

Alisa Pasanen ja Zila Pirdil

Säilyvätkö bakteerilajit antikoagulanttia sisältävissä putkissa?

Opinnäytetyö

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

24.10.2013

Tekijät Otsikko Sivumäärä Aika	Alisa Pasanen, Zila Pirdil Säilyvätkö bakteerilajit antikoagulanttia sisältävissä putkissa? 38 sivua + 7 liitettä 24.10.2013
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaajat	Lehtori Tuula Kurkinen Mikrobiologi, laboratoriohoitaja Reetta Sihvonen
<p>Punktionäytteitä tulee toisinaan HUSLABin kliinisen bakteriologian laboratorioon verinäytteille tarkoitetuissa koeputkissa. Laboratorion henkilökunta arvioi jokaisen näytteen kohdalla erikseen, kannattaako veriputkeen otettu näyte viljellä. Näytteistä saadun negatiivisen tuloksen luotettavuus kuitenkin kyseenalaistetaan. Bakteriologian laboratorio halusi saada lisätietoa bakteerien säilyvyydestä antikoagulanttia sisältävissä putkissa. Näin laboratorio pystyisi paremmin arvioimaan veriputkien käyttökelpoisuutta laboratoriodiagnostiikassa. Työmme tarkoituksena oli tutkia, vaikuttavatko veriputkien antikoagulantit bakteerien säilyvyyteen ja voidaanko veriputkissa kuljetettua näytettä viljellä.</p> <p>Teimme opinnäytetyön HUSLABin kliinisen bakteriologian laboratoriossa. Tutkimme miten kuusi yleisimmän nivelnesteestä löydettävää bakteerilajia <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i> sekä <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kasvavat kasvatusmaljoilla antikoagulanttiputkissa säilyttämisen jälkeen. Tutkimusputkina olivat litium-hepariini- ja natrium-fluoridiputki, lisäaineeton seerumiputki sekä bakteerien nestekuljetusputki eSwab®.</p> <p>Tutkimuksessamme havaitsimme, että osa bakteerilajeista kuoli jo kuuden tunnin seisotuksen jälkeen kaikissa veriputkissa. Tämän perusteella voimme sanoa, että veriputket eivät sovellu bakteerien kuljetukseen pitkällä aikavälillä. Tulosten välillä oli kuitenkin eroja. Huomattavaa olikin, että veriputkista huonoiten bakteerit näyttivät säilyvän seerumiputkessa. Veriputkia vertailtaessa parhaiten bakteerilajit säilyivät litium-hepariiniputkessa. Tutkimustulosten perusteella emme kuitenkaan suosittelisi näytteitä kuljetettavan veriputkissa lainkaan.</p>	
Avainsanat	natrium-fluoridiputki, litium-hepariiniputki, antikoagulantti, bakteerien säilyminen

Authors Title Number of Pages Date	Alisa Pasanen, Zila Pirdil The Survival of Bacterial Species in Blood Tubes Containing Anticoagulants 38 pages + 7 appendices 24 October 2013
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Tuula Kurkinen, Senior Lecturer Reetta Sihvonen, Microbiologist, Biomedical Laboratory Scientist
<p>Our final project was done in a co-operation with HUSLAB, the Division of Clinical Microbiology, Helsinki, Finland. Bacterial samples (such as MRSA) sent to the laboratory are collected in eSwab® transport system which has the optimal preservation for the viability of bacteria. However, the laboratory occasionally receives punctate samples collected in incorrect transport systems such as blood tubes. Our goal for this final project was to search whether bacterial species would survive in blood tubes containing anticoagulant.</p> <p>For our final project we chose the following six bacterial species: <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. The test tubes used in our study were Lithium heparin, Sodium fluoride, non-additive serum and eSwab®.</p> <p>In our final project, we detected that some of the studied bacterium species died already after six hours of settling in all blood tubes. We came to the conclusion that blood tubes are not suitable for long-term containers for bacterial samples. However we observed that there were differences between the blood tubes. The result we got from the non-additive serum tube was most surprising: the bacteria did not survive in it unlike we assumed. Lithium heparin tube appeared to be the best of the three blood tubes we studied for bacterial preservation.</p>	
Keywords	sodium-fluoride, lithium-heparin, anticoagulant, survival of bacteria

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Bakteerien kasvuun vaikuttavat tekijät	1
3	Tutkittavat bakteerilajit	2
4	Tutkimukseen valitut näyteastiat ja aikaisemmat tutkimukset	5
4.1	Verinäyteputket	5
4.2	Bakteerien nestekuljetusputki	8
5	Opinnäytetyön tarkoitus ja tutkimusongelmat	9
6	Työn toteutus	9
6.1	Esitutkimus	10
6.2	Tutkimuksen kulku	11
7	Tulokset	14
7.1	<i>Haemophilus influenzae</i>	14
7.2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	16
7.3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
7.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
7.5	<i>Escherichia coli</i>	24
7.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
7.7	Johtopäätökset	30
8	Pohdinta	31
9	Luotettavuus, toistettavuus ja eettisyys	33
	Lähteet	35
	Liitteet	
	Liite 1. Bakteerikannat	
	Liite 2. Tutkimusputket	
	Liite 3. Bakteeripitoisuuden laskeminen	
	Liite 4. Esitutkimuksen tulokset	
	Liite 5. Tulostaulukot	

Liite 6. Muutosprosentit

Liite 7. Työohje

1 Johdanto

Bakteeriviljelynäytteitä tulee toisinaan HUSLABin kliinisen bakteriologian laboratorioon verinäytteille tarkoitetuissa koeputkissa. Kyseessä on ainutkertainen, steriilin alueen näyte, yleensä nivelneste. Laboratorion henkilökunta arvioi jokaisen näytteen kohdalla erikseen, kannattaako veriputkeen otettu näyte viljellä. Näytteistä saatujen tulosten luotettavuus kuitenkin kyseenalaistetaan. Bakteriologian laboratorion henkilökunta halusi saada lisätietoa bakteerien säilyvyydestä antikoagulanttia sisältävissä putkissa. (Sihvonen 2013). Opinnäytetyön tulosten perusteella laboratorion henkilökunta saa tukea tilanteisiin, joissa näyte tulee laboratorioon verinäyteputkessa. Näin veriputkien käyttökelpoisuutta pystytään paremmin arvioimaan. Työmme tarkoituksena oli tutkia, vaikuttavatko veriputkien antikoagulantit bakteerikasvuun ja selviävätkö bakteerit antikoagulanttia sisältävissä veriputkissa. Aiheesta oli aiempaa tutkimustietoa vain vähän. Aiemmissa tutkimuksissa ei tutkittu varsinaisesti bakteerien säilymistä antikoagulanttiputkissa, vaan kemikaalien vaikutusta bakteereihin.

Opinnäytetyöryhmään kuuluivat opiskelijat Alisa Pasanen ja Zila Pirdil. Työelämän puolelta yhdyshenkilömme oli mikrobiologi Reetta Sihvonen bakteriologian laboratoriosta. Ohjaavana opettajana toimi lehtori Tuula Kurkinen. Työ tehtiin HUSLABin kliinisen bakteriologian laboratorioissa. Työhön valittiin kuusi tavallisesti nivelnesteessä esiintyvää bakteerilajia. Tutkimusputkiksi valittiin kaksi antikoagulanttia sisältävää veriputkea, lisääaineeton seerumiputki sekä bakteerien nestekuljetusputki eSwab®.

2 Bakteerien kasvuun vaikuttavat tekijät

Bakteerien kasvuun vaikuttavat monet eri tekijät: ympäristön pH ja lämpötila, kasvatusalustan koostumus sekä bakteerin kyky käyttää happea. Bakteereista useimmat tarvitsevat lisäksi kosteita olosuhteita lisääntyäkseen. (Salkinoja-Salonen 2002: 191–200.)

Jokaisella bakteerilajilla on sille ominainen pH-alue, jossa se kasvaa parhaiten. (Clark – Dunlap – Madigan – Martinko 2009: 165.) Bakteereista suurin osa viihtyy parhaiten

pH:n ollessa lähellä seitsemää, toisin sanoen neutraalissa happamuudessa (Elliott – Worthington – Osman – Gill 2007: 9; Bauman 2004: 174).

Optimilämpötila on lämpötila, jossa bakteeri kasvaa parhaiten. Ihmisissä tauteja aiheuttavat bakteerit kasvavat parhaiten lämpötilan ollessa noin 37 °C. (Salkinoja-Salonen 2002:193.) Kasvatimme kaikki bakteerilajit +35 celsiusasteessa. Bakteerilajeista *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* ja *Staphylococcus aureus* kasvatimme CO₂ -kaapissa. *Escherichia coli* ja *Pseudomonas aeruginosa* kasvavat CO₂ -kaapissa liian tehokkaasti, mistä syystä kasvatimme kyseiset kaksi bakteerilajia lämpöhuoneessa.

Osa bakteereista käyttää orgaanisia aineita hiilenlähteenään. Bakteerit käyttävät esimerkiksi glukoosia ja muita sokereita, orgaanisia happoja, glyserolia ja selluloosaa sekä monia muita orgaanisia aineita. Bakteerit rakentavat vedestä ja hiilidioksidista orgaanisia yhdisteitä käyttämällä epäorgaanista energianlähdettä. Epäorgaanisia energianlähteitä on esimerkiksi auringonvalo tai kemiallisten aineiden kuten vedyn, rikkivedyn tai ammoniakkin hapetus. (Vaara – Skurnik – Sarvas 2010: 35.) Bakteerit pystyvät hajottamaan myös esimerkiksi lääkevalmisteiden sisältämiä orgaanisia aineita sekä suuren osan epäorgaanisista aineista. Hajotessaan lääkeaine voi tuottaa bakteereille energiaa tai tarpeellisia yhdisteitä. (Eklund ym. 1997: 219–220.) Tutkimukseen valitut antikoagulanttiputket sisältävät litium-hepariinia tai natriumfluoridia ja kaliumoksalaa. Näistä aineista litium-hepariini ja kaliumoksalaa ovat orgaanisia aineita. Mielenkiintoista onkin, pystyvätkö bakteerit hyödyntämään tutkittujen putkien antikoagulantteja.

3 Tutkittavat bakteerilajit

Työhön valittiin kuusi tavallisesti nivelnesteissä esiintyvää bakteerilajia: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* sekä *Pseudomonas aeruginosa*. Valitsemamme bakteerit olivat kasvuvaatimuksiltaan hyvin erilaisia, mikä oli tutkimusasetelman kannalta järkevää.

Haemophilus influenzae on gramnegatiivinen sauvabakteeri (Käyhty – Peltola: 2010: 166) Se tarvitsee hemiiniä ja NAD⁺:a kasvaakseen (Champe – Fisher – Harvey 2007:

131). Se on kasvuolosuhteiltaan vaativa, ja tulee siksi viljellä runsasravinteiselle suklaamaljalle (Strelkauskas – Strelkauskas – Moszyk-Strelkauskas 2010: 199). Bakteri on herkkä kuivuudelle sekä suurille lämpötilan vaihteluille (Park Talaro 2008: 619). *H. influenzae* voi olla patogeeni, vaikka se on yleinen bakteri nenänielun normaalifloorassa (Kauppinen ym. 1997: 53). *H. influenzae* kasvaa suklaamaljalla pieninä (1mm), kosteina pesäkkeinä, joille on ominaista vaimea tuoksu. (BD Chocolate Agar 2011: 3.)

Streptococcus pyogenes on A-ryhmän β -hemolyyttinen streptokokki. Se on grampositiivinen, liikkumaton ja fakultatiivisesti anaerobinen kokkibakteeri. Streptokokkien optimi kasvulämpötila on 37 °C ja ne tarvitsevat usein kasvaakseen rikastetun kasvualustan kuten verimaljan. *Str. pyogenes* voi säilyä pitkään kuivassakin ympäristössä. (Elliott – Worthington – Osman – Gill 2007: 23–24; Gillespie 1998: 20.) *Str. pyogenes* erottuu helposti verimaljalta kirkkaan hemolyysinsä ansiosta. (Kotilainen – Syrjänen – Vuopio-Varkila 2010: 102–105.)

Streptococcus pneumoniae on grampositiivinen kapselillinen streptokokki (Champe ym. 2007: 84). *Str. pneumoniae* on fakultatiivinen anaerobi, joka pystyy lisääntymään sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa (Kauma – Virolainen-Julkunen 2010: 112). Bakteri kasvaa pareina (diplokokki) tai lyhyinä ketjuina. (Kauma – Virolainen-Julkunen 2010). *Str. pneumoniae* on α -hemolyyttinen bakteri. (Humphreys 2007: 190). Bakteerin hajottaessa punasoluja verimaljalla bakteeripesäkkeiden ympärille muodostuu vihreä rengas (Champe ym. 2007: 79). *Str. pneumoniae* kasvaa parhaiten suklaa- tai verimaljalla, 5–10 %:n CO₂-pitoisuudessa. (Park Talaro 2008: 553.) *Str. pneumoniae* muodostaa verimaljalla pieniä, harmahtavia ja kiiltäviä pesäkkeitä. Pesäkkeet ovat keskeltä kuopalla muodostaen donitsimaisen muodon. (Forbes – Sahm – Weissfeld 1998: 629). Se on opportunisti, eli aiheuttaa infektioita ensisijaisesti ihmisillä, joiden vastustuskyky tauteja vastaan on heikentynyt (Park Talaro 2008: 553).

Staphylococcus aureus kuuluu stafylokokkien sukuun (Vuopio-Varkila – Kuusela – Kotilainen 2010: 83). *S. aureus* on grampositiivinen kokkibakteeri. Bakteri kasvaa laajalla lämpötila-alueella, 10–42 celsiusasteessa. Bakteerin optimi kasvulämpötila on 37 °C ja se viihtyy sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa ja kasvaa tavallisilla kasvualustoilla. (Elliott ym. 2007: 19.) Vaikka *S. aureus* on usein osana ihmisen normaaliflooraa, se voi sopivissa olosuhteissa aiheuttaa merkittäviä opportunistisia infektioita (Koneman – Allen – Janda – Schreckenberger – Winn 1997:

541; Clark ym. 2009: 982). Verimaljalla se muodostaa kooltaan 1–2 millimetrin levyisiä pesäkkeitä, jotka ovat sileitä, matalia ja kuperia. Jotkin *S. aureus* kannat voivat muodostaa keltaisia tai keltaoransseja pesäkkeitä, toiset valkoisia tai harmaita. (Koneman ym. 1997: 549.)

Ihmisen suoliston aerobisen bakteeriston valtalaji on *Escherichia coli* eli kolibakteeri (Siitonen – Vaara 2010: 178). Se on gramnegatiivinen sauvabakteeri. (Siitonen – Vaara 2010: 177.) Bakteerin optimi kasvulämpötila on 37 °C ja se kasvaa tavallisilla kasvualustoilla (Elliott ym. 2007: 39). *E. coli* on isännälleen hyödyllinen, sillä se tuottaa K-vitamiinia ja estää muiden bakteerien kasvua. *E. coli* voi kuitenkin aiheuttaa monenlaisia opportunistisia infektioita, jos se pääsee ruuansulatuskanavan ulkopuoliseen tilaan esimerkiksi limakalvojen vastustuskyvyn heikennettyä tai haavan kautta. (Siitonen – Vaara 2010: 178.) Se kasvaa verimaljalla isoina, harmaina, kuivina tai limaisina pesäkkeinä (Koneman ym. 1997: 172). Cled-maljalla *E. coli* kasvaa keltaisina, läpikuultamattomina pesäkkeinä, jotka ovat keskeltä lievästi tummemman keltaisia (BD CLED Agar 2006: 2).

Pseudomonas aeruginosa kuuluu *Pseudomonas*-sukuun. *Pseudomonas*-suvun bakteerit ovat luonnossa laajasti tavattavia gramnegatiivisia sauvabakteereja. (Elliott ym. 2007: 49.) *Pseudomonakset* ovat vaatimattomia kasvuvaatimustensa suhteen, sillä ne voivat käyttää kasvaakseen useita orgaanisia yhdisteitä. Ne kasvavat parhaiten pH:n ollessa 7.4–7.6, 5–42 celsiusasteen lämpötilassa. (Clark ym. 2009: 413; Collee – Fraser – Marmion – Simmons 1996: 414.) Bakteeri suosii kosteita olosuhteita ja viihtyy muun muassa piilolasinesteissä, uima-altaissa ja pesuvesissä. (Anttila – Tissari. 2010: 200.) *P. aeruginosa* on opportunisti ja tärkeä sairaala-infektioiden aiheuttaja (Anttila – Tissari 2010: 200–201; Elliott ym. 2007: 49). *Pseudomonas aeruginosa* muodostaa isoja pesäkkeitä. Useimmat *P. aeruginosa* -kannat tuottavat pyocyaniinia, mikä värjää kasvualustan vihertäväksi. Jotkin kannat tuottavat eriväristä pigmenttiä, kuten pyorubiinia (punainen), pyomelaniinia (musta tai ruskea) sekä pyoverdiiniä (keltainen). (Koneman ym. 1997: 288.) *P. aeruginosan* pesäkkeet ovat sinivihreitä (Govan 2007: 293; Forbes – Sahm – Weissfeld 1998: 453), metallinhohtoisia, joille on ominaista viinirypäleen tuoksu (Forbes ym. 1998: 453).

4 Tutkimukseen valitut näyteastiat ja aikaisemmat tutkimukset

Valitsimme tutkimuksen veriputket sen mukaan, mitä verinäyteputkia HUSLABin kliinisen bakteriologian laboratorioon yleensä lähetetään. Useimmiten laboratorioon tulleet verinäyteputkiin otetut punktaattinäytteet tulevat litium-hepariiniputkessa, natrium-fluoridiputkessa tai seerumiputkessa. Tutkimusputkiksi valitsimme näiden antikoagulanttiputkien ja lisääaineettoman seerumiputken lisäksi bakteerien nestekuljetusputken eSwab®:n.

Lisäaineeton seerumiputki ja bakteerien nestekuljetusputki toimivat vertailuputkina. Tutkimuksessa vertasimme eri putkien tuloksia toisiinsa, minkä perusteella teimme päätelmiä bakteerien säilyvyydestä. HUSLAB käyttää eSwab® -nesteputkea tiettyjen bakteerinäytteiden kuljetukseen, sillä siinä on bakteerien säilyvyydelle optimiolosuhteet. ESwab® onkin automaattiviljelyn yleistettyä HUSLABissa yleisimmin käytössä oleva nestekuljetusputki bakteereille. Valitsimme ESwab® -putken tutkimukseemme, koska sen sisältämä nestemäinen ravintoliuos pystyttiin pipetoimaan agarmaljoille samalla tavalla kuin veriputkien sisältämä bakteerisuspensio.

4.1 Verinäyteputket

Käytimme tutkimuksessamme samoja putkia kuin mitä HUSLABilla on käytössä. Käytimme BD Vacutainer FX Na-fluoridiputkea, BD Vacutainer Z seerumiputkea ja Venosafe™ VF Li-hepariiniputkea. Niiden sisältämät antikoagulantit on listattu alla olevaan taulukkoon 1.

Taulukko 1. Näytteenottoputkien sisältämät aineet. (Mukaillen HUSLAB 2012).

Putken merkki	Käyttötarkoitus	Lisäaine
Venosafe™ VF	Hepariiniputki (P) Plasmanäyte 4ml	Li-hepariini 60 IU/ml (Mediq 2010)

BD Vacutainer® Z	Seerumiputki (S) Seeruminäyte 5ml	Ei lisäainetta (BD 2010)
BD Vacutainer® FX	Verensokeriputki (P) Plasmanäyte 2ml	Na-fluoridi 5mg kaliumoksalatti 4mg (BD 2010)

Näytteenottoputkissa oleva antikoagulantti, litium-hepariini ja natrium-fluoridi, estää veren hyytymisen. Antikoagulantit jaetaan kahteen pääryhmään. Välittömästi vaikuttavat antikoagulantit vaikuttavat suoraan aktivoituneisiin hyytymistekijöihin kun taas välillisesti vaikuttavat antikoagulantit estävät hyytymistekijöiden muodostumista maksassa. (Koulu – Tuomisto 2007: 621–622).

Hepariini on välittömästi vaikuttava antikoagulantti, joka on vahva happo sen suuren esterisulfaattipitoisuudensa vuoksi (Koulu – Tuomisto 2007:622). Hepariini on sulfaatti mykopolysakkaridi, joka koostuu osittain sulfaattiyksiköistä α -D-glukuronihaposta ja 2-amino-2-deoksi- α -D-glukoosista (Ehrlich – Stilava 1973: 517–544; Andreoli ym. 2000: 807). Hepariini pystyy yhdistymään entsyymeihin, esimerkiksi trypsiiniin ja pepsiiniin sekä mahdollisesti sitoutumaan muiden orgaanisten aineiden kanssa. Hepariinin antikoagulanttinen vaikutus perustuu sen kykyyn sitoutua proteiinin kanssa, jonka seurauksena inhibiittorissa tapahtuu rakennemuutos. Tämä luo komplementaarisen vuorovaikutuksen inhibiittorin ja aktivoituneen hyytymistekijän välillä, jolloin inhibiittori estää hyytymistekijää osallistumasta hyytymisprosessiin. (Angstadt ym. 2002: 685.)

Natrium-fluoridiputkia, joihin usein lisätään kaliumoksalattia, käytetään glukoosin mittauksessa. Natrium-fluoridi estää glykolyysiä sillä se toimii entsyymi-inhibiittorina. (Adeniyj ym. 2012; Bishop – Fody – Schoeff 2010: 45–46; Estridge – Reynolds 2008: 143; McPherson – Pincus 2011: 28). Fluoridi inhiboi entsyymienolaasin, jota löytyy glukoosin aineenvaihduntareitiltä. Tämän seurauksena glykolyysiä ei tapahdu (Adeniyi ym. 2012). Natrium-fluoridilla on myös bakteerien kasvua estäviä vaikutuksia (Adeniyi ym. 2012; Bishop ym. 2010: 45–46).

Graham ja Warren raportoivat vuonna 1950 että hepariini esti *S. aureuksen* ja *E. stewartii* bakteerien kasvua pitoisuuden ollessa 150 U/ml kasvatettaessa niitä proteiinittomalla kasvualustalla. Hepariini ei kuitenkaan vaikuttanut bakteerikasvuun pitoisuuksilla 15–7500 U/ml kasvatettaessa bakteereja aivosydäninfuusiolemessä. Tutkimuksessa tultiin siihen tulokseen, että kasvatusalustan proteiinit vähensivät hepariinin bakteriostaattista (bakteerien kasvua estävää) vaikutusta. (Graham – Warren 1950.)

Hodgesin ja Rosettin tekemässä tutkimuksessa hepariinin todettiin estävän mikrobien kasvua. Hepariinin estovaikutuksen huomattiin olevan riippuvainen kasvualustan ravinteiden minimimäärästä. Tutkijat arvioivat, että hepariinin esto perustunee kasvualustan kationeiden (magnesiumin, kalsiumin tai molempien) vähentämiseen. (Hodges – Rosett 1980.)

Rahn ja Roberts tutkivat vuonna 1946 natrium-fluoridin vaikutusta bakteerikasvuun. Tutkimuksessa todettiin, että natrium-fluoridi itsessään ei ole merkittävästi bakterisidinen (bakteereita tappava) edes 2-prosenttisessä liuoksessa. Se kuitenkin hidasti tutkittavan bakteerin, *S. aureuksen*, kasvua. Natrium-fluoridin bakteerikasvua vähentävä ominaisuus on riippuvainen sen dissosioitumattomista molekyyleistä. NaCl korostaa sen tehoa neutraalissa liuoksessa. (Rahn – Roberts 1946.)

Journal of Paediatrics and Child Health -lehdessä vuonna 2002 julkaistussa artikkelissa "Pseudomonas fluorescens pseudobacteraemia: A cautionary lesson", kirjoittanut Ashhurst-Smith, Norton ja Smith, kuvataan vuosina 1998–1999 Townsvillen sairaalassa esiintynyttä pseudobakteremiaa. 38 potilaalla saatiin veriviljelystä väärä positiivinen tulos *Pseudomonas fluorescens*-bakteerin suhteen. Kun asiaa ruvettiin tutkimaan tarkemmin, havaittiin, että *P. fluorescens* oli lähtöisin kontaminoituneista Li-hepariini veriputkista, jotka oli otettu ennen veriviljelyputkea. (Ashhurst-Smith – Norton – Smith 2002.) Artikkelin perusteella ainakin *P. fluorescens* säilyy elinkykyisenä Li-hepariiniputkessa. Lisäksi tutkimuksesta kävi ilmi, että veriputki ei välttämättä ole steriili, niin kuin bakteerikuljetusputken tulee olla kontaminaation välttämiseksi. Meidän tulikin ottaa huomioon, että mahdollinen kontaminaatio voi olla peräisin myös itse veriputkesta.

Edellä mainitut tutkimukset osoittivat, että litium-hepariinilla ja natrium-fluoridilla on bakteriostaattisia ominaisuuksia. Näin ollen arvioimme, että bakteeripesäkkeiden

määrä kasvatustaljoilla vähenee seisotusaikojen pidentyessä litium-hepariini- ja natrium-fluoridiputkissa. Oletimme, että bakteerikannat säilyvät paremmin seerumiputkessa, joka ei sisällä antikoagulanttia.

4.2 Bakteerien nestekuljetusputki

Bakteriologisten näytteiden säilytyksessä ja kuljetuksessa on perinteisesti käytetty geelikuljetusputkea. Geelikuljetusputki ei kuitenkaan sovellu yleistyviin automaatiolaitteisiin. Siksi on kehitetty nestekuljetusputkia, joista viljelyautomaatti kykenee viljelemään näytteen. (Hilla 2012: 22.) Tietyt bakteerinäytteet ohjeistetaan HUSLABissa ottamaan Copanin valmistamaan eSwab® -nestekuljetusputkeen. Otammekin eSwab® -nestekuljetusputken vertailuputkeksi tutkimukseemme. Tutkimme, oliko bakteerien säilyvyydessä eroa säilytettäessä näytettä verinäyteputkissa verrattuna käytössä olevaan nestekuljetusputkeen. HUSLABilla on käytössään seuraavat nestekuljetusputket: eSwab® 490CE.A (tutkimuksille Ps-Streptococcus, viljely, ja Ps-Bakteeri, viljely) ja eMRSA® 086CE01.A (tutkimukselle Metisilliiniresistentti *Stafylococcus aureus*, viljely) (Bakteerinäytteen nestekuljetusputken käyttö. 2012). Tutkimukseemme valitsimme eSwab® 490CE.A -nestekuljetusputken.

ESwab® (Copan Liquid Amies Elution Swab) on tarkoitettu niin aerobisten, anaerobisten ja vaativien bakteerien kuin myös virusten ja Chlamydiaan näytteenottoon ja kuljetukseen. ESwabia® voidaan käyttää bakteeriviljelyyn sekä antigeeni- ja nukleinihappo-osoitukseen. Copan ESwab® 490CE.A -pakkaus sisältää tarroitetun kierrekorkillisen polypropeeniputken (korkki on väriltään pinkki) sekä nailonkuitupäisen näytteenottotikun. Putkessa on 1ml "Liquid Amies" kuljetusnestettä, jonka tarkoituksena on säilyttää kuljetettavat mikrobit elinkykyisinä. Näytteenottotikun pää on pehmeää nukkamaista nailonkuitua. Nailonkuitu estää mikrobien tunkeutumisen liian syvälle nukan sisälle parantaen mikrobien irtoamista kuljetusnesteeseen. Näytteenoton jälkeen tikku katkaistaan putken sisälle, jolloin mikrobit liukenevat kuljetusnesteeseen. Nesteestä mikrobit voidaan viljellä myös viljelyautomaatilla. Näyte tulisi kuljettaa tutkivaan laboratorioon huoneenlämmössä mahdollisimman pian, mieluiten kahden tunnin kuluessa näytteenotosta. Muussa tapauksessa putkea tulisi säilyttää jääkaappilämpötilassa, jossa mikrobit säilyvät 48 tuntia (poikkeuksena *Neisseria gonorrhoeae*, joka tulisi tutkia 24 tunnin kuluessa näytteenotosta). (Copan Flock Technologies 2012.)

5 Opinnäytetyön tarkoitus ja tutkimusongelmat

Aihe opinnäytetyöhön saatiin HUSLABin kliinisen bakteriologian osastolta. Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia, onko antikoagulanttiputkesta viljellyn näytteen tulos luotettava. Tutkimuksemme perusteella bakteriologian osastolla pystytään tulevaisuudessa paremmin arvioimaan, voidaanko antikoagulanttia sisältäviä koeputkia käyttää. Antikoagulanttien vaikutusta bakteerien tunnistuskelpoisuuteen on tutkittu aikaisemminkin, mutta tutkimuksia, joissa bakteerit olisi viljelty veriputkista, ei löytynyt.

Työssämme oli tarkoitus selvittää, säilyvätkö tavallisesti nivelnesteessä esiintyvät bakteerilajit *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* sekä *Pseudomonas aeruginosa* verinäytteille tarkoitetuissa koeputkissa elävinä. Opinnäytetyössämme tutkimme, vaikuttavatko bakteereille epäsuotuisat kuljetuselinympäristöt, verinäytteenottoon tarkoitetut veriputket, bakteerien selviytymiseen. Jos viljelymaljalla ei ole kasvustoa, on se merkki siitä, että tutkittava bakteeri ei ole säilynyt kyseisessä näytteenottoputkessa.

Työssämme selvitimme, muuttuuko näytteiden bakteeripitoisuus säilyttäessä bakteerilajeja litium-hepariiniputkessa, natrium-fluoridiputkessa, lisääaineettomassa seerumiputkessa tai bakteerien nestekuljetusputkessa. Tutkimuksessa selvitimme myös, vaikuttiko seisotusaika bakteerilajien säilyvyyteen.

Työmme tutkimusongelmat olivat:

- Säilyvätkö bakteerilajit antikoagulanttia sisältävissä putkissa?
- Miten säilytys antikoagulanttiputkissa vaikuttaa bakteerisolujen määrään?
- Onko tutkittavien putkien bakteerikasvussa eroja?

6 Työn toteutus

Työmme oli empiirinen, kvantitatiivinen tutkimus. Empiirisellä tutkimuksella tarkoitetaan soveltavaa tutkimusta, jonka tarkoituksena on tuottaa käytännön tietoa omaperäisellä tiedon etsinnällä. Empiirinen tieto perustuu perustutkimuksen tuloksiin. Saatu tieto on

numeerista, tilastollis-matemaattista. (Holopainen – Pulkkinen 2002: 20–21.) Tutkimustuloksemme esitimme havainnollistavissa kaavioissa ja taulukoissa.

Työmme oli myös kokeellinen tutkimus. Kokeellisessa tutkimuksessa selvitetään tutkitun muuttujan vaikutusta tutkimuskohteeseen vakioiden muut muuttujat. (Heikkilä 2008: 21; Hirsjärvi – Remes – Sajavaara 2010: 134.) Tutkimme tiettyjen bakteerilajien säilyvyyttä neljässä eri koeputkessa tiettyjen säilytysaikojen jälkeen. Tutkimuskohteenamme oli bakteerilajien säilyminen, tutkittavina muuttujina koeputket ja seisotusaika. Vakioimme säilytyslämpötilan (huoneenlämpö), viljelytekniikan ja bakteerinäytteiden pitoisuuden. Opinnäytetyössä käytettiin HUSLABin hankkimia viljelymaljoja, koeputkia ja välineitä. Myös tutkimuksessa käytetyt bakteerilajit saatiin bakteriologian laboratoriosta.

Tapasimme työelämän ohjaajan Reetta Sihvosen ja teimme tapaamisen pohjalta aiheen jäsentelyn. Kevään aikana suunnittelimme opinnäytteen toteuttamisen. Teimme tiedonhakuja opinnäytetyösuunnitelmaa varten internetistä sekä kirjallisuudesta.

Teimme jokaisesta bakteerikannasta bakteerisuspension 0,9 % natriumkloridiin sekä steriiliin veteen, joista siirsimme suspensiota tutkittaviin koeputkiin. Tämän jälkeen koeputkia seisotettiin 0, 6, 24 ja 48 tuntia. Seisotusaikojen jälkeen viljelimme näytteet maljoille. Maljoja kasvatettiin bakteereille suotuisissa oloissa yön yli. Laskimme maljoilla kasvavat bakteeripesäkkeet seuraavana aamuna ja kirjasimme tulokset ylös.

6.1 Esitutkimus

Esitutkimuksessa selvitimme bakteerisuspensioiden solupitoisuudet. Suspension vahvuuden tuli olla sellainen, että maljoille viljeltäessä bakteeripesäkkeitä olisi yli 50 mutta alle 300. Näin ollen tulokset ovat luotettavia pesäkkeiden määrän ollessa vielä laskettavissa. Kasvatusmaljat valitsimme bakteerilajin kasvuvaatimusten mukaan. Esitutkimuksen perusteella valitsimme bakteerisuspensioille seuraavat vahvuudet:

<i>Haemophilus influenzae</i>	$1,5 \times 10^3$ PMY	Suklaamalja
<i>Streptococcus pyogenes</i>	$1,5 \times 10^3$ PMY	Verimalja
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$1,5 \times 10^3$ PMY	Verimalja
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,5 \times 10^4$ PMY	Verimalja
<i>Escherichia coli</i>	$1,5 \times 10^4$ PMY	Cled

*Pseudomonas aeruginosa*1,5 x 10³ PMY

Cled

Esitutkimuksessa testasimme koeasetelmaa *Haemophilus influenzaella* ja *Streptococcus pneumoniaella*. Kuuden tunnin säilytysajan päätyessä lisääineettomassa seerumiputkessa bakteeripesäkkeiden lukumäärä kasvatusmaljoilla oli pudonnut lähes nolnaan, kun taas litium-hepariini- ja natriumfluoridiputkissa bakteereja oli vielä jäljellä. Tämän perusteella ajattelimme, että 0,9 %:lla natriumkloridilla saattaisi olla bakteereja vähentävä vaikutus *Haemophilus influenzaeen* ja *Streptococcus pneumoniaeen*. Päätimme tehdä tutkimuksen käyttämällä bakteerisuspensioliuoksena 0,9 % natriumkloridin lisäksi myös steriiliä vettä, sillä halusimme varmistua siitä, että natriumkloridi ei vaikuttanut bakteerimäärän vähenemiseen. Koko tutkimus toteutettiin siis kahdella suspensioliuoksella: 0,9 % natriumkloridilla sekä steriilillä vedellä. Esitutkimuksen aikana teimme myös työohjeen (liite 6) tutkimuksen kulkua helpottaaksemme.

6.2 Tutkimuksen kulku

Käyttämämme bakteerikannat olivat tunnettuja kontrollikantoja (ks. liite 1), joista teimme 0,5 McFarlandin vahvuisia suspensioita steriiliin veteen tai 0,9 % natriumkloridiin (0,5 McFarland ~ 1.5 x 10⁸ PMY/ml, eli pesäkkeen muodostavaa yksikköä millilitrassa). Taulukossa 2 on kuvattu laimennoksen valmistaminen.

Taulukko 2. Laimennoksen valmistaminen.

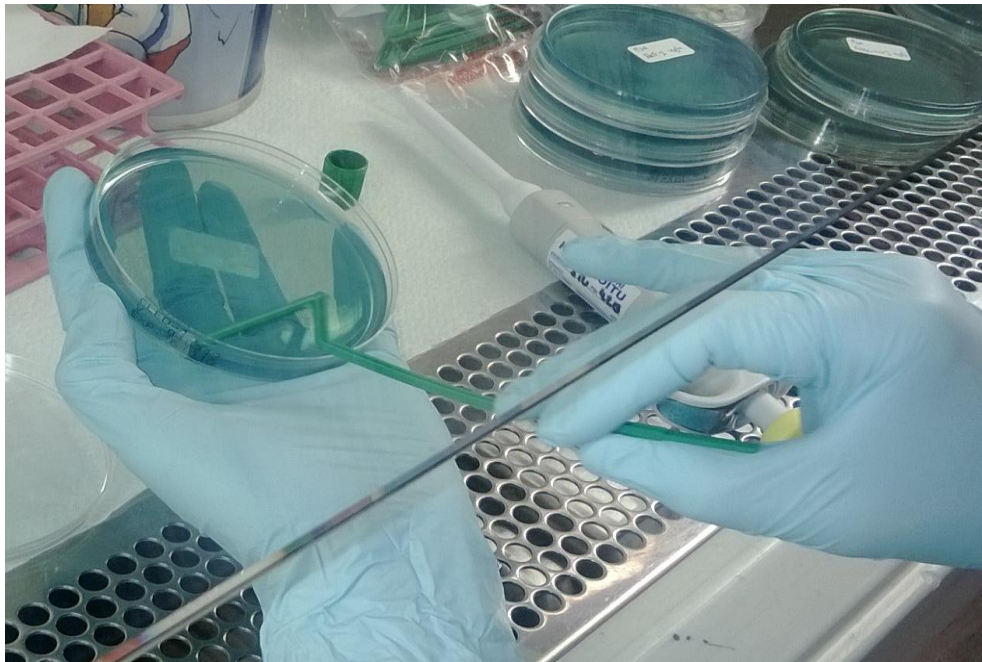
1,5 x 10 ⁷ PMY	1:10	1ml 0,5McFarlandia	9ml 0,9 % NaCl / steriili vesi
1,5 x 10 ⁶ PMY	1:100	1ml 1:10 laimennosta	9ml 0,9 % NaCl / steriili vesi
1,5 x 10 ⁵ PMY	1:1000	1ml 1:100 laimennosta	9ml 0,9 % NaCl / steriili vesi
1,5 x 10 ⁴ PMY	1:10 000	1ml 1:1000 laimennosta	9ml 0,9 % NaCl / steriili vesi
1,5 x 10 ³ PMY	1:100 000	1ml 1:10 000 laimennosta	9ml 0,9 % NaCl / steriili vesi

Laimennoksesta siirrettiin kaksi millilitraa näytettä tutkittaviin putkiin: litium-hepariini, natrium-fluoridi ja seerumiputkeen sekä eSwab® -putkeen. Teimme antikoagulanttia sisältävistä putkista kolme rinnakkaisputkea lisätäksemme tutkimuksen luotettavuutta. Siirrettyämme näytettä putkiin käänntelimme jokaista putkea ensin kahdeksan kertaa ylösalaisin ja vorteksoimme putket lopuksi, jotta näytteet olisivat homogeenisiä ja ettei

korkkiin jäisi säilöntäainetta. Laitoimme näytetikun eSwab® -putkien sisälle valmistajan ohjeiden mukaisesti.

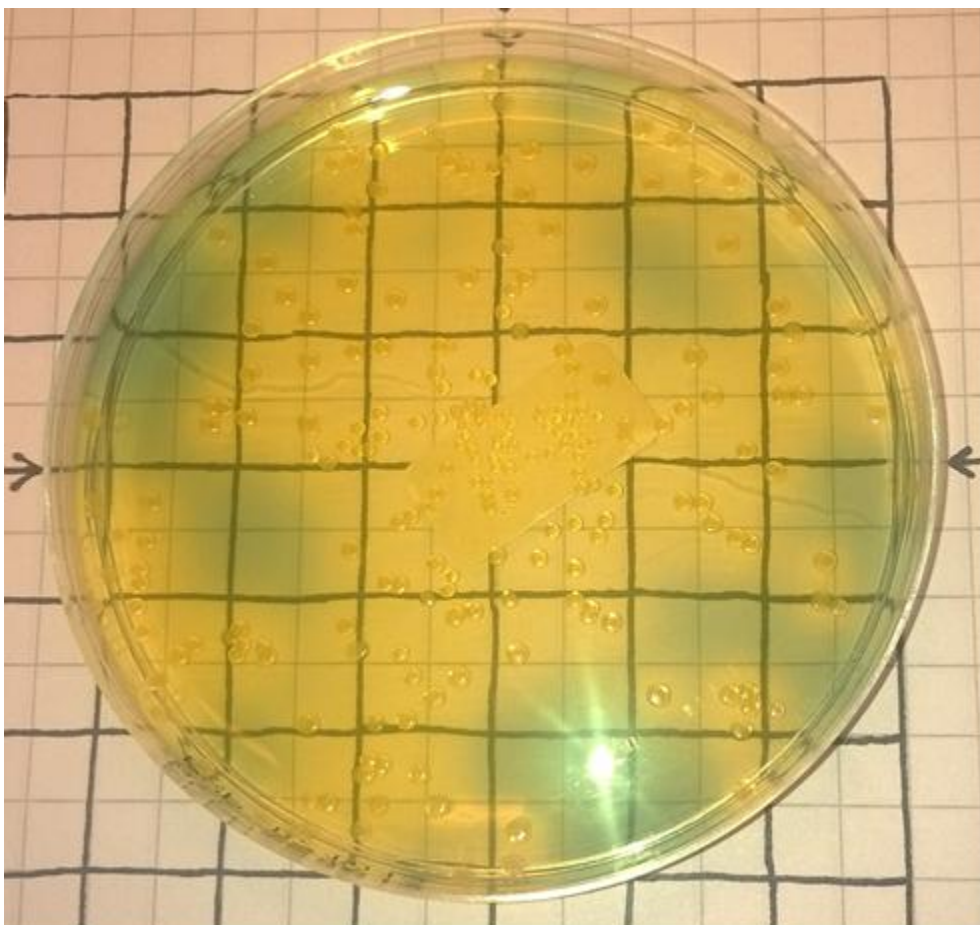
Seisotimme bakteerisuspensiota sisältäviä koeputkia suunnitellun ajan, jonka jälkeen viljelimme putkessa olevan näytteen kasvatusmaljalle. Seisotusajoiksi valitsimme 0 tuntia (= 10 minuuttia), 6 tuntia, 24 tuntia sekä 48 tuntia. Valitsimme kyseiset ajat siksi, että veriputkien kuljetukseen näytteenotto paikasta tutkimuslaboratorioon voi mennä jopa 48 tuntia. Kahden vuorokauden jälkeen näytteenotosta näytteen negatiivinen tulos ei ole enää luotettava. Seisotimme näytteitä huoneenlämmössä, koska näytteet lähetetään yleensä huoneenlämpöisinä.

Seisotuksen jälkeen viljelymaljoille siirrettiin 100 µl näytettä. ESwab® -putkista tehtiin 48 tunnin seisotuksen jälkeen myös kaksi viljelymaljaa, joihin otettiin vain 10 µl. Tämä siksi, että oletimme että eSwab® -putkissa bakteerien määrä saattaa jopa nousta, jolloin bakteeripesäkkeiden laskeminen vaikeutuu. Näytteet viljeltiin L-muotoisella sauvalla (ks. kuvio 1) mahdollisimman tasaisesti viljelymaljoille. Jokainen bakteerilaji viljeltiin vain yhden tyyppiselle elatusmaljalle. Viljelymaljoina käytimme Cled-maljaa, verimaljaa tai suklaamaljaa bakteerin kasvuvaatimuksista riippuen. Viljelyn jälkeen Cled-maljat laitettiin lämpökaappiin ja veri- ja suklaamaljat CO₂-kaappiin +35 celsiusasteeseen kasvamaan yön yli.



Kuvio 1. Viljely L-muotoisella sauvalla

Kasvatuksen jälkeen laskimme bakteeripesäkkeiden määrän koko maljalla. Käytimme laskennassa apuna laskuria ja ruudukkoa (ks. kuvio 2). Laskimme ensimmäiset kymmenen maljaa ristiin (sama malja laskettiin kahteen kertaan eri laskijan toimesta), jolloin varmistuimme siitä että päädyimme samaan tulokseen. Kirjasimme saadut tulokset taulukkoon. Yli 700 laskettu pesäkemäärä merkittiin taulukkoon >700. Tulokset on kirjattu liitteeseen 5. ESwab® -putken lopputilavuudeksi tulee kahden millilitran bakteerisuspension lisäämisen jälkeen kolme millilitraa. ESwab® -putkien eri tilavuus huomioitiin kertomalla pesäkkeiden lukumäärä kertoimella 1,5. Tulostaulukkoihin merkityt bakteeripesäkkeiden määrät on kerrottu eSwabin osalta kertoimella 1,5.



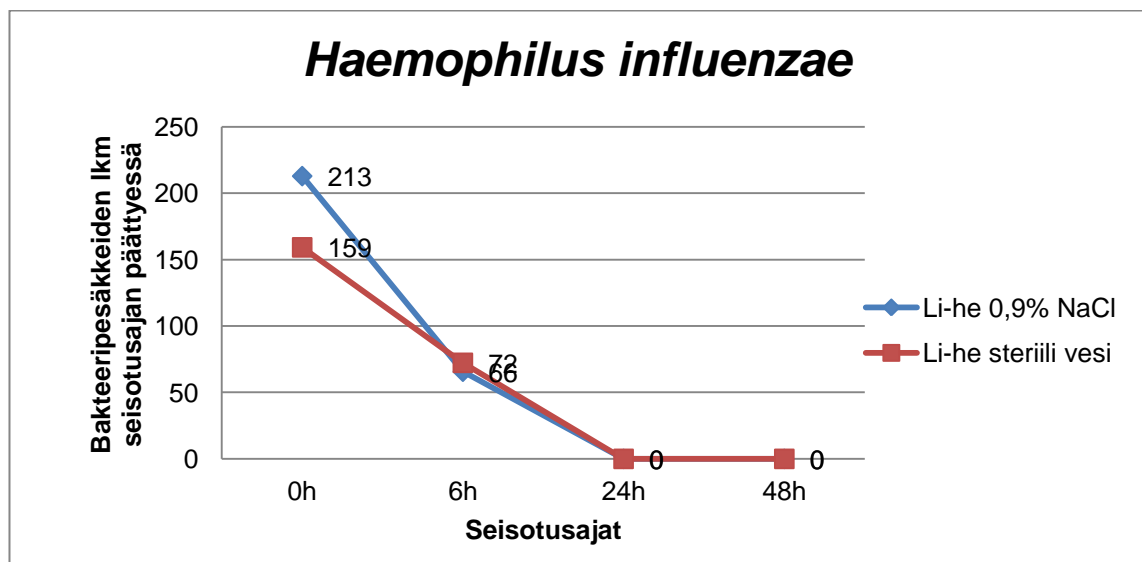
Kuvio 2. Bakteeripesäkkeiden lukuruudukko

7 Tulokset

Esitämme tulokset bakteerilajeittain. Tulokset on taulukoituna tutkittavien putkien mukaan. Bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä on esitetty kaavioina.

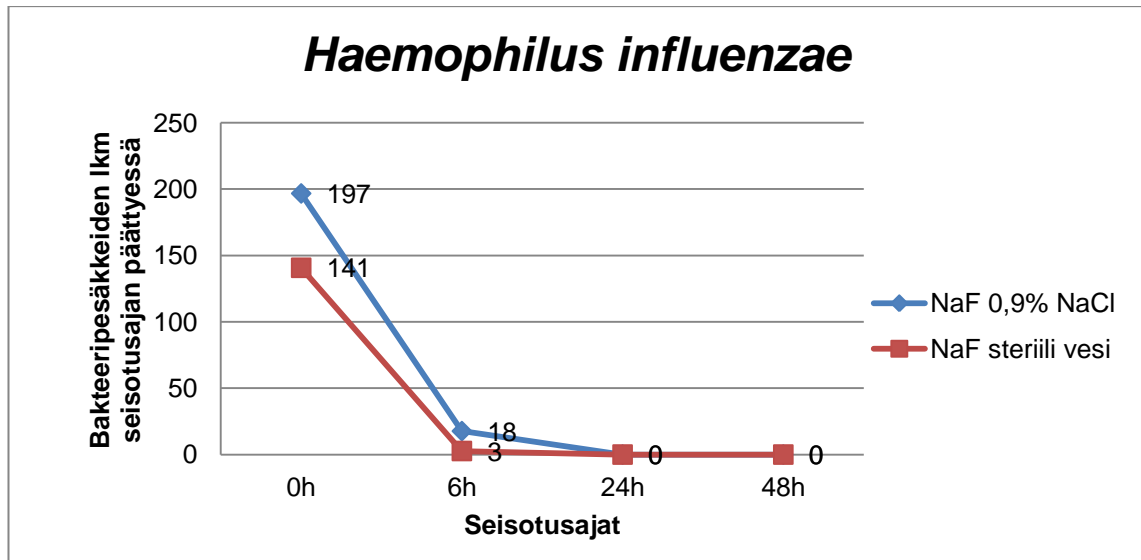
7.1 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae bakteeripitoisuus laskee huomattavasti litium-hepariiniputkessa. Jo kuuden tunnin kohdalla bakteeripitoisuus on laskenut yli 55 % (liite 6 taulukko 3). Litium-hepariiniputkessa bakteeria ei ole enää jäljellä (0 pesäkettä) 24 tunnin seisotuksen jälkeen (kuvio 3). Bakteeri säilyy samalla tavalla huolimatta siitä, onko bakteerisuspensioliuoksena käytetty 0,9 % natriumkloridia tai steriiliä vettä.



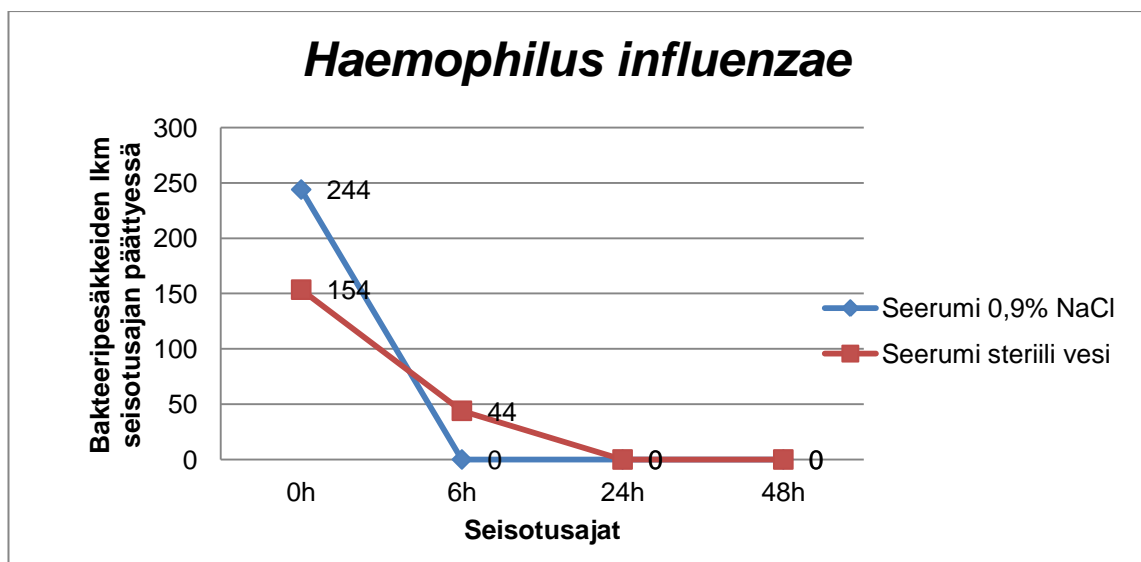
Kuvio 3. *Haemophilus influenzae* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä litium-hepariiniputkessa.

Natrium-fluoridiputkessa *Haemophilus influenzae* bakteeripitoisuus laskee rajusti (-81,4 % lähtötasoon verrattuna) jo kuuden tunnin jälkeen (liite 6 taulukko 3). Bakteeria ei ole enää jäljellä 24 tunnin seisotuksen jälkeen (kuvio 4). Bakteeri säilyy samansuuntaisesti sekä 0,9 % natriumkloridissa että steriilissä vedessä.



Kuvio 4. *Haemophilus influenzae* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä natrium-fluoridiputkessa.

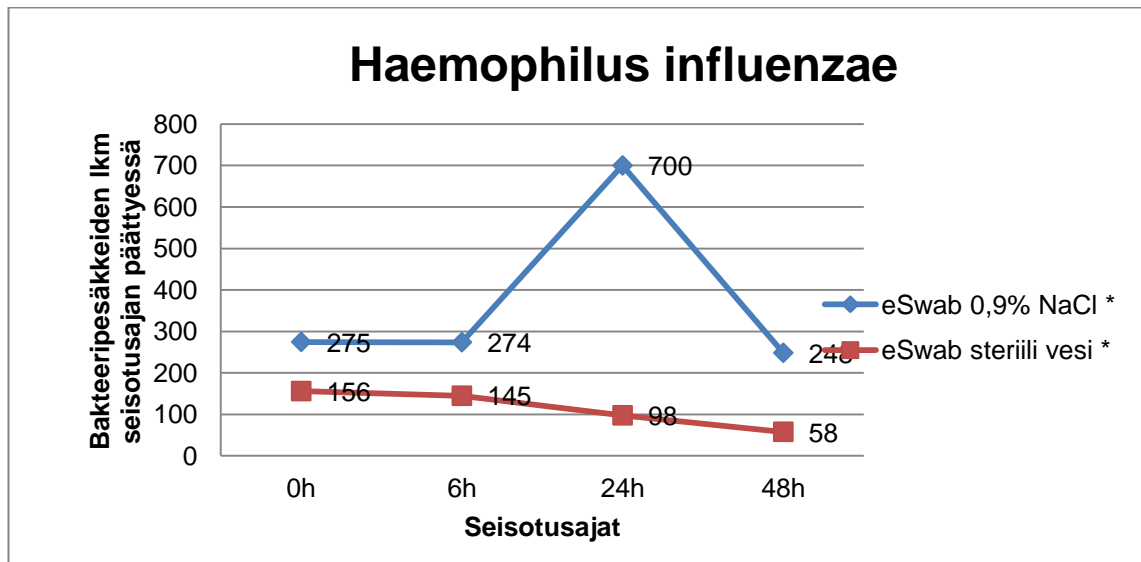
Seerumiputkessa *Haemophilus influenzae* ei säily edes kuutta tuntia käytettäessä bakteerisuspensioliuoksena 0,9 % natriumkloridia (liite 6 taulukko 3). Steriilissä vedessä muutos kuuden tunnin kohdalla lähtötasoon verrattuna on -71,4 %. 24 tunnin seisotuksen jälkeen bakteeria ei ole enää jäljellä edes steriilissä vedessä (kuvio 5).



Kuvio 5. *Haemophilus influenzae* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä seerumiputkessa.

ESwab® -putkessa käytettäessä bakteerisuspensioliuoksessa steriiliä vettä bakteerin määrä vähenee jonkin verran, mutta 48 tunnin seisotuksen jälkeen bakteereista on

jäljellä vielä 46,5 %. 0,9 % natriumkloridiin tehdyssä bakteerisuspensiossa eSwab® -putkessa bakteerien määrä pysyy kuuteen tuntiin saakka lähes samana lähtötasoon verrattuna, mutta 24 tunnin jälkeen bakteerien määrä on noussut yli 153,3 %. 48 tunnin seisotuksen jälkeen bakteeripitoisuus on laskenut -9,8 % lähtötason alapuolelle. Kuviossa 4 huomataan, että bakteerien määrä putkessa laskee loivemmin kuin veriputkissa. Bakteeri kuitenkin säilyi eSwab® -putkessa jopa 48 tuntia.



Kuvio 6. *Haemophilus influenzae* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä eSwab® -putkessa.

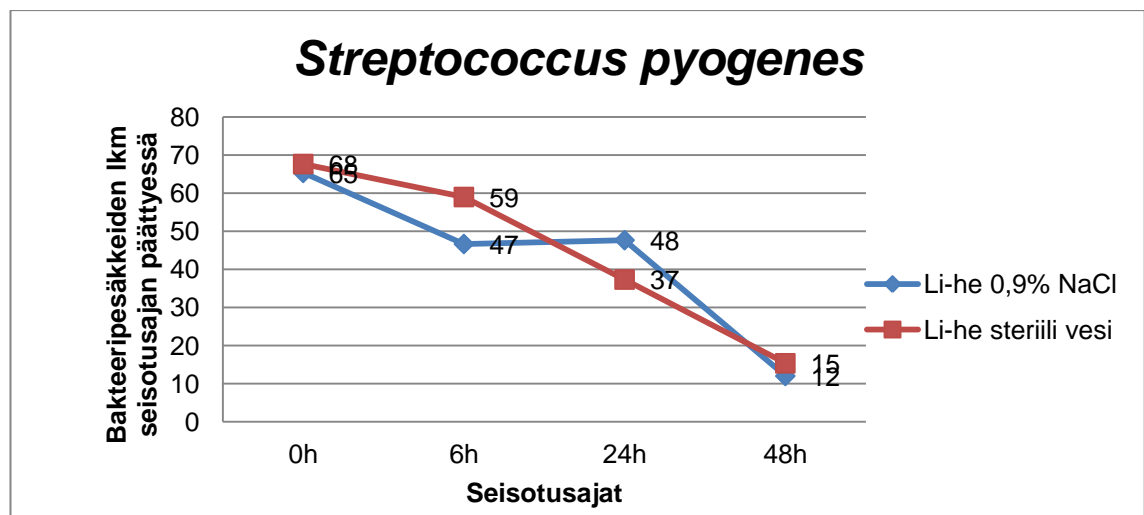
Haemophilus influenzae bakteeripitoisuus laskee johdonmukaisesti jokaisessa tutkittavassa veriputkessa. Taulukosta 3 (liite 6) nähdään, että kaikissa veriputkissa on tapahtunut kuuden tunnin jälkeen yli -50 %:n muutos verrattuna lähtötasoon (0 h) ja 24 tunnin kuluttua bakteerien määrä on laskenut nolnaan eli kaikki bakteerit ovat kuolleet. Kuvioista 3–5 nähdään samansuuntainen laskeva muutos bakteeripesäkkeiden määrässä.

7.2 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes pitoisuus kaikissa veriputkissa vähenee lähes nolnaan 48 tunnin seisotuksen jälkeen. Bakteerisuspension koostumuksella (0,9 % NaCl / steriili vesi) ei näyttänyt olevan huomattavaa vaikutusta bakteerien säilymiseen veriputkissa vaan bakteerimäärä on laskenut tasaisesti sekä 0,9 % natriumkloridissa että steriilissä

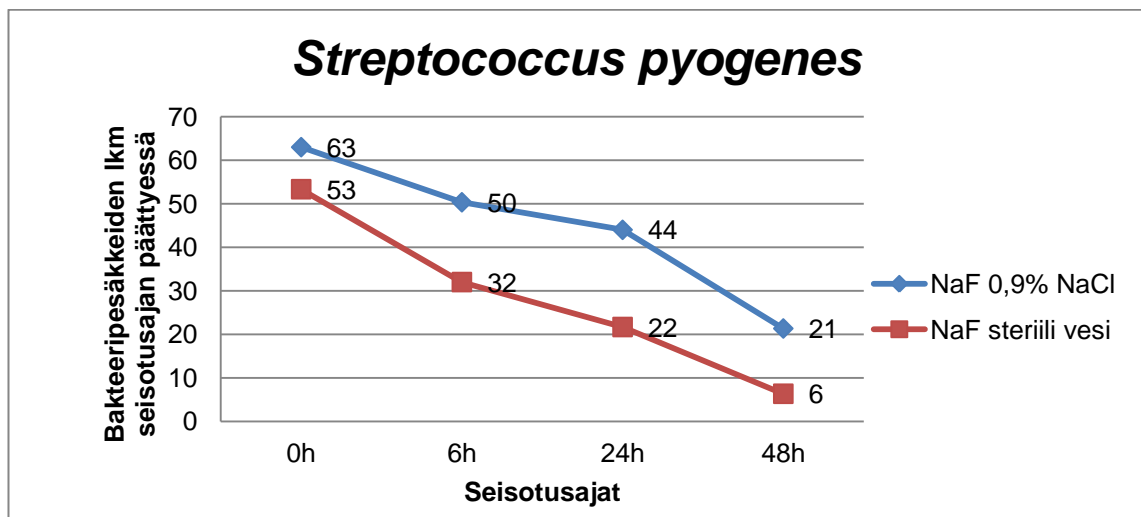
vedessä seisotusajan edetessä. Kuvioissa 7–9 huomataan, että *Str. pyogenesin* määrä vähenee melko lineaarisesti.

Lyhyellä aikavälillä (0–6 h) *Str. pyogenes* vaikuttaisi säilyvän hyvin litium-hepariiniputkessa. Kuuden tunnin kohdalla (0,9 % natriumkloridi) bakteerisuspensiopitoisuudesta on jäljellä 69,7 % alkuperäisestä pitoisuudesta (liite 6 taulukko 4). Käytettäessä 0,9 % natriumkloridia bakteerisuspensioliuksena *Str. pyogenesin* määrä on pysynyt tasaisena kuuden ja 24 tunnin välillä, jonka jälkeen bakteerin määrä on lähtenyt taas laskuun. 48 tunnin seisotuksen (0,9 % natriumkloridi) jälkeen bakteeripitoisuudesta on jäljellä vain 18,2 % alkuperäisestä pitoisuudesta. *Str. pyogenesin* säilyvyydessä ei ole suurta eroa käytettäessä bakteerisuspensioliuksena 0,9 % natriumkloridia tai steriiliä vettä.



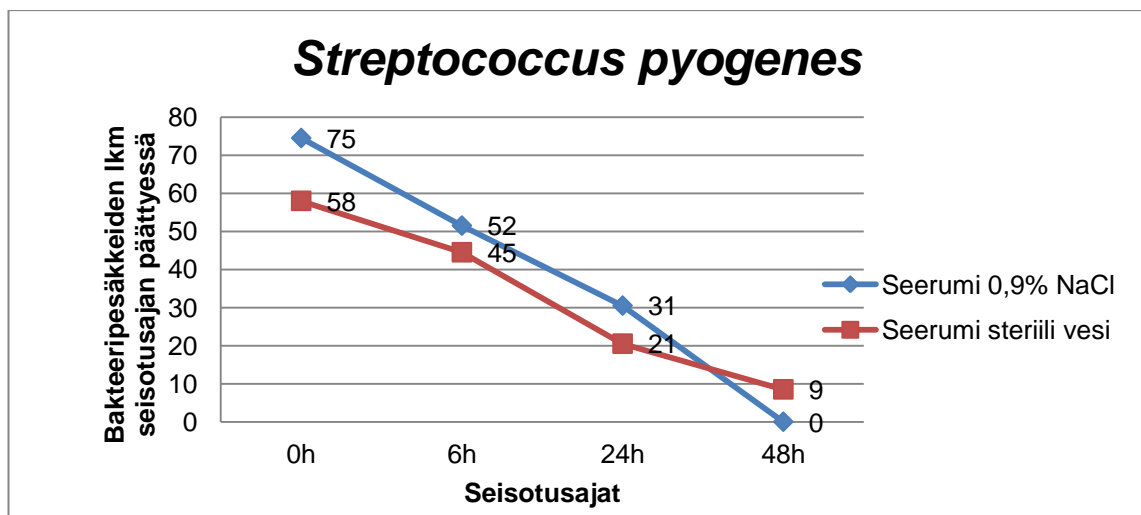
Kuvio 7. *Streptococcus pyogenesin* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä litium-hepariiniputkessa.

Kuuden tunnin jälkeen *Streptococcus pyogenesin* pitoisuus natrium-fluoridiputkessa käytettäessä bakteerisuspensioliuksena 0,9 % natriumkloridia on laskenut vajaat 22 % (liite 6 taulukko 4). Käytettäessä suspensioliuksena steriiliä vettä *Str. pyogenes* pitoisuuden väheneminen on melko lineaarista (kuvio 8). Bakteeripitoisuus laskee hieman jyrkemmin ja 48 tuntiin mennessä bakteeripesäkkeitä on jäljellä kuusi. Bakteeripitoisuuden muutos lähtötasoon on tällöin melkein 89 %. Pitkällä aikavälillä (48 h) natrium-fluoridiputkessa on eniten bakteereja jäljellä verrattuna muihin veriputkiin: bakteereja on jäljellä 34,4 % lähtötasosta käytettäessä suspensioliuksena 0,9 % natriumkloridia.



Kuvio 8. *Streptococcus pyogenesin* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä natrium-fluoridiputkessa.

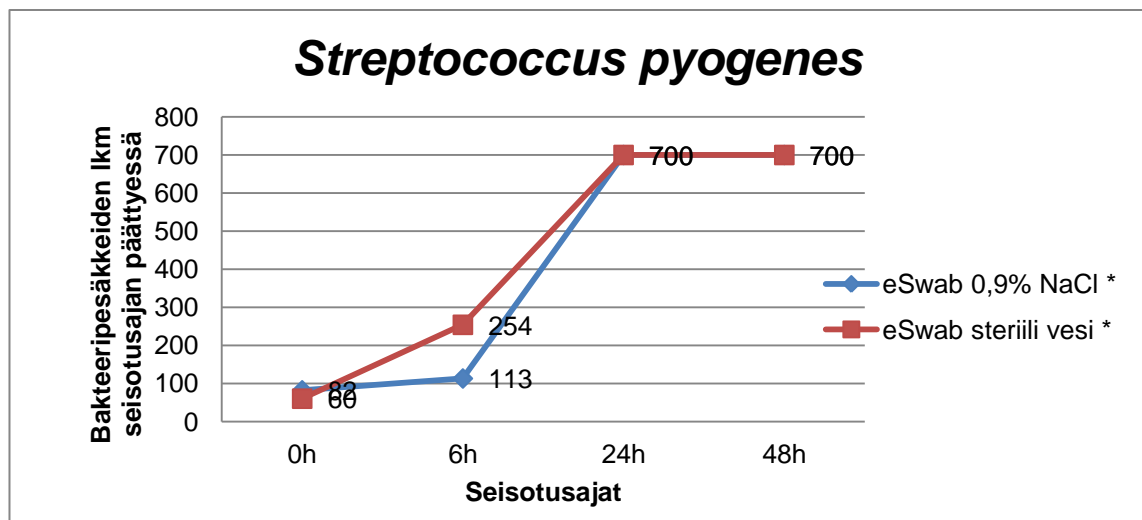
Str. pyogenesin määrä seerumiputkessa vähenee melko lineaarisesti. Kuuden tunnin kohdalla pitoisuuden muutos lähtöarvoon sekä steriilissä vedessä että 0,9 % natriumkloridissa on maltillista: 24,1–29,7 % (liite 6 taulukko 4). Ainoastaan seerumiputkessa bakteerin määrä on vähentynyt 48 tunnin seisotuksen jälkeen noltaan (0,9 % natriumkloridi, kuvio 9).



Kuvio 9. *Streptococcus pyogenesin* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä seerumiputkessa.

Str. pyogenesin määrä moninkertaistuu eSwab® -putkessa 24 tunnin seisotuksen kohdalla. Kuviossa 8 nähdään, että *Streptococcus pyogenesin* määrä eSwab® -

putkessa nousee jo kuuden tunnin seisotuksen jälkeen. 24 tunnin seisotuksen jälkeen bakteeripesäkkeitä on kasvatusmaljalla jo yli 700 (kuvio 10).

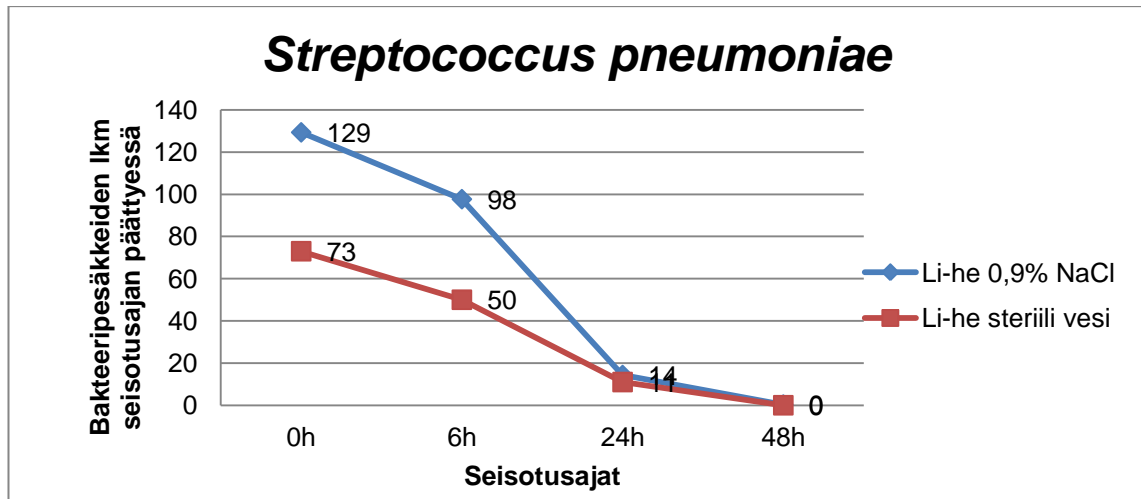


Kuvio 10. *Streptococcus pyogenes*in bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päätyttyä eSwab® -putkessa.

7.3 *Streptococcus pneumoniae*

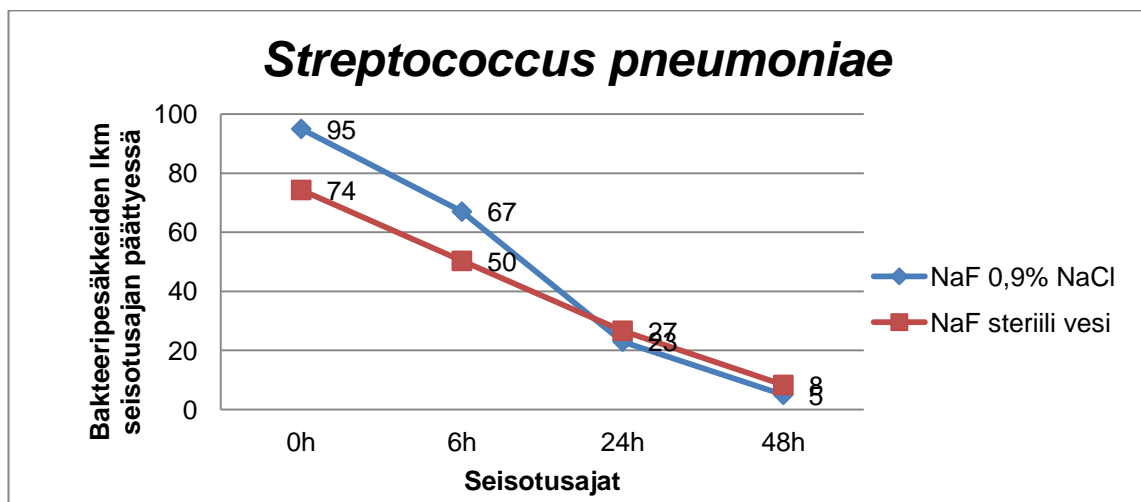
Streptococcus pneumoniae säilyy huonosti veriputkissa pidemmällä aikavälillä (liite 6 taulukko 5). *Str. pneumoniae*n määrä laskee kaikissa veriputkissa (kuviot 11–13). 24 tunnin seisotuksen jälkeen bakteerin määrä on vähentynyt huomattavasti (64,9–100 %) kaikissa veriputkissa. Lasku on tasaisempaa käytettäessä bakteerisuspensioliuksena steriiliä vettä kuin 0,9 % natriumkloridia. Steriilissä vedessä bakteeripesäkkeiden määrä on 24 tunnin kohdalla kaikissa veriputkissa samaa luokkaa (14–27 pesäkettä, kuvio 11–13).

*Str. pneumoniae*n pitoisuuden väheneminen litium-hepariiniputkessa on kuuden tunnin kohdalla ollut maltillista, 29–32 % (liite 6 taulukko 5). Kuuden ja 24 tunnin välillä bakteeripitoisuuden lasku on jyrkempää: 0,9 % natriumkloridissa muutos lähtötasoon on -89,2 % ja steriilissä vedessä -83,8 %. 48 tunnin kohdalla bakteeri on kuollut molemmissa suspensioliuksissa (kuvio 11).



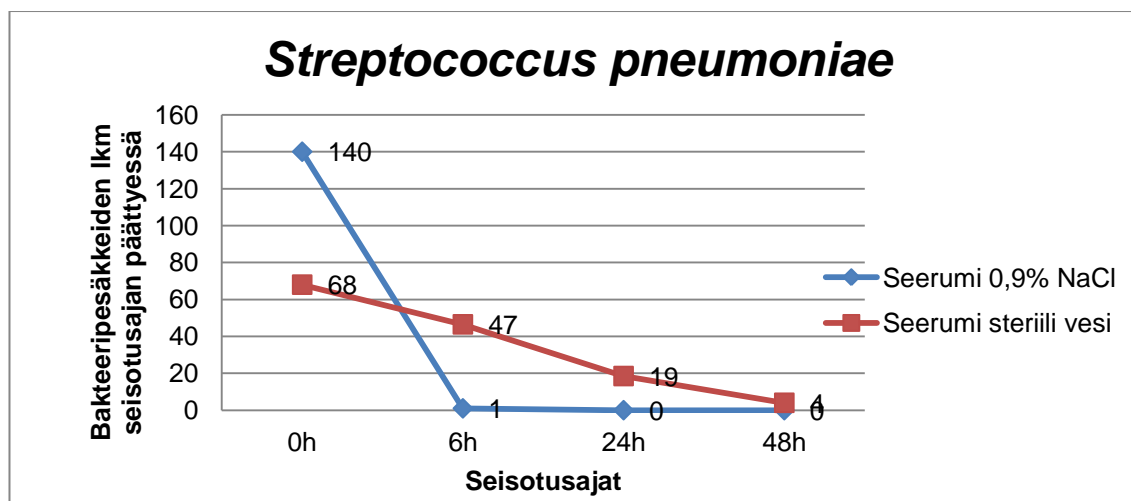
Kuvio 11. *Streptococcus pneumoniae*n bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä litium-hepariiniputkessa.

Natrium-fluoridiputkessa kuuden tunnin jälkeen käytettäessä bakteerisuspensioliuoksena 0,9 % natriumkloridia *Str. pneumoniae*n pitoisuus lähtötasoon verrattuna on laskenut 29,2 %. Steriilissä vedessä muutos on -32,4 % (liite 6 taulukko 5). Bakteeripesäkkeiden määrä laskee melko lineaarisesti sekä steriilissä vedessä että 0,9 % natriumkloridista tehdyssä suspensiossa. 24 tunnin kohdalla bakteeripesäkkeiden määrä on 0,9 % natriumkloridissa ja steriilissä vedessä laskenut melko samalle tasolle (kuvio 12). Natrium-fluoridiputkessa bakteereja on jäljellä 6,2–10,8 % alkuperäisestä pitoisuudesta 48 tunnin kohdalla.



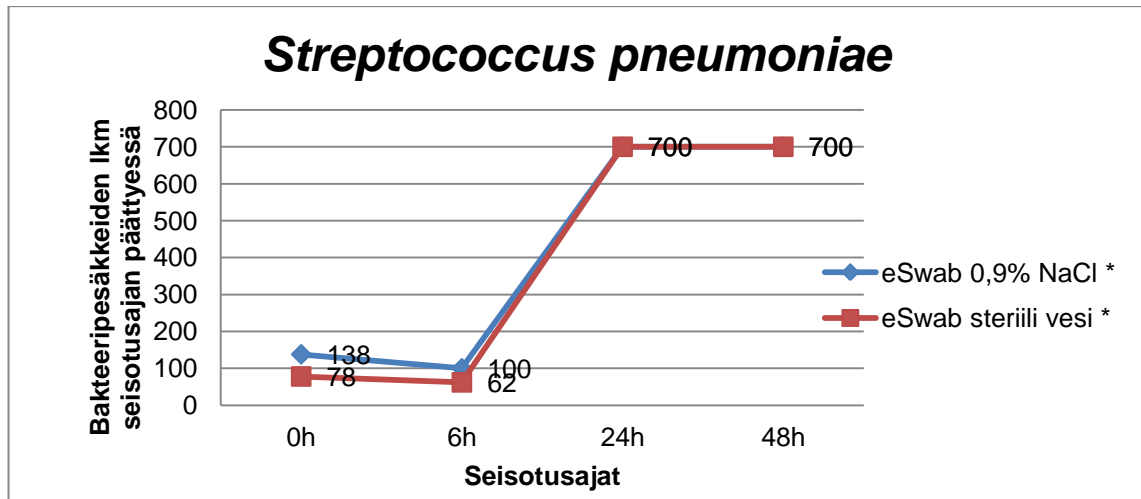
Kuvio 12. *Streptococcus pneumoniae*n bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä natrium-fluoridiputkessa.

Str. pneumoniae bakteeripesäkkeiden väheneminen on tasaisempaa käytettäessä bakteerisuspensioliuoksena steriiliä vettä kuin 0,9 % natriumkloridia (kuvio 13). Kuuden tunnin jälkeen bakteeri on lähes kokonaan kuollut 0,9 % natriumkloridissa, kun taas steriilissä vedessä bakteeria on jäljellä 67,6 % (liite 6 taulukko 5). 24 tunnin kohdalla steriilissä vedessä bakteeripitoisuuden muutos on lähtötasosta -73,5 %. Bakteeripitoisuus seerumiputkessa on laskenut steriilissä vedessä 48 tunnin seisotuksen jälkeen lähes nolnaan.



Kuvio 13. *Streptococcus pneumoniae* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä seerumiputkessa.

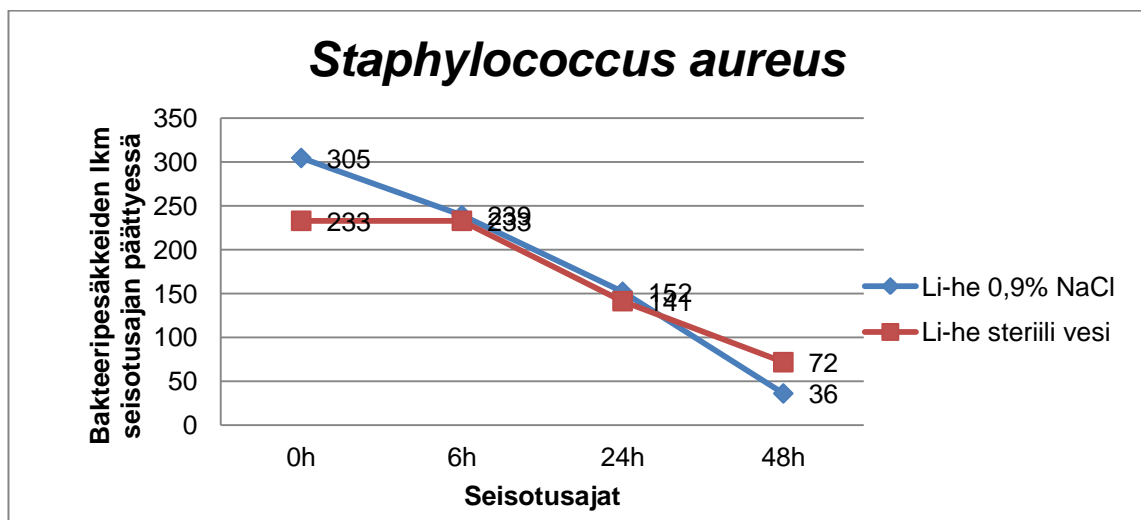
ESwab® -putkessa bakteerin määrä laskee kuuden tunnin kohdalla hieman (19,2–28,3 %) mutta lähtee 24 tunnin kohdalla nousemaan. ESwab® -putkessa bakteerin määrä nousee eksponentiaalisesti 6 tunnin jälkeen. Bakteeripesäkkeiden määrää kuvaava käyrä on samanlainen sekä 0,9 % natriumkloridiin että steriiliin veteen tehdystä suspensiossa (kuvio 14).



Kuvio 14. *Streptococcus pneumoniae*en bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä eSwab® -putkessa.

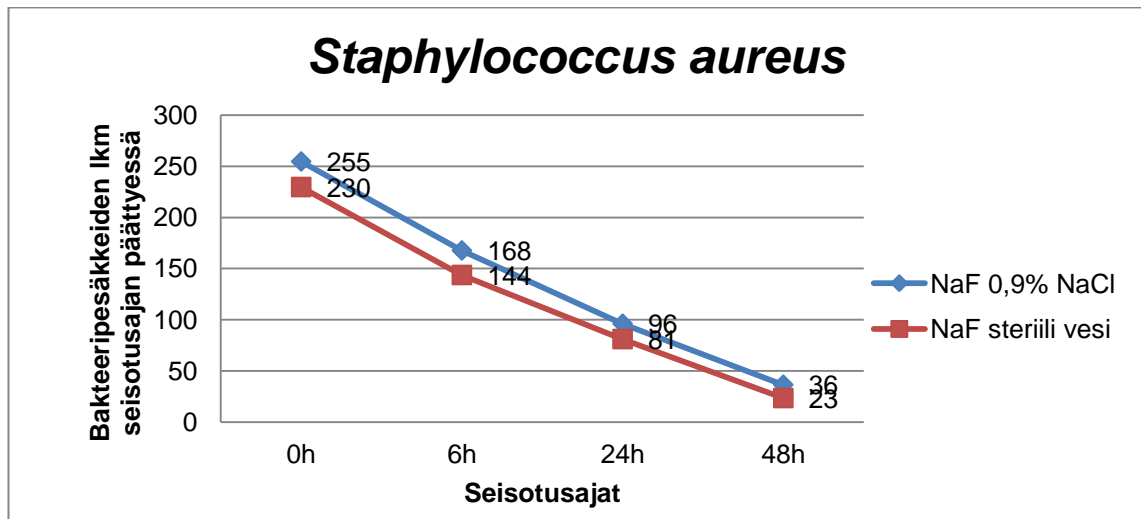
7.4 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus*en pitoisuus litium-hepariiniputkessa on lähtenyt laskemaan heti kuuden tunnin kohdalla käytettäessä bakteerisuspensioliuoksena 0,9 % natriumkloridia. Steriilissä vedessä bakteeripitoisuus on 0–6 h välillä säilynyt muuttumattomana (kuvio 15). Muutoin muutos on hyvin yhteneväistä eikä steriilin veden ja 0,9 % natriumkloridin välillä ei ole suurtakaan eroa (liite 6 taulukko 6). Litium-hepariiniputkessa *S. aureus*ta on jäljellä vielä 48 tunnin seisotuksen jälkeen.



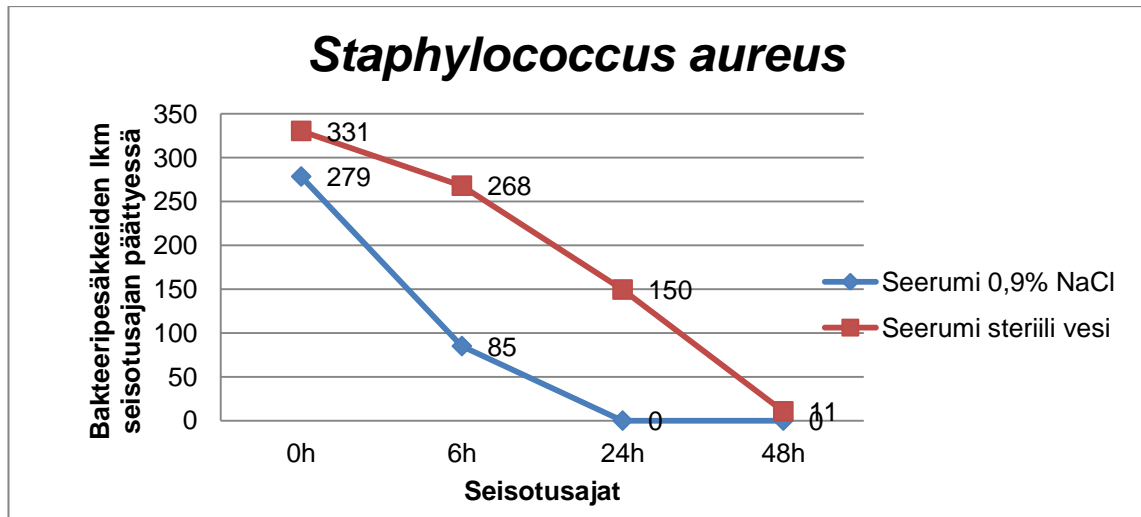
Kuvio 15. *Staphylococcus aureus*en bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä litium-hepariiniputkessa.

Natrium-fluoridiputkessa *Staphylococcus aureuksen* pitoisuus on lähtenyt laskemaan jo kuuden tunnin kohdalla (liite 6 taulukko 6). Steriilin veden ja 0,9 % natriumkloridin välillä ei ole juurikaan eroa ja muutos on lähes lineaarista (kuvio 16). Natrium-fluoridiputkessa *S. aureusta* on jäljellä 48 tunnin seisotuksen jälkeen 0,9 % natriumkloridiin tehdyssä suspensiossa 14,2 % ja steriiliin veteen tehdyssä suspensiossa 10 %.



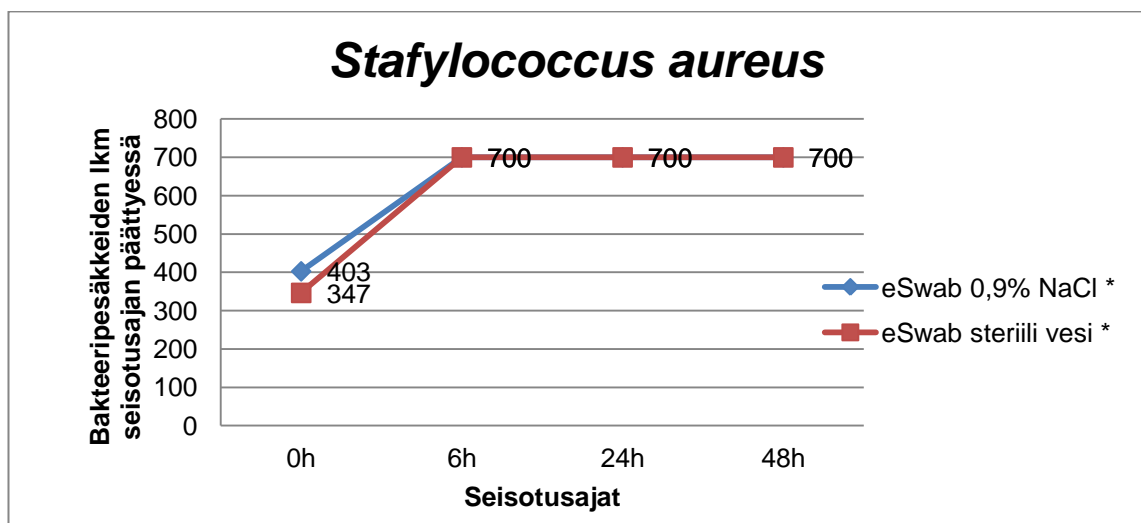
Kuvio 16. *Staphylococcus aureuksen* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä natrium-fluoridiputkessa.

Staphylococcus aureuksen pitoisuus seerumiputkessa laskee jo kuuden tunnin kohdalla (liite 6 taulukko 6). Seerumiputkessa *S. aureus* on säilynyt paremmin steriilissä vedessä kuin 0,9 % natriumkloridissa. Seerumiputkessa 0,9 % natriumkloridiin ja steriiliin veteen tehdyssä suspensiossa käyrät eroavat selvästi (kuvio 17); 24 tunnin kohdalla bakteerin määrä on laskenut steriilissä vedessä 54,5 %, kun taas 0,9 % natriumkloridissa bakteeria ei ole jäljellä lainkaan (-100 %). 48 tunnin seisotuksen jälkeen seerumiputkessa bakteeri on kuollut myös steriilissä vedessä.



Kuvio 17. *Staphylococcus aureuksen* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä seerumiputkessa.

ESwab® -putkesta viljeltäessä *S. aureus* bakteeripesäkkeitä on maljalla kuuden tunnin seisotuksen jälkeen jo yli 700. Bakteeripesäkkeiden määrä pysyy korkeana 48 tunnin jälkeenkin (kuvio 18).

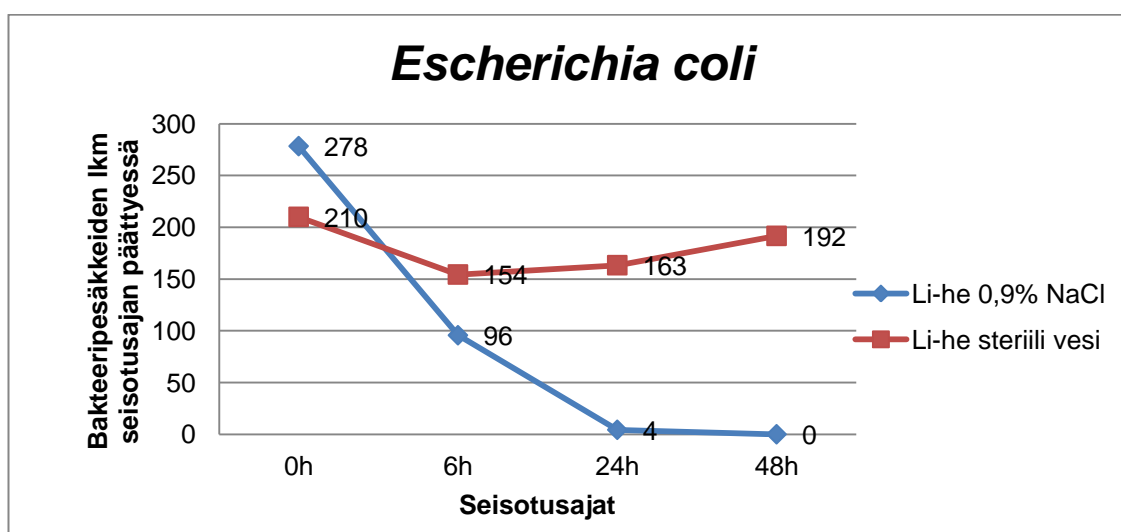


Kuvio 18. *Staphylococcus aureuksen* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä eSwab® -putkessa.

7.5 *Escherichia coli*

E.coli on säilynyt tutkimusputkissa vaihtelevasti. 0,9 % natriumkloridiin tehdystä suspensiossa bakteerin määrä laskee seisotuksen myötä kaikissa veriputkissa.

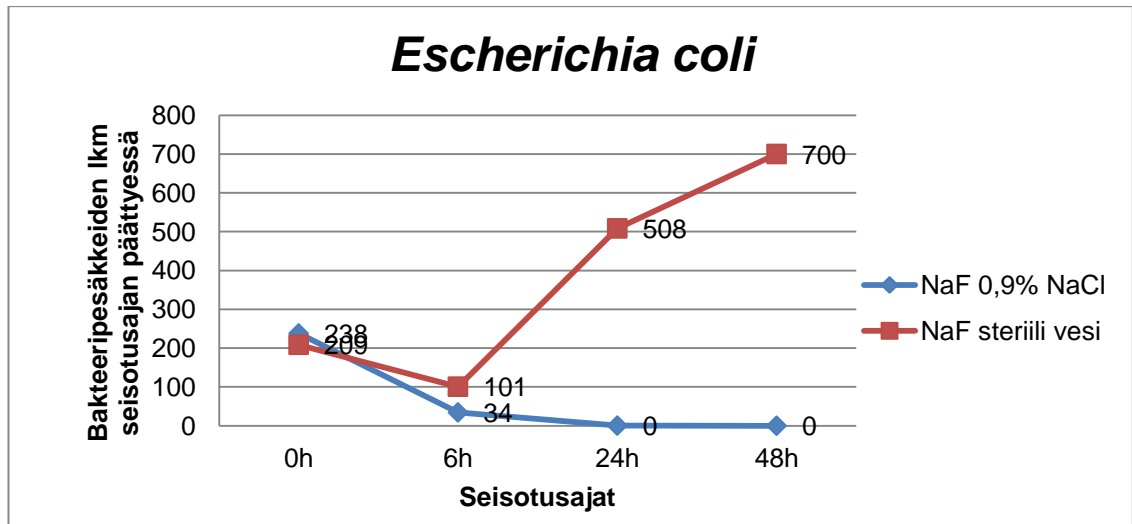
Litium-hepariiniputkessa (käytettäessä suspensioliuoksena steriiliä vettä) bakteeripitoisuus on kuuden tunnin kohdalla laskenut -26,7 %, jonka jälkeen bakteeripitoisuus nousee lähemmäs lähtötasoa. 48 tunnin jälkeen bakteeria on jäljellä 91,4 % lähtötasosta. Litium-hepariiniputkessa (0,9 % natriumkloridissa) bakteeripitoisuus on laskenut rajusti (-65,5 %) jo kuuden tunnin jälkeen (liite 6 taulukko 7). 24 tunnin jälkeen bakteeria on jäljellä 1,4 % lähtötasosta, ja 48 tunnin jälkeen bakteeria ei ole enää jäljellä lainkaan (kuvio 19).



Kuvio 19. *Escherichia coli* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päätyessä litium-hepariiniputkessa.

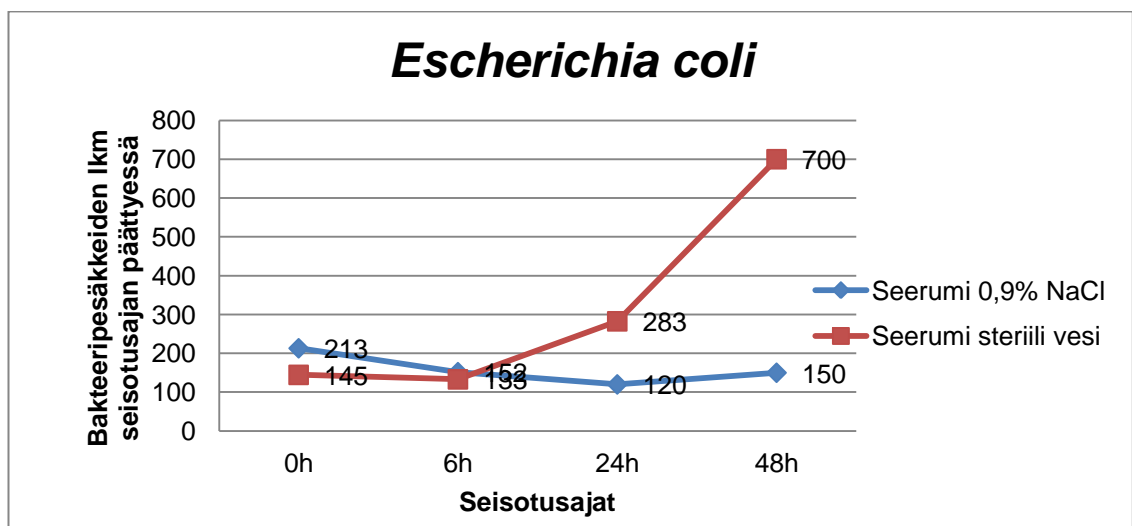
Natrium-fluoridi- ja seerumiputkessa on havaittavissa samankaltaisia muutoksia steriilin veden ja 0,9 % natriumkloridin välillä. Kuvioista (20–21) huomataan, että seerumi- ja natrium-fluoridiputkessa steriilissä vedessä *E. coli* rikastuu.

Natrium-fluoridissa sekä steriilissä vedessä että 0,9 % natriumkloridissa bakteerin määrä laskee aluksi. Muutos kuuden tunnin kohdalla on steriilissä vedessä -51,9 % ja 0,9 % natriumkloridissa -85,7 %. 24 tunnin jälkeen bakteerin määrä on steriilissä vedessä noussut lähtötason yläpuolelle (+144,2 %), kun taas 0,9 % natriumkloridissa bakteeri on lähes täysin hävinnyt (-99,9 %). Steriilissä vedessä bakteeripesäkkeiden määrä viljelymaljalla on 48 tunnin kohdalla yli 700 (kuvio 20).



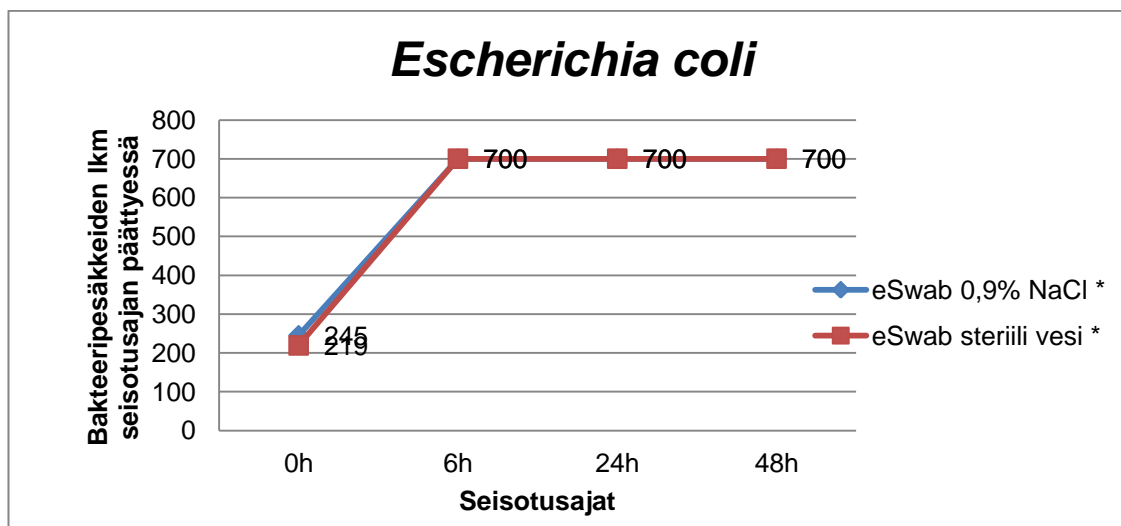
Kuvio 20. *Escherichia coli* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä natriumfluoridiputkessa.

E. coli säilyy ainoastaan seerumiputkessa 0,9 % natriumkloridiliuokseen tehdyssä suspensiossa koko 48 tunnin seisotuksen ajan. Seerumiputkessa *E. coli* pitoisuus laskee kuuden tunnin kohdalla sekä steriilissä vedessä 29,0 % ja 0,9 % natriumkloridissa 6,9 % (liite 6 taulukko 7). Bakteeripitoisuus nousee steriilissä vedessä kuuden tunnin jälkeen (kuvio 21), kun taas 0,9 % natriumkloridissa se laskee edelleen 14,9 prosenttiyksikköä. 24 tunnin jälkeen bakteeripitoisuus nousee 0,9 % natriumkloridissakin. 48 tunnin kohdalla steriilissä vedessä bakteeripitoisuus on jo +386,1 % ja 0,9 % natriumkloridissa -29,9 % lähtötasosta.



Kuvio 21. *Escherichia coli* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä seerumiputkessa.

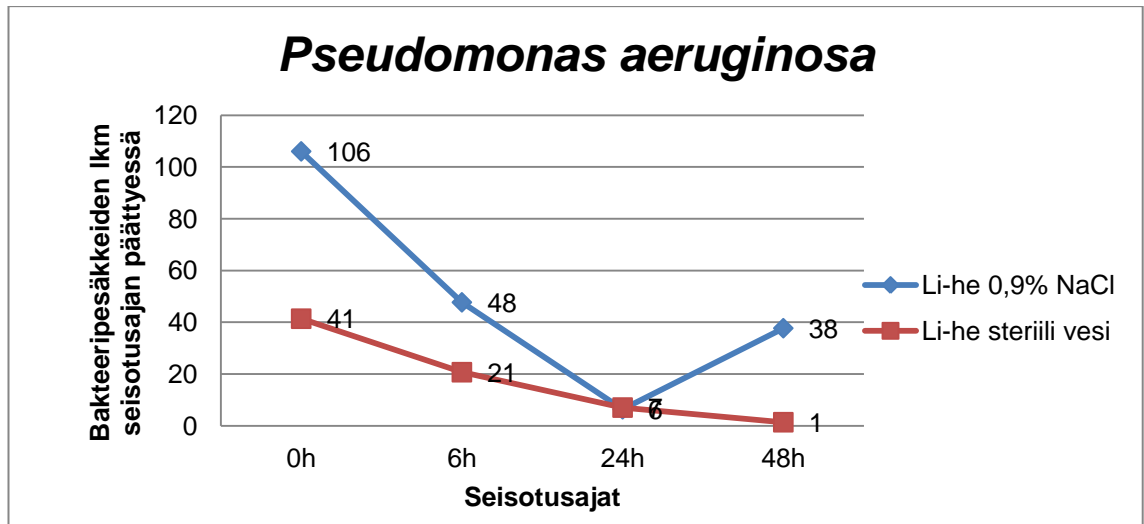
ESwab® -putkessa bakteeripesäkkeiden määrä on jo kuuden tunnin kohdalla yli 700 sekä 0,9 % natriumkloridissa että steriilissä vedessä ja pysyy korkeana 48 tuntiin saakka (kuvio 22). Bakteeripitoisuus on noussut eksponentiaalisesti seisotuksen alusta kuuteen tuntiin mennessä.



Kuvio 22. *Escherichia coli* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä eSwab® -putkessa.

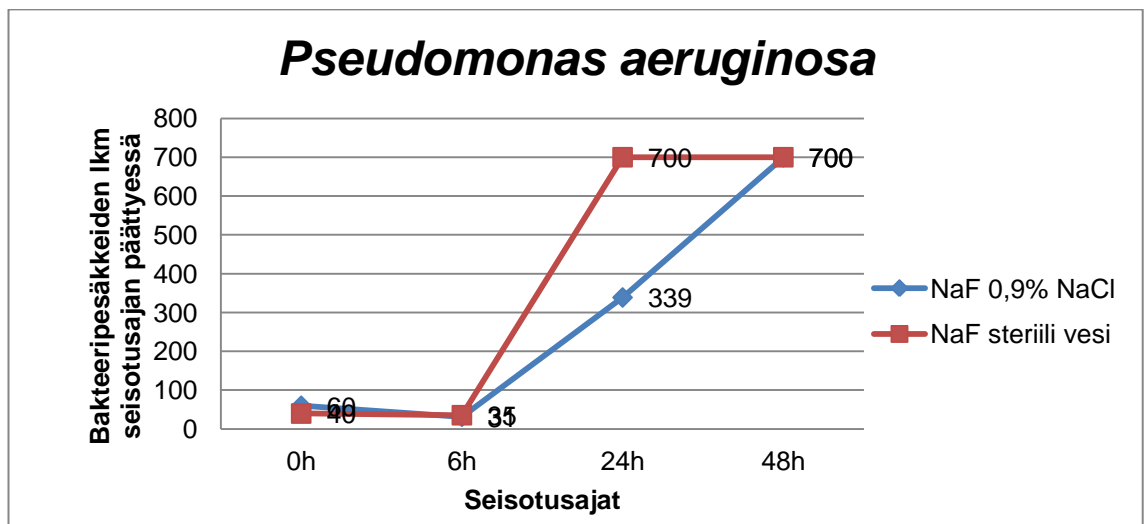
7.6 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa*n pitoisuus laskee litium-hepariiniputkessa. Kuviosta 23 huomataan, että litium-hepariiniputkessa steriilin veden tulostykäyrä on loivempi kuin 0,9 % natriumkloridin. 24 tunnin kohdalla *P. aeruginosa*a on steriiliin veteen tehdystä suspensiossa jäljellä 19 % lähtöarvosta ja 0,9 % natriumkloridiin tehdystä suspensiossa 5,7 % (liite 6 taulukko 8). 48 tunnin kuluttua jälkeen steriiliin veteen tehdystä suspensiossa bakteerin määrä on laskenut edelleen (-95,2 % eli lähes nolnaan), kun taas 0,9 % natriumkloridiin tehdystä suspensiossa bakteerin määrä nousee miltei kuuden tunnin bakteerimäärän tasolle, eli bakteeri alkaakin rikastua. 0,9 % natriumkloridissa bakteeria on 48 tunnin seisotuksen jälkeen 45,8 % lähtöarvosta.



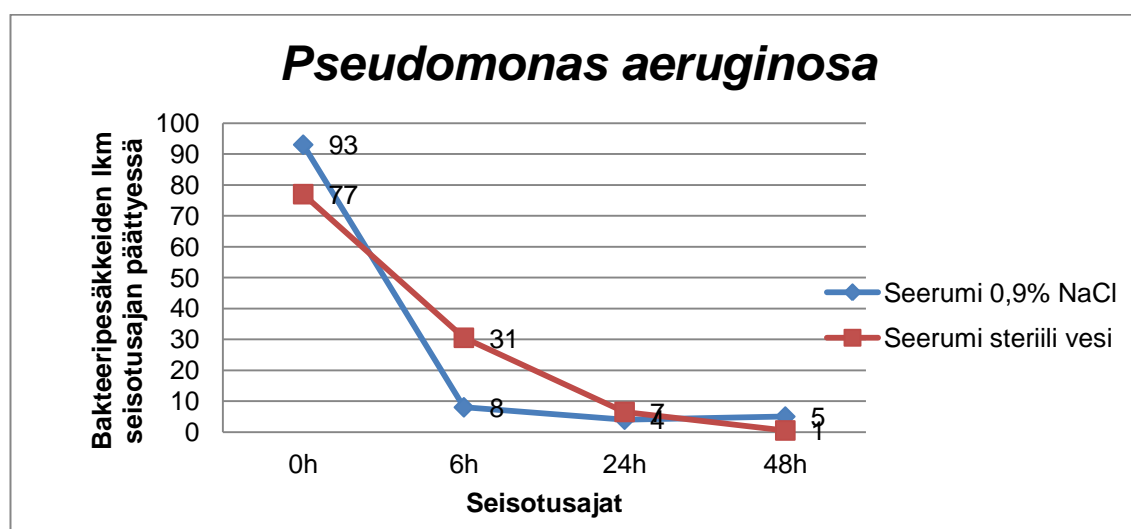
Kuvio 23. *Pseudomonas aeruginosa*n bakteeripesäkkeiden määrä seisosusaikojen päättyessä litium-hepariiniputkessa.

Natrium-fluoridiputkessa sekä steriiliin veteen että 0,9 % natriumkloridiin tehdyssä suspensiossa *Pseudomonas aeruginosa*n pitoisuus laskee välillä 0–6 tuntia. Steriilissä vedessä bakteeripitoisuuden lasku on 10 % ja natriumkloridissa 46,7 % (liite 6 taulukko 8). Toisin kuin muissa veriputkissa, *P. aeruginosa* rikastuu natrium-fluoridiputkessa sekä steriilissä vedessä että 0,9 % natriumkloridissa kuuden tunnin jälkeen. Steriilissä vedessä pesäkemäärien nousu on eksponentiaalinen 6–24 tunnin välillä. 0,9 % natriumkloridissa pesäkemäärä saavuttaa steriilin veden tason 48 tunnin kohdalla (kuvio 24).



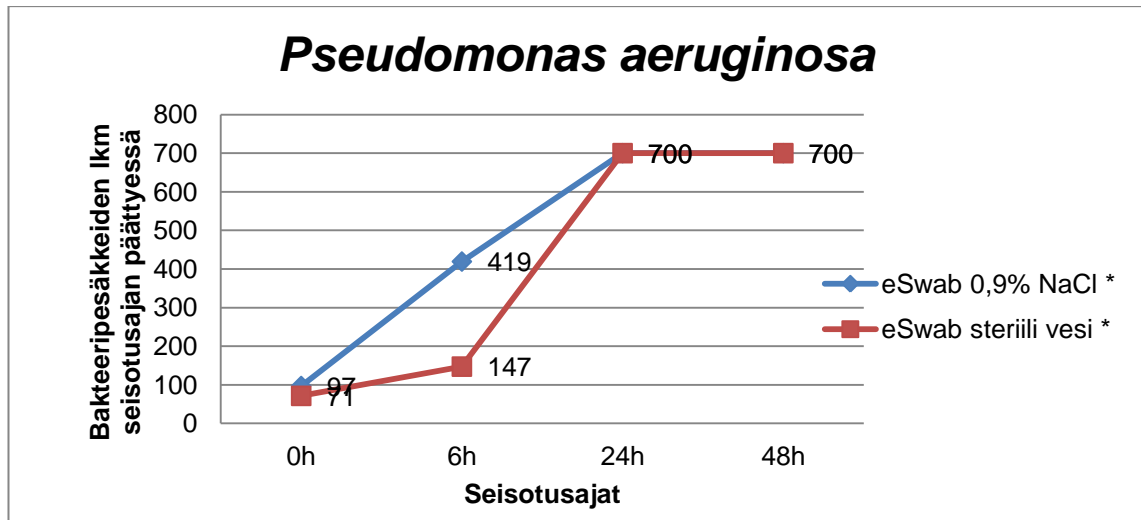
Kuvio 24. *Pseudomonas aeruginosa*n bakteeripesäkkeiden määrä seisosusaikojen päättyessä natrium-fluoridiputkessa.

Seerumiputkessa *Pseudomonas aeruginosa* määrä laskee kuudessa tunnissa sekä steriilissä vedessä että 0,9 % natriumkloridissa. 0,9 % natriumkloridiin tehdyssä suspensiossa lasku on jyrkempää (-91,5 %) kuin steriiliin veteen tehdyssä suspensiossa (-61,5 %) ja bakteerien määrä lähestyy nollaa jo kuuden tunnin kuluttua (liite 6 taulukko 8). Steriilissä vedessä pesäkkeiden määrä putoaa vasta 24 tunnin kohdalla lähelle nollaa (kuvio 25). Bakteria on kuitenkin jäljellä pieninä pitoisuuksina molemmissa suspensioissa vielä 48 tunninkin kohdalla.



Kuvio 25. *Pseudomonas aeruginosa* bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä seerumiputkessa.

ESwab® putkessa sekä 0,9 % natriumkloridiin tehdyssä suspensiossa että steriiliin veteen tehdyssä suspensiossa *P. aeruginosa* pesäkkeiden määrä nousee, mutta steriilissä vedessä nousu on maltillisempaa. Kuitenkin 24 tunnin kohdalla pesäkkeitä on molemmissa suspensioissa yli 700. Pesäkkeiden määrä pysyy korkeana 48 tunnin jälkeenkin (kuvio 26).



Kuvio 26. *Pseudomonas aeruginosa*n bakteeripesäkkeiden määrä seisotusaikojen päättyessä eSwab® -putkessa.

7.7 Johtopäätökset

Gramnegatiiviset sauvabakteerit (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) rikastuvat steriilissä vedessä joissain veriputkissa. 0,9 % natriumkloridissa kyseisten bakteerien säilyvyydellä on eroja. *P. aeruginosa* rikastuu räjähdysmäisesti natriumfluoridiputkessa 0,9 % natriumkloridissa, kun taas *E. coli* kuolee. *Haemophilus influenzae*, joka sekin on gramnegatiivinen sauvabakteeri, kuolee kaikissa veriputkissa 24 tunnin kohdalla. Tämä selittyy sillä, että *H. influenzae* onkin kasvuvaatimuksiltaan hyvin vaativa bakteeri. *H. influenzae*n säilyvyyteen ei vaikuta se, onko suspensiona käytetty steriiliä vettä tai 0,9 % natriumkloridia. Saatujen tulosten perusteella *Haemophilus influenzae* säilyy huonosti kaikissa veriputkissa eikä säilyvyydessä havaita selkeää eroa tutkittujen veriputkien välillä. *Haemophilus influenzae*n vaativat kasvuvaatimukset näkyvät bakteerin vähenemisenä myös eSwab® -putkessa.

Grampositiiviset kokkibakteerit (*Stafylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ja *Streptococcus pneumoniae*) eivät ole säilyneet missään veriputkessa 48 tuntia. Bakteerien väheneminen on tasaista ja lähes lineaarista. Bakteerien säilyvyydellä ei näyttäisi olevan huomattavaa eroa riippumatta siitä onko suspensiossa käytetty steriiliä vettä tai 0,9 % natriumkloridia.

Litium-hepariiniputkessa kaikki bakteerilajit ovat vielä hengissä kuuden tunnin seisotuksen kohdalla sekä 0,9 % natriumkloridissa että steriilissä vedessä. Kuuden

tunnin jälkeen bakteerien määrä vähenee lähes kaikilla bakteerilajeilla. *E. coli* määrä on jopa noussut steriilissä vedessä. *H. influenzae* ei selviä vuorokauden ajan litium-hepariiniputkessa. Tulosten perusteella voimme todeta, että litium-hepariiniputki on liian epästabiili bakteerien pidempiaikaiseen säilytykseen. Lyhytaikaiseen kuljetukseen (alle kuusi tuntia) putki voisi kuitenkin sopia. Negatiivinen bakteeriviljelytulos ei ole luotettava, jos näytettä on seisotettu litium-hepariiniputkessa yli kuusi tuntia huoneenlämmössä.

Lyhyellä aikavälillä bakteerit säilyvät huonommin natrium-fluoridiputkessa kuin litium-hepariiniputkessa. Esimerkiksi *H. influenzae* on kuuden tunnin seisotuksen jälkeen jäljellä hälyttävän vähän. Saamamme heikko positiivinen tulos voi olla myös sattumaa; jos bakteeria on näytteessä vain niukasti, se voi kuolla jo alle kuudessa tunnissa. *P. aeruginosa* jopa rikastui natrium-fluoridiputkessa. Koska tutkittavassa näytteessä voi olla mitä tahansa bakteeria, ei natrium-fluoridiputki sovi edes lyhytaikaiseen kuljetukseen. Negatiivinen tulos ei ole luotettava edes alle kuuden tunnin seisotuksen jälkeen.

Seerumiputkesta saadut tulokset ovat yllättäviä. Alkuperäinen oletus oli, että bakteerilajit säilyisivät seerumiputkessa paremmin kuin antikoagulanttia sisältävissä veriputkissa. Tulokset osoittavat kuitenkin toisin. Osa tutkittavista bakteereista ei säily edes kuutta tuntia. Kaikki bakteerikannat paitsi *E. coli* kuolevat seerumiputkessa viimeistään kahden vuorokauden kuluessa. Näin ollen seerumiputki ei vaikuta soveltuvan bakteerien kuljetukseen.

8 Pohdinta

Oletuksena oli, että bakteerit eivät säily antikoagulanttia sisältävissä koeputkissa tai seerumiputkessa yhtä hyvin kuin bakteerien nestekuljetusputkessa. Tutkimuksen perusteella tutkitut veriputket eivät ole optimaalisia astioita bakteerinäytteiden kuljettamiseen. Tutkimuksessa kävi ilmi, että litium-hepariini sopii veriputkista parhaiten bakteerien säilytykseen. Tämä saattaisi johtua siitä, että hepariini on orgaaninen aine, jota bakteerit ehkä pystyvät hyödyntämään.

Steriilin veden ja 0,9 % natriumkloridin tulokset ovat pitkälti samanlaiset muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. Esimerkiksi *E. coli* rikastuu natrium-fluoridiputkessa

steriilissä vedessä ja kuolee 0,9 % natriumkloridissa. Steriili vesi tai 0,9 % natriumkloridi eivät kumpikaan kuvasta täysin oikeaa näytettä. On vaikea sanoa, miten bakteerit käyttäytyisivät nivelnesteessä. Tutkimus olisi hyvä toistaa joko oikealla näytteellä tai näytettä paremmin mallintavalla nesteellä.

Rahnin ja Robertsin (1946: 52) tutkimuksessa kävi ilmi, että natrium-fluoridi hidasti tutkittavan bakteerin, *S. aureuksen*, kasvua ja natriumkloridi tehosti tätä vaikutusta. Emme kuitenkaan huomanneet merkittävää eroa *S. aureuksen* kasvussa verrattaessa natrium-fluoridiputken tuloksia seerumiputkesta saatuihin tuloksiin. Emme havainneet 0,9 % natriumkloridin tehostavan natrium-fluoridin bakteeria vähentävää vaikutusta, vaan 0,9 % natriumkloridissa ja steriilissä vedessä tulokset olivat hyvin yhtenevät. Ainoastaan *E. colin* kohdalla natriumkloridin ja natrium-fluoridin bakteereja vähentävä vaikutus saattoi tulla ilmi. *E. coli* näytti rikastuvan natrium-fluoridiputkessa käytettäessä suspensioliuoksena steriiliä vettä. Kuitenkin käytettäessä 0,9 % natriumkloridia *E. coli* kuoli.

Grahamin ja Warrenin (1950: 60) tekemässä tutkimuksessa todettiin, että hepariini estää *S. aureuksen* kasvua kasvatettaessa sitä proteiinittomalla kasvualustalla. Myös Hodges ja Rosett (1980: 11) totesivat hepariinin estävän mikrobien kasvua. Tutkimuksessamme litium-hepariinilla ei ollut huomattavaa vaikutusta bakteerin määrän vähenemiseen verrattuna lisääaineettomaan seerumiputkeen. Tämä voisi johtua siitä, että käyttämämme veriputkien hepariinipitoisuus oli erilainen kuin edellä mainituissa tutkimuksissa.

Tutkimuksessa huomasimme, että bakteerit rikastuvat eSwab® -putkessa. Tämä johtuu siitä, että seisotimme putkia huoneenlämmössä. Valmistaja kuitenkin ohjeistaa laittamaan putket jääkaappilämpötilaan. Jääkaappilämpötila hillitsisi bakteerien lisääntymistä. ESwab® -putkessa bakteerien määrän pitäisi säilyä samana kuin näytteenottohetkellä, jotta bakteerien määrää näytteessä voitaisiin arvioida totuudenmukaisesti. Putki tulisikin laittaa jääkaappiin heti näytteenoton jälkeen, sillä bakteerit rikastuivat nestekuljetusputkessa jo alle kuudessa tunnissa.

Koeasetelmasta ei käy selvästi ilmi, mistä putkien erot johtuvat. Saamamme tulokset ovat vain suuntaa antavia, sillä käyttämämme suspensio ei vastaa aitoa näytettä ja tutkimusotos oli hyvin pieni. Lisäksi vakuumputkissa käytetty volyyymi oli vertailun vuoksi kaksi millilitraa, kun punktionäytteitä kerätettäessä vakuumi vetää putken täyteen

volyyymiinsä (seerumiputki 5ml, litium-hepariini 4ml, natrium-fluoridi 2ml). Tutkimuksen voisi toistaa suuremmalla näytemäärällä. Tutkimuksessamme nousi ilmi seuraavia jatkotutkimusaiheita:

Onko nivelnesteelle olemassa valmista bakteerien nestekuljetusputkea, ja jos ei ole, mikä olemassa oleva putki olisi bakteerien kuljetukselle paras?

Tutkimuksemme voisi toistaa useammilla toistoilla tai käyttäen toista bakteerisuspensioliuosta. Bakteerien säilymistä voisi myös tutkia seisottamalla putkia jääkaappilämpötilassa. Lisäksi tutkimuksen voisi toistaa ottamalla tutkimukseen enemmän bakteerilajeja sekä hiivoja.

Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettisissä ohjeissa veloitetaan bioanalytikoja ylläpitää ja kehittää ammattitoimintansa edellyttämää osaamista (Suomen bioanalytikkoliitto ry 2006). Opinnäytetyön aikana opimme niin tutkittavista bakteerilajeista kuin itse tutkimuksen kulustakin. Esimerkiksi jatkossa osaamme tarkastella lähteitä kriittisesti. Osaamme valita paremmin olennaista teoretietoa tutkimukseemme. Eniten opimme tutkimusprosessin etenemisestä ja miten toteuttaa tieteellinen tutkimus. Ymmärrämme, miten tärkeää on olla valmis suunnitelma ja selkeä tutkimusasetelma mitä noudattaa.

9 Luotettavuus, toistettavuus ja eettisyys

Suunnittelimme työmme tarkkaan, jotta saadut tulokset olisivat luotettavia ja jotta työskentely sujuisi mahdollisimman sujuvasti. Työskentelimme huolellisesti ja aseptisesti koko tutkimuksen ajan. Keräämämme tieto oli hankittu luotettavista ja ajankohtaisista lähteistä. Lisäsimme toistettavuutta tekemällä näytteistä rinnakkaisputket.

Toimimme eettisesti opinnäytetyössämme. Haimme tutkimuksellemme tutkimusluvan ja työskentelimme häiritsemättä laboratorion henkilökuntaa. Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet kehottavat kunnioittamaan potilaan/asiakkaan oikeuksia (Suomen bioanalytikkoliitto ry 2006). Emme käyttäneet potilasnäytteitä, vaan käyttämämme bakteerilajit olivat kaikki tunnettuja kontrollikantoja.

Laboratorio valvoo viljelymaljojen puhtautta ja toimivuutta sekä viljelykaappien lämpötilaa, jolloin olimme varmoja kyseisten välineiden laadusta. Käyttämämme bakteerikannat olivat tuoreita ja puhtaita. Esitutkimuksen aikana teimme toimintaohjeen, jota seurasimme tutkimuksen ajan. Näin varmistimme, että meillä oli yhteneväiset työskentelytavat. Laskimme ensimmäiset kymmenen viljelymaljaa ristiin varmistaaksemme että pääsimme samaan tulokseen.

Suspensiot ja viljelyt tehtiin laminaarikaapissa kontaminaatioiden ehkäisemiseksi. Tarkistimme suspensioiden vahvuudet densitometrillä. Suspension tavoitearvo oli 0,5 McFarland mutta hyväksyimme arvot 0,45–0,55. Viljelimme näytteet huoneenlämpöisille viljelymaljoille. Tarkistimme että käyttämämme maljat sekä tutkimusputket eivät olleet ohittaneet viimeistä käyttöpäivää. Jokaista putkea sekoitettiin Vortex® -laitteella ennen pipetointia varmistaaksemme näytteen homogeenisuuden. Kääntelimme tutkimusputket kahdeksan kertaa näytteen lisäämisen jälkeen, jolla varmistettiin, että kaikki putkessa ollut antikoagulantti liukenisi näytteeseen. Näin pyrimme vähentämään turhia virhelähteitä. Noudatimme seisotusaikoja tarkasti. Varmistimme seisotusaikojen oikeellisuuden kirjaamalla ylös kellonajat, jolloin aloitimme tutkimusputkien seisotuksen.

Lähteet

Adeniyi S. A ym. 2012. Artikkel. Effects of Anticoagulants on Fasting Blood Glucose of Diabetics and Non-Diabetics Individuals, as well as Random Blood Glucose of Apparently Healthy Individuals, Determined by One Touch Ultra Glucometer. International Journal of Pharmaceutical and Clinical Science. 2(4): 11–13. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa
<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://urpjournals.com/tocjnl/s/23_12v2i4_1.pdf>.

Andreoli, Thomas E. ym. 2000. Dorland's illustrated medical dictionary. 29. painos. Kanada: W.B.Saunders Company.

Angstadt, Carol N. ym. 2002. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation. 15. painos. New York: Wiley-Liss.

Anttila, Veli-Jukka – Tissari, Päivi 2010: Pseudomonakset, pseudomonaksen kaltaiset sauvat ja akinetobakteerit. Teoksessa Vaara, Martti (toim.) – Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo 2010: Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Ashhurst-Smith, C. – Norton, R. – Smith, J. 2002. Artikkel. Pseudomonas fluorescens pseudobacteraemia: A cautionary lesson. Journal of Paediatrics and Child Health 38: 63–65.

Bakteerinäytteen nestekuljetusputken käyttö. 2012. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti.
<http://huslab.fi/preanalytiikan_kasikirja/bakteriologiset_naytteet/bakteerinaytteen_nestekuljetusputken_kaytto.pdf>. Luettu 2.3.2013.

Bauman, W. Robert 2004. Microbiology. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.

BD 2010. BD Diagnostics – Preanalytical Systems Product Catalogue. Verkkodokumentti. Päivitetty 22.1.2010.
<<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=7559>>. Luettu 4.4.2013.

BD Chocolate Agar (GC II Agar with IsoVitaleX) BD Chocolate Agar (Blood Agar No. 2 Base) 2011. Käyttöohje. Becton Dickinson Diagnostics.
<<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8994>>. Luettu 15.3.2013.

BD CLED Agar 2006. Käyttöohje. Becton Dickinson Diagnostics.
<<http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007367%2804%29%280506%29.pdf>>. Luettu 15.3.2013.

Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. 2010. Clinical Chemistry. Techniques, Principles, Correlations. Kuudes painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Champe, C. Pamela – Fisher, D. Bruce – Harvey, A. Richard 2007. Microbiology. Toisen painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Clark, David – Dunlap, Paul – Madigan, Michael – Martinko, John 2009. Brock biology of microorganisms. 12. painos. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.

Collee, J. Gerald – Fraser, Andrew G. – Marmion, Barrie P. – Simmons, Anthony 1996. Mackie & McCartney Practical medical microbiology. 14. painos. New York: Churchill Livingstone.

Copan Flock Technologies. 2012. ESwab collection & preservation. Tuoteseloste. <http://www.copanflocktech.com/media/packinserts/50C_ESwab-PackInsertREV03-2010.pdf>. Luettu 2.3.2013.

Ehrlich, Julian – Stivala, Salvatore S. 1973. Artikkeili. Chemistry and pharmacology on heparin. Journal of pharmaceutical sciences 62: 517–544.

Eklund, Jarl ym. 1997. Farmaseuttinen mikrobiologia. Toinen painos. Helsinki: Suomen farmaseuttinen yhdistys.

Elliott, Tom – Worthington Husam Osman, Tony – Gill, Martin 2007. Medical microbiology & infection. Neljäs painos. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd.

Estridge, Barbara H. – Reynolds, Anna P. 2008. Basic Clinical Laboratory Techniques. Viides painos. Yhdysvallat: Thomson Delmar Learning.

Forbes, Betty – Sahm, Daniel – Weissfeld, Alice. 1998. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Kymmenes painos. Missouri: Mosby.

Gillespie, Stephen 1998. Medical Microbiology Illustrated. Oxford: Butterworth-Heinemann.

Govan, J. R. W. 2007. Pseudomonads and non-fermenters. Teoksessa Barer, Mike – Greenwood, David – Peutherer, John – Slack, Richard 2007: Medical Microbiology. 17. painos. Philadelphia: Elsevier.

Graham, Fredrick – Warren, John R. 1950. Artikkeili. The Effect of Heparin on the Growth of Bacteria and Yeasts. Journal of Bacteriology. 60(2): 171–174.

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

Hilla, Risto. 2012. Bakteeriviljelynäytteiden nestekuljetusputket ja viljelyautomaatio kliinisessä laboratoriodiagnostiikassa. Bioanalytiikka 2. 22–25.

Hirsjärvi, Sirkka – Remes, Pirkko – Sajavaara, Paula 2010. Tutki ja kirjoita. 15.–16. painos. Helsinki: Tammi.

Hodges, Glenn R. – Rosett, Walter. 1980. Artikkeili. Antimicrobial Activity of Heparin. Journal of Clinical Microbiology. 11(1): 30–34.

Holopainen, Martti – Pulkkinen, Pekka 2002. Tilastolliset menetelmät. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

Humphreys, H. 2007. Staphylococcus. Teoksessa Barer, Mike – Greenwood, David – Peutherer, John – Slack, Richard 2007: Medical Microbiology. 17. painos. Philadelphia: Elsevier.

HUSLAB 2012. Veriputkikartta. Verkkodokumentti. Päivitetty 9.10.2012. <http://huslab.fi/preanalytiikan_kasikirja/naytteiden_vastaanottaminen_ja_kasittely/veriputkikartta_huslab.pdf>. Luettu 15.3.2013.

Kauma, Heikki – Virolainen-Julkunen, Anni 2010: Pneumokokki. Teoksessa Vaara, Martti (toim.) – Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo 2010: Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Kauppinen, Lauri – Kiviranta, Jari – Laakso, Teija – Mannermaa, Jukka-Pekka – Nurmi, Tapio – Saarela Sirkku 1997. Farmaseuttinen mikrobiologia. Toinen painos. Helsinki: Hakapaino Oy.

Koneman, Elmer – Allen, Stephen – Janda, William – Schreckenberger, Paul – Winn, Washington 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Viides painos. Philadelphia: Lippincott.

Kotilainen, Pirkko – Kuusela, Pentti – Vuopio-Varkila, Jaana 2010: Staphylococcus aureus. Teoksessa Vaara, Martti (toim.) – Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo 2010: Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Kotilainen, Pirkko – Syrjänen, Jaana – Vuopio-Varkila, Jaana 2010: A-ryhmän streptokokki. Teoksessa Vaara, Martti (toim.) – Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo 2010: Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Koulu, Markku – Tuomisto, Jouko 2007. Farmakologia ja toksikologia. Seitsemäs painos. Kuopio: Medicina.

Käyhty, Helena – Peltola, Heikki 2010: Hemofilukset. Teoksessa Vaara, Martti (toim.) – Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo 2010: Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

McPherson, Richard A. – Pincus, Matthew R. 2011. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22. painos. Philadelphia: Elsevier Saunders.

Mediq 2010. Näytteenottotarvikkeet ja pikatestit. Verkkodokumentti. Päivitetty 16.12.2010. <http://www.mediq.fi/public/dokumenter/MediqSuomi/Labraluettelo%20Mediq/Naytteenottotarvikkeet%20ja%20pikatestit_s.102_111_Mediq.pdf>. Luettu 10.4.2013.

Park Talaro, Kathleen 2008: Foundations in microbiology. Kuudes painos. New York: McGraw-Hill Companies.

Rahn, Otto. – Roberts, Martha H. 1946. Artikkel. Antisepsis and Ionization of Sodium Fluoride. Journal of Bacteriology. 52(5): 612–163.

Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Sihvonen, Reetta 2013. Mikrobiologi. Suullinen tiedonanto 04.02.2013.

Siitonen, Anja – Vaara, Martti 2010: Escherichia, Salmonella, Shigella ja Yersinia. Teoksessa Vaara, Martti (toim.) – Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo 2010: Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Strelkauskas, Anthony – Strelkauskas, Jennifer – Moszyk-Strelkauskas, Danielle 2010: Microbiology a clinical approach. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.

Suomen bioanalytikkoliitto ry. 2006. Esite. Bioanalytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet.

Vaara, Martti – Skurnik, Mikael – Sarvas, Matti 2010: Bakteerisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa Vaara, Martti (toim.) – Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo 2010: Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Bakteerikannat

Haemophilus influenzae

ATCC 49247

T-12930

β-laktam-

Streptococcus pyogenes

ATCC 19615

T-9119

Streptococcus pneumoniae

ATCC 49619

T-16299

Staphylococcus aureus

ATCC 25923

T-9118

Escherichia coli

ATCC 25922

T-9112

Pseudomonas aeruginosa

ATCC 27853

T-9112

Tutkimusputket

Litium-hepariini
Venosafe™ 60 USP
Ref VF054SHL
Lot 1212019

Natrium-fluoridi
BD Vacutainer® FX 5mg 4mg
Ref 368920
Lot 2219497
2ml

Seerumi
BD Vacutainer® Z
Ref 367624
Lot 2282265
5ml

Copan eSwab 490CE.A
Ref 490 CE.A
Lot D12600

Bakteeripitoisuuden laskeminen

Bakteeripitoisuus laskettiin käyttämällä seuraavaa kaavaa:

$$\text{PMY/ml} = (\text{pesäkkeiden määrä maljalla} \times \text{laimennuskerroin}) / \text{seisotusputken tilavuus}$$

Esimerkki:

E. coli bakteeripesäkkeitä oli kasvatusmaljalla 34,33 (rinnakkaisputkien keskiarvo) kuuden tunnin seisotuksen jälkeen natrium-fluoridiputkessa käytettäessä bakteerisuspensioliuoksena 0,9 % natriumkloridia.

E. colin pitoisuus putkessa lasketaan seuraavasti:

pesäkkeiden määrä maljalla	34,33
laimennuskerroin	10 ⁴
seisotusputken tilavuus	2ml

$$\begin{aligned}\text{PMY/ml} &= (34,33 \times 10^4) / 2 \\ &= 171650 \\ &= 1,7 \times 10^5\end{aligned}$$

E. colin pitoisuus putkessa on $1,7 \times 10^5$ PMY/ml.

Esitutkimuksen tulokset

Bakteerin nimi	Pesäkkeiden määrä laimennoksella 1:10 000	Pesäkkeiden määrä laimennoksella 1:100 000
<i>Haemophilus influenzae</i>	n. 1200	156
<i>Streptococcus pyogenes</i>	n. 1000	94
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	n. 800	96
<i>Staphylococcus aureus</i>	626	36
<i>Escherichia coli</i>	318	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n. 1000	102

Tulostaulukot

Bakteeripesäkkeiden määrä kasvatusmaljoilla seisotusaikojen päättyessä. ESwab® -putkien eri tilavuus huomioitiin kertomalla pesäkkeiden lukumäärä kertoimella 1,5. Yli 700 lasketut pesäkemäärät merkittiin taulukkoon >700.

<i>Hemofilus influenzae</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripesäkkeiden määrä kasvatusmaljoilla seisotusaikojen päättyessä			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl I	205	65	0	0
Li-he 0,9 % NaCl II	222	54	0	0
Li-he 0,9 % NaCl III	212	78	0	0
Li-he steriili vesi I	190	65	0	0
Li-he steriili vesi II	131	77	0	0
Li-he steriili vesi III	157	75	0	0
NaF 0,9 % NaCl I	192	18	0	0
NaF 0,9 % NaCl II	200	14	0	0
NaF 0,9 % NaCl III	198	21	0	0
NaF steriili vesi I	139	1	0	0
NaF steriili vesi II	153	4	0	0
NaF steriili vesi III	130	3	0	0
Seerumi 0,9 % NaCl I	240	0	0	0
Seerumi 0,9 % NaCl II	248	0	0	0
Seerumi steriili vesi I	153	41	0	0
Seerumi steriili vesi II	154	47	0	0
eSwab® 0,9 % NaCl I	268,5	270	>700	253,5
eSwab® 0,9 % NaCl II	280,5	277,5	>700	243
eSwab® steriili vesi I	150,0	138,0	96,0	66,0
eSwab® steriili vesi II	162,0	151,5	99,0	49,5

<i>Streptococcus pyogenes</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripesäkkeiden määrä kasvatusmaljoilla seisotusaikojen päättyessä			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl I	59	59	46	7
Li-he 0,9 % NaCl II	62	31	50	15
Li-he 0,9 % NaCl III	75	50	47	14
Li-he steriili vesi I	77	55	41	12
Li-he steriili vesi II	60	62	25	19
Li-he steriili vesi III	66	60	46	15
NaF 0,9 % NaCl I	60	52	31	18
NaF 0,9 % NaCl II	57	51	41	27
NaF 0,9 % NaCl III	72	48	60	19
NaF steriili vesi I	58	36	26	5
NaF steriili vesi II	56	33	13	2
NaF steriili vesi III	46	27	26	12
Seerumi 0,9 % NaCl I	70	43	17	0
Seerumi 0,9 % NaCl II	79	60	44	0
Seerumi steriili vesi I	54	43	4	0
Seerumi steriili vesi II	62	46	37	17
eSwab® 0,9 % NaCl I	79,5	97,6	>700	>700
eSwab® 0,9 % NaCl II	85,5	129,0	>700	>700
eSwab® steriili vesi I	61,5	310,5	>700	>700
eSwab® steriili vesi II	58,9	196,5	>700	>700

<i>Streptococcus pneumoniae</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripesäkkeiden määrä kasvatusmaljoilla seisotusaikojen päättyessä			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl I	121	106	7	0
Li-he 0,9 % NaCl II	136	88	17	0
Li-he 0,9 % NaCl III	131	99	19	1
Li-he steriili vesi I	69	44	9	0
Li-he steriili vesi II	62	52	13	0
Li-he steriili vesi III	88	54	11	0
NaF 0,9 % NaCl I	106	51	18	6
NaF 0,9 % NaCl II	92	73	23	3
NaF 0,9 % NaCl III	87	77	28	6
NaF steriili vesi I	66	51	27	4
NaF steriili vesi II	86	50	20	12
NaF steriili vesi III	71	50	33	9
Seerumi 0,9 % NaCl I	143	1	0	0
Seerumi 0,9 % NaCl II	137	1	0	0
Seerumi steriili vesi I	63	59	28	8
Seerumi steriili vesi II	73	34	9	0
eSwab® 0,9 % NaCl I	141,0	103,5	>700	>700
eSwab® 0,9 % NaCl II	135,0	96,0	>700	>700
eSwab® steriili vesi I	66,0	79,5	>700	>700
eSwab® steriili vesi II	90,0	45,0	>700	>700

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripesäkkeiden määrä kasvatusmaljoilla seisotusaikojen päättyessä			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl I	301	236	138	15
Li-he 0,9 % NaCl II	328	252	178	52
Li-he 0,9 % NaCl III	285	230	140	41
Li-he steriili vesi I	244	197	143	64
Li-he steriili vesi II	220	264	159	90
Li-he steriili vesi III	235	238	122	61
NaF 0,9 % NaCl I	236	199	99	24
NaF 0,9 % NaCl II	273	161	100	39
NaF 0,9 % NaCl III	255	143	89	46
NaF steriili vesi I	202	145	87	18
NaF steriili vesi II	218	141	74	23
NaF steriili vesi III	269	145	82	29
Seerumi 0,9 % NaCl I	310	72	0	0
Seerumi 0,9 % NaCl II	247	98	0	0
Seerumi steriili vesi I	347	251	148	14
Seerumi steriili vesi II	314	285	151	7
eSwab® 0,9 % NaCl I	432,0	>700	>700	>700
eSwab® 0,9 % NaCl II	373,5	>700	>700	>700
eSwab® steriili vesi I	342,0	>700	>700	>700
eSwab® steriili vesi II	351,0	>700	>700	>700

<i>Escherichia coli</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripesäkkeiden määrä kasvatusmaljoilla seisotusaikojen päättyessä			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl I	251	74	1	0
Li-he 0,9 % NaCl II	300	102	2	0
Li-he 0,9 % NaCl III	284	111	10	0
Li-he steriili vesi I	232	132	186	132
Li-he steriili vesi II	187	154	189	223
Li-he steriili vesi III	211	177	115	220
NaF 0,9 % NaCl I	259	35	0	0
NaF 0,9 % NaCl II	230	30	1	0
NaF 0,9 % NaCl III	224	38	0	0
NaF steriili vesi I	216	89	670	>700
NaF steriili vesi II	195	128	416	>700
NaF steriili vesi III	215	85	439	>700
Seerumi 0,9 % NaCl I	194	154	164	251
Seerumi 0,9 % NaCl II	232	149	76	49
Seerumi steriili vesi I	157	144	289	>700
Seerumi steriili vesi II	132	122	276	>700
eSwab® 0,9 % NaCl I	268,5	>700	>700	>700
eSwab® 0,9 % NaCl II	222,0	>700	>700	>700
eSwab® steriili vesi I	229,5	>700	>700	>700
eSwab® steriili vesi II	208,5	>700	>700	>700

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripesäkkeiden määrä kasvatusmaljoilla seisotusaikojen päättyessä			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl I	98	38	7	33
Li-he 0,9 % NaCl II	108	52	6	55
Li-he 0,9 % NaCl III	112	53	6	25
Li-he steriili vesi I	40	17	7	1
Li-he steriili vesi II	38	25	10	0
Li-he steriili vesi III	46	20	4	3
NaF 0,9 % NaCl I	56	28	369	>700
NaF 0,9 % NaCl II	62	34	339	>700
NaF 0,9 % NaCl III	61	32	308	>700
NaF steriili vesi I	37	40	>700	>700
NaF steriili vesi II	49	37	>700	>700
NaF steriili vesi III	33	29	>700	>700
Seerumi 0,9 % NaCl I	92	8	5	8
Seerumi 0,9 % NaCl II	94	8	3	2
Seerumi steriili vesi I	80	33	5	0
Seerumi steriili vesi II	74	28	8	1
eSwab® 0,9 % NaCl I	79,5	411,0	>700	>700
eSwab® 0,9 % NaCl II	114,0	427,5	>700	>700
eSwab® steriili vesi I	70,5	160,5	>700	>700
eSwab® steriili vesi II	72	133,5	>700	>700

Muutosprosentit

<i>Haemophilus influenzae</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripitoisuudet (PMY/ml) seisotusaikojen päättyessä (rinnakkaisputkien keskiarvosta) sekä muutos% lähtötasoon (0h) verrattuna.			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl	10,6 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁴ (-68,9 %)	0 (-100 %)	0 (-100 %)
Li-he steriili vesi	8,0 x 10 ⁴	3,6 x 10 ⁴ (-55 %)	0 (-100 %)	0 (-100 %)
NaF 0,9 % NaCl	9,8 x 10 ⁴	0,9 x 10 ⁴ (-90,8 %)	0 (-100 %)	0 (-100 %)
NaF steriili vesi	7,0 x 10 ⁴	1,3 x 10 ³ (-81,4 %)	0 (-100 %)	0 (-100 %)
Seerumi 0,9 % NaCl	12,2 x 10 ⁴	0 (-100 %)	0 (-100 %)	0 (-100 %)
Seerumi steriili vesi	7,7 x 10 ⁴	2,2 x 10 ⁴ (- 71.4 %)	0 (-100 %)	0 (-100 %)
eSwab® 0,9 % NaCl *	9,2 x 10 ⁴	9,1 x 10 ⁴ (-1,1 %)	23,3 x 10 ⁴ (+153,3 %)	8,3 x 10 ⁴ (-9,8 %)
eSwab® steriili vesi *	5,2 x 10 ⁴	4,8 x 10 ⁴ (-7,7 %)	3,3 x 10 ⁴ (-36,5 %)	1,9 x 10 ⁴ (-63,5 %)

Taulukko 3. *Haemophilus influenzae*. Bakteeripitoisuudet seisotusaikojen päättyessä sekä muutos% lähtötasoon verrattuna.

*Saatu tulos on yli 700 bakteeripesäkettä. PMY arvo laskettiin pesäkemääränä 700.

<i>Streptococcus pyogenes</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripitoisuudet (PMY/ml) seisotusaikojen päättyessä (rinnakkaisputkien keskiarvosta) sekä muutos% lähtötasoon (0h) verrattuna.			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl	3,3 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁴ (-30,3 %)	2,4 x 10 ⁴ (-27,3 %)	0,6 x 10 ⁴ (-81,8 %)
Li-he steriili vesi	3,4 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁴ (-11,8 %)	1,9 x 10 ⁴ (-44 %)	0,8 x 10 ⁴ (-76,5 %)
NaF 0,9 % NaCl	3,2 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴ (-21,9 %)	2,2 x 10 ⁴ (-31,3 %)	1,1 x 10 ⁴ (-65,6 %)
NaF steriili vesi	2,7 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴ (-40,7 %)	1,1 x 10 ⁴ (-59,3 %)	0,3 x 10 ⁴ (-88,9 %)
Seerumi 0,9 % NaCl	3,7 x 10 ⁴	2,6 x 10 ⁴ (-29,7 %)	1,5 x 10 ⁴ (-59,5 %)	0,0 x 10 ⁴ (-100 %)
Seerumi steriili vesi	2,9 x 10 ⁴	2,2 x 10 ⁴ (-24,1 %)	1,0 x 10 ⁴ (-34,5 %)	0,4 x 10 ⁴ (-86,2 %)
eSwab® 0,9 % NaCl *	2,7 x 10 ⁴	3,8 x 10 ⁴ (+40,7 %)	23,3 x 10 ⁴ (+763,0 %)	23,3 x 10 ⁴ (+763,0 %)
eSwab® steriili vesi *	2,0 x 10 ⁴	8,5 x 10 ⁴ (+240,7 %)	23,3 x 10 ⁴ (+1065 %)	23,3 x 10 ⁴ (+1065 %)

Taulukko 4. *Streptococcus pyogenes*. Bakteeripitoisuudet seisotusaikojen päättyessä sekä muutos% lähtötasoon verrattuna.

*Saatu tulos on yli 700 bakteeripesäkettä. PMY arvo laskettiin pesäkemääränä 700.

<i>Streptococcus pneumoniae</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripitoisuudet (PMY/ml) seisotusaikojen päättyessä (rinnakkaisputkien keskiarvosta) sekä muutos% lähtötasoon (0h) verrattuna.			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl	6,5 x 10 ⁴	4,9 x 10 ⁴ (-24,6 %)	0,7 x 10 ⁴ (-89,2 %)	0,0 x 10 ⁴ (-100 %)
Li-he steriili vesi	3,7 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴ (-32,4 %)	0,6 x 10 ⁴ (-83,8 %)	0,0 x 10 ⁴ (-100 %)
NaF 0,9 % NaCl	4,8 x 10 ⁴	3,4 x 10 ⁴ (-29,2 %)	1,2 x 10 ⁴ (-75 %)	0,3 x 10 ⁴ (-93,8 %)
NaF steriili vesi	3,7 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴ (-32,4 %)	1,3 x 10 ⁴ (-64,9 %)	0,4 x 10 ⁴ (-89,2 %)
Seerumi 0,9 % NaCl	7,0 x 10 ⁴	0,1 x 10 ⁴ (-98,6 %)	0,0 x 10 ⁴ (-100 %)	0,0 x 10 ⁴ (-100 %)
Seerumi steriili vesi	3,4 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁴ (-32,4 %)	0,9 x 10 ⁴ (-73,5 %)	0,2 x 10 ⁴ (-94,1 %)
eSwab® 0,9 % NaCl *	4,6x10 ⁴	3,3 x10 ⁴ (- 28,3 %)	23,3 x 10 ⁴ (+ 406,5 %)	23,3 x 10 ⁴ (+ 406,5 %)
eSwab® steriili vesi *	2,6 x10 ⁴	2,1 x10 ⁴ (- 19,2 %)	23,3 x 10 ⁴ (+796,2 %)	23,3 x 10 ⁴ (+796,2 %)

Taulukko 5. *Streptococcus pyogenes*. Bakteeripitoisuudet seisotusaikojen päättyessä sekä muutos% lähtötasoon verrattuna.

*Saatu tulos on yli 700 bakteeripesäkettä. PMY arvo laskettiin pesäkemääränä 700.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripitoisuudet (PMY/ml) seisotusaikojen päättyessä (rinnakkaisputkien keskiarvosta) sekä muutos% lähtötasoon (0h) verrattuna.			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl	15,2 x 10 ⁵	12,0 x 10 ⁵ (-21,1 %)	7,6 x 10 ⁵ (-50 %)	1,8 x 10 ⁵ (-88,2 %)
Li-he steriili vesi	11,7 x 10 ⁵	11,7 x 10 ⁵ (0 %)	7,1 x 10 ⁵ (-39,3 %)	3,6 x 10 ⁵ (-69,2 %)
NaF 0,9 % NaCl	12,7 x 10 ⁵	8,4 x 10 ⁵ (-33,9 %)	4,8 x 10 ⁵ (-62,2 %)	1,8 x 10 ⁵ (-85,8 %)
NaF steriili vesi	11,5 x 10 ⁵	7,2 x 10 ⁵ (-37,4 %)	4,1 x 10 ⁵ (-64,3 %)	1,2 x 10 ⁵ (-90,0 %)
Seerumi 0,9 % NaCl	13,9 x 10 ⁵	4,3 x 10 ⁵ (-69,1 %)	0,0 x 10 ⁵ (-100 %)	0,0 x 10 ⁵ (-100 %)
Seerumi steriili vesi	16,5 x 10 ⁵	13,4 x 10 ⁵ (-18,8 %)	7,5 x 10 ⁵ (-54,5 %)	0,5 x 10 ⁵ (-97,0 %)
eSwab® 0,9 % NaCl *	13,4 x 10 ⁵	23,3 x 10 ⁵ (+73,9 %)	23,3 x 10 ⁵ (+73,9 %)	23,3 x 10 ⁵ (+73,9 %)
eSwab® steriili vesi *	11,6 x 10 ⁵	23,3 x 10 ⁵ (+100,9 %)	23,3 x 10 ⁵ (+100,9 %)	23,3 x 10 ⁵ (+100,9 %)

Taulukko 6. *Staphylococcus aureus*. Bakteeripitoisuudet seisotusaikojen päättyessä sekä muutos% lähtötasoon verrattuna.

*Saatu tulos on yli 700 bakteeripesäkettä. PMY arvo laskettiin pesäkemääränä 700.

<i>Escherichia coli</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripitoisuudet (PMY/ml) seisotusaikojen päättyessä (rinnakkaisputkien keskiarvosta) sekä muutos% lähtötasoon (0h) verrattuna.			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl	13,9 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁵ (-65,5 %)	0,2 x 10 ⁵ (-98,6 %)	0,0 x 10 ⁵ (-100 %)
Li-he steriili vesi	10,5 x 10 ⁵	7,7 x 10 ⁵ (-26,7 %)	8,2 x 10 ⁵ (-21,9 %)	9,6 x 10 ⁵ (-8,6 %)
NaF 0,9 % NaCl	11,9 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵ (-85,7 %)	0,01 x 10 ⁵ (-99,9 %)	0,0 x 10 ⁵ (-100 %)
NaF steriili vesi	10,4 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵ (-51,9 %)	25,4 x 10 ⁵ (+144,2 %)	35,0 x 10 ⁵ (+236,5 %)
Seerumi 0,9 % NaCl	10,7 x 10 ⁵	7,6 x 10 ⁵ (-29,0 %)	6,0 x 10 ⁵ (-43,9 %)	7,5 x 10 ⁵ (-29,9 %)
Seerumi steriili vesi	7,2 x 10 ⁵	6,7 x 10 ⁵ (-6,9 %)	14,1 x 10 ⁵ (+95,8 %)	35,0 x 10 ⁵ (+386,1 %)
eSwab® 0,9 % NaCl *	0,8x10 ⁵	23,3 x 10 ⁵ (+2812,5 %)	23,3 x 10 ⁵ (+2812,5 %)	23,3 x 10 ⁵ (+2812,5 %)
eSwab® steriili vesi *	0,7 x10 ⁵	23,3 x 10 ⁵ (+3228,6 %)	23,3 x 10 ⁵ (+3228,6 %)	23,3 x 10 ⁵ (+3228,6 %)

Taulukko 7. *Escherichia coli*. Bakteeripitoisuudet seisotusaikojen päättyessä sekä muutos% lähtötasoon verrattuna.

*Saatu tulos on yli 700 bakteeripesäkettä. PMY arvo laskettiin pesäkemääränä 700.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Tutkimusputket	Bakteeripitoisuudet (PMY/ml) seisotusaikojen päättyessä (rinnakkaisputkien keskiarvosta) sekä muutos% lähtötasoon (0h) verrattuna.			
	0h	6h	24h	48h
Li-he 0,9 % NaCl	5,3 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴ (-54,7 %)	0,3 x 10 ⁴ (-94,3 %)	1,9 x 10 ⁴ (-64,2 %)
Li-he steriili vesi	2,1 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴ (-52,4 %)	0,4 x 10 ⁴ (-81,0 %)	0,1 x 10 ⁴ (-95,2 %)
NaF 0,9 % NaCl	3,0 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴ (-46,7 %)	16,9 x 10 ⁴ (+463,3 %)	35,0 x 10 ⁴ (+1066,7 %)
NaF steriili vesi	2,0 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴ (-10,0 %)	35,0 x 10 ⁴ (+1650,0 %)	35,0 x 10 ⁴ (+1650,0 %)
Seerumi 0,9 % NaCl	4,7 x 10 ⁴	0,4 x 10 ⁴ (-91,5 %)	0,2 x 10 ⁴ (-95,7 %)	0,3 x 10 ⁴ (-93,6 %)
Seerumi steriili vesi	3,9 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴ (-61,5 %)	0,3 x 10 ⁴ (-92,3 %)	0,03 x 10 ⁴ (-99,2 %)
eSwab® 0,9 % NaCl *	3,2 x 10 ⁴	14,0 x 10 ⁴ (+337,5 %)	23,3 x 10 ⁴ (+628,1 %)	23,3 x 10 ⁴ (+628,1 %)
eSwab® steriili vesi *	2,4 x 10 ⁴	4,9 x 10 ⁴ (+104,2 %)	23,3 x 10 ⁴ (+870,8 %)	23,3 x 10 ⁴ (+870,8 %)

Taulukko 8. *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteeripitoisuudet seisotusaikojen päättyessä sekä muutos% lähtötasoon verrattuna.

*Saatu tulos on yli 700 bakteeripesäkettä. PMY arvo laskettiin pesäkemääränä 700.

Työohje

Bakteerit	Lyhenne	Pitoisuus	Malja	Kasvatuskaappi
<i>Haemophilus influenzae</i>	H.I	10 ³	SM	CO ₂
<i>Streptococcus pyogenes</i>	St.Py	10 ³	VM	CO ₂
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	St.Pne	10 ³	VM	CO ₂
<i>Staphylococcus aureus</i>	S.A	10 ⁴	VM	CO ₂
<i>Escherichia coli</i>	E.C	10 ⁴	Cled	Lämpö
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pse	10 ³	Cled	Lämpö

- Hae edellisen päivän maljat lämpökaapista ja laita syrjään odottamaan.
- Nimeä bakteerisuspensioputket (2 sarjaa: NaCl JA steriili vesi) ja aseta telineeseen:
 - **bakt. nimi McF** 0,5 McF putki (2ml)
 - **7** 1:10 putki (10ml vetävä putki)
 - **6** 1:100 putki (10ml vetävä putki)
 - **5** 1:1000 putki (10ml vetävä putki)
 - **4** 1:10 000 putki (10ml vetävä putki) **3 x 4** *Staf. Aur ja E.Colille*
 - **3 x 3** 1:100 000 putki (10ml vetävä putki) **3 x 3** *H.I, St.Py, St.Pne, Pse*
- Nimeä tutkimusputket (2 x 10kpl) ja aseta telineeseen. Kirjoita Li-He, Na-F, Seerumi ja eSwab putkiin:
 - **päivämäärä, bakt nimi, I**
 - **päivämäärä, bakt nimi, II**
 - **päivämäärä, bakt nimi, III** (Li-he ja Na-F)
 - Kirjoita steriilille vedelle tarkoitettuihin putkiin **vesi**
- Tee bakteerisuspensio:
 - TARKISTA LAJI ja maljan puhtaus!
 - Ota pari pesäkettä **McF** putkeen, jossa 2ml 0,9%NaCl, vortexoi → mittaa vahvuus (oltava 0,5 McF, +/- 0,05)
- Tee laimennossarja 9ml 0,9%NaClia JA steriiliä vettä sisältäviin putkiin:
 - Pipetoi **McF** putkesta 1ml suspensiota **7**-putkeen. Vortexoi.
 - Pipetoi **7**-putkesta 1ml suspensiota **6**-putkeen. Vortexoi.

- Pipetoi **6**-putkesta 1ml suspensiota **5**-putkeen. Vortexoi.
 - Pipetoi **5**-putkesta 1ml suspensiota **4**-putkeen. Vortexoi. (*Huom! Pipetoi kolmeen **4**-putkeen 1ml suspensiota Staf. Aur ja E.Colille.*)
 - Pipetoi **4**-putkesta 1ml suspensiota **3**-putkeen. Vortexoi. (*Huom! Pipetoi kolmeen **3**-putkeen 1ml suspensiota H.I, St.Py, St.Pne, Pse*)
5. Pipetoi tutkimusputkiin laimennosta:
- Avaa varovasti korkit ja aseta ne alustalle ylöspäin.
 - Pipetoi tutkimusputkiin (3x Li-He, 3x Na-F, 2x seerumi, 2x eSwab, yht 10 putkea) 2ml laimennosta (NaCl), vortexoi.
 - Pipetoi tutkimusputkiin (3x Li-He, 3x Na-F, 2x seerumi, 2x eSwab, yht 10 putkea) 2ml laimennosta (steriili vesi), vortexoi.
 - Laita eSwabin tikku mukaan putkeen.
 - Laita korkit takaisin.
 - Sekoita ensin 8krt, jonka jälkeen vielä vortexoi.
6. Seisota tarvittava aika huoneenlämmössä. (0h, 6h, 24h, 48h.) Merkitse paperille kellonaika ylös jolloin seisotus alkoi ja milloin seisotuksen tulee loppua.
7. Nimeä kasvatusaljat (2 x 10kpl) (TARKISTA BAKTEERILLE SOPIVA MALJA)
- **bakt. nimi, Li-He, seisotusaika, I, II tai II**
 - **bakt. nimi, Na-F, seisotusaika, I, II tai II**
 - **bakt. nimi, Seerumi, seisotusaika, I tai II**
 - **bakt. nimi, eSwab, seisotusaika, I tai II**
 - merkitse maljat steriilille vedelle punaisella täplällä.
8. Sivele näytteet kasvatusaljoille.
- Ota yhdestä putkesta 100 µl näytettä kasvatusaljalle (tarkista putki ja malja) ja sivele käyttäen L-sauvaa.
 - Tee seerumista ja eSwabista 48 tunnin seisotuksesta 100 µl LISÄKSI 10 µl kasvatusaljat.
9. Laita maljat lämpö- tai CO₂ kaappiin.
10. Laske edellisen päivän pesäkkeet ja merkitse tulos taulukkoon.
11. Nimeä seuraavat putket valmiiksi.
12. Viljele seuraavan päivän tutkittavat bakteerikannat.