. Kun putket on verifioitu, voidaan niitä käyttää nielun streptokokkiviljelyn näytekuljetuksessa.

HUSLABilla on näytteenottopisteitä, joissa näytteet nielurisojen streptokokkiviljelyä varten otetaan kuljetusputkiin, joissa ne toimitetaan bakteriologian laboratorioon. Bakteriologian laboratoriossa näytteet viljellään elatusainemaljoille. Yhtenä opinnäytetyömme tehtävänä on selvittää, säilyvätkö streptokokit nestemäisessä kuljetusaineessa toimipaikassa viikonlopun yli, jos näyte ei jostain syystä ehdi mukaan päivän viimeiseen näytekuljetukseen. Lisäksi tarkoituksena on selvittää, missä lämpötilassa näytteet tulee säilyttää. Selvitämme työssämme lisäksi, vaikuttaako nielurisojen normaalifloora näytteen säilyvyyteen nestemäisessä kuljetusaineessa.

## 2 Nestekuljetusputki

Luotettavan bakteriologisen laboriodiagnostiikan kulmakiviä ovat ohjeiden mukainen näytteenotto, säilytys ja kuljetus sekä laboratorioanalytiikka. Aiemmin bakteerikuljetusputkina on käytetty geelimäistä säilytysainetta sisältäviä putkia, mutta viime vuosien aikana markkinoille on tullut kuljetusputkia, jotka sisältävät nestemäistä kuljetusainetta.

Copan on kehittänyt kuljetusta varten ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputken, jossa näyte säilytetään nestemäisessä kuljetusaineessa. Kuljetusaineessa voidaan säilyttää sekä aeroibi-, että anaerobi-bakteereja. Copan ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputki koostuu kahdesta osasta: polypropyleeniputkesta, joka sisältää yhden millilitran nestemäistä kuljetusainetta sekä näytetikusta, jonka päähän on kiinnitetty pehmeitä nailonkuituja. (Copan 2010: 2.) Näytteenoton jälkeen näytetikku katkaistaan putkeen, jolloin näytettä irtoaa tikusta putkessa olevaan nesteeseen. Näin saadaan yksi millilitra homogeenista seosta, joka voidaan käyttää kokonaisuudessaan laboratoriossa testien suorittamiseen. (Copan Italia. LBM.)

Eswab<sup>®</sup> - nestekuljetusputken tikku on oleellinen osa tuotetta. Vaikka tikkua ei käytettäisi näytteenotossa, tulee se katkaista putkeen näytteenoton yhteydessä. Tikku sisältää kasviproteiinia, joka vaikuttaa huomattavasti näytteen säilymiseen Eswab<sup>®</sup> - nestekuljetusputkessa. (Kati Pentikäinen 2012.) Bakteeriviljelyä varten ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputkeen otetut näytteet tulisi analysoida laboratoriossa mahdollisimman nopeasti, kuitenkin viimeistään 48 tunnin kuluttua näytteenotosta. ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputket voidaan ennen näytteiden analysointia säilyttää jääkaappilämpötilassa (+4 - 8°C) tai huoneenlämmössä (+20 - 25°C). (Copan 2010: 2.)

Copanin ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputken nukkatikku on valmistettu nukkakuitujen ruis-  
kutustekniikalla. Tämä poikkeaa perinteisen vanutikun valmistuksesta, jossa käytetään yleensä dacronia tai puuvillaa. Tämä teknologia mahdollistaa vahvan kapillaari-ilmion, jonka ansiosta nukkatikkuun kerääntyy enemmän näytettä kuin perinteisiin vanutikkuihin. Muotoilu mahdollistaa nukkatikun suuren näytteenluovutusmäärän, eikä näytettä jää kiinni tikkuun, kuten perinteisiin vanutikkuihin. (Van Horn – Audette – Sebeck – Tuckert 2008: 1655.)

Kuljetusputkissa käytettävien näytetikujen eroista on tehty monia tutkimuksia, joissa verrataan uutta nukkatikkua perinteiseen vanutikkuihin. Esimerkiksi verrattaessa nukkatikkua vanutikkuihin *Herpes simplex* -viruksen diagnosoinnissa havaittiin nukkatikun sekä keräävän että luovuttavan huomattavasti enemmän viruksia sisältäviä soluja kuin vanutikun. Vanutikun luovuttama solumäärä oli 18 % - 30 % kerätystä näytteestä, kun taas nukkatikku luovutti näytteestä 70 % - 80 %. Näin ollen nukkatikusta saadut tulokset olivat hyviä tai erinomaisia 49.7 prosentissa tutkituista näytteistä vanutikusta saa-

tavien hyvien tai erinomaisten tulosten jäädessä 23.9 prosenttiin. (Väre – Hedman – Lappalainen 2007.)

Säilytysaineen tulee pitää mikro-organismit lisääntymiskykyisinä, mutta minimoida niiden metabolisia tapahtumia ja hidastaa niiden lisääntymistä. Säilytysaine, jossa on liikaa ravintoa, nopeuttaa mikro-organismien lisääntymistä. Suotuisinta koostumusta säilytysaineelle ei ole määritetty ja se luultavasti vaihtelee lajista toiseen. (Petti – Carroll 2011: 124.) ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputki on yleiskuljetusputki, joka on suunniteltu säilyttämään lisääntymiskykyisenä monia bakteerilajeja. Näin ollen ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputken kuljetusaine ei sisällä tiettyjä ravinteita yksittäisille bakteerilajeille. (Miikkulainen-Lahti 2012.)

ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputken neste sisältää natriumkloridia, kaliumkloridia, kalsiumkloridia ja magnesiumkloridia. Lisäksi nesteessä on monokaliumfosfaattia, dinatriumfosfaattia, tioglykolaattia ja tislattua vettä. (Copan 2010:2.) Suolat auttavat pitämään osmoosia yllä, ja helpottavat näin bakteerien hengissä säilymistä. Fosfaatit toimivat puskureina, jotka pitävät nesteen pH:n sopivana. Tioglykolaatti on pelkistävä aine joka sitoo happea ja tekee nesteeseen suotuisat olosuhteet myös anaerobisille bakteereille. (Miikkulainen-Lahti 2012.)

### **3 WASP<sup>®</sup>- viljelyautomaatti**

Walk Away Specimen Processor eli WASP<sup>®</sup> on Copanin viljelyautomaatti, joka viljelee nestemäisessä muodossa olevan mikrobiologisen näytteen maljalle. Copan valmistaa näytteenottoon ja -kuljetukseen tarvittavia välineitä ja putkia jotka soveltuvat viljelyautomaatille, mutta analysaattorilla voidaan käyttää myös muiden valmistajien näytteenkuljetusputkia. WASP<sup>®</sup>- viljelyautomaatilla voidaan viljellä useimmat bakteriologiset näytteet, kuten virtsanäytteet sekä ulostenäytteet. Viljelyautomaattia ja sen toimintoja ohjataan tietokoneohjelmalla. (WASP<sup>®</sup> viljelyautomaatti, käyttöohje 2011: 10-11.)

Viljelyautomaatti tunnistaa näytteet viivakoodin perusteella ja hakee sen avulla näytteen tiedot laboratorion tietojärjestelmästä. Tietojen avulla laite valitsee oikeat toimintavaiheet määriteltujen asetusten mukaisesti. Toimintavaiheisiin kuuluvat muun muas-

sa näytteen sekoitus sekä oikean maljan ja viljelykuvion valinta. Laitetta voidaan ohjata myös manuaalisesti. WASP<sup>®</sup> - viljelyautomaatti tunnistaa näytteen ja näyteastian ja tekee tämän jälkeen ohjelmoidut toimintavaiheet: poistaa korkit, ottaa näytettä viljelysilmukalla, varmistaa että silmukassa on näytettä valokuvaamalla silmukan, tekee valitun viljelykuvion, kiinnittää viivakoodin maljaan, lajittelee maljat ennalta määriteltiin luokkiin esimerkiksi inkubointiolosuhteiden mukaan ja steriloi lopuksi silmukan. (WASP<sup>®</sup> - viljelyautomaatti, käyttöohje 2011: 10-11.)

HUSLABin bakteriologian laboratoriossa olevassa viljelyautomaatissa on erilaisille viljelysilmukoille kolme erillistä paikkaa. WASP<sup>®</sup> - viljelyautomaatti viljelee näytteet maljoille kahden robottikäden avulla. Ensimmäinen robotti tarroittaa ja liikuttaa näyteastian korinavaukseen sekä tuo tarvittavat viljelymaljat viljelyä varten. Toinen robotti viljelee näytteen maljalle. (WASP<sup>®</sup> - viljelyautomaatti, käyttöohje 2011: 17-58.)

Jos näytettä ei jostain syystä voida analysoida, viljelyautomaatti siirtää käsittelemättömät tai osittain käsitellyt näytteet automaattisesti hylätyille näytteille tarkoitettuun telineeseen. WASP<sup>®</sup> - viljelyautomaatti hylkää näytteet joissa on liian vähän nestettä, viivakoodin lukeminen on epäonnistunut tai jokin hälytys on keskeyttänyt näytteenkäsitelyyn. Viljelyautomaattia on mahdollista muokata tilaajan tarpeiden mukaan. Esimerkiksi sentrifuugi ja gramvärjäyusaluslasin valmistaminen on mahdollista lisätä laitteen toimintavaiheisiin. (WASP<sup>®</sup> - viljelyautomaatti, käyttöohje 2011: 17-58.)

#### **4 Beetahemolyttiset streptokokit**

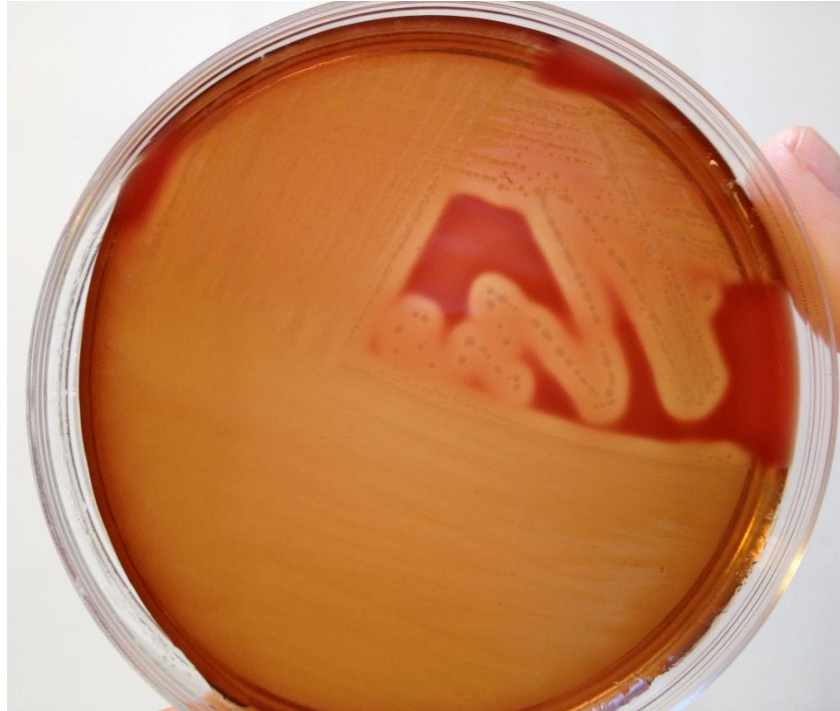
Streptokokit ovat fakultatiivisesti anaerobisesti kasvavia grampositiivisia kokkibakteereja, jotka sietävät säilytystä melko hyvin (Bisno - Ruoff 2005:2360; Spellberg - Brandt 2011:332). Verimaljalla beetahemolyysiä aiheuttavat streptokokit voivat olla ryhmältään joko nielutulehdusta aiheuttavien A-, C- tai G-ryhmien streptokokkeja tai varsinkin vastasyntyneille paljon infektioita aiheuttavaa B-ryhmän streptokokkia (*Streptococcus agalactiae*). Myös nielurisojen normaaliflooraan kuuluva pienipesäkkeinen *Streptococcus anginosus* saa verimaljalla aikaan beetahemolyysiä, mutta sitä ei pidetä nielurisatulehdusta aiheuttavana lajina. (Rantakokko- Jalava - Anttila 2010: 123-124; Spellberg - Brandt 2011:331-332.)

A- ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki (*St. pyogenes*) on yleinen taudinaiheuttaja, joka aiheuttaa eniten infektioita lapsille (yli 3-vuotiaat) ja nuorille aikuisille mutta myös muille ikäluokille. Yleisin A-ryhmän streptokokin aiheuttamista taudeista on ylivoimaisesti nielurisatulehdus (tonsilliitti), jonka oireisiin kuuluvat muun muassa kurkkukipu, suurentuneet ja aristavat imurauhaset kaulan ja leuan alueella sekä korkea kuume, päänsärky ja pahoinvointi. (Vuopio-Varkila - Syrjänen - Kotilainen 2010: 102-103; Bisno - Stevens 2011:2364.)

C- ja G-ryhmään kuuluvat streptokokit eivät ole yhtä tiettyä lajia, vaan ryhmät luokitellaan pinta-antigeenien perusteella. Suurin osa C- ja G-ryhmän beetahemolyyttisistä streptokokeista kuuluu kuitenkin *Streptococcus dysgalactiae* - lajiin. C- ja G-ryhmän beetahemolyyttiset streptokokit kuuluvat ihmisen normaaliflooraan, mutta voivat myös aiheuttaa nielurisatulehduksen, jonka oireet ovat hyvin samankaltaiset A-ryhmän streptokokin aiheuttamaan tulehdukseen verrattuna. Oireilevalta ihmiseltä viljelyssä löytyneet C- ja G-ryhmän streptokokit hoidetaan käytännössä aina, vaikka jälkitauteja esiintyykin huomattavasti harvemmin kuin A-ryhmän streptokokin aiheuttamissa infektioissa. C-ryhmän ja G-ryhmän streptokokkien taudinaiheuttamiskyky on hyvin samankaltainen kuin A-ryhmän streptokokilla. (Rantakokko ym. 2010: 122-124; Spellberg - Brandt 2011:333.) Nielurisatulehdusta aiheuttavat C- ja G-ryhmän beetahemolyyttiset streptokokit erotetaan normaaliflooraan kuuluvasta streptokokkikannasta Voges-Proskauer-testin avulla.

A-, C- ja G-ryhmän beetahemolyyttiset streptokokit tarttuvat useimmiten pisara- tai kosketustartuntana ja tartunta saadaan lähes aina toisesta ihmisestä. Streptokokkien varmin osoittamiskeino on viljely. Nielurisatulehdusta aiheuttavat A-, C- ja G-ryhmän streptokokit tuottavat O-hemolysiiniä, joka saa aikaan hemolysin verimaljalla. Beetahemolyyttiset streptokokit pystytään erottamaan maljalta pesäkkeen ympärillä näkyvän kirkkaan kehän ansiosta 18-48 tunnin viljelyn jälkeen, mutta beetahemolyyttisten streptokokkien erottamiseen toisistaan tarvitaan koagglutinaatiotestiä, jonka avulla ryhmä saadaan heti selville. (Vuopio - Varkila ym. 2010: 106-109.)

Kuvio 1. Beetahemolyysia verimaljalla (Hautala 2012).



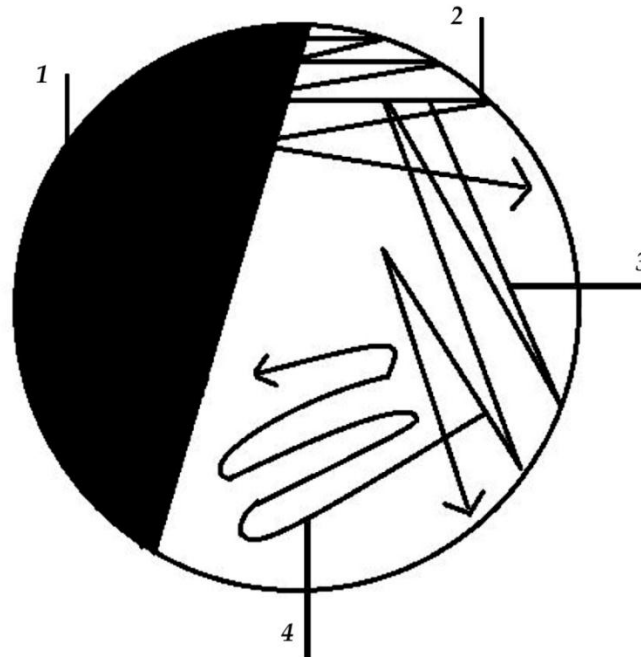
Streptokokit kasvavat hyvin tavallisella verimaljalla +35- 37 °C:ssa (Kuvio 1). Koska streptokokit ovat fakultatiivisia anaerobeja, ne kasvavat parhaiten hiilidioksidipitoisessa ympäristössä, mutta ne eivät vaadi sitä. (Spellberg - Brandt 2011: 332; Bisno - Stevens 2005:2366.)

## 5 Maljaviljely

Streptokokkiviljelyt tulisi tehdä elatusainemaljoille nelikenttähajotuksena (Kuvio 2). Nelikenttähajotuksessa näyte levitetään tiheäksi matoksi noin 1/3 osaan maljaa. Tämän jälkeen vedetään viljelysauvalla pari kertaa viljelyalueen yli jatkaen vetoja viljelemättömälle alueelle. Tämä toistetaan vielä kaksi kerta niin, että uusi viljely aloitetaan aina jo viljellyltä alueelta ja viljely loppuu viljelemättömälle alueelle. Näin viljely on tehty neljään eri kenttään maljalla. (Carlson – Koskela 2011: 41.) Tällä tavalla hajotuksen

aikana sekä näytemäärä että bakteerien määrä vähenee koko ajan ja lopuksi pitäisi syntyä erillisiä pesäkkeitä.

Kuvio 2. Nelikenttähajotus (Hautala, Johansson 2012).



Streptokokkiviljelyssä tulisi käyttää verimaljaa, joka on valmistettu joko lampaan- tai hevosenverestä. Verimalja valmistetaan lisäämällä verta agarpohjaan niin, että sen osuus elatusaineesta on 5%. Viisiprosenttisella verimaljalla hemolyysin havaitseminen on helppoa. Matalampi pitoisuus saattaa tehdä hemolyysin erottamisesta vaikeaa ja korkeampi pitoisuus voi peittää hemolyysin täysin. Kun näytteet on viljelty maljalle, maljoja inkuboidaan hiilidioksidipitoisessa ympäristössä yleensä 24- 48 tuntia, jonka jälkeen pesäkkeitä ja niiden ympärille syntynyttä hemolyyysiä voidaan tarkastella. (Korneman - Allen - Janda - Schreckenberger - Winn 2006: 710.)

HUSLABin bakteriologian laboratorion elatusaineosasto valmistaa itse mm. veri- ja CO-maljoja. Verimaljaa kutsutaan yleismaljaksi, joka sopii hyvin muun muassa streptokokeille. Verimaljan seospohja on tutkittu ja näin ollen sen tiedetään antavan sopivan hemolyysin. Malja tehdään liuottamalla agar tislattuun veteen, ja lisäämällä siihen hevosen verta. Seosta autoklavoidaan agarkeitimessä ja jäähdytetään. Jäähdytymisen jäl-

keen, pH:n ollessa sopiva seos jaetaan maljoille. Maljat säilytetään kylmähuoneessa jossa ne säilyvät neljä viikkoa. (Sivonen 2010.)

CO- malja on selektiivinen streptokokkimalja. Maljan agarpohja koostuu lampaanverestä, tislatusista vedestä ja antibiooteista. Antibiootit ovat kolistiini ja oksoliinihappo. Näiden lisäksi seospohjaan lisätään defibrinoitua lampaanverta. Antibiootit estävät gram-negatiivisten bakteerien, stafylokokkien, basillusten ja difterioiden kasvua maljalla. Seos autoklavoidaan agarkeittimessä ja jäädytetään. Tämän jälkeen pH tarkastetaan ja sen ollessa sopiva seos jaetaan maljoille. Maljat säilytetään kylmähuoneessa jossa ne säilyvät neljä viikkoa. (Sivonen 2010.)

## 6 Tutkimusasetelma

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, soveltuuko ESwab<sup>®</sup>-nestekuljetusputki nielurisoiden streptokokkiviljelyn näytekuljetusputkeksi ja missä lämpötilassa näytteet tulisi ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputkessa säilyttää. Viljelyt tehdään näytteistä joista oli aiemmin saatu positiivinen tulos A-, C-, tai G-ryhmän beetahemolyttisistä streptokeista. Lisäksi viljellään kolme ominaisuuksiltaan tunnettua ATCC- kontrollikantaa ja testataan, miten nielurisoiden normaaliflooran mukanaolo vaikuttaa seitsemän A-ryhmän streptokokkikannan säilyvyyteen ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputkessa.

Tutkimuskysymykset

1. Miten näytteiden säilytyslämpötila vaikuttaa streptokokkien säilyvyyteen nestekuljetusputkessa?
2. Miten viljelyn tuloksiin vaikuttaa näytteen säilytysaika nestekuljetusputkessa ennen viljelyä?
3. Miten nielurisoiden normaaliflooran mukanaolo vaikuttaa näytteen säilyvyyteen nestekuljetusputkessa?

ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputkesta on viime vuosien aikana tehty paljon tutkimuksia. Omaan aiheeseemme liittyviä tutkimuksia ei kuitenkaan juuri löytynyt, vaan tutkimukset joissa aineistona oli käytetty streptokokkeja, käsitelivät useimmiten erilaisten näyt-

teenottotikkujen vertailua tai eri kuljetusaineiden vertailua. Yhden tutkimuksen löysimme aiheeseemme liittyen, jossa tutkittiin A-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin säilyvyyttä ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputkessa.

Koska emme löytäneet streptokokkien säilyvyytutkimuksia, käsittelemme työssämme tutkimuksia, joissa on tutkittu muidenkin mikro-organismien kuin streptokokkien säilyvyyttä ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputkessa. Omaan aiheeseemme liittyvien tutkimusten löytäminen saattoi olla hankalaa siitä syystä, että ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputki on melko uusi tuote ja jotkin siihen liittyvät tutkimukset saattavat jäädä vain valmistajan tietoon.

Tutkimuksessa, jossa oli tutkittu A-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin säilyvyyttä kuljetusputkissa, A-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin (*S.pyogenes*) havaittiin säilyvän ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputkessa hyvin. Nestekuljetusputkea säilytettiin jääkaappilämpötilassa (+4 ° C) ja huoneenlämmössä ja näytettä viljeltiin 0, 6, 24 ja 48 tunnin kuluttua näytteenotosta. *S.pyogenes* kasvoi lampaanverimaljalla jokaisen viljelyn jälkeen eikä merkittäviä eroja havaittu. Nestekuljetusputken säilytyslämpötila ei vaikuttanut viljelyn tuloksiin merkittävästi. (Van Horn – Audette – Sebeck – Tuckert 2008: 1655- 1658.)

Toisessa tutkimuksessa ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputkissa ja geelimäistä kuljetusainetta sisältävissä kuljetusputkissa säilytettiin kolme mikro-organismia (*E. coli*, *C. albicans* ja *S. agalactiae*), joiden säilyvyyttä tutkittiin sekä huoneenlämmössä, että jääkaappilämpötilassa 0, 6, 24 ja 48 tunnin kuluttua näytteenotosta tekemällä näytteistä viljelyt Columbia-verimaljalle. Huoneenlämmössä säilytetyistä 0 ja kuuden tunnin jälkeen näytteenotosta otetuissa viljelyissä tulokset olivat paremmat ESwab<sup>®</sup>- kuljetusputkesta tehdyissä viljelyissä kuin geelikuljetusputkista tehdyissä viljelyissä. Huoneenlämmössä *E. coli* ja *C. albicans* alkoivat lisääntyä nopeammin kuuden tunnin kasvatuksen jälkeen molemmissa kuljetusputkissa. *S. agalactiaen* lisääntyminen säilyi koko ajan samana. Jääkaappilämpötilassa säilytetyissä näytteissä *E. colin* ja *C. albicansin* nopeaa lisääntymistä ei havaittu missään vaiheessa tutkimusta ja ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputken todettiin soveltuvan mikro-organismien säilytykseen paremmin kuin geelikuljetusputken. (Nys – Vijgen – Magerman – Cartuyvels 2010: 453-456.)

Pohjois-Karjalan Ammattikorkeakoulussa tehdyssä opinnäytetyössä tutkittiin yleisimpien bakteeriripulin aiheuttajien säilyvyyttä kahdessa eri kuljetusputkessa, joista toinen oli Copanin FecalSwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputki, joka kuuluu samaan Liquid Based Microbiology (LBM) tuoteperheeseen kuin ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputki. Tutkimusaineistona käytettiin puhtasviljeltyjä ATCC-bakteerikantoja, joita säilytettiin jääkaappilämpötilassa kuljetusputkissa 72 tuntia. Näytteistä tehtiin laimennossarjat 0, 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua niiden siirtämisestä kuljetusputkeen. Laimennosten teon jälkeen näytteet viljeltiin elatusainemaljoille ja maljoja inkuboitiin kullekin bakteerilajille otollisimmassa lämpötilassa 24 tai 48 tuntia jonka jälkeen bakteeripesäkkeet laskettiin elatusainemaljoilta. Yleisimpien bakteeriripulin aiheuttajien havaittiin säilyvän FecalSwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputkessa hyvin 72 tuntia ja näin ollen putkea voidaan suositella bakteeriripulin aiheuttajien kuljetusputkeksi. Tutkimuksen tulokset ovat kuitenkin suuntaa antavia, sillä tutkittavat näytteet eivät sisältäneet ulosteen normaaliflooraa, vaan tutkimus tehtiin puhtasviljellyistä bakteerilajeista. (Forsman 2011.)

## **7 Työn suorittaminen**

Suoritimme opinnäytetyömme käytännön osuuden HUSLABin bakteriologian osastolla tammi-helmikuussa 2012. Tulosten analysointi tapahtui maaliskuussa 2012. Ennen käytännön osuuden suorittamista olimme harjoittelussa HUSLABin bakteriologian osaston nieluviiljelypisteessä, jossa harjoittelimme maljojen lukemista sekä opettelimme käyttämään WASP<sup>®</sup> - viljelyautomaattia.

Opinnäytetyömme näyttemateriaalina käytettiin beetahemolyttisiä streptokokkikantoja. Streptokokkikannat saatiin positiivisista analysoiduista nieluviiljelyistä poimimalla maljoilta pesäkkeitä ja tekemällä niistä puhtasviljelmät verimaljoille. Streptokokit tunnistettiin A-, C- tai G-ryhmän beetahemolyttisiksi streptokokeiksi niiden aiheuttaman beetahemolyysin avulla, sekä tekemällä tunnistustesti OXOIDin Streptococcus grouping kit-menelmällä. A-ryhmän beetahemolyttisiä streptokokkeja viljeltiin 20 kantaa ja C- ja G-ryhmän beetahemolyttisiä streptokokkeja viljeltiin 10 kantaa kumpaakin. Näiden lisäksi viljeltiin kolme ominaisuuksiltaan tunnettua ATCC- kantaa, sekä seitsemää A-ryhmän beetahemolyttistä streptokokkia sisältävää näytettä tutkittiin niin, että putkessa oli mukana myös nielurisojen normaaliflooraa. Nielurisojen normaaliflooran vaikutus-

ta streptokokkien säilyvyyteen tutkittiin, sillä oikeassa potilasnäytteessä on nielurisojen normaalifloora aina mukana ja näin ollen tilanne vastasi todellista näytettä.

Jokaisesta bakteerista tehtiin MacFarland 0,5 vahvuinen bakteerisuspensio jota laimentamalla saatiin sopivan vahvuinen laimennos, josta viljelyn jälkeen maljalla kasvoi yksittäispesäkkeitä jotka olivat helposti luettavissa. Kun bakteerisuspensiota oli laimennettu riittävästi, laimennosta siirrettiin ESwab<sup>®</sup> - nestekuljetusputkeen josta tehtiin viljelyt.

Näytteet viljeltiin 0, 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua streptokokkien siirtämisestä ESwab<sup>®</sup>-nestekuljetusputkeen rinnakkaisina (sekä huoneenlämmössä että jääkaappilämpötilassa säilytetyistä). Viljely tehtiin WASP<sup>®</sup> - viljelyautomaatilla. Näytteet viljeltiin CO-maljoille nelikenttähajotuksena. HUSLABin Bakteriologialla nelikenttähajotus on validoitu viljelytekniikka ja näin ollen heillä käytössä, joten myös me teimme viljelyn käytännön työsämme nelikenttähajotuksena. Viljelyn jälkeen maljat siirrettiin hiilidioksidinkubaattoriin kasvamaan vuorokauden ajaksi. Kasvatuksen jälkeen maljat luettiin laskekemalla pesäkemäärät jokaiselta maljalta. Pesäkemäärät kirjattiin lukemisen yhteydessä taulukkoon (Liite 1).

Ennen käytännön osuuden suorittamista teimme esitestauksen, jonka avulla varmistuimme siitä, että kaikki työn vaiheet on suunniteltu oikein eikä työn aikana ilmene yllättäviä asioita. Teimme esitestauksen kahdella eri kannalla, joista toinen oli A-ryhmän beetahemolyyttistä streptokokkia ja toinen G-ryhmän beetahemolyyttistä streptokokkia. Kävimme opinnäytetyömme käytännön osuuden läpi vaihe vaiheelta ja esitestauksen onnistuttua aloitimme käytännön osuuden suorittamisen.

## **8 Tulokset**

Opinnäytetyömme suoritettiin kvantitatiivisena tutkimuksena, jolla saadaan vastauksia kysymyksiin mikä, missä, paljonko tai kuinka usein. Kvantitatiivista eli määrällistä tutkimusta kutsutaan myös tilastolliseksi tutkimukseksi. Tutkimuksella saadaan vastauksia lukumääriin ja prosenttiosuuksiin liittyviin kysymyksiin. Tutkittavat asiat kuvataan numeristen suureiden avulla ja tuloksia havainnoidaan taulukoin ja numeroin tai sopivin kuvioin. Tyypillistä kvantitatiiviselle tutkimukselle on selvittää eri asioiden keskeistä riippuvuutta tai asioiden mahdollista muuttumista. (Heikkilä 2008: 16-19.)

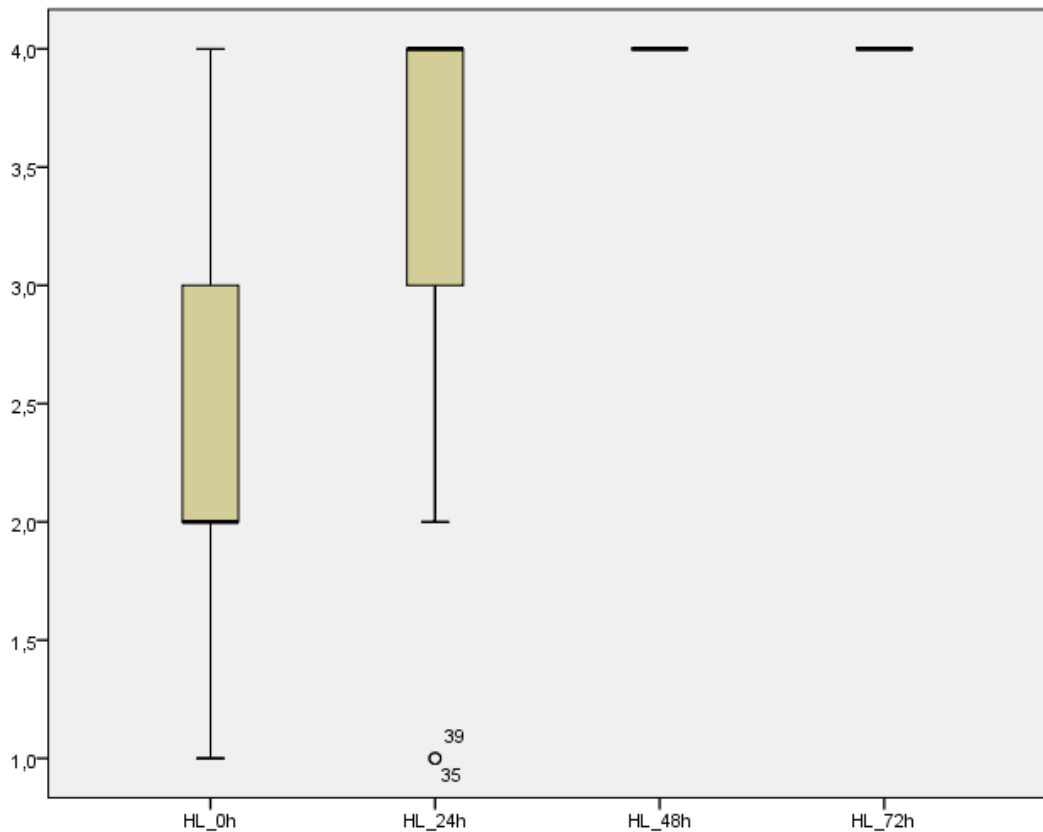
Tutkimuksen suorittamisen aikana näytteistä saadut viljelytulokset kirjattiin taulukkoon pesäkemäärinä maljojen luvun yhteydessä jokaisessa aikapisteessä (Liite 1). Koska moni näyte rikastui putkessa ja yksittäisten pesäkemäärien lukeminen maljoilta kävi mahdottomaksi, kirjasimme pesäkemäärät vain sataan pesäkkeeseen asti, jonka jälkeen merkitsimme maljat >100. Tilasto-ohjelmilla tämän kaltaisia tuloksia ei voida analysoida, joten jaoimme maljat ryhmiin 0-4 pesäkemäärien mukaan ja kirjasimme ryhmät uuteen taulukkoon (Liite 2). Ryhmään 0 kuuluvissa maljoissa ei kasvanut yhtään pesäkettä. Ryhmään 1 kuuluvissa maljoissa pesäkkeitä oli 1-30, ryhmään 2 kuuluvissa maljoissa 31-60, ryhmään 3 kuuluvissa maljoissa 61-100 ja ryhmään 4 laskettiin ne maljat, joilla oli yli 100 pesäkettä. Näin tulosten analysointi tilastonkäsittelyohjelmalla saatiin helpommaksi.

Tulokset A-, C- ja G-ryhmän beetahemolyyttisten streptokokkien säilyvyydestä neste-mäisessä kuljetusaineessa analysoitiin PASW18-tilasto-ohjelman avulla. Ohjelman avulla sai helposti selville missä tutkittavista aikapisteistä näytteissä oleva bakteerimäärä kasvaa tai vähenee huomattavasti sekä lämpötilan vaikutuksen viljelytuloksiin. Ohjelmalla saatiin selville myös maljojen muuttujien tilastollinen merkitys. Tulokset käsiteltiin Wilcoxon-järjestystestin avulla. Wilcoxon-järjestystesti etsii eroja kahden toisistaan riippuvan muuttujan välillä. (Field 2009: 796.)

Laatikko-janakuvion avulla saadaan yleiskuva muuttujien jakaumasta ja siitä miten jakaumat muuttuvat eri aikapisteiden välillä. Myös muuttujien hajonta tulee laatikko-janakuviossa hyvin esiin. (Karhunen – Rasi – Lepola – Muhli – Kanninen 2011: 42-43.) Laatikkojanakuviossa jana kertoo tulosten hajonnasta eli janan päät merkitsevät minimiä ja maksimia. Alakvartaali merkitsee laatikon alareunaa ja sen alle sijoittuu korkeintaan 25% tuloksista. Yläkvartaali merkitsee laatikon yläreunaa ja sen alle sijoittuu korkeintaan 75% tuloksista. Laatikon sisään sijoittuu 50% tuloksista. Jos laatikko ja jana puuttuvat kuviosta kokonaan, merkitsee se sitä että kaikki tulokset sijoittuvat kuviossa näkyvän tumman viivan merkitsemään kohtaan. (Leppälä 2006.) Janan ulkopuolelle sijoittuvat, muusta ryhmästä poikkeavat tulokset näkyvät kuviossa tähti- tai rengas-symbolina (Graafinen esitys 2004). Tulokset on esitetty työssä laatikko-janakuvioiden avulla.

### 8.1 A-, C- ja G-ryhmän streptokokkikannat huoneenlämmössä

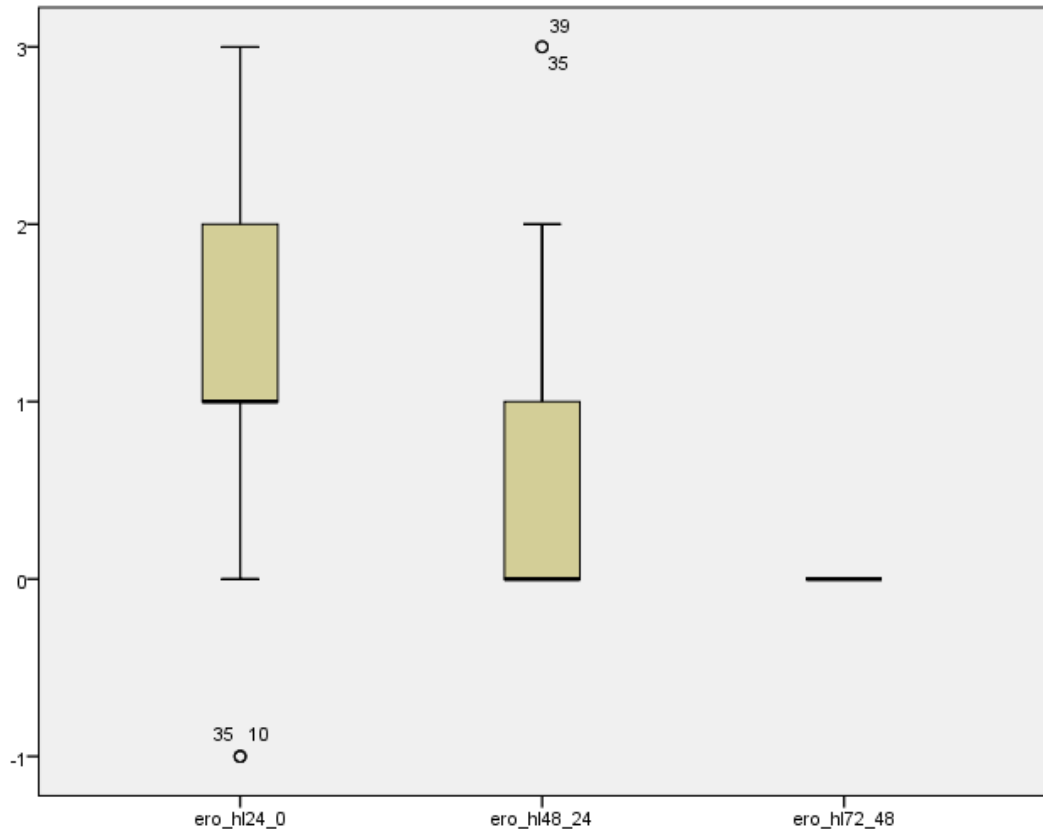
Kuviosta 3 käy ilmi A-, C- ja G-ryhmän streptokokkeja sisältävien näytteiden viljelytulokset eri aikapisteissä, kun näytettä on säilytetty huoneenlämpötilassa. Kuviossa 4 näkyy eri aikapisteiden välillä tapahtuneet erot.



Kuvio 3. A-, C- ja G-ryhmän streptokokkien viljelytulokset huoneenlämpötilassa

0h aikapisteessä näkyy, paljonko nestekuljetusputkissa on ollut bakteeria lähtötilanteessa. Vaihteluväli on ollut ryhmästä 1 ryhmään 4. Suurin osa tutkittavista tuloksista sijoittui ryhmiin 2 (20kpl) ja 3 (15kpl). Vain viisi tulosta sijoittui ryhmiin 1 (3kpl) tai 4 (2kpl).

24h aikapisteessä ryhmään 4 sijoittui 29 kappaletta tutkittavista tuloksista. Ryhmään 3 sijoittui neljä kappaletta ja ryhmään 2 viisi kappaletta. Ryhmään 1 sijoittui vain 2 tulosta. 48h aikapisteessä kaikki tulokset (40 kpl) sijoituivat ryhmään 4, kuten myös 72h aikapisteessä.



Kuvio 4. A-, C- ja G-ryhmän streptokokkien säilyvyydessä aikapisteiden välillä tapahtuneet erot huoneenlämmössä

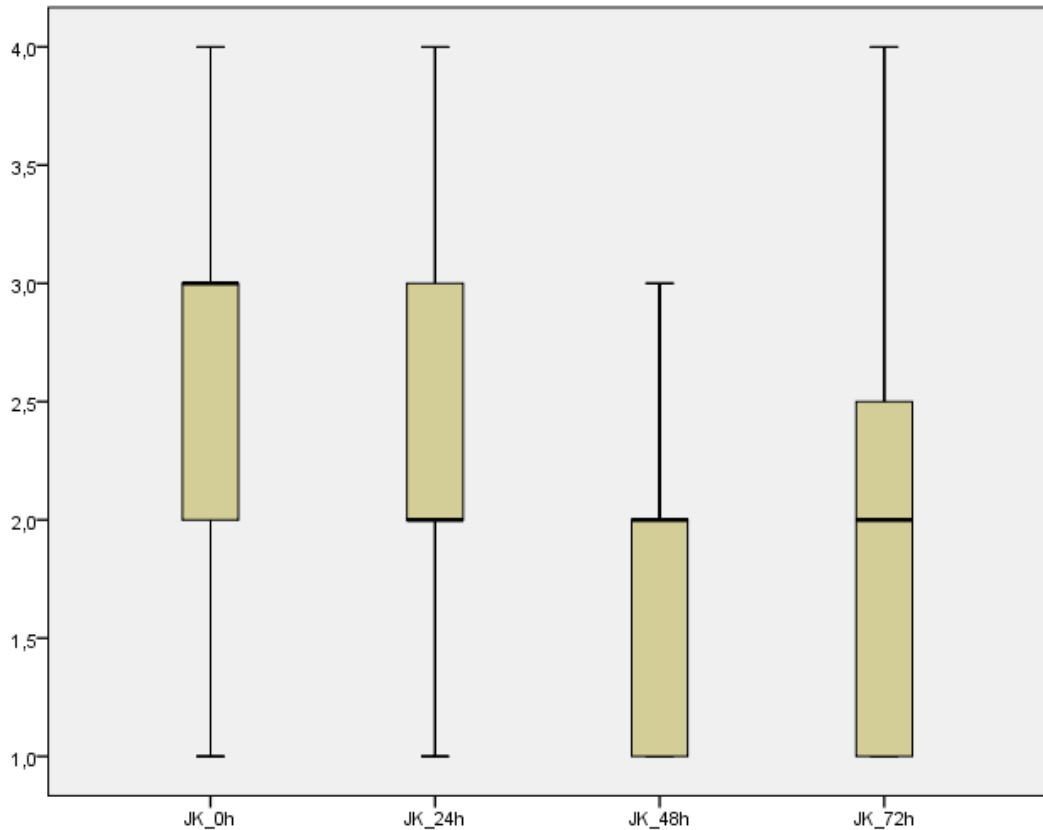
0h ja 24h aikapisteiden välillä kasvua tapahtui 31 kappaleessa tutkittavista näytteistä. Laskua tapahtui kolmessa näytteessä ja bakteerimäärä pysyi samana kuudessa näytteessä. Keskimääräinen ero 24h aikapisteessä 0h aikapisteeseen verrattuna oli 1,1 eli kasvua tai vähenemistä pesäkemäärissä tapahtui noin yhden ryhmän verran. Suurin tapahtunut ero oli kuitenkin +3, eli näytteen ryhmä muuttui aikavälillä 0h-24h ryhmästä 1 ryhmään 4.

24h ja 48h aikapisteiden välillä kasvua tapahtui 11 näytteessä ja 29 näytteen viljelytulokset pysyivät 48 tunnin viljelyssä samassa ryhmässä kuin edellisessä aikapisteessä. Keskimäärin ryhmä muuttui 0,5 ryhmän verran, mutta kahdessa tapauksessa ero 24 ja 48 tunnin viljelyiden välillä oli jopa +3, eli pesäkemäärä kasvoi huomattavasti.

48h ja 72h aikapisteiden välillä muutosta ei tapahtunut yhdessäkään näytteessä, vaan kaikki pysyivät ryhmässä 4.

## 8.2 A-, C- ja G-ryhmän streptokokkikannat jääkaappilämpötilassa

Kuviosta 5 käy ilmi A-, C- ja G-ryhmän streptokokkeja sisältävien näytteiden viljelytulokset eri aikapisteissä, kun näytettä on säilytetty jääkaappilämpötilassa. Kuviossa 6 näkyy eri aikapisteiden välillä tapahtuneet erot.



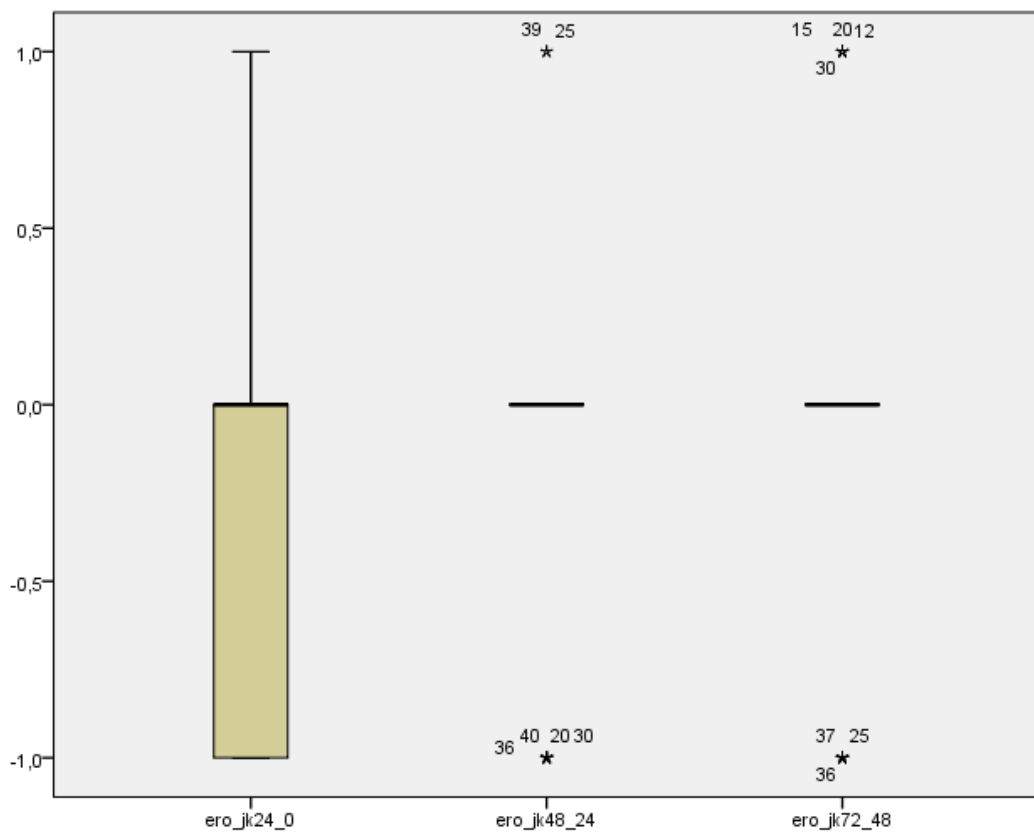
Kuvio 5. A-, C- ja G-ryhmän streptokokkien viljelytulokset jääkaappilämpötilassa

0h aikapisteessä vaihteluväli oli ryhmästä 1 ryhmään 4. 0h aikapisteessä ryhmään 1 sijoittui kuusi näytettä, ryhmään 2 sijoittui 13 näytettä, ryhmään 3 sijoittui 19 näytettä ja ryhmään 4 kaksi näytettä.

24h aikapisteessä ryhmään 2 sijoittui 20 näytettä. Vaihteluväli oli ryhmästä 1 ryhmään 4. Ryhmään 1 sijoittui yhdeksän näytettä, ryhmään 3 kymmenen näytettä ja ryhmään 4 yksi näyte.

48h aikapisteessä ryhmään 2 sijoittui 19 näytettä. 48h aikapisteessä vaihteluväli oli ryhmästä 1 ryhmään 3, eli yhdelläkään maljalla ei kasvanut yli sataa pesäkettä. Ryhmään 1 sijoittui 12 näytettä ja ryhmään 3 yhdeksän näytettä.

72h aikapisteessä ryhmään 2 sijoittui 13 näytettä. Ryhmään 1 sijoittui 17 näytettä, ryhmään 3 yhdeksän näytettä ja ryhmään 4 yksi näyte. Vaihteluväli oli siis ryhmästä 1 ryhmään 4.



Kuvio 6. A-, C- ja G-ryhmän streptokokkien säilyvyydessä aikapisteiden välillä tapahtuneet erot jääkaappilämpötilassa

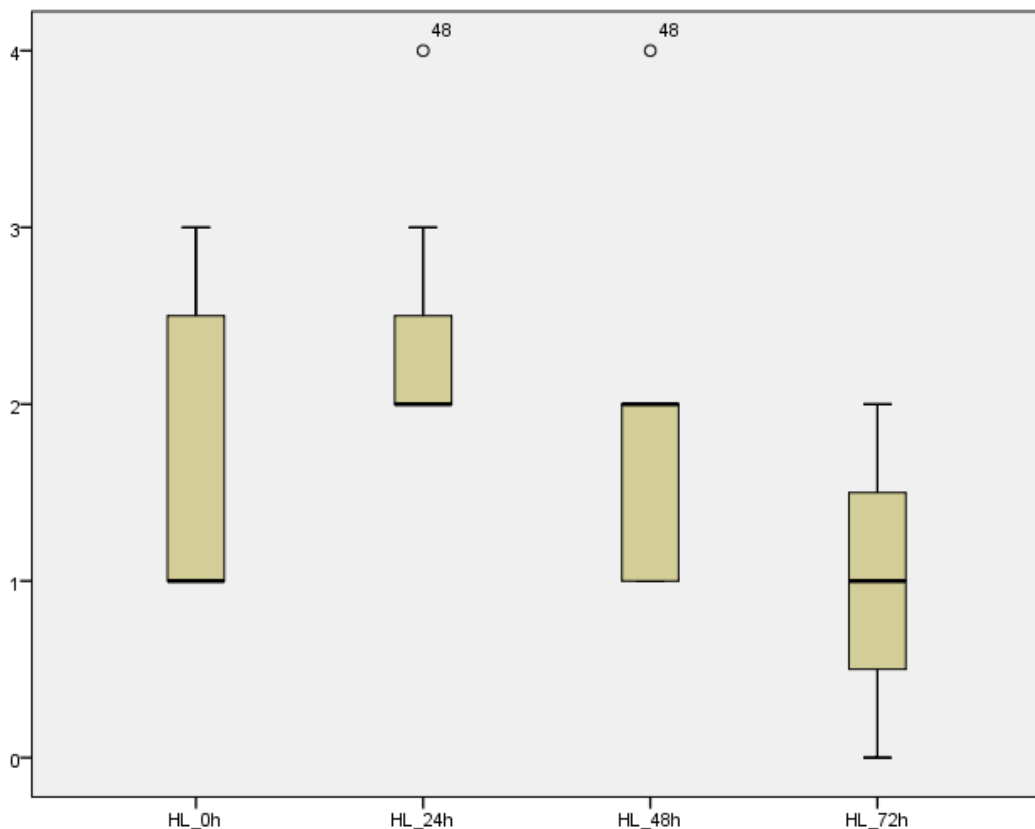
Jääkaappilämpötilassa kasvua 0h ja 24h aikapisteiden välillä tapahtui yhdessä näytteessä. Vähenemistä tapahtui 15 näytteessä ja bakteerimäärä pysyi samana 24 näytteessä. Enimmillään näytteestä saatu viljelytulos eli pesäkemäärä maljalla väheni tai kasvoi sen verran, että ryhmä nousi tai väheni yhdellä.

24h ja 48h aikapisteiden välillä kasvua tapahtui kahdessa näytteessä. Vähenemistä tapahtui kahdeksassa näytteessä ja bakteerimäärä pysyi samana 30 näytteessä. 24h ja 48h aikapisteiden välillä kasvua tai vähenemistä tapahtui enimmillään yhden ryhmän verran.

48h ja 72h aikapisteiden välillä kasvua tapahtui kuudessa näytteessä. Vähenemistä tapahtui yhdeksässä näytteessä ja bakteerimäärä pysyi samana 25 näytteessä. Kasvua tai vähenemistä tapahtui enimmillään yhden ryhmän verran.

### 8.3 Nielurisojen normaaliflooraa sisältävät näytteet huoneenlämmössä

Kuviosta 7 käy ilmi nielurisojen normaaliflooraa sisältävien näytteiden viljelytulokset eri aikapisteissä, kun näytettä on säilytetty huoneenlämmössä. Kuviossa 8 näkyy eri aikapisteiden välillä tapahtuneet erot.



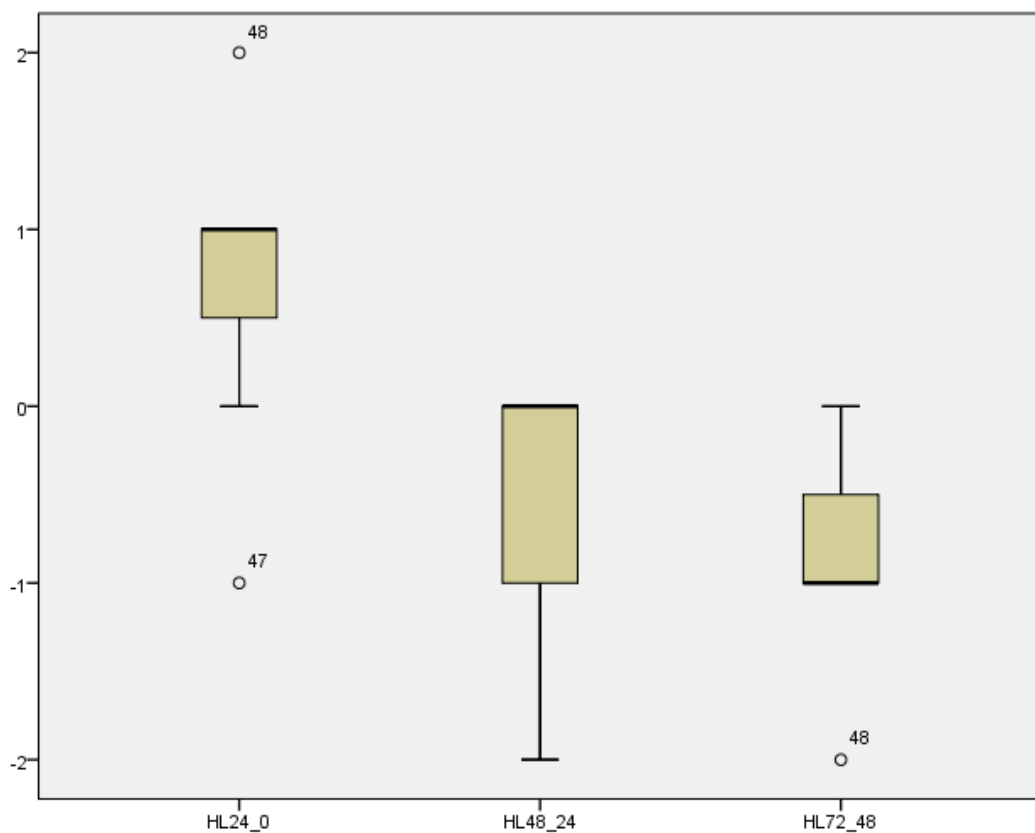
Kuvio 7. Nielurisojen normaaliflooraa sisältävien näytteiden viljelytulokset huoneenlämpötilassa

Vaihteluväli 0h aikapisteessä on ryhmästä 1 ryhmään 3. Ryhmään 1 sijoittui neljä näytettä. Ryhmään 2 sijoittui yksi näyte ja ryhmään 3 kaksi näytettä.

24h aikapisteessä vaihteluväli oli ryhmästä 2 ryhmään 4. Ryhmään 2 sijoittui viisi näytettä. Ryhmään kolme sijoittui yksi näyte ja ryhmään 4 yksi näyte.

48h aikapisteessä vaihteluväli oli ryhmästä 1 ryhmään 4. Ryhmään 2 sijoittui kolme näytettä. Ryhmään 1 sijoittui kolme näytettä ja ryhmään 4 sijoittui yksi näyte.

72h aikapisteessä vaihteluväli oli ryhmästä 0 ryhmään 2. Ryhmään 0 sijoittui kaksi näytettä, ryhmään 1 kolme näytettä ja ryhmään 2 sijoittui kaksi näytettä.



Kuvio 8. Nielurisojen normaaliflooraa sisältävien näytteiden säilyvyyden muutos eri aikapisteiden välillä huoneenlämmössä

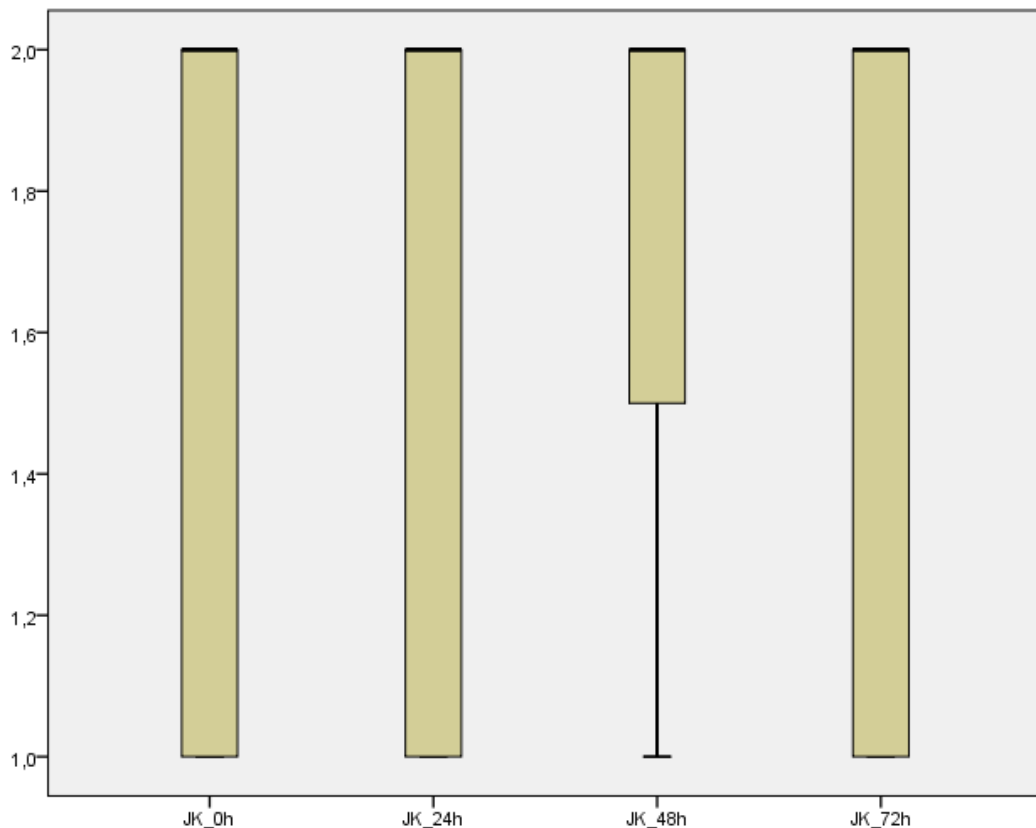
Aikapisteiden 0h ja 24h välillä vähenemistä tapahtui enimmillään yhden ryhmän verran, kun taas kasvua tapahtui enimmillään kahden ryhmän verran. Kasvua tapahtui viidessä näytteessä, vähenemistä yhdessä näytteessä ja bakteerimäärä pysyi samana yhdessä näytteessä.

24h ja 48h aikapisteiden välillä vähenemistä tapahtui enimmillään kahden ryhmän verran, kasvua ei tapahtunut. Vähenemistä tapahtui kolmessa näytteessä ja bakteerimäärä pysyi samana neljässä näytteessä.

48h ja 72h aikapisteiden välillä vähenemistä tapahtui enimmillään kahden ryhmän verran, kasvua ei tapahtunut. Vähenemistä tapahtui viidessä näytteessä, kahdessa näytteessä bakteerimäärä pysyi samana.

#### 8.4 Nielurisojen normaaliflooraa sisältävät näytteet jääkaappilämpötilassa

Kuviosta 9 käy ilmi nielurisojen normaaliflooraa sisältävien näytteiden viljelytulokset eri aikapisteissä, kun näytettä on säilytetty jääkaappilämpötilassa. Kuviossa 10 näkyy eri aikapisteiden välillä tapahtuneet erot.



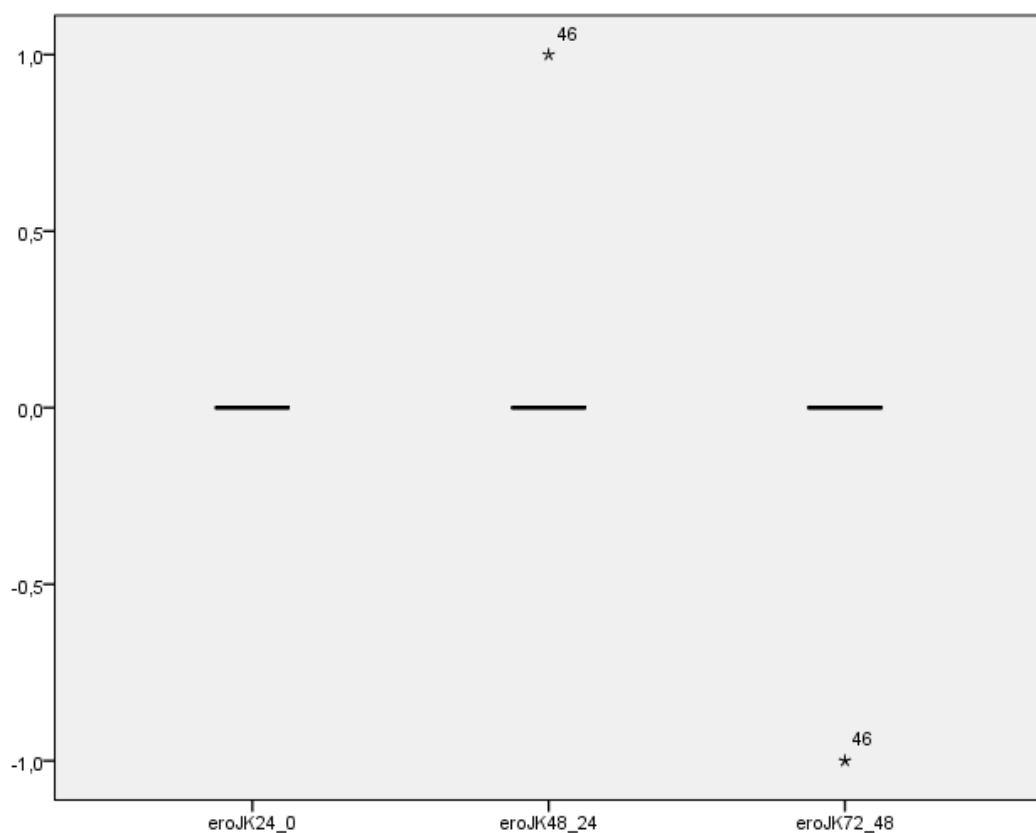
Kuvio 9. Nielurisojen normaaliflooraa sisältävien näytteiden viljelytulokset jääkaappilämpötilassa

Aikapisteessä 0h vaihteluväli oli ryhmästä 1 ryhmään 2. Ryhmään 2 sijoittui neljä näytettä. Ryhmään 1 sijoittui kolme näytettä.

24h aikapisteessä vaihteluväli oli ryhmästä 1 ryhmään 2. Ryhmään 2 sijoittui neljä näytettä ja ryhmään 1 sijoittui kolme näytettä.

48h aikapisteessä vaihteluväli oli ryhmästä 1 ryhmään 2. Ryhmään 2 sijoittui viisi näytettä ja ryhmään 1 sijoittui 2 näytettä.

72h aikapisteessä vaihteluväli oli ryhmästä 1 ryhmään 2. Ryhmään 2 sijoittui neljä näytettä ja ryhmään 1 sijoittui kolme näytettä.



Kuvio 10. Nielurisojen normaaliflooraa sisältävien näytteiden säilyvyyden muutos eri aikapisteiden välillä jääkaappilämpötilassa

0h ja 24h aikapisteiden välillä vähenemistä tai kasvua ei ollut tapahtunut yhdessäkään näytteessä.

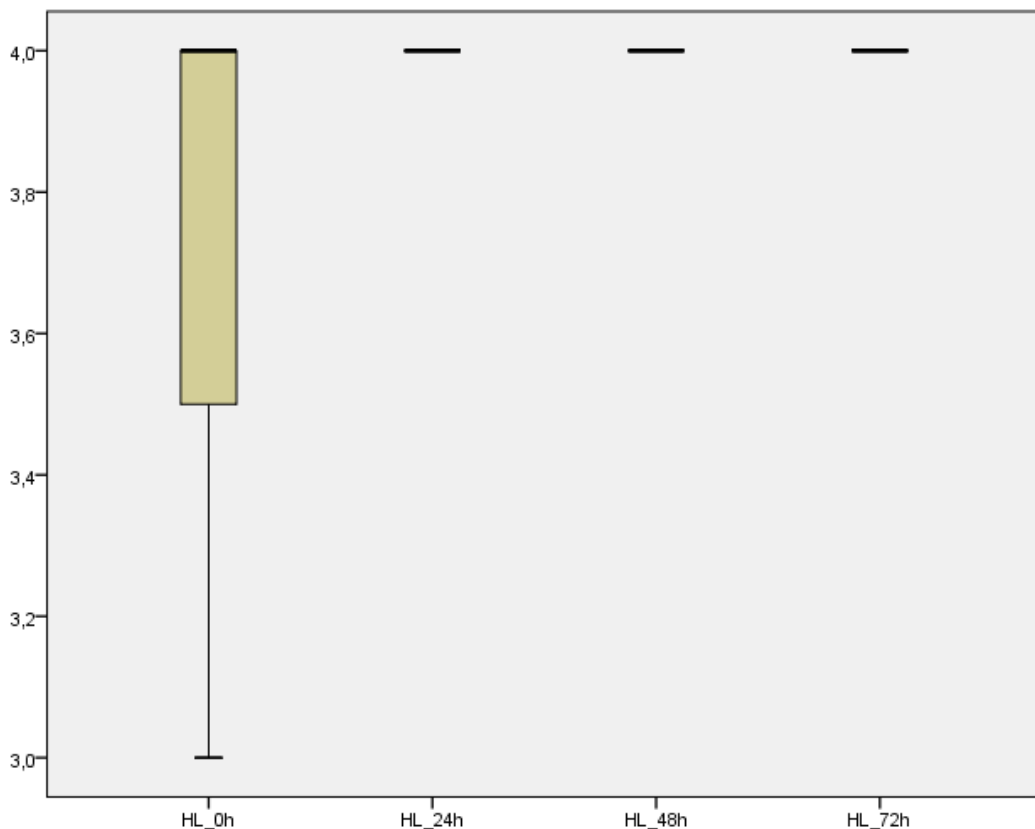
24h ja 48h aikapisteiden välillä kasvua tapahtui enimmillään yhden ryhmän verran, vähenemistä ei tapahtunut. Bakteerimäärä pysyi samana kuudessa näytteessä, kasvua tapahtui yhdessä näytteessä.

48h ja 72h aikapisteiden välillä vähenemistä tapahtui enimmillään yhden ryhmän verran, kasvua ei tapahtunut. Bakteerimäärä pysyi samana kuudessa näytteessä, vähenemistä tapahtui yhdessä näytteessä.

### 8.5 ATCC- kantojen viljelytulokset

Kuviosta 11 käy ilmi ATCC-kannoista saadut viljelytulokset eri aikapisteissä, kun näytettä on säilytetty huoneenlämpötilassa. 0h aikapisteessä kaksi ATCC-kantoja sisältävistä näytteistä sijoittui ryhmään 4 ja yksi sijoittui ryhmään 3.

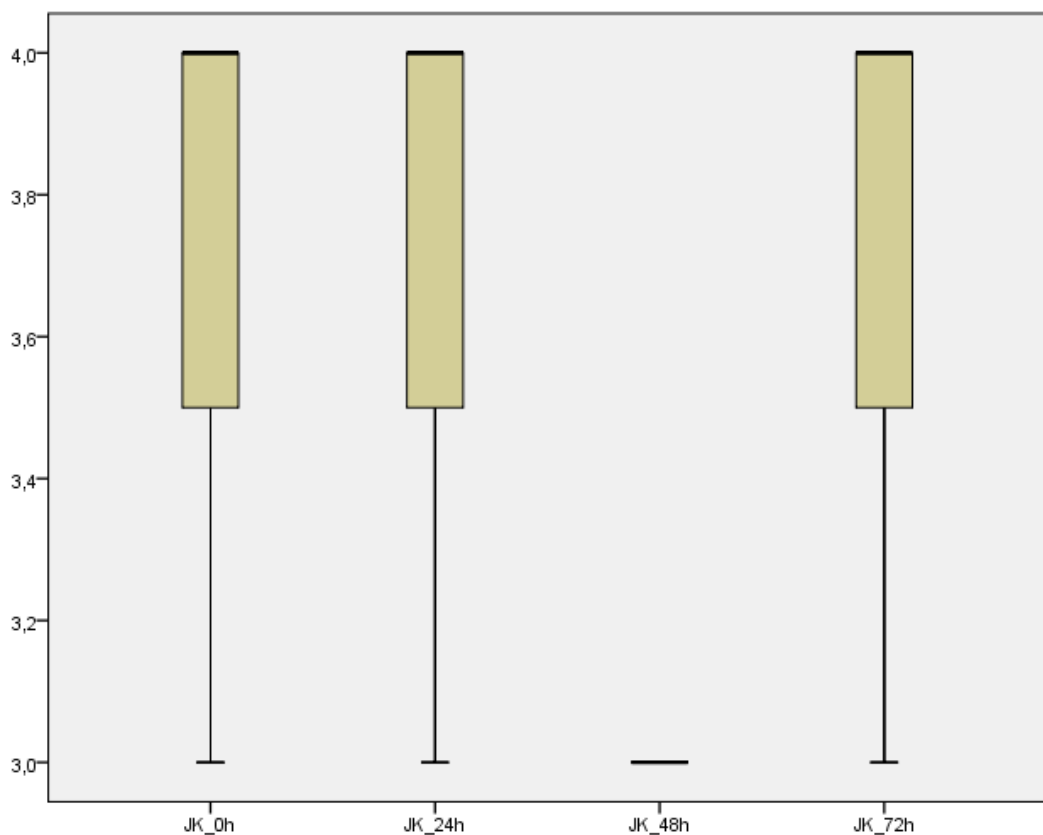
24h aikapisteessä kaikki näytteet sijoituivat ryhmään 4. Tilanne ei muuttunut 48h ja 72h aikapisteissä, vaan kaikki näytteet sijoituivat ryhmään 4.



Kuvio 11. ATCC- kantojen viljelytulokset huoneenlämmössä

Kuviosta 12 käy ilmi ATCC-kantoja sisältävien näytteiden viljelytulokset eri aikapisteissä, kun näytteitä on säilytetty jääkaappilämpötilassa. 0h aikapisteessä kaksi ATCC-kantoja sisältävistä näytteistä sijoittuu ryhmään 4, yksi näyte sijoittuu ryhmään 3.

24h aikapisteessä tilanne pysyy samana 0h aikapisteeseen verrattuna. 48h aikapisteessä kaikki kolme näytettä sijoittuvat ryhmään 3, eli vähenemistä tapahtuu kahdella näytteellä yhden ryhmän verran. 72h aikapisteessä kaikki näytteet sijoittuvat taas samoihin ryhmiin kuin 0h ja 24h aikapisteissä, eli kaksi näytettä ryhmään 4 ja yksi näyte ryhmään 3.



Kuvio 12. ATCC-kantojen viljelytulokset jääkaappilämpötilassa

## 8.6 Yhteenveto tuloksista

Nielurisoista eristetyt A-, C- ja G-ryhmän streptokokit rikastuivat huoneenlämmössä ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputkessa. 0h ja 24h aikapisteiden välillä kasvu oli huomattavaa ja pesäkkeiden määrä maljalla saattoi olla jopa nelinkertainen aikaisempaan viljelytulokseen verrattuna. 24h ja 48h välillä rikastumista tapahtui yhä huomattavasti. 48h ja

72h aikapisteiden välillä kasvua ei taulukosta näe, sillä kaikki maljat joilla kasvoi yli 100 pesäkettä laskettiin ryhmään 4. Rikastumista on kuitenkin voinut tapahtua vielä tässäkin vaiheessa.

Jääkaappilämpötilassa nielurisoista eristetyt A-, C- ja G-ryhmän streptokokit vähenivät tai kasvoivat kaikkien aikapisteiden välillä korkeintaan sen verran, että pesäkemäärät kirjattiin yhtä pienempään tai yhtä suurempaan ryhmään kuin aikaisemmista viljelyistä saadut tulokset. Vaikka ero oli 0h ja 24h aikapisteiden välillä tilastollisesti merkitsevä, ei eroa pidetty merkitsevänä työssämme kasvun tai vähenemisen ollessa suhteellisen vähäistä. Suurimmaksi osaksi näytteet säilyivät jääkaappilämpötilassa hyvin, eikä rikastumista tapahtunut.

Nielurisojen normaaliflooraa sisältävien näytteiden bakteerimäärä kasvoi ensimmäisen vuorokauden aikana viidessä näytteessä huoneenlämmössä, mutta tämän jälkeen kasvua ei enää tapahtunut. 48h aikapisteen viljelytuloksissa vähenemistä tapahtui kolmessa näytteessä ja 72h aikapisteessä vähenemistä tapahtui edelleen viidessä näytteessä. Kahden näytteen kohdalla 72h viljelytulokset olivat negatiivisia, vaikka bakteeripesäkeitä oli aiemmissa aikapisteissä molemmista näytteistä maljoilla kasvanut. Bakteerimäärän vähenemistä tapahtui kaikilla, paitsi yhdellä näytteellä, jossa tulokset pysyivät samana.

Jääkaappilämpötilassa säilytetyt nielurisojen normaaliflooraa sisältävät näytteet säilyivät koko tutkimuksen ajan hyvin, eikä rikastumista tapahtunut. Yhden näytteen viljelytulokset nousivat ryhmästä 1 ryhmään 2 48h viljelyssä, muuten näytteistä saadut viljelytulokset pysyivät samoissa ryhmissä koko tutkimuksen ajan.

Kahdesta huoneenlämmössä säilytetystä ATCC-kannasta saatiin jo ensimmäisessä viljelyssä niin paljon pesäkkeitä, ettei niitä ollut mahdollista laskea maljoilta. Kolmas ATCC-kantaa sisältävä näyte sijoittui ensimmäisessä viljelyssä ryhmään 3, mutta nousi 24h viljelyssä jo ryhmään 4. Kaikki näytteet säilyivät ryhmässä 4 tutkimuksen loppuun asti, eikä niiden rikastumisesta näin ollen voida olla varmoja.

Jääkaappilämpötilassa kaksi ATCC-kantaa sisältävää näytettä sijoittui jo alkutilanteessa ryhmään 4, jossa ne pysyivät myös 24h viljelytuloksissa. 48h viljelyn tuloksissa mo-

lemmat näytteet sijoittuivat ryhmään 3, mutta viimeisessä viljelyssä pesäkkeitä oli taas niin paljon, että näytteet sijoittuivat ryhmään 4. Kolmas ATCC-kantaa sisältävä näyte pysyi tutkimuksen alusta loppuun ryhmässä 3.

## **9 Luotettavuus, toistettavuus ja eettisyys**

Tutkimusta voidaan sanoa hyväksi ja laadulliseksi tutkimukseksi mikäli tutkimuksen avulla saadaan luotettavat vastaukset tutkimuskysymyksiin. Muita kriteereitä laadukkaalle kvantitatiiviselle tutkimukselle on validiteetti, eli tutkimuksen on mitattava sitä, mitä oli tarkoitus selvittää. Tämä edellyttää tarkkoja tavoitteita tutkimukselle, muuten tutkitaan helposti väärä asioita. Reliabiliteetti, eli luotettavuus täytyy myös huomioida. Tämä tarkoittaa, etteivät tutkimuksen tulokset saa olla sattumanvaraisia. Tutkimuksen täytyy antaa toistuvia tuloksia ja tekijän tulee olla tarkka ja kriittinen. (Heikkilä 2008: 29-32.)

Objektiivisuus eli puolueettomuus on myös tärkeää, eli tutkija ei saa antaa omien mielipiteiden vaikuttaa tutkimusprosessiin. Hyvä tutkimus on myös tehokas ja taloudellinen, tämä käy toteen parhaiten silloin kun tutkimuksen hyöty ja kustannukset ovat oikeassa suhteessa. Tietosuoja on tärkeä ottaa huomioon tutkimusta tehdessä ja tuloksia raportoidessa. Tietosuojalla tarkoitetaan, ettei kenenkään yksityisyyttä tai ammatillisuutta vaaranneta. Tärkeintä tutkimuksessa on sen hyödyllisyys ja käyttökelpoisuus niin, että tutkimuksen avulla saadaan selville jotakin uutta ja relevanttia. (Heikkilä 2008: 29-32.)

Työn avulla saatiin vastaukset ennalta määriteltyihin tutkimuskysymyksiin. Työn tavoitteet oli määritelty tarkasti ja työelämäohjaajan kanssa pidetyissä tapaamisissa varmistettiin, että tutkitut asiat olivat oikeita. Työn luotettavuuteen vaikuttaa näytteiden pieni määrä. Näytemäärän ollessa näin suppea työn tuloksia voidaan pitää ainoastaan suuntaa antavina, sillä on mahdollista, että tulokset ovat sattumanvaraisia. Suuremman näytemäärän kanssa sattuman mahdollisuus voitaisiin sulkea pois näytteistä saatavien tulosten ollessa samansuuntaisia.

Työ tehtiin positiivisina vastatuista potilasnäytteistä, mikä oli tärkeää jotta saatiin tietoa nimenomaan HUSin alueen streptokokkikantojen säilyvyydestä. Työtä tehdessämme

emme missään vaiheessa nähneet potilastietoja, vaan positiivisina vastatuista potilasnäytteistä tehtiin meitä varten puhtasviljelmät, joista oli poistettu potilastiedot ja kannat oli numeroitu. Työtä tehdessämme olimme tietoisia siis vain kannan järjestysnumerosta, emme siitä, kenestä näyte alun perin on otettu.

Mikrobiologian laboratoriossa käytössä olevien elatusaineiden korkea laatu on tärkeää tulosten luotettavuuden kannalta. Valmistusprosessia on seurattava tavoilla, joilla varmistetaan eri vaiheiden toimivuus prosessissa. Lopputuotteiden steriiliys ja toimivuus on varmistettava. (Metrologian neuvottelukunta 2006: 8.) Elatusainemaljat valmistetaan aina samalla tavalla, HUSLABin elatusaineosaston työohjeen mukaan, jolloin koostumus on samanlainen jokaisessa maljaerässä. Työohjeessa annetaan ohjeet myös asianmukaiseen säilytykseen. Jokaiselle maljaerälle tehdään valmistuksen jälkeen puhautuskontrolli, jonka avulla todetaan, ettei erä ole kontaminoitunut tekovaiheessa ympäristön bakteereilla.

Bakteerikannoista tehtiin 0,5 MacFarlandin vahvuiset laimennokset, joiden avulla pyrittiin saamaan maljoille helposti laskettavissa olevia yksittäisiä bakteeripesäkkeitä. Laimennosten vahvuus mitattiin densitometrillä, sekä silmämääräisesti verraten laimennosta 0,5 MacFarlandin vahvuiseen liuokseen. Densitometrin toimivuus tarkastettiin ennen laimennosten tekoa kahdella erivahvuisella kontrolliputkella. Näin varmistuttiin siitä, että laimennokset olivat saman vahvuisia.

Toistettavuutta tarkastelimme opinnäytetyössämme rinnakkaisten näytteiden avulla. Jokaisesta laimennoksesta siirrostettiin saman verran bakteerisuspensiota kahteen eri putkeen, joista toista säilytettiin huoneenlämmössä ja toista jääkaappilämpötilassa. Ennen kuin putket siirrettiin eri lämpötiloihin, molemmista putkista viljeltiin viljelyautomaatilla 10µl näytettä maljoille ja viljelyiden tuloksia verrattiin toisiinsa. Hyvien rinnakkaisten viljelytulosten perusteella voitiin varmistua pipetoinnin onnistumisesta ja tarkkuudesta laimennosten teon aikana. Yksi ihminen vastasi pipetoinnista, jolloin varmistuttiin siitä, että pipetointijälki oli samanlainen jokaisen näytteen kohdalla.

Työn luotettavuutta lisäsi se, että kaikki näytteet viljeltiin viljelyautomaatilla, joka viljelee jokaisen näytteen samalla tavalla. Ihmisten viljellessä näytteitä eri viljelmät saattavat olla jopa saman ihmisen viljeleinä erilaisia. Automaatilla viljellessämme voimme

olla varmoja viljelyiden tasalaatuisuudesta. Ennen viljelyä laite sekoitti jokaisen näytteen, jolloin bakteerimäärä jakautui nesteessä tasaisesti ja saatiin homogeeninen seos. Putkesta viljeltiin maljoille vain pieni määrä, joten sekoituksen avulla varmistuttiin siitä, että viljelty näytemäärä vastasi koko putkessa vallitsevaa tilannetta.

Viljeltyjä maljoja inkuboitiin 24 tuntia hiilidioksidi-inkubaattorissa, jonka hiilidioksidipitoisuus oli säädetty viiteen prosenttiin ja lämpötila 35 °C. Hiilidioksidipitoisuutta ja lämpötilaa kontrolloidaan laboratoriossa päivittäin. Jääkaappilämpötilassa säilytetyt näytteet säilytettiin jääkaapissa jonka lämpötila on myös kontrolloitu. Työssämme tutkittavat bakteerikannat oli jo tunnistettu ja eristetty potilasnäytteistä, joten muun kuin halutun bakteerin kasvaminen maljalla oli työssämme epätodennäköistä.

Maljojen luvun teimme aluksi ristiinlukuna, jotta varmistuimme siitä, että lukutapamme on sama eikä kahden eri henkilön suorittamasta maljojen lukemisesta aiheudu virheitä tuloksiin. Pyrimme laimennoksen avulla saamaan maljalle helposti luettavissa olevia yksittäispesäkkeitä, jolloin lukeminen helpottui ja virheiden teon mahdollisuus pieneni.

Viljeltyt tehtiin seitsemää näytettä lukuun ottamatta puhtasviljelyistä streptokokeista, joten normaaliflooran mukana oleminen ei aiheuttanut virheitä tuloksiin. Niiden seitsemän näytteen viljelytulokset, joissa oli mukana nielurisojen normaaliflooraa, luettiin ristiinlukuna. Maljojen luku suoritettiin hyvässä valaistuksessa vaaleaa taustaa vasten, jolloin yksittäisten pesäkkeiden laskeminen oli helppoa ja pesäkkeiden ympärillä näkyvä beetahemolyysi erottui hyvin.

Työn aikana eettisyys otettiin huomioon muun muassa siten, että työn kaikki vaiheet suunniteltiin tarkasti ja toteutettiin suunnitelman mukaan. Työn vaiheista ja etenemisestä tiedotettiin työelämäohjaajalle säännöllisesti. Työ pyrittiin suorittamaan mahdollisimman avoimesti ja työyhteisön yhteisiä sääntöjä noudattaen. Raportointi suoritettiin rehellisesti.

Eettisyys otettiin huomioon myös tekijänoikeusasioiden kannalta ja muiden kirjoituksista lainatut osat työssä on merkitty selkeästi. Kuvat teimme raporttiamme varten itse, jolloin niiden suhteen ei tarvinnut tekijänoikeusasioita miettiä. Työssä ei plagioitu muiden tekstejä. Työohjeiden käyttöä varten kysyttiin lupa HUSLABin elatusaineosastolta.

## 10 Pohdinta

Työn tulosten perusteella voidaan sanoa streptokokkien säilyvän ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputkessa hyvin jääkaappilämpötilassa. Huoneenlämmössä potilasnäytteiden streptokokkimäärä väheni säilytyksen aikana ja puhtaat streptokokkikannat taas lisääntyivät huoneenlämmössä, joten jääkaappilämpötilaa voidaan suositella nestekuljetusputken säilytykseen, kun sinne on lisätty potilasnäytettä. Streptokokit säilyivät jääkaappilämpötilassa nestekuljetusputkessa hyvin 72 tuntia eikä suuria muutoksia bakteerimäärässä tapahtunut. Työllä saatiin vastaukset tutkimuskysymyksiin ja työn tuloksia voidaan käyttää hyödyksi nestekuljetusputkien käyttöönotossa.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli alun perin selvittää erikseen A-, C- ja G-ryhmien beetahemolyyttisten streptokokkien säilyvyyttä ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputkessa. Työn käytännön osuuden jälkeen huomattiin ryhmien tulosten olevan yhteneviä, joten ryhmiä päätettiin käsitellä yhtenä kokonaisuutena aineiston analysointivaiheessa. Myös ATCC-kannat oli alun perin tarkoitus käsitellä tämän ryhmän yhteydessä, mutta niiden tulosten ollessa alusta lähtien korkeita päätettiin ne käsitellä omana ryhmänään. ATCC-kannoista saadut tulokset olivat odotettavissa, sillä kantojen bakteerimäärän tiedettiin olevan suuri. Lisäksi ATCC-kantojen tiedettiin säilyvän hyvin.

Työ tehtiin potilasnäytteistä eristetyillä streptokokeilla ja pienemmällä ryhmällä kokeiltiin, ovatko tulokset samansuuntaisia jos putkessa on mukana myös nielurisojen normaaliflooraa eli putkessa vallitsee oikeaa potilasnäytettä vastaava tilanne. Tulosten mukaan puhtaat streptokokkikannat säilyvät putkessa eri tavoin kuin näyte, jossa on mukana nielurisojen normaaliflooraa. Molempien ryhmien tulokset osoittavat jääkaappilämpötilan olevan suositeltava säilytyslämpötila streptokokkien säilytystä varten, mutta huoneenlämpötilassa säilytettyjen putkien viljelytuloksista käy ilmi ero ryhmien välillä. Puhtaat streptokokkikannat rikastuvat nestekuljetusputkessa huoneenlämmössä, kun taas normaaliflooraa sisältävistä putkista saatavat viljelytulokset pienenevät ajan kuluessa.

Monissa aikaisemmissa tutkimuksissa, joissa on tutkittu bakteerilajien säilyvyyttä, on aineistona käytetty tunnettuja ATCC-kantoja. Oman tutkimuksemme tulosten perusteella ATCC-kannat käyttäytyvät eri tavoin kuin potilasnäytteet, joissa on mukana nielurisojen normaaliflooraa. Koska useilla tutkimuksilla pyritään saamaan selville, mikä olisi

potilasnäytteiden käsittelyyn tai säilytykseen paras menetelmä, olisi suotavaa tehdä tutkimukset potilasnäytteillä. Potilasnäytteiden käyttö tutkimuksessa vaatii kuitenkin enemmän resursseja ja tulokset saattavat olla ennalta arvaamattomampia kuin tunnetuista ATCC-kannoista saatavat tulokset, sillä potilasnäytteiden bakteeripitoisuuksia ei tiedetä etukäteen. Tämän vuoksi tutkimuksissa päädytään usein käyttämään ATCC-kantoja.

Opinnäytetyömme käytännön osuuden aikana huomasimme Eswab<sup>®</sup>- nestekuljetusputken näytteenottotikun käytön tärkeyden. Suoritimme työn käytännön osuuden ensimmäisen kerran tammikuussa 2012. Työn tulokset eivät olleet odotettuja ja aloimme etsiä syytä erikoisille tuloksille. Pian aloimme pohtia, johtuisivatko tulokset siitä, ettemme olleet työn aikana katkaisseet tikkua putkeen. Pipetoimme nestekuljetusputkiin tietyn määrän bakteerisuspensiota emmekä näin ollen käyttäneet tikkua. Tiesimme tikun sisältävän kasviproteiinia, mutta näytteenottotikun käyttämisen välttämättömyydestä ei ollut mainintaa valmistajalta saamissamme materiaaleissa.

Maahantuojaan yhteyttä otettuamme kävi kuitenkin selväksi, että ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputken näytteenottotikun käyttö on välttämätöntä bakteerien säilymisen kannalta sen sisältämän kasviproteiinin vuoksi. Valmistajalta emme saaneet tarkempaa tietoa kasviproteiinista, sillä tikun koostumus on liikesalaisuus. Tehdessämme työmme käytännön osuuden toiseen kertaan katkaisimme tikun nestekuljetusputkeen bakteerisuspension pipetoinnin yhteydessä. Tällä kertaa bakteerit säilyivät putkessa pidempään lisääntymiskykyisinä ja koska työ tehtiin muuten samoin kuin ensimmäisellä suorituskerralla, voidaan muutoksen tuloksissa olettaa johtuvan näytteenottotikun käyttämisestä. Samalla huomasimme myös esitestauksen tärkeyden. Jos olisimme suorittaneet esitestauksen jo ennen ensimmäistä kertaa kun teimme käytännön työn, olisimme huomanneet virheen jo siinä vaiheessa eikä työtä olisi tarvinnut toistaa.

Ennen toisen käytännön osuuden suorittamista teimme esitestauksen kahdella eri kannalla, joista toinen oli A-ryhmän beetahemolyyttistä streptokokkia ja toinen G-ryhmän beetahemolyyttistä streptokokkia. Tulokset olivat hyvät, sillä yksittäisiä erillisiä pesäkeitä syntyi ja ne olivat helposti laskettavissa maljoilta. Käytännön osuudessa bakteerikannoista tehtiin esitestauksen perusteella 0,5 MacFarlandin vahvuisia laimennoksia. Joidenkin tulosten perusteella laimennokset olivat kuitenkin liian vahvoja. Rikastumista

tapahtui runsaasti eikä yksittäispesäkkeitä voitukaan laskea, näin ollen tulokseksi tuli yli 100 monessa tapauksessa. Niissä tapauksissa missä tulokseksi tuli yli 100 jo varhaisessa vaiheessa oli mahdoton seurata yksittäispesäkkeiden kasvua tai laskua. Suunta kävi kyllä ilmi ja mahdollinen rikastuminenkin näkyi selvästi maljoilta, yksittäispesäkkeiden vähenemisestä ei voitu kuitenkaan olla enää varmoja.

Mietimme työn suorituksen jälkeen, olisiko laimennosten pitänyt olla laimeampia, jotta olisimme voineet seurata yksittäisiä pesäkemääriä vieläkin tarkemmin. Toisissa näytteissä pesäkemäärät olivat kuitenkin koko ajan laskettavissa, joissain näytteissä pesäkemäärät jopa laskivat säilytyksen edetessä. Jos laimennokset olisivat olleet laimeampia, on mahdollista, ettei näiden näytteiden kohdalla olisi maljoilla kasvanut lainkaan bakteeripesäkkeitä. Niukempi bakteerimäärä ei myöskään automaattisesti olisi tarkoittanut, että pesäkkeet olisivat olleet laskettavissa sillä rikastuminen olisi saattanut olla hyvin voimakasta myös laimeampia näytteitä tutkittaessa.

Maljojen luvussa päätimme melko nopeasti, että yksittäispesäkkeitä maljalta laskettaisiin sataan pesäkkeeseen asti. Sadan pesäkkeen laskeminen maljalta oli vielä mahdollista mutta luvun noustessa runsaasti siitä oli laskeminen melkein mahdotonta. Tilasto-ohjelmaan syötimme tulokset ryhmissä 0-4 jotka määräytyivät pesäkemäärän mukaan. Ryhmät olisi myös voinut nimetä eikä numeroida. Näin ollen tuloksissa olisi vältytty runsaalta numeromäärältä. Ryhmien numerointi aiheutti hieman sekavuutta tulosten analysointivaiheessa.

Monen näytteen rikastuessa runsaasti ja pesäkemäärien noustessa reippaasti yli sadan olisi yksittäispesäkkeitä voitu laskea vieläkin enemmän esimerkiksi 0-150, jolloin runsaasti rikastuneita näytteitä olisi voitu seurata tarkemmin. Ryhmäjako olisi siis voinut olla vieläkin laajempi yksittäisten pesäkemäärien perusteella. Monissa näytteissä bakteeripesäkkeitä kasvoi kuitenkin tiheänä mattona, jolloin yksittäispesäkkeiden laskeminen olisi joka tapauksessa jäänyt näiltä maljoilta laskematta.

Tehdessämme työmme käytännön osuuden ensimmäisen kerran viljelyautomaatti lopetti toiminnan ensimmäisen viljelykerran jälkeen. Tästä johtuen viljelimme näytteitä käsin. Vaikka suoritimme viljelyn niin, että yksi ja sama henkilö viljeli kaikki maljat, olivat tulokset hieman arveluttavia. Käden jälki ei antanut välttämättä niin luotettavaa

lopputulosta. Näin ollen oli hyvä, että suoritimme käytännön osuuden vielä toisen kerran jolloin viljelyautomaatti viljeli kaikki maljat jokaisella viljelykerralla. Viljelyautomaatin viljely oli tasalaatuista ja lisäsi työssämme toistettavuutta ja tulosten luotettavuutta.

Työmme suunnitteluvaiheessa pohdimme, teemmekö kaikille viljelykerroille oman putken, vai teemmekö kaikki viljelyt samasta putkesta. Pelkäsimme kontaminaatiovaaran olevan suuri, kun kaikki viljelyt tehdään yhdestä putkesta ja sitä joudutaan näin ollen avaamaan ja sulkemaan monta kertaa. Myös bakteerimäärän väheneminen putkessa jokaisen viljelykerran aikana huolestutti meitä. Suunnittelimme tekevämme jokaisesta kannasta yhden laimennoksen, joka sitten jaettaisiin neljään putkeen joista viljelyt tehtäisiin. Lopulta päädyimme kuitenkin tekemään kaikki viljelyt yhdestä ja samasta putkesta, sillä halusimme saada selville nimenomaan, kuinka säilytysaika tai lämpötila vaikuttaa kyseisen putken bakteerimäärään. Koska putket sekoitettiin aina ennen viljelyä eli neste oli homogeenista ja viljelty nestemäärä oli jokaisella kerralla sama, ei bakteerimäärän vähentyminen putkessa haitannut sillä näimme aina viljelyn jälkeen elatusainemaljalla sen, minkä verran bakteeria oli nesteessä kymmenessä mikrolitrassa. Myöskään kontaminaatiota ei työn suorituksen aikana havaittu.

Vaikka työssä tutkittavat bakteerikannat oli eristetty potilasnäytteistä ja niistä tehtiin tämän jälkeen puhtasviljelmät yhdestä bakteeripesäkkeestä, emme olleet työmme aikana täysin varmoja siitä, että kannat olivat puhtaita. Kahden näytteen kohdalla elatusainemaljalla kasvoi vuorokauden inkuboinnin jälkeen kahden näköisiä pesäkkeitä ja luulimme että näytteet ovat kontaminoituneet. Vuorokauden lisäinkuboinnin jälkeen bakteeripesäkkeet näyttivät kuitenkin samanlaisilta ja koagglutinaatiotestin avulla varmistettiin niiden olevan samaa streptokokkiryhmää. Tästä huomasimme, että samaa kantaa olevat bakteeripesäkkeet saattavat näyttää maljalla erilaisilta esimerkiksi jos toisilla pesäkkeillä on enemmän tilaa kasvaa kuin toisilla. Tällöin erityinen tarkkaavaisuus ja lisätestit ovat tarpeen, jotta voidaan varmistua siitä että tiedetään tarkasti, mitä bakteeria maljalla kasvaa.

Streptokokkeihin viitattiin toisissa lähteissä anaerobeina, kun taas toisissa lähteissä niiden kerrottiin olevan fakultatiivisia anaerobeja mikä tarkoittaa streptokokkien kasvavan paremmin anaerobisissa olosuhteissa kuin ollessaan tekemisissä hapen kanssa. Tällaisissa tilanteissa asioista piti ottaa tarkemmin selvää ja pohtia, miksi joissain läh-

teissä kerrottiin virheellistä tietoa. Kun monesta lähteestä löydettiin sama tieto, oli asiaa helpompi pitää totena. Kun lähteestä havaittiin jokin virheellinen tieto, saattoi se koko lähteen hieman epäluotettavaan valoon, emmekä käyttäneet kyseisiä lähteitä työmme lopullisessa raportissa lainkaan. Tästä huomasimme, kuinka tärkeää on esittää asiat oikein ja varmistaa tietojen oikeellisuus joka vaiheessa.

Analysoimme työmme tulokset tilasto-ohjelmalla. Kun tarkastelimme tuloksia, tulimme siihen lopputulokseen että tulokset oltaisi voitu käsitellä jollain muulla tavalla. Tilasto-ohjelman käyttö ei tuntunut aivan tarkoituksenmukaiselta, sillä esimerkiksi tilastollisesti merkitsevä ero ei työmme kannalta ollut välttämättä merkitsevä. Työssämme tulokset jaettiin vain viiteen ryhmään ja näitä ryhmiä oltaisi voitu käsitellä helposti myös ilman tilasto-ohjelmaa. Monet arvot, joita eri testien avulla tuloksista saatiin selville, olivat hyödyttömiä. Esimerkiksi p-arvo, joka kertoo muuttujien välisen tilastollisen eron, ei kertonut todellisen tilanteen merkitsevää eroa mikrobiologian työssä, jossa merkitsevä ero saattaa olla eri kuin tilastotieteessä. Tulosten käsittelyn jälkeen havaitsimme että ainoat työmme kannalta merkitsevät asiat, joita saimme tilasto-ohjelmalla selville, olivat kuinka paljon vähenemistä tai kasvua on tapahtunut ja missä vaiheessa.

Työn luotettavuuden kannalta olisi ollut kannattavaa tehdä tutkimus suuremmalla näytemäärällä, jolloin oltaisi voitu varmistua siitä, etteivät tulokset ole sattumanvaraisia. Tämä olisi hyvä jatkotutkimusaihe oman työmme tulosten varmistamiseksi. Voimme myös suositella, että tulevaisuudessa tutkimuksissa käytettäisiin suurempia näytemääriä jolloin tulosten oikeellisuus tulee varmemmaksi.

Mahdollisia jatkotutkimusaiheita nousi työmme aikana esille monessa vaiheessa. Aikaisempia tutkimuksia etsittäessä huomasimme että melkein kaikki tutkimukset oli tehty puhtailla ATCC-kannoilla eikä näytteisiin ollut lisätty ihmisen normaaliflooraa. Omien tulostemme perusteella normaalifloora vaikuttaa streptokokkien säilyvyyteen putkessa ja jatkotutkimusaiheeksi ehdotamme puhtaiden bakteerikantojen ja potilasnäytteiden vertailua myös muiden bakteerilajien osalta. Myös streptokokkien jatkotutkimus tähän aiheeseen liittyen on tarpeellista, sillä omassa työssämme tutkimme vain seitsemän näytteen säilyvyyttä.

Eri nestekuljetusputkien eroista ja niiden soveltuvuudesta eri bakteerilajien kuljetukseen voidaan suositella tehtävän tutkimuksia. Nestekuljetusputkia on tullut markkinoille viime vuosien aikana ja niiden eroja olisi hyvä selvittää. ESwab<sup>®</sup>- nestekuljetusputken näytteenottotikussa on esimerkiksi kasviproteiinia, jota muissa kuljetusputkissa (esim. Sigma-Swab) ei ole. Olisi kiinnostavaa tietää, kuinka kasviproteiini vaikuttaa bakteerien lisääntymiseen ja miten se on muissa kuljetusputkissa huomioitu. Kasviproteiinista ei saatu valmistajalta tietoa ja olisi myös kiinnostavaa saada selville, voiko näytteenottotikun kasviproteiini allergisoida ihmisiä näytteenoton yhteydessä, jos kasviproteiinia joutuu esimerkiksi silmän verkkokalvolle sivelynäytettä otettaessa.

Omassa työssämme teimme kaikista tutkittavista bakteerikannoista saman vahvuiset laimennokset, jolloin työmme tulokset kertovat vain tietyn vahvuisen bakteerikannan säilyvyydestä nestekuljetusputkessa. Jatkotutkimusaiheena ehdotamme, että tutkittaisiin vaikuttaako bakteerien säilyvyyteen näytteessä olevan bakteerin määrä. Yhdestä kannasta voitaisiin siis tehdä monta eri vahvuista laimennosta, joiden säilyvyyttä tutkitaisiin.

## Lähteet

Bisno, Alan L. - Ruoff, Kathryn L. 2005. Classification of Streptococci. Teoksessa Mandell, Gerald L. - Bennett, John E. - Dolin, Raphael (toim.): Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. Volume 2. 6<sup>th</sup> edition. USA: Elsevier, Churchill, Livingstone.

Bisno, Alan L. - Stevens, Dennis L. 2005. Streptococcus pyogenes. Teoksessa Mandell, Gerald L. - Bennett, John E. - Dolin, Raphael (toim.): Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. Volume 2. 6<sup>th</sup> edition. USA: Elsevier, Churchill, Livingstone.

Carlson, Petteri – Koskela, Markku 2011. Bakteriologiset tutkimukset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Seppo, Meri – Vaara, Martti (toim.): Infektiosairaudet 3. Helsinki: DUODECIM.

Copan Italia. 2010. eSwab. Product insert & how to use swab guide. Esite.

Copan Italia. Liquid based microbiology. Esite.

Field, Andy 2009. Discovering statistics using SPSS. 3<sup>rd</sup> edition. Britain: SAGE Publications Ltd.

Forsman, Noora 2011. Yleisimpien bakteeripulvin taudinaiheuttajien säilyvyys kahdessa eri bakteerikuljetusputkessa. Opinnäytetyö. Pohjois-Karjalan Ammattikorkeakoulu.

Graafinen esitys 2004. Tampereen yliopisto, yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto. Verkkodokumentti. <<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/kuviot/kuviot.html>>. Luettu 28.3.2012.

Heikkilä, Tarja 2008. Tilastollinen tutkimus. Helsinki: Edita Prima Oy.

Karhunen, Ville – Rasi, Ilkka – Lepola, Esa – Muhli, Arto – Kanninen, Aila 2011. IBM SPSS Statistics: Perusteet. Opas. Oulun yliopisto.

Koneman, Elmer W. - Allen, Stephen D. - Janda, William M. - Schreckenberger, Paul C. - Winn, Washington C. Jr. 2006. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, New York: Lippincott.

Leppälä, Raija 2006. Tilastotieteen johdantokurssi. Tampereen yliopisto, Matematiikan ja tilastotieteen laitos. Verkkodokumentti. <<http://mtl.uta.fi/tilasto/tiltp1/syksy2006/luentorunko.pdf>> . Luettu 28.3.2012.

Metrologian neuvottelukunta 2006. Mikrobiologian laboratorion elatusaineiden sisäinen laadunvarmistus. Teoksessa Ehder, J. (toim.): Mikes J6/2006. Espoo: Mittatekniikan keskus.

Miikkulainen-Lahti, Terhi 2012. Mikrobiologi. HUSLAB. Suullinen tiedonanto 27.1.2012.

Nys, S. – Vijgen, S. – Magerman, K. – Cartuyvels, R. 2010. Comparison of Copan eSwab with the Copan Venturi Transystem for the quantitative survival of *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases* 29. 453-456.

Pentikäinen, Kati 2012. Mekalasi. Suullinen tiedonanto 7.3.2012.

Petti, Cathy A. - Carroll, Karen C. 2011. Procedures for the storage of microorganisms. Teoksessa Versalovic, James - Carroll, Karen C. - Funke, Guido - Jorgensen, James H. - Landry, Marie Louise - Warnock, David W. (toim.): *Manual of clinical microbiology*. Volume 2. 10<sup>th</sup> edition. Washington, USA: ASM Press.

Rantakokko-Jalava, Kaisu - Anttila, Veli-Jukka 2010. Muut streptokokit, enterokokit ja muita grampositiivisia kokkeja. Teoksessa Hedman, Klaus - Heikkinen, Teppo - Huovinen, Pentti - Järvinen, Asko - Meri, Seppo - Vaara, Martti (toim.): *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet* 1. Helsinki: DUODECIM.

Sivonen, A. 22.03.2010. Colistin-oxolinic = CO- malja. HUSLAB elatusaineosaston työohje.

Sivonen, A. 25.10.2010. Verimalja. HUSLAB Elatusaineosaston työohje.

Spellerberg, Barbara - Brandt, Claudia 2011. *Streptococcus*. Teoksessa Versalovic, James - Carroll, Karen C. - Funke, Guido - Jorgensen, James H. - Landry, Marie Louise - Warnock, David W. (toim.): *Manual of clinical microbiology volume 2*. 10<sup>th</sup> edition. Washington, USA: ASM Press.

Van Horn, Kenneth G. – Audette, Carol D. – Sebeck, Denise – Tuckert, Kelly A. 2008. Comparison of the Copan eSwab system with two amies agar swab transport systems for maintenance of microorganism viability. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (5). 1655-1658.

Vuopio-Varkila, Jaana - Syrjänen, Jaana - Kotilainen, Pirkko 2010. A-ryhmän streptokokki. Teoksessa Hedman, Klaus - Heikkinen, Teppo - Huovinen, Pentti - Järvinen, Asko - Meri, Seppo - Vaara, Martti (toim.): *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet* 1. Helsinki: DUODECIM.

Väre, Paula 2007. Nailonisen näytteenottotikun evaluaatio. Asiantuntijatyö. Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia.

### Taulukko maljojen pesäkemääristä

Kanta	RT				JK			
A-ryhmä	0	24	48	72	0	24	48	72
	pes.	pes.	pes.	pes.	pes.	pes.	pes.	pes.
1	67	38	>100	>100	90	48	65	76
2	32	>100	>100	>100	22	25	9	14
3	77	>100	>100	>100	78	56	56	29
4	50	69	>100	>100	54	33	28	28
5	57	>100	>100	>100	66	33	14	16
6	22	>100	>100	>100	29	26	20	17
7	73	>100	>100	>100	73	43	31	41
8	55	>100	>100	>100	55	47	60	51
9	52	>100	>100	>100	49	26	15	4
10	64	57	>100	>100	58	42	33	41
11	54	>100	>100	>100	66	42	30	52
12	57	>100	>100	>100	46	60	38	69
13	83	>100	>100	>100	78	74	72	66
14	89	>100	>100	>100	88	75	73	71
15	93	>100	>100	>100	>100	>100	100	>100
16	70	>100	>100	>100	78	62	74	54
17	73	>100	>100	>100	75	69	65	55
18	57	>100	>100	>100	69	39	45	27
19	39	>100	>100	>100	50	38	31	28
20	96	>100	>100	>100	>100	92	60	92
C-ryhmä								
1	78	>100	>100	>100	72	53	40	46
2	>100	>100	>100	>100	100	100	90	80
3	74	>100	>100	>100	80	73	81	95
4	46	55	>100	>100	41	53	50	37
5	92	>100	>100	>100	69	52	70	44
6	50	>100	>100	>100	64	45	51	31
7	56	>100	>100	>100	58	12	11	13
8	>100	>100	>100	>100	100	98	96	74
9	78	>100	>100	>100	70	45	43	43
10	98	>100	>100	>100	75	72	56	66

G-ryhmä									
1	45	66	>100	>100	52	36	32	31	
2	28	>100	>100	>100	26	17	14	11	
3	52	>100	>100	>100	39	23	17	10	
4	17	35	>100	>100	13	9	5	6	
5	34	12	>100	>100	28	29	13	8	
6	78	86	>100	>100	62	67	32	20	
7	43	66	>100	>100	38	32	32	30	
8	32	>100	>100	>100	17	43	50	38	
9	42	27	>100	>100	47	23	37	8	
10	44	35	>100	>100	47	32	26	24	
ATCC									
1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	80	>100	
2	69	>100	>100	>100	72	86	71	68	
3	>100	>100	>100	>100	>100	>100	99	>100	
Pooli									
1	69	65	12	0	58	60	56	40	
2	28	50	12	0	46	60	53	46	
3	4	42	25	2	11	28	34	30	
4	63	50	21	2	56	57	54	54	
5	56	>100	>100	52	38	46	46	43	
6	21	35	48	20	14	13	23	8	
7	5	21	22	2	6	3	8	1	

**Taulukko pesäkemääristä lajiteltuna ryhmiin 1-4**

Malja	HL_0h	HL_24h	HL_48h	HL_72h	JK_0h	JK_24h	JK_48h	JK_72h
1	2	2	4	4	3	2	2	3
2	2	4	4	4	1	1	1	1
3	3	4	4	4	3	2	2	1
4	2	3	4	4	2	2	1	1
5	2	4	4	4	3	2	1	1
6	1	4	4	4	1	1	1	1
7	3	4	4	4	3	2	2	2
8	2	4	4	4	2	2	2	2
9	2	4	4	4	2	1	1	1
10	3	2	4	4	2	2	2	2
11	2	4	4	4	3	2	1	2
12	2	4	4	4	2	2	2	3
13	3	4	4	4	3	3	3	3
14	3	4	4	4	3	3	3	3
15	3	4	4	4	4	4	3	4
16	3	4	4	4	3	3	3	2
17	3	4	4	4	3	3	3	2
18	2	4	4	4	3	2	2	1
19	2	4	4	4	2	2	2	1
20	3	4	4	4	4	3	2	3
21	3	4	4	4	3	2	2	2
22	4	4	4	4	3	3	3	3
23	3	4	4	4	3	3	3	3
24	2	2	4	4	2	2	2	2
25	3	4	4	4	3	2	3	2
26	2	4	4	4	3	2	2	2
27	2	4	4	4	2	1	1	1
28	4	4	4	4	3	3	3	3
29	3	4	4	4	3	2	2	2
30	3	4	4	4	3	3	2	3

31	2	3	4	4	2	2	2	2
32	1	4	4	4	1	1	1	1
33	2	4	4	4	2	1	1	1
34	1	2	4	4	1	1	1	1
35	2	1	4	4	1	1	1	1
36	3	3	4	4	3	3	2	1
37	2	3	4	4	2	2	2	1
38	2	4	4	4	1	2	2	2
39	2	1	4	4	2	1	2	1
40	2	2	4	4	2	2	1	1
41	4	4	4	4	4	4	3	4
42	3	4	4	4	3	3	3	3
43	4	4	4	4	4	4	3	4
44	3	3	1	0	2	2	2	2
45	1	2	1	0	2	2	2	2
46	1	2	2	1	1	1	2	1
47	3	2	2	1	2	2	2	2
48	2	4	4	2	2	2	2	2
49	1	2	2	2	1	1	1	1
50	1	2	1	1	1	1	1	1