



Gram-värjäysliuosten säilyvyystestaukset

Ida Jokela

Leena Niemi

Viivi Virkajärvi

OPINNÄYTETYÖ

Marraskuu 2024

Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma

JOKELA, IDA; NIEMI, LEENA & VIRKAJÄRVI, VIIVI:
Gram-värien säilyvyytestaukset

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 10 sivua
Marraskuu 2024

Gram-värjäys on tärkeä bakteerien ensivaiheen tunnistukseen käytettävä menetelmä. Se perustuu bakteerien soluseinien rakenteellisiin eroihin, erottaen bakteerit kahteen suureen ryhmään. Sen myötä Gram-positiiviset bakteerit värjäytyvät sinivioleteiksi ja gram-negatiiviset punertaviksi. Mikrobilääkityksen aloituksen kannalta on tärkeää tunnistaa bakteerit oikein joko gram-negatiivisiksi tai -positiivisiksi, sillä niihin tehoavat erilaiset lääkkeet.

Opinnäytetyö on Reagena Oy:n toimeksiantama, ja sen tarkoituksena on testata lääkinnälliseksi laitteeksi luokiteltavan Gram Staining Kit -tuotteen säilyvyyttä sekä tuottaa tuloksista kuvamateriaalia. Värjäysliuoksia oli säilytetty erilaisissa olosuhteissa ja simuloitu mm. kuljetuksen aikaisille lämpötilan vaihteluille altistumista. Säilyvyytestaukset perustuvat IVD-direktiivin korvanneeseen IVD-asetukseen, joka tuli portaittain voimaan.

Opinnäytetyössä käytettiin kolmea eri Tampereen ammattikorkeakoulun arkistosta löytyvää bakteerilajia, jotka viljeltiin maljoille ja värjättiin Gram Staining Kitin värjäysliuoksilla. Värjäykset suoritettiin kahdessa erässä. Ensimmäiset värjäykset suoritettiin lokakuussa 2023, jolloin testattiin huoneenlämmössä (18...25 °C:ssa) säilytettyä kittiä, lämpörasitettua kittiä (altistettu +37 °C:een) sekä käytönaikaisen säilyvyyden testaukseen tarkoitettua kittiä (säilytetty 24 h ajan korkit auki), josta tehtiin värjäykset aikapisteissä 0 h, 5 h ja 24 h. Tässä vaiheessa kaikissa värjäysliuoksissa oli jäljellä käyttöaika. Toiset värjäykset suoritettiin huhtikuussa 2024, kun värjäysliuosten päiväykset olivat menneet umpeen. 24 h auki olleilla värjäysliuoksilla suoritettiin tällöin vain yhden värjäykset.

Värjäystulosten perusteella kaikki värjäysliuokset pysyivät toimintakelpoisina, mutta lämpörasitetut (+37 °C) värjäysliuokset olivat alttiimpia artefaktoille, etenkin, kun niiden päiväys oli umpeutunut. Myös muut vanhentuneet värjäysliuokset olivat hieman alttiimpia erilaisille artefaktoille verrattuna niihin, joissa oli päiväystä jäljellä. Kaikki bakteerit värjäytyivät oikein gram-värjäysperiaatteen mukaisesti. Tutkimuksen perusteella Gram Staining Kitin värjäysliuokset ovat käyttökelpoisia vielä päiväyksen umpeutumisenkin jälkeen.

Asiasanat: gram-värjäys, bakteerit, säilyvyytestaus

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

JOKELA, IDA; NIEMI, LEENA & VIRKAJÄRVI, VIIVI:
Stability Study of Gram Staining Solutions

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 10 pages
November 2024

This bachelor's thesis is a part of the client's stability studies of the IVD-product Gram Staining Kit. The client is Reagen Oy, which is a Finnish company in the field of diagnostics. The objective of this study was to determine the stability of the Gram Staining Kit due to the new requirements of the IVD-act. The Gram stain is a staining technique used to classify bacteria in gram-positive and gram-negative bacteria. The Gram stain is an important first stage classifying method according to which clinicians choose the patient's antimicrobial medication.

In this study, three different species of bacteria were dyed using the Gram Staining Kit. These kits were stored in different temperatures to examine shelf life and simulate different conditions during transportation. The purpose of this was to assess the reliability of the dyeing results. The study examined shelf life in room temperature (18...25 °C) and stability during transport (exposed to +37 °C heat). Furthermore, the study examined in-use stability (stored with the caps off and stained at time points 0 h, 5 h and 24 h) and expired reagents (two months after expiration date).

During the study it became apparent that the reagents cannot freeze as the reagent containers broke in the freezer. Otherwise, different temperatures and other factors did not make the reagents unusable, but the number of artefacts increased in the samples. All bacteria were stained according to gram stain principle. In conclusion the reagents can withstand changing conditions, but the stain results may be affected by artefacts.

Key words: Gram staining, bacteria, stability study

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	7
2	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE	9
3	BAKTEERIT	11
	3.1 Bakteerien rakenne ja luokittelu	11
	3.2 Kokkibakteerit.....	13
	3.3 Sauvabakteerit	15
4	GRAM-VÄRJÄYS.....	17
	4.1 Värjäyksen periaate	17
	4.2 Värjäyksen tulkinta	19
	4.3 Virhelähteet.....	19
5	OPINNÄYTETYÖN TOTEUTTAMINEN.....	21
	5.1 Aineiston keruu	22
	5.2 Menetelmälliset lähtökohdat.....	23
	5.3 Käyttöturvallisuus	25
6	TULOKSET	27
7	JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA.....	34
	7.1 Tutkimuskysymykset.....	36
	LÄHTEET.....	37
	LIITTEET	41
	Liite 1 Gram Staining Kit värjäysohje (Reagena Oy).....	41
	Liite 2 Kuvamateriaalista koostettu PowerPoint -esitys.....	42

ERITYISSANASTO

Aerobinen bakteeri	Hapellisessa ympäristössä elävä bakteeri.
Anaerobinen bakteeri	Hapettomissa ympäristöissä elävä bakteeri.
Ekstra-kromosomaalinen	Perinnöllinen tekijä, joka ei sijaitse kromosomissa.
Fakultatiivisesti anaerobinen bakteeri	Vähähappisia tai hapettomia olosuhteita sietävä aerobinen bakteeri (Tieteen termipankki 2024a).
Fimbria	Ohuita karvoja, joilla bakteerit kiinnittyvät ympäristöönsä.
Flagella	Värekarva bakteerin liikkumista varten.
Kapseli	Useimmiten polysakkarideista koostuva, löyhästi solun ulkopuolelle liittynyt bakteeria suojaava rakenne (Skurnik & Vuopio 2020).
Lipopolysakkaridi	Rasvasta ja suurimolekyylisestä hiilihydraatista koostuva ulkokalvon molekyyli (Terveyskirjasto 2016).
Lipoproteiini	Soluseinän proteiineja, jotka auttavat bakteeria kiinnittymään isäntäsoluun ja osallistuvat ravinteiden kuljettamiseen solukalvon läpi (Kovacs-Simon, Titball & Michell 2010).
Lipoteikkohappo	Solukalvon rakennusaine, jonka tehtävänä on mm. tulehdusreaktion aiheuttaminen isännälle (Vuopio, Kuusela & Järvinen 2020).
Normaalimikrobisto	Ihmisessä esim. iholla normaalisti elävä tavallinen, yleensä haitaton mikrobisto (Tieteen termipankki 2024b).
Nukleoidi	Pakkautunut solun kromosomaalinen DNA.
Opportunisti	Tilannetta tai vallitsevaa olosuhdetta hyväksikäyttävä eliö.
Patogeeni	Taudinaiheuttaja.
Peptidoglykaani	Bakteerin soluseinän rakenneosa, joka ylläpitää solun muotoa.
Ribosomi	Proteiinista ja RNA:sta koostuva soluelin.

Soluseinä	Solukalvon ulkopuolinen rakenne, joka estää bakteerisolujen osmoottisen hajoamisen ja antaa niille ominaisen muodon (Skurnik & Vuopio 2020).
Sytoplasma	Solukalvon sisäpuolella oleva solulima.
Sytoplasminen membraani	Solurakenteita ympäröivä solukalvo.
S-kerros	Parakiteinen ohut proteiinikerros, joka on kiinnittynyt soluseinän uloimpaan osaan, ja joka voi suojata solua esim. haitallisilta entsyymeiltä. (Uniprot n.d.)
Teikkohappo	Peptidoglykaaniin kovalenttisesti sitoutuneita vesiliukoisia ja negatiivisesti varautuneita polymeerejä, jotka ovat välttämättömiä solun elinkyvyille (Murray ym. 2021.)

1 JOHDANTO

Gram-värjäys on yleinen bakteerien tunnistamiseen käytettävä värjäysmenetelmä, jonka avulla bakteerit voidaan jakaa värjäytyvyytensä perusteella gram-positiivisiin ja -negatiivisiin bakteereihin. Gram-värjäytyminen perustuu bakteerien soluseinien erilaisiin kemiallisiin ja fysikaalisiin ominaisuuksiin. Gram-positiiviset bakteerit värjäytyvät gram-värjäyksessä sinivioleteiksi ja gram-negatiiviset bakteerit vaaleanpunaisiksi tai punertaviksi. Gram-värjäys on nopea, tehokas ja helppo testi, jonka avulla klinikot voivat erottaa bakteerit kahteen suureen ryhmään, kehittää alustavan diagnoosin ja näin ollen aloittaa potilaan hoidon perustuen bakteerien luontaisiin eroihin (Murray, Rosenthal & Pfaller 2021).

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimii Reagena Oy, joka on suomalainen bioteknologiayritys. Reagena valmistaa, myy ja kehittää erilaisia korkealaatuisia tuotteita klinisille laboratorioille, apteekeille sekä teollisuudelle. Näihin kuuluu esimerkiksi erilaiset reagenssit, värjäysliuokset, puskurit ja fiksatiivit. Yksi Reagenan valmistamista tuotteista on lääkinnälliseksi laitteeksi luokiteltu Gram Staining Kit, joka sisältää bakteerien gram-värjäyksen tarvittavat neljä käyttövalmista värjäysliuosta.

IVD-asetus (EU 2017/746) on in vitro -diagnostisia lääkinnällisiä laitteita koskeva EU-asetus, jonka soveltaminen alkaa porrastettuna muutosasetuksen mukaisesti 26.5.2022. Uusi asetus korvaa in vitro -diagnostiikkaan tarkoitettujen lääkinnällisten laitteiden direktiivin 98/79/EY (IVDD) ja sen tavoitteena on parantaa lääkinnällisten laitteiden potilasturvallisuutta. (Fimea 2022.) IVD-asetuksen myötä Reagena toteuttaa Gram Staining Kit -tuotteelle säilyvyystestaukset, jotta tuote täyttää uuden asetuksen mukaiset vaatimukset.

Opinnäytetyön tarkoituksena on muuttuneiden vaatimusten pohjalta tutkia gram-värjäysliuosten säilyvyyttä osana Gram Staining Kit -tuotteen säilyvyystestauksia. Tavoitteena on tehdä gram-värjäyksiä eri bakteerikannoille Reagenan valmistamilla gram-värjäysliuoksilla sekä tuottaa toimeksiantajalle kuvamateriaalia värjäystuloksista. Säilyvyystestaukset perustuvat bakteerien värjäytymiseen oikein

värjäysliuksilla, joita on säilytetty eri lämpötiloissa simuloiden erilaisia olosuhteita, joihin ne voisivat joutua esimerkiksi kuljetuksen aikana. Vertailussa on mukana huoneenlämpötilassa säilytetyt, +37 °C:een lämpötilalle altistetut sekä vetokaappiin auki jätetyt värjäyskitit. Värjäysliuksia testattiin myös niiden viimeisen käyttöpäivän umpeuduttua.

Opinnäytetyön aihetta lähestyttiin IVD-asetuksen kautta, koska uusi asetus on ollut pohjana Gram Staining Kit -tuotteen säilyvyystestauksille. Opinnäytetyö käsittelee bakteerien teoriaa yleisellä tasolla sekä kuvailee tarkemmin työhön valittuja bakteereja, jotka ovat *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ja *Escherichia coli*. Värjättäväksi valikoitui kolme yleistä bakteeria, koska näytetyypien tuli vastata kliinisissä laboratorioissa rutiininomaisesti analysoituja potilasnäytteitä sekä kantojen tuli olla saatavilla Tampereen ammattikorkeakoulun näytearkistossa. Opinnäytetyössä käydään läpi myös gram-värjäyksen teoriaa ennen opinnäytetyön toteutuksen ja tulosten kuvausta sekä johtopäätöksiä ja pohdintaa.

Tutkimuskysymyksiksi valikoituivat seuraavat kysymykset:

1. Miten värjäysliuosten pitkäaikainen säilytys vaikuttaa värjäystulokseen?
2. Pysyvätkö värjäysliukset käyttökelpoisina, kun ne ovat altistuneet kuljetuksen aikaisille lämpötilan vaihteluille?
3. Miten reagenssipullon auki jättäminen vaikuttaa värjäystulokseen?
4. Miten vanhentuneiden värjäysliuosten käyttö vaikuttaa värjäystulokseen?

2 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyö on toteutettu osana Reagenan *Stability studies of IVD device* -suunnitelmaa (2021), jonka tavoitteena on määrittää Gram Staining Kit -tuotteen säilyvyys ja kuljetusrajoitukset. Meidän osuutenamme on suorittaa tuotteella bakteerien gram-värjäyksiä ja tutkia siten tuotteen säilyvyyttä. Säilyvyystutkimukset on järjestetty täyttämään IVD-asetuksen (2017/746/EU) vaatimukset.

IVD-asetus muuttaa in vitro -diagnostiikkaan tarkoitettujen lääkinnällisten laitteiden (IVD-laitteiden) vaatimuksia muun muassa riskiluokitusten sekä ilmoitettujen laitosten kohdalta. Laitevalmistajien tulee varmistaa, että laitteet täyttävät nämä vaatimukset. Muutokset vaativat laitevalmistajilta erilaisia toimia, kuten suorituskyvyn arviointia. IVD-asetus lisää seurantaa sekä valvontaa, joita suorittavat kansalliset toimivaltaiset viranomaiset ja Euroopan komissio. Tarkoituksena on luotettavan, vakaan ja avoimen sääntelykehyksen avulla parantaa kliinistä turvallisuutta sekä markkinoiden yhdenvertaisuutta. (Euroopan komissio 2020.)

Keskeisimpiä uuden asetuksen tuomia muutoksia potilasturvallisuuden parantamiseksi ovat esimerkiksi ilmoitettujen laitosten eli riippumattomien ulkopuolisten arviointilaitosten osallistuminen laitteiden turvallisuuden ja suorituskyvyn arviointiin ja valmistajien valvontaan, lisääntynyt painoarvo laitteilta vaadittavaan kliiniseen tutkimusnäyttöön ja koko elinkaaren mittaiseen suorituskyvyn seurantaan sekä koko toimitusketjua koskevat velvoitteet vastata laitteiden vaatimustenmukaisuuden varmistamisesta ja käyttöturvallisuudesta. (Fimea 2022.) Yhtenä suurimpana muutoksena on IVD-laitteiden riskiluokitukset. IVD-asetuksen mukaan ensisijaisesti laitteiden valmistajat luokittelevat omat laitteensa kansainvälisten luokitusperiaatteiden mukaisesti riskiluokkiin A-D. (Euroopan komissio 2020.)

Opinnäytetyön tarkoituksena on IVD-asetuksen pohjalta tehdä säilyvyystestauksia Reagenan valmistamille gram-värjäysliuoksille. Opinnäytetyössä tehdään kvalitatiivista tutkimusta, jonka tarkoituksena on tutkia gram-värjäysliuosten säilyvyyttä sekä huoneenlämmössä että altistuessaan kuljetuksen aikaisille lämpötilan vaihteluille. Tavoitteena on värjätä eri bakteerikantoja käyttämällä erilaisissa olosuhteissa olleita kittejä ja tuottaa tuloksista kuvamateriaalia toimeksiantajalle.

Reagena suorittaa värjäysliuksille omat analyysit, mutta ne eivät suoraan osoita tuotteen säilyvyyttä, joten päätös säilyvyydestä perustuu pääasiassa värjäysliuksiin.

Lisäksi tarkoituksena on tutkia värjäysliuosten käytön aikaista säilyvyyttä säilyttämällä värjäysliuksia vetokaapissa 24 tunnin ajan korkit auki. Käytön aikaisen säilyvyyden tutkimista ei ole kuvattu Reagenan säilyvyytutkimussuunnitelmassa, sillä kliinisten laboratorioden tulee itse määrittää tuotteen käytönaikainen kestävyys, johtuen vaihtelevista värjäyskammioiden ominaisuuksista ja värjäys-
taajuudesta eri laboratorioden välillä. Opinnäytetyön tavoitteena on kuitenkin kerätä toimeksiantajalle suuntaa antavaa tietoa myös tuotteen käyttökestävyydestä. Testasimme kittejä myös sen jälkeen, kun niiden viimeinen käyttöpäivä oli umpeutunut.

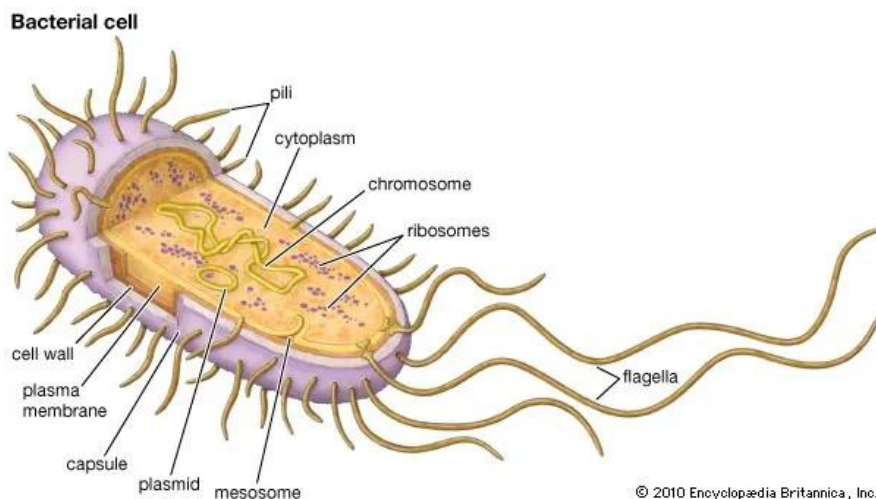
3 BAKTEERIT

Bakteerit ovat yksisoluisia mikrobeja, joita esiintyy ihmisten ja eläinten normaali-mikrobistossa sekä ympäröivässä maaperässä. Ihmiskehoa kolonisoivat bakteerit ovat pääsääntöisesti hyödyllisiä, sillä esimerkiksi suolistobakteerit osallistuvat ruoansulatukseen ja tuottavat vitamiineja. Vain pieni osa tunnetuista bakteereista on ihmiselle haitallisia, mutta ne voivat aiheuttaa erilaisia sairauksia vaihdellen flunssan kaltaisista oireista jopa hengenvaaralliseen septiseen shokkiin. (Willis 2020.)

Bakteeri infektoi isännän joko kiinnittymällä limakalvoon ja tunkeutumalla suoraan isäntäsoluun tai kiinnittymällä epiteelisoluihin ja tuottamalla isäntäsoluun tunkeutuvia toksiineja. Nämä vaikuttavat haitallisesti solun biokemiallisiin reaktioihin, minkä seurauksena solun toiminta häiriintyy tai solu kuolee. Joidenkin bakteerien lisääntyessä, ne ulottuvat yhä syvemmälle kudoksiin ja päätyvät lopulta verenkiertoon. Kehittyvissä maissa huono sanitaatio lisää infektioriskiä ja bakteeri-infektiot aiheuttavat usein kuoleman tai vamman. Korkean tulotason maissa bakteeri-infektiot ovat yleisimpiä kuolemaan johtavia tartuntatauteja. (Willis 2020.)

3.1 Bakteerien rakenne ja luokittelu

Bakteerit ovat prokaryootteja eli esitumallisia mikrobeja. Ne ovat mikroskooppisen pieniä ja rakenteeltaan suhteellisen yksinkertaisia (kuva 1). Niillä ei ole tumaa, vaan niiden rengasmaisen DNA-molekyylin, eli niin kutsuttu bakteerikromosomi, on solulimassa nukleoidina. (Skurnik & Vuopio 2020.) Bakteereilla voi olla myös ekstrakromosomaalisesta DNA:sta koostuvia plasmideja. (Murray ym. 2021). Bakteerien perusrakenteeseen kuuluvat DNA:n lisäksi ribosomit, sytoplasma, solukalvo, soluseinä, kapseli, fimbriat ja flagellat (Skurnik & Vuopio 2020).



KUVA 1. Bakterisolun rakenne: yläpuolella vasemmalta oikealle fimbriat, sytoplasma, rengasmaisen kromosomi, ribosomit ja flagellat sekä alapuolella vasemmalta oikealle soluseinä, solukalvo, kapseli, plasmidi ja mesosomi. (Kuva: Encyclopedia Britannica).

Soluseinän rakenne, komponentit ja toiminnot erottavat bakteerit joko gram-positiivisiksi tai -negatiivisiksi. Gram-positiivisten bakteerien soluseinässä on teikkoja ja lipoteikkohappoja sisältävä paksu peptidoglykaanikerros. Gram-negatiivisilla bakteereilla on soluseinässään ohut peptidoglykaanikerros sekä ulkomembraani, joka sisältää lipopolysakkarideja, fosfolipidejä ja proteiineja. Ulkomembraanin ja solukalvon välinen alue, periplasminen tila, sisältää mm. proteiinien ja aineenvaihduntatuotteiden kuljetusjärjestelmien komponentteja sekä hydrolyyttisiä entsyymejä. (Murray ym. 2021.)

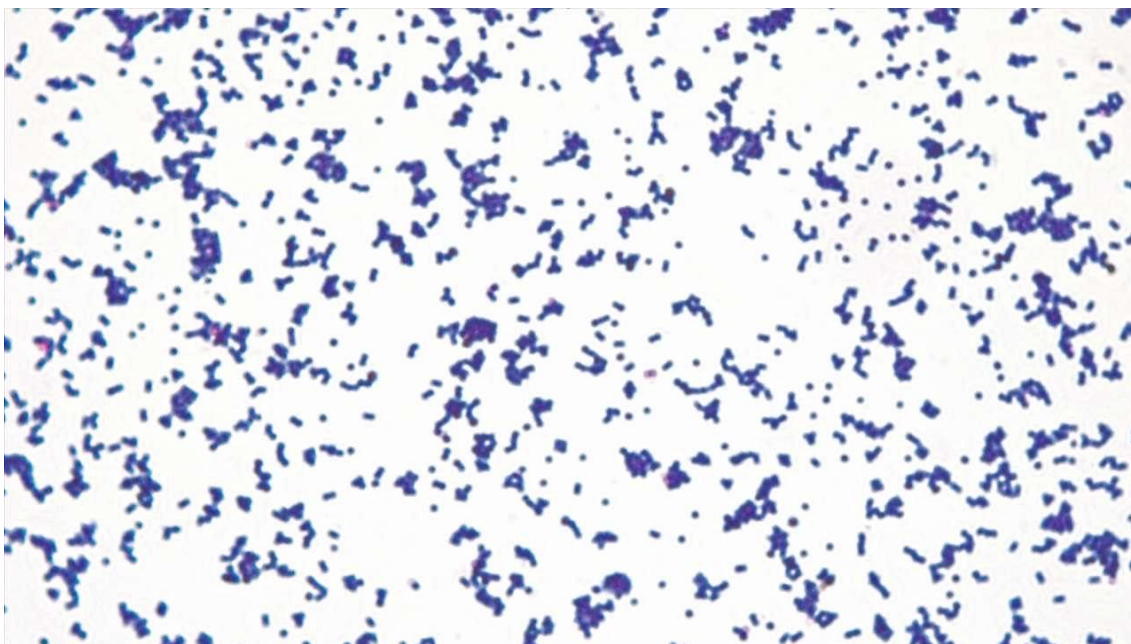
Bakteereja voidaan luokitella makroskooppisen ja mikroskooppisen ulkonäön, tyypillisten kasvu- ja aineenvaihduntaominaisuuksien sekä antigeenien ja genotyypin mukaan (Murray ym. 2021). Bakteerien taksonominen luokittelu perustuu nykyisin bakteerien DNA-rakenteeseen ja luokittelussa voidaan käyttää erilaisia testejä. Rutiinidiagnostiikassa bakteerien tunnistuksessa pyritään kuitenkin yksinkertaisuuteen, nopeuteen sekä toistettavuuteen. Infektiodiagnostiikassa bakteerit tyypitetään edelleen pääosin fenotyyppiominaisuuksien mukaan. Infektioiden alustavassa toteamisessa tärkeitä parametrejä ovat mm. bakteerien gramvärjäytyvyys sekä solujen morfologia. (Munukka & Eerola 2020.)

Bakteerit jaetaan muodon perusteella mm. kokkeihin (pallomaisia), sauvoihin (sylinderimäisiä), vibrioihin (käyristyneitä sauvoja) ja spirokeettoihin (kierteisiä). Kokkobasillit ovat kokkien ja sauvojen välimuotoja. Bakteerit voivat ryhmittyä tunnusomaisella tavalla esimerkiksi pareiksi (diplokokkeja), ketjuiksi tai ryhmiksi (Carlson & Koskela 2011). Vaatimukset kasvuolosuhteiden suhteen määrittelevät, ovatko bakteerit aerobisia, anaerobisia vai fakultatiivisesti anaerobisia. (Murray 2018.)

3.2 Kokkibakteerit

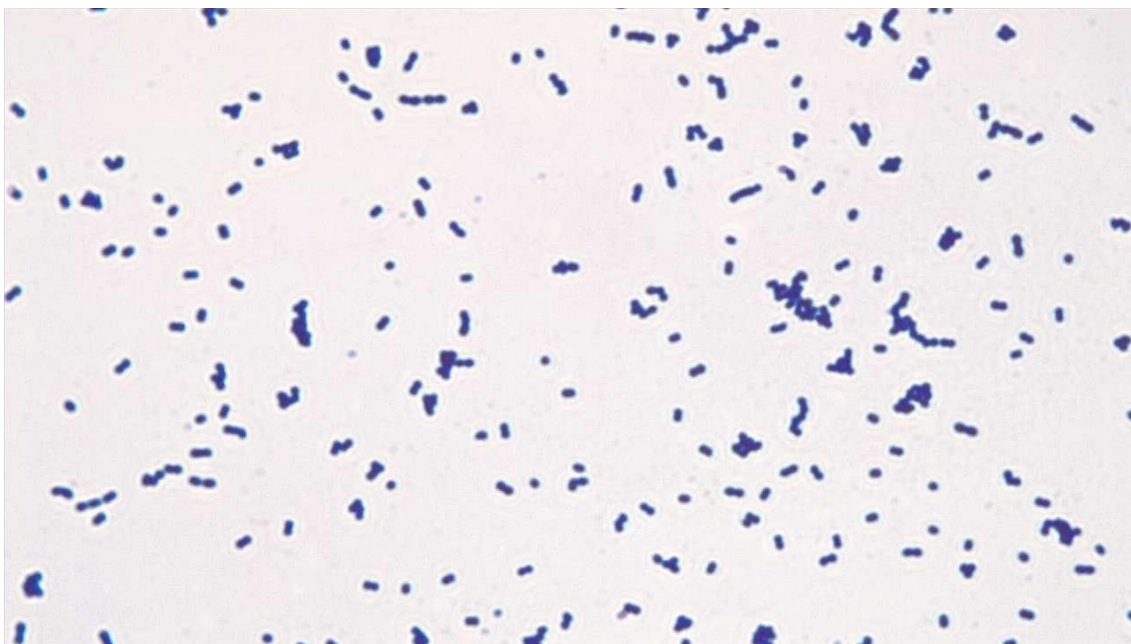
Aerobiset gram-positiiviset kokit ovat heterogeeninen ryhmä pallomaisia bakteereja, joita esiintyy yleisesti suussa, maha-suolikanavassa, virtsateissä ja iholla. Näistä tärkeimmät ja yleisimmät bakteri-infektioihin liittyvät suvut ovat *Staphylococcus*, *Streptococcus* ja *Enterococcus*. (Murray 2018.)

Staphylococcus aureus on yleinen ihon ja limakalvojen bakteeri. Se esiintyy joka neljännellä terveellä suomalaisella iholla tai nenänielussa (Anttila 2024). *S. aureus* on gram-positiivinen ryhmäkokki (kuva 2), joka aiheuttaa infektioita niin perusterveille kuin henkilöille, joiden vastustuskyky on heikentynyt. Tärkeimpiä *S. aureuksen* aiheuttamia infektioita ovat muun muassa märkäiset iho- ja pehmytkudosinfektiot, leikkaushaavainfektiot sekä vakavat yleisinfektiot, kuten bakteremia. *S. aureus*:ta esiintyy myös metisilliini mikrobilääkkeelle resistentteinä MRSA-kantoina. Nämä kannat ovat muuntuneet resistenteiksi myös lähes kaikille beetalaktaamimikrobilääkkeille. MRSA-löydökset tulee ilmoittaa tartuntatautirekisteriin. (Järvinen, Kuusela & Vuopio 2020.)



KUVA 2. *Staphylococcus aureus* on gram-positiivinen kokki, joka värjättyy gram-värjäyksellä sinivioletiksi. (Kuva: Ida Jokela)

Streptococcus pyogenes on A-ryhmään kuuluva gram-positiivinen beetahemolyttinen ketjukokki (kuva 3), joka elää ihmisen limakalvoilla. Se kuuluu yleisimpiin lasten ja aikuisten bakteeri-infektioiden aiheuttajiin. *Str. pyogenes* aiheuttaa yleisimmin nielurisatulehdusta ja useimmiten nieluinfektiot esiintyvät epidemiana. Tällöin tärkein hoitokeino on varhainen antibioottihoidon aloitus. Tautikirjo on kuitenkin laaja ja *Str. pyogenes* voi myös aiheuttaa infektiota iholla ja pehmytkudoksissa tai vakavan yleisinfektion, kuten sepsiksen. *Str. pyogenes* tarttuu tyypillisesti pisaratartuntana, mutta joskus myös kosketustartuntana oireellisesta tai oireettomasta kantajasta. (Vuopio & Syrjänen 2020.)



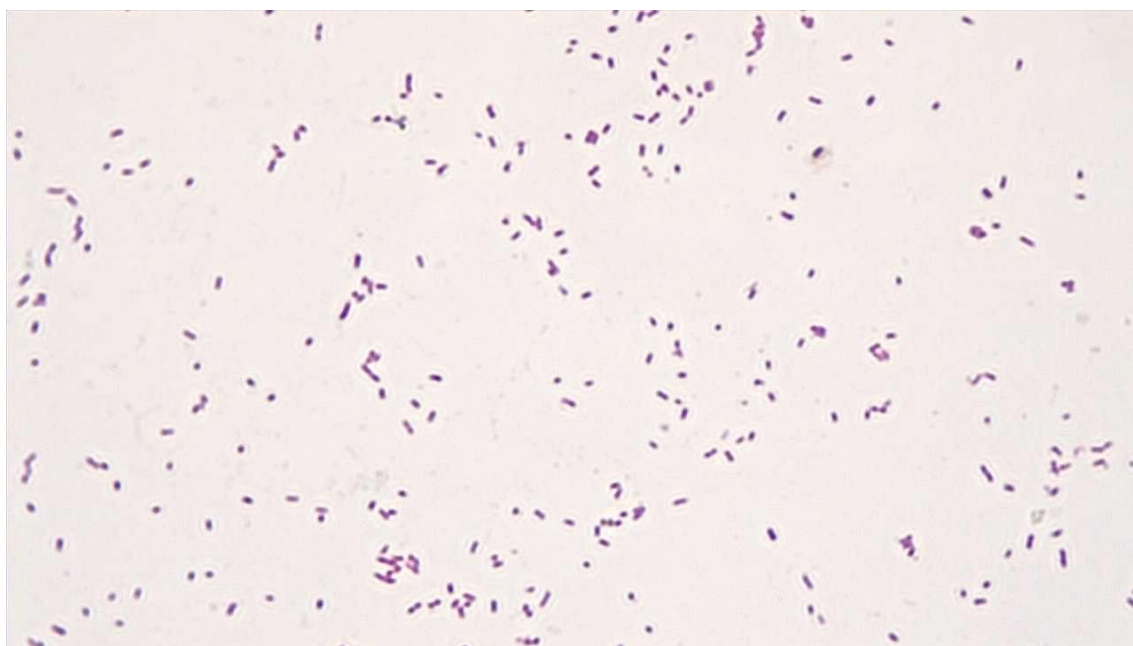
KUVA 3. *Streptococcus pyogenes* on gram-positiivinen kokki, joka värjättyy gram-värjäyksellä sinivioletiksi. (Kuva: Ida Jokela)

Gram-negatiivisia kokkeja ovat *Neisseriaceae*-heimoon kuuluvat neisseriat, joista tärkeimmät ihmispatogeenit ovat tippuria aiheuttava *N. gonorrhoeae*, sekä sepsistä ja aivokalvontulehdusta aiheuttava *N. meningitidis*. Lisäksi heimoon kuuluu monia muita lajeja, jotka ovat normaaleja suunielun asukkaita. (Berkowitz & Jerris 2015.)

3.3 Sauvabakteerit

Aerobiset gram-positiiviset sauvabakteerit voidaan jakaa itiöitä muodostaviin sauvoihin, joista yleisin on *Bacillus* sekä itiöitä muodostamattomiin sauvoihin, joista yleisimpiä ovat *Listeria* ja *Corynebacterium*. Anaerobisia itiönmuodostajia ovat *Clostridium*- ja *Clostridioides*-sukujen jäsenet, joita esiintyy maaperässä ja muussa ympäristössä. Näistä tunnetuimpia ovat jäykkäkouristusta aiheuttava *Clostridium tetani*, botulismia aiheuttava *Clostridium botulinum*, kaasukuoliota aiheuttava *Clostridium perfringens* ja antibioottiripulia aiheuttava *Clostridioides difficile*. (Murray 2018.)

Gram-negatiiviset sauvat muodostavat suuren bakteerijoukon, johon sisältyy monia heimoja, sukuja ja lajeja. Useimmat kliiniset isolaatit kuuluvat *Enterobacteriaceae*-heimoon. (Berkowitz & Jerris 2015.) Enterobakteereista tunnetuin on *Escherichia coli*, joka on hyvin laajalti tutkittu bakteeri. *E. coli* on gram-negatiivinen sauva (kuva 4) ja se on ihmisen suoliston normaalimikrobiston yleisin aerobinen bakteerilaji. *E. colit* ovat useimmiten ihmiselle harmittomia ja niitä pidetään hyödyllisinä, sillä ne estävät patogeenejä esiintymästä ja lisääntymästä suolistossa. *E. colit* voivat kuitenkin muuttua opportunistisiksi patogeeneiksi ja aiheuttaa erilaisia infektioita, joista tavallisimpia ovat ripuli ja virtsatieinfektiot. Ripulia aiheuttavat *E. colit* tarttuvat yleensä saastuneen ruoan ja veden välityksellä. Virtsatieinfektioissa ja kirurgisissa infektioissa *E. coli* on peräisin yleensä ihmisen omasta suolistosta. (Hakanen, Kantele & Salmenlinna 2020.)



KUVA 4. *Escherichia coli* on gram-negatiivinen sauva, joka värjäytyy gram-värjyksellä punertavaksi. (Kuva: Leena Niemi)

4 GRAM-VÄRJÄYS

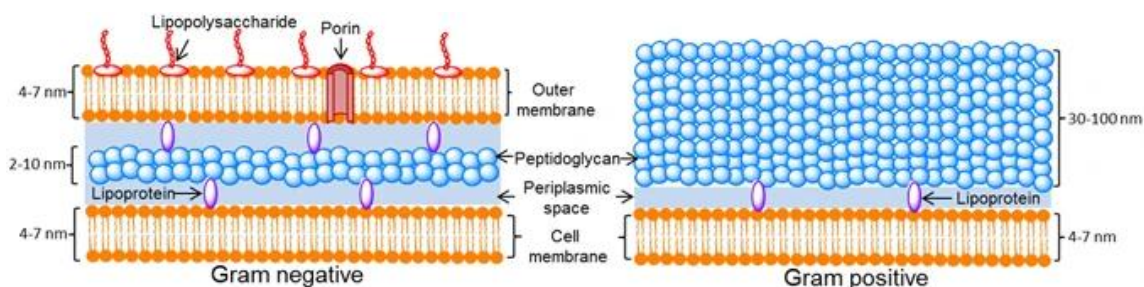
Gram-värjäys on Hans Christian Gramin vuonna 1884 kehittämä bakteerien värjäysmenetelmä, jolla on mahdollista erottaa gram-positiiviset ja gram-negatiiviset bakteerit toisistaan käyttämällä kristallivioletti-jodikompleksia sekä safraniini-vas-taväriä. Gram-värjäys on nykyään yksi tärkeimmistä bakteerien värjäystekniikoista. Se on edullinen ja yksinkertainen menetelmä, jota käytetään maailmanlaajuisesti. Gram-värjäyksen avulla voidaan nopeasti arvioida patogeenien morfologisia ominaisuuksia infektoituneelta alueelta otetusta näytteestä. (Yoshimura, Ogura & Oda 2023.) Värjäys on mahdollista tehdä joko suoraan näytteestä tai viljelystä bakteeripesäkkeestä (Vuento & Vuorinen 2020).

Gram-värjäys on tärkeä pikatesti, joka antaa alustavaa tietoa mahdollisesta infektiotaudista. Se on hyödyksi etenkin märkäisen aivokalvontulehduksen laboratoriodiagnostiikassa. Lisäksi gram-värjäyksen avulla voidaan todeta alustavasti miehen tippuri sekä hengenvaarallinen kaasukuolio. (Carlson & Koskela 2011.) Bakteremian tunnistamisessa tieto bakteerin gram-värjäytyvyydestä sekä muodosta ja ryhmittymisestä auttavat antibiootihoidon valinnassa ennen kuin bakteeri tunnistetaan tarkemmin muilla menetelmillä (Anttila 2024). Gram-negatiivisten bakteerien soluseinässä olevan ulkomembraanin tehtävä on suojella bakteeria haitallisilta aineilta, minkä vuoksi monet gram-positiivisiin bakteereihin vaikuttavat bakteerilääkkeet eivät tehoa gram-negatiivisiin bakteereihin (Skurnik & Vuopio 2020).

4.1 Värjäyksen periaate

Gram-värjäys on differentiaalivärjäys eli siinä käytetään useampaa kuin yhtä värjäysliuosta ja prosessi koostuu useista vaiheista, mikä mahdollistaa solurakenteiden erottumisen. Värjäys perustuu eroihin gram-positiivisten ja gram-negatiivisten bakteerien soluseinissä (kuvio 1) sekä gram-positiivisten bakteerisolujen kykyyn säilyttää primaariväriä käytettävä kristallivioletti (Ahern 2018). Sinivioletiksi värjäytyvillä gram-positiivisillä bakteereilla kristallivioletti jää loukkuun soluseinän

verkkomaiseen peptidoglykaanikerrokseen, toisin kuin gram-negatiivisilla bakteereilla, joilla peptidoglykaanikerros on ohuempi. Tämän vuoksi ne vastavärjätään safraniinilla punertaviksi. (Murray ym. 2021.)



KUVIO 1. Gram-negatiivisen ja gram-positiivisen soluseinän erot. Gram-negatiivisella bakteerilla on ohut peptidoglykaanikerros solukalvon ja ulkokalvon välisessä periplasmisessa tilassa. Lipidikaksoiskerroksesta koostuva ulkomembraani sisältää lipopolysakkarideja ja erilaisia kanavia. Gram-positiivisen bakteerin solukalvoa ympäröi paksu peptidoglykaanikerros. Lipoproteiinit sitovat solukalvon hydrofobisilla sidoksilla ja peptidoglykaanin vetysidoksilla. (Berezin, Aviv, Y., Aviv, H., Goldberg & Tischler 2017.)

Ennen värjäämistä bakteerit on siirrettävä ja kiinnitettävä objektilaseille. Pieni määrä bakteeria levitetään ohuelti objektilasin pinnalle ja lasi ilmakuivataan. Tämän jälkeen bakteerit kiinnitetään lasille joko kemiallisesti tai fysikaalisesti, jotta ne eivät huuhtoutuisi pois värjäysvaiheiden aikana. Bakteerit voidaan kiinnittää lasille helposti ja tehokkaasti lämmön avulla viemällä objektilasi lyhyesti Bunsen-polttimen liekin läpi. (Ahern 2018.)

Kun bakteerit on kiinnitetty objektilasille, ne käsitellään emäksisellä kristalliviolettiliuoksella (Carlson & Koskela 2011). Vesipohjaisissa liuoksissa kristallivioletti erottuu kristallivioletti-ioneiksi (CV^+) ja kloridi-ioneiksi (Cl^-), jotka läpäisevät bakteerien soluseinän membraanin. CV^+ reagoi bakteerien negatiivisesti varautuneiden komponenttien kanssa värjäten ne sinivioleteiksi (Hussey & Smith 2005). Väri kiinnitetään bakteereihin jodi-kaliumjodidiliuoksella (Carlson & Koskela 2011). Kun lasille lisätään jodi-kaliumjodidiliuosta, jodidi (I^- tai I_3^-) reagoi CV^+ ionin kanssa muodostaen isoja kristallivioletti-jodikomplekseja ($CV-I$) bakteerisolun sytoplasmassa ja uloimmissa kerroksissa. (Hussey & Smith 2005.)

Objektilasit huuhdellaan asetonispriillä, jonka avulla kristallivioletti huuhtoutuu pois gram-negatiivisista bakteereista (Carlson & Koskela 2011). Väriä poistava aine (etanoli tai etanoliasetoniliuos) reagoi bakteerien membraanien lipidien kanssa. Gram-negatiivisten bakteerien ulkomembraani häviää käsittelyssä ja esille jää peptidoglykaanikerros. Tämän myötä gram-negatiivisten bakteerien soluseinät muuttuvat läpäiseviksi ja isot CV-I kompleksit voivat huuhtoutua solun sisältä pois. Gram-positiivisten bakteerien monikerroksinen, ristosilloitettu peptidoglykaanikerros pitää sisällään isot CV-I kompleksit. Tätä myös edesauttaa solua kuivattava etanolikäsittely. Väriinpoiston jälkeen gram-positiivinen solu pysyy siis siniviolettina ja gram-negatiivinen solu menettää värinsä. Vastavärinä käytetään positiivisesti varautunutta safraniinia, joka värjää gram-negatiiviset bakteerit lopulta punertaviksi. (Hussey & Smith 2005.)

4.2 Värjäyksen tulkinta

Värjätyt objektilasit tarkastellaan mikroskoopissa 100-kertaisella öljyimmissio-objektiivilla. Tulkinnassa otetaan huomioon näytteen edustavuus ja kelvollisuus, bakteerien ja muiden solujen määrä, bakteerien värjäytyvyys gram-positiivisiksi (nähtävissä mikroskoopilla sinivioletteina) tai gram-negatiivisiksi (nähtävissä punertavina tai vaaleanpunaisina) sekä bakteerien morfologia. Tulkintaa voi häiritä näytteen kontaminoituminen normaalimikrobistolla. (Reagena Oy 2022.)

4.3 Virhelähteet

Vaikka gram-värjäys on ollut käytössä jo yli vuosisadan ajan, se on edelleen altis virheille. Värjäystulokseen voivat vaikuttaa pienet vaihtelut niin preanalyttisessä, analyttisessä kuin postanalyttisessä vaiheessa. Tällaisia tekijöitä ovat esimerkiksi aikaisempi antibioottihoito, näytteenotto, näytteen kiinnitys, väriinpoisto ja värjäyksen tulkinnan subjektiivisuus. Käsin värjättyjen objektilasien värjäyslaatu riippuu värjääjän taidoista, joten värjäyksen laatu voi vaihdella ajan mittaan sekä eri henkilöiden välillä. Värjäysautomaateissa käytettävät standardoidut protokollat lisäävät tulosten vertailukelpoisuutta ja johdonmukaisuutta sekä helpottavat

värjäysprosessia. (Froböse, Bjedov, Schuler, Kahl, Kampmeier & Schaumburg 2020.)

Suurin virhe gram-värjäyksen tulkinnassa on gram-negatiivisten bakteerien tulkinta gram-positiiviseksi ja toisin päin. Näistä yleisempi on gram-positiivisten bakteerien tulkinta gram-negatiiviseksi. Gram-positiiviset bakteerit voivat menettää kykynsä pitää kristalliviolettiä sisällään. Tämä voi tapahtua antibiootihoidon tai liiallisen liekkikiinnityksen myötä, jolloin bakteerin soluseinä vahingoittuu. Vanhan jodidiliuksen käyttö voi myös aiheuttaa vääriä negatiivisia tuloksia. Tällöin jodidiliuos on muuttunut ruskeasta keltaisen väriseksi. Myös liian heikko jodidiliuos voi jättää bakteerit värjäytymättä, kun kristallivioletin kanssa reagoivia ioneja ei ole tarpeeksi. (Sandle 2020.)

Kuitenkin yleisin syy väärin värjäytymiseen on liiallinen värinpoisto. Kun värinpoistovaiheessa vaikutusajat ovat liian pitkiä, kristallivioletti huuhtoutuu pois myös gram-positiivisista bakteereista. Joidenkin bakteerien peptidoglykaanikerros ohenee ajan myötä, jolloin ne myös saattavat värjäytyä väärin gram-negatiiviseksi. Tämän takia suositellaan aina tuoreiden viljelmien käyttöä. Gram-värjäys itsessään voi myös aiheuttaa joidenkin bakteerien proteiinien S-kerroksen heikentymistä. Heikentyneet soluseinät eivät pysty pitämään sisällään kristallivioletti-jodikomplekseja. (Sandle 2020.)

On myös mahdollista, että gram-negatiiviset bakteerit ilmenevät gram-positiivisina. Liian paksut näytteet eivät välttämättä peseydy kristallivioletista oikein värinpoistovaiheessa, koska paksumpi näyte tarvitsisi pidemmän vaikutusajan. La-seilla olisi myös hyvä olla negatiivinen ja positiivinen kontrolli, jotta värjäysprosessin mahdolliset virheet tulisivat helpommin havaittaviksi. (Sandle 2020.)

Tutkimuksen mukaan gram-värjäyksen virhemarginaaleissa on eroja eri laboratorioden välillä. Tutkimus suoritettiin Yhdysvalloissa neljän mikrobiologian laboratorion kesken. Tutkimuksen mukaan 5 %:ssa kaikista näytteistä oli epäjohtomukaisuuksia viljelyn ja gram-värjäyksen välillä. 24 % poikkeavista tuloksista johduivat tulkintavirheistä. (Samuel ym. 2016.) Toisen tutkimuksen mukaan virhemarginaali on noin 3 % luokkaa. Tässä tutkimuksessa otoksena oli yli 6115 gram-värjättyä näytettä. Eniten virheitä aiheutti liiallinen värinpoisto. (Sandle 2020.)

5 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTTAMINEN

Opinnäytetyössä tehtiin kvalitatiivista eli laadullista tutkimusta värjäämällä bakteereja Reagenan valmistamalla Gram Staining Kit -tuotteella ja tutkimalla, miten tuotteen erilaiset säilytysolosuhteet vaikuttavat bakteerien gram-värjäytyvyyteen. Värjäystuloksista kerättiin myös kuvamateriaalia Reagenalle. Opinnäytetyön empiirinen osuus eli värjäysten suoritus ja kuvamateriaalin kerääminen suoritettiin kahdessa erässä, joista ensimmäinen toteutettiin 2023 lokakuussa ja toinen 2024 huhtikuussa. Empiirisen osuuden kaikki vaiheet bakteerien sulatuksesta mikroskopointiin suoritettiin Tampereen ammattikorkeakoulun mikrobiologian laboratoriotiloissa. Työssä käytettiin kolmea eri bakteerikantaa. Bakteereiksi valittiin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ja *Streptococcus pyogenes* -bakteerikannat, sillä tutkimuksessa käytettävien näytetyyppien tuli vastata laboratorioissa rutiininomaisesti analysoituja potilasnäytteitä. Työssä käytetyt bakteerit sekä muut materiaalit ja laitteet saatiin käyttöön Tampereen ammattikorkeakoululta, lukuun ottamatta gram-värjäysliuoksia ja värjäysprotokollaohjetta, jotka saimme Reagenalta.

Reagenalta toimitettiin testattavaksi kolme eri värjäyskittiä lokakuussa 2023 (taulukko 1). Testattaviin värjäyskitteihin kuuluivat huoneenlämmössä säilytettävät värjäysliuokset, joille toimeksiantaja oli suorittanut reaaliaikaisen säilyvyysajan seurannan 18...25 °C:ssa ja simuloituille kuljetuksen aikaisille lämpötilan vaihteluille altistuneet värjäysliuokset, joille toimeksiantaja oli suorittanut lämpörasituksen 3 päivän ajan +37 °C:ssa. Käytön aikaista säilyvyyden seuranta varten toimitettiin myös erillinen värjäyskitti, jota säilytettiin TAMK:lla korkit auki veto-kaapissa 24 tunnin ajan. Käytössä olleet kitit olivat kaikki samaa erää AB15/1 ja värjäysliuosten normaali säilyvyysaika on 12 kk 2...25 °C:n lämpötilassa. Lokakuussa 2023 koululle toimitettuja värjäysliuoksia oli säilytetty huoneenlämmössä 7–8 kk ajan, ja huhtikuuhun 2024 mennessä värjäysliuoksia oli säilytetty huoneenlämmössä 13–14 kk. Värjäyshetkellä keväällä niiden viimeinen käyttöpäivä oli siis umpeutunut 1–2 kk sitten.

TAULUKKO 1. Testattavaksi toimitetut värjäyskitit. Värjäysliuosten normaalit säilytysolosuhteet ovat valolta suojattuna 2...25 °C:ssa ja säilyvyysaika avaamattomana 12 kk (Reagena Oy 2022).

Säilyvyystutkimus	Säilytysolosuhteet Reagenalla	Säilytysolosuhteet TAMK:lla
Reaaliaikainen säilyvyysajan seuranta	7–8 kk 18...25 °C	13–14 kk 18...25 °C
Kuljetuksen aikaisen säilyvyyden testaus	3 päivää +37 °C ja tämän jälkeen säilytetty 7–8 kk 18...25 °C	13–14 kk 18...25 °C
Käytön aikaisen säilyvyyden testaus	7–8 kk 18...25 °C	Pidetty korkkeja auki 24 h ja tämän jälkeen säilytetty 13–14 kk 18...25 °C

Reagena suoritti värjäysliuoksille lämpörasitus- ja kylmärasitustestit 7–8 kk ennen omaa kokeellista osuuttamme. Kristallivioletti 2 % m/V, safraniiniliuos ja Lugolin liuos altistettiin lämmölle, mutta asetonispiiriin 1:1 säilyvyyttä lämmölle altistuessa ei tutkittu, sillä se on helposti syttyvä neste ja turvallisuuden vuoksi maksimi säilytyslämpötila sille on 25 °C. Myös ulkoisia lämmönlähteitä tulee välttää (Reagena Oy 2021). Kylmärasituksessa värjäysliuokset altistettiin 3 päivän ajan -18...-36 °C:n lämpötilalle. Kylmärasituksessa olleista värjäysliuoksista kuitenkin todettiin, etteivät reagenssipakkaukset kestä kylmää, joten näitä värjäysliuoksia ei toimitettu ollenkaan värjättäväksi, kuten oli alun perin suunniteltu.

5.1 Aineiston keruu

Lokakuussa 2023 testattiin reaaliaikaisen säilyvyysajan seurannan värjäyskittiä, kuljetuksen aikaisen säilyvyyden värjäyskittiä sekä käytön aikaiseen säilyvyyden seurantaan käytettävää värjäyskittiä. Ennen värjäysten suoritusta valitut bakteerikannat otettiin syväjäädästä -80 °C:sta sulamaan huoneenlämpöön, jonka jälkeen bakteerit viljeltiin sekä suklaa- että verimaljoille käyttämällä viljelysilmukoita ja -sauvoja. Viljellyt maljat siirrettiin inkuboitumaan lämpökaappiin +37 °C:een viikonlopun ajaksi. Seuraavan viikon (41) tiistaina kasvatetut bakteerit otettiin pois

lämpökaapista. Bakteeripesäkkeistä otettiin bakteeria viljelysilmukoilla ja -sauvoilla, ja ne suspensoitiin objektilasille laitettuun NaCl-tippaan. Bakteerit kiinnitettiin lasille liekittämällä. Jokaisesta bakteerista tehtiin kaksi rinnakkaista lasia josta testattavaa värjäyskittiä varten. Objektilasit merkittiin asianmukaisella tavalla bakteerikannan ja testattavan värjäyskitin mukaan. Käytön aikaiseen säilyvyyden seurantaan käytettävää värjäyskittiä säilytettiin korkit auki 24 tunnin ajan ja värjäykset suoritettiin 0, 5 ja 24 tunnin kohdalla. Näin ollen värjättäviä lasipreparaatteja tuli yhteensä 30.

Huhtikuussa 2024 testattiin samoja värjäyskittejä, kuin lokakuussa. Tällöin värjäysliuokset olivat jo vanhentuneita, koska siihen mennessä niitä oli säilytetty 13-14kk ajan. Objektilasien valmistuksessa käytettiin muuten samoja menetelmiä ja värjäyksessä samaa protokollaa kuin syksyllä, mutta käytön aikaisen säilyvyyden seurannan värjäyskitillä värjättiin lasit vain yhden kerran, eikä pulloja pidetty auki vetokaapissa. Lasipreparaatteja valmistettiin värjättäväksi tällä kerralla yhteensä 18.

5.2 Menetelmälliset lähtökohdat

Syväästä sulatetut bakteerit viljeltiin maljoille käyttämällä hajotusviljelytekniikkaa. Tekniikan tarkoituksena on saada viljelymaljalle yksittäisiä bakteeripesäkkeitä erilleen toisistaan. Hajotusviljelytekniikassa näytettä levitetään viljelysauvalla aluksi pienelle alueelle viljelymaljaa, josta sitä aletaan levittämään laajemmalle alueelle pyörittämällä maljaa samalla ja tekemällä pidempiä ja hajanaisempia sivelyitä viljelysauvalla. Viljelyalueen tulisi olla kolmessa eri kohdassa maljaa. (Carlson & Koskela 2011.)

Erilaisia elatusainemaljoja on useampia, mutta opinnäytetyössä käytettiin vain suklaa- ja verimaljoja, joilla kasvatetaan aerobisia bakteereita. Kahdenlaisiin maljoihin päädyttiin bakteerien kasvun varmistamiseksi. Elatusainemaljat sisältävät agaria ja nestemäistä elatusainetta, jotka on valettu muoviselle petrimaljalle. Elatusaine toimii ravinteena bakteereille (Carlson & Koskela 2011). Verimaljoissa elatusaineena käytetään yleensä lampaan tai hevosen verta ja niihin lisätään hydrolysoituja proteiineja, hiivauutetta, natriumkloridia ja tryptonia (Thermo

Fisher Scientific 2024). Suklaamaljat sisältävät kuumentamalla hajotettua verta. (Carlson & Koskela 2011.)

Viljeltyt bakteerit tarvitsevat vähintään +35 °C:een lämpötilan kasvaakseen, ja niitä kasvatetaan n. 2 vuorokautta, mutta aerobisten bakteerien kohdalla usein riittää 1 vuorokausi (Carlson & Koskela 2011). Bakteereja kasvatettiin inkubaattorissa lokakuussa 2023 aikataulullisista syistä 3 vuorokauden ajan ja huhtikuussa 2024 n. 1 vuorokauden ajan. Kasvaneista pesäkkeistä kerätyt bakteerit suspensoitiin NaCl-tippaan bakteeripitoisuuden laimentamiseksi, jotta bakteeria ei olisi lasilla liian paksulta. Lasit ilmakeivattiin ja bakteerit kiinnitettiin liekillä muutamana sekunnin ajan, koska mikrobiologian laboratoriotiloissa oli käytettävissä Bunsen-polttimet.

Värjäysliuokset toimitettiin TAMK:lle noin viikkoa ennen ensimmäisiä värjäyksiä ja mittauksia. Reagena suoritti UV-VIS-spektrofotometriset mittaukset kristallivioletti- ja safraniiniliuoksille, määrittäen Lugolin liuoksen jodipitoisuuden titraamalla sekä mittasi asetonispiiriin tiheyden, kun liuosten valmistuksesta oli kulunut 7–8 kk ja 13–14 kk. Kuljetuksen aikaiseen säilyvyyden testaukseen käytettävillä värjäysliuoksilla Reagena suoritti mittaukset 1–3 päivän kuluttua lämpörasituksesta ja seuraavan kerran 13–14 kk:n kuluttua (Reagen Oy 2021). Värjäykset suoritettiin TAMK:illa Reagenan värjäysohjeen mukaan.

Lasipreparaattien värjäys suoritettiin kokonaisuudessaan vetokaapissa, johon koottiin ennen värjäyksen aloittamista tarvittavat tarvikkeet, eli muoviset pasteuripipetit, värjäysjäteastia ja värjäysteline, sellupaperia, sekä värjäysliuokset. Värjäysliuoksia käännettiin muutamana kerran ennen vetokaappiin laittoa, jotta liuos olisi mahdollisimman tasaisesti sekoittunut. Koska väripullot olivat isoja (500 ml), pipettejä käytettiin värjäysliuosten ”kaatamiseen” lasille. Pipetit laitettiin avattuihin pulloihin valmiiksi työn sujuvuutta helpottamaan. Aikaa mitattiin sekuntikellolla ja työt jaettiin siten, että kaikki pääsivät osallistumaan.

Värjääminen aloitettiin Reagenan värjäysohjeen (liite 1) mukaan kristallivioletilla, jonka annettiin vaikuttaa lasilla 1 minuutin ajan. Minuutin kuluttua ylimääräinen väri valutettiin lasilta pois värjäysjäteastiaan. Seuraavaksi lasit värjättiin Lugolin liuoksella, jonka annettiin vaikuttaa lasilla 1 minuutin ajan. Tämän jälkeen lasit

huuhdeltiin vedellä n. 5 sekunnin ajan. Asetonispriitä käytettiin värinpoistossa, ja sillä huuhdeltiin laseja 30 sekunnin ajan. Lasit huuhdeltiin värinpoiston jälkeen vedellä n. 5 sekunnin ajan. Huuhtelun jälkeen lasit värjättiin safraniiniliuoksella 30 sekunnin ajan, jonka jälkeen ne huuhdottiin nopeasti vedellä. Värjäyksen lopuksi lasien pohjat kuivattiin kevyesti sellulla ja lasien annettiin kuivua hyvin loppuun vetokaapissa ennen mikroskopoinnin aloittamista.

Mikroskopoinnissa ja kuvamateriaalin keräyksessä käytettiin Leica Microsystems -valomikroskooppia ja Leican AirLab v2.0 puhelimeen ladattavaa kamerasovellusta. Sovelluksen avulla otettiin live-kuvia mikroskooppinäkömystä Wi-Fi-yhteyden välityksellä jokaisesta värjätystä lasista. Jokainen lasi tarkasteltiin läpi 100-kertaisella suurennoksella ja kuvat otettiin sattumanvaraisista kohdista laseja, jotka edustivat parhaiten värjäystulosta. Lisäksi esimerkkimateriaalia otettiin havaituista artefaktoista. Reagenalle tehdyssä erillisessä tuotoksessa käytettiin PowerPoint -ohjelmaa, johon koottiin diaesitys värjäystuloksista (liite 2).

5.3 Käyttöturvallisuus

Koska työskentely tapahtui mikrobiologian laboratoriotiloissa ja käytössä oli vahvoja reagensseja, työskennellessä käytettiin suojavarusteina laboratoriotakkeja, suojakäsineitä sekä suojalaseja, ja värjäykset suoritettiin vetokaapissa. Värjäyskitteihin kuuluvat liuokset ovat kristallivioletti 2 % m/V (sisältää etanolia, kristalliviolettiä, Di-ammoniumoksalattia x H₂O ja stabilointiainetta), Lugolin liuos (sisältää jodia ja kaliumjodidia), Safraniiniliuos (sisältää etanolia ja safraniinia) ja asetonisprii 1+1 (sisältää etanolia ja asetoniamia). (Reagena Oy 2022.)

Reagenan käyttöturvallisuustiedote Gram Staining Kittä varten on laadittu Euroopan komission asetuksen 2020/878 mukaisesti. Kristallivioletti 2 % m/V ja safraniiniliuos luokitellaan väriaineiksi, ja asetonisprii 1+1 monikäyttöiseksi aineeksi, jota ei suoraan luokitella tiettyyn tarkoitukseen. Kitin tiedotteessa ei mainita Lugolin liuosta. Kitin komponenttien kerrotaan sisältävän vaarallisia, hitaasti hajoavia, biokertyviä ja myrkyllisiä aineita (PBT-aineet), erittäin hitaasti hajoavia tai voimakkaasti biokertyviä aineita (vPvB-aineet) tai erityistä huolta aiheuttavia aineita (SVHC). (Reagena Oy 2020.)

Lugolin liukselle on erillinen käyttöturvallisuustiedote ja se on laadittu saman asetuksen (EU 2020/878) mukaan, kuin Gram Staining Kit. Tiedotteessa liuos luokitellaan väriaineeksi, joka on tarkoitettu ammattimaiseen käyttöön. Sitä ei luokitella vaaraa aiheuttavaksi aineeksi, koska se ei täytä CLP-asetuksen (EY) N:o 1272/2008 PBT- tai vPvB-aineiden kriteerejä. Vaaralausekkeet ja varoitusmerkit on esitetty taulukossa 2 tarkemmin. (Reagena Oy 2008.)

TAULUKKO 2. Gram Staining Kitin ja Lugolin liuksen käyttöturvallisuustiedotteiden vaaran yksilöinti.

	Kristallivioletti 2 % m/V	Asetonisprii 1+1	Safraniiniliuos	Lugolin liuos
Vaaralausekkeet	H412 - Haitallista vesieläimille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. H351 - Epäillään aiheuttavan syöpää. H319 - Ärsyttää voimakkaasti silmiä. H226 - Syttyvä neste ja höyry.	H319 - Ärsyttää voimakkaasti silmiä. H225 - Helposti syttyvä neste ja höyry. H336 - Saattaa aiheuttaa uneliaisuutta ja huimausta.	H226 - Syttyvä neste ja höyry.	Ei luokitella vaaralliseksi aineeksi
Varoitusmerkit	Syttyvä, Terveyshaitta, Krooninen terveyshaitta	Syttyvä, Terveyshaitta	Syttyvä	-

Kristallivioletti 2 % m/V, safraniiniliuos, sekä asetonisprii 1:1 luokitellaan CLP-asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaan, joka vastaa aineiden ja seosten luokituksista, merkinnöistä ja pakkaamisesta. Asetus perustuu YK:n kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettuun luokitus- ja merkintäjärjestelmään. (Euroopan parlamentti ja neuvosto 2008.)

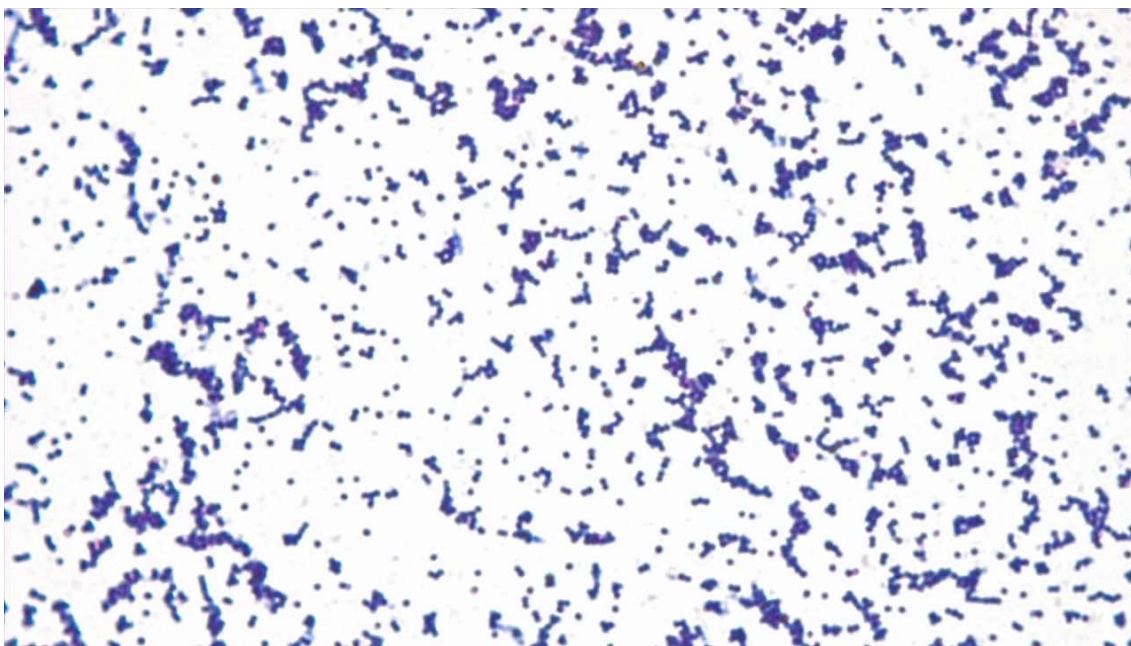
6 TULOKSET

Reagenan *Stability studies of IVD device* -suunnitelman (2021) mukaan tulokset ovat hyväksyttäviä, jos väriliuokset täyttävät niiden suorituskykyominaisuudet eli gram-positiiviset ja gram-negatiiviset bakteerit värjäytyvät erikseen ja ne ovat ammattilaisen tunnistettavissa. Värjäystulos ei saa poiketa normaalista värjäystuloksesta.

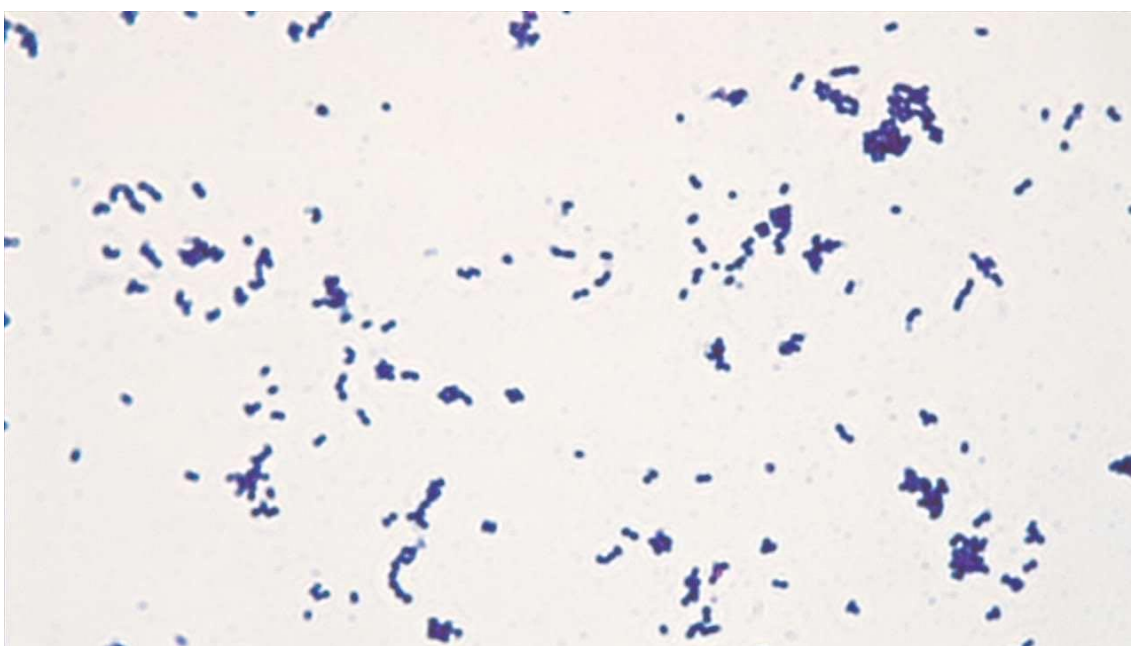
Lokakuussa 2023 suoritetuissa värjäyksissä bakteerit värjäytyivät oikein gram-värjäysperiaatteen mukaisesti; gram-positiiviset *S. aureus* ja *Str. pyogenes* värjäytyivät sinivioleteiksi ja gram-negatiivinen *E. coli* punertaviksi. Värjäytyvyys oli pääsääntöisesti normaalia (kuva 5 & kuva 6), lukuun ottamatta +37 °C:een lämmölle altistuneella värjäyskitillä värjättyä *E. colia*, jonka värisävy oli violettiin taittava (kuva 7). Värisakkaa oli nähtävissä osassa näytteistä (kuva 8), mutta se ei haitannut tulkintaa. Tulokset on esitetty taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Lokakuun 2023 värjäysten tulokset.

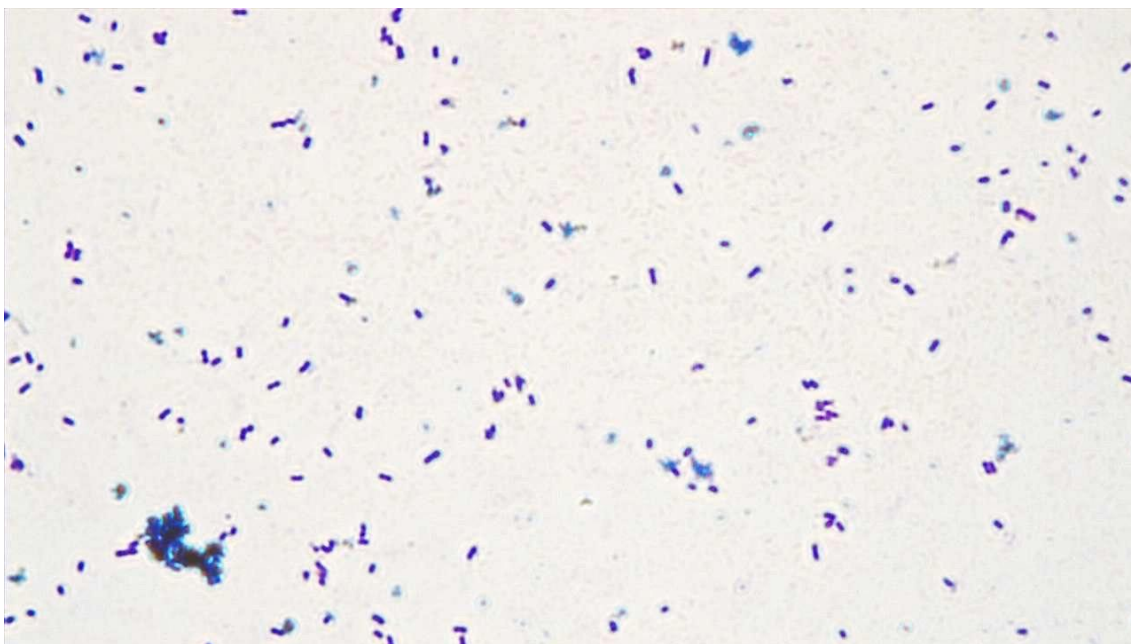
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>
Kitti säilytetty 18...25 °C:ssa	Värjäytyminen: gram-positiivinen.	Värjäytyminen: gram-positiivinen.	Värjäytyminen: gram-negatiivinen.
Kitti altistettu +37 °C:een	Värjäytyminen: gram-positiivinen.	Värjäytyminen: gram-positiivinen. Havaittavissa myös sinertävää ja punertavaa taustavärjäytymistä.	Värjäytyminen: gram-negatiivinen (sävy violettiin taittava). Taustalla havaittavissa sinertävää artefaktia ja taustavärjäytymistä.
Käytönaikainen seuranta, korkit auki 0 h (18...25 °C)	Värjäytyminen: gram-positiivinen.	Värjäytyminen: gram-positiivinen.	Värjäytyminen: gram-negatiivinen. Havaittavissa sinertävää värisakkaa ja taustavärjäytymistä.
Käytönaikainen seuranta, korkit auki 5 h (18...25 °C)	Värjäytyminen: gram-positiivinen.	Värjäytyminen: gram-positiivinen.	Värjäytyminen: gram-negatiivinen. Havaittavissa myös sinertävää värisakkaa.
Käytönaikainen seuranta, korkit auki 24 h (18...25 °C)	Värjäytyminen: gram-positiivinen.	Värjäytyminen: gram-positiivinen.	Värjäytyminen: gram-negatiivinen.



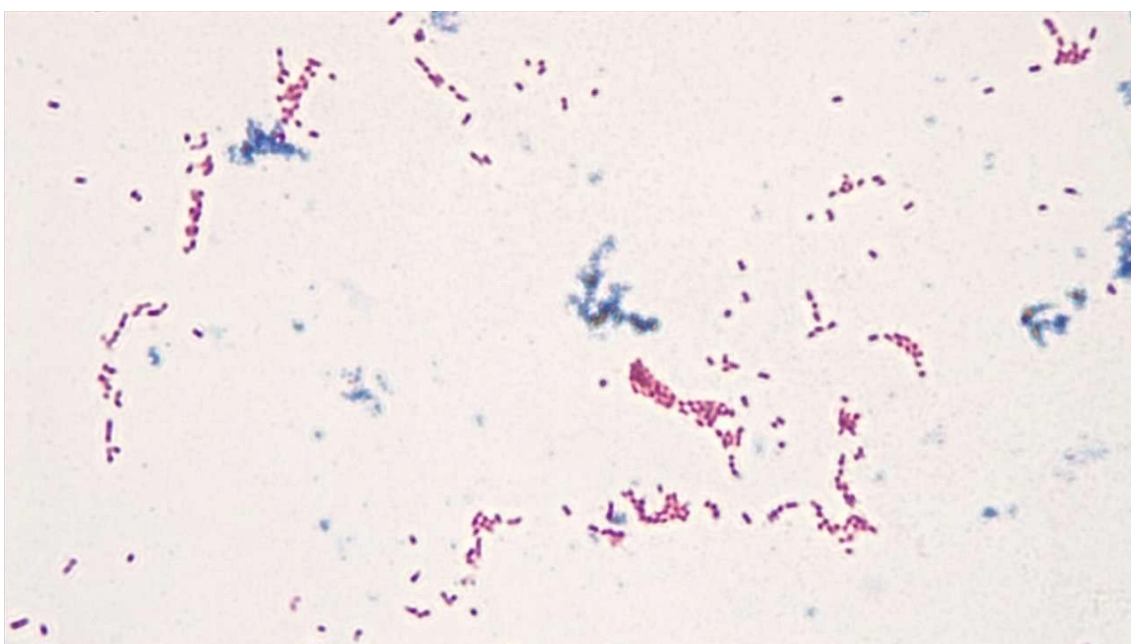
KUVA 5. Gram-positiivinen *S. aureus*, joka värjättiin 0 h korkit auki säilytetyllä värjäyskitillä. (Kuva: Leena Niemi)



KUVA 6. Gram-positiivinen *Str. pyogenes*, joka värjättiin 24 h korkit auki säilytetyllä värjäyskitillä. (Kuva: Viivi Virkajärvi)



KUVA 7. Gram-negatiivinen *E. coli*, joka värjättiin +37 °C:een lämmölle altistetulla värjäyskitillä. (Kuva: Ida Jokela)

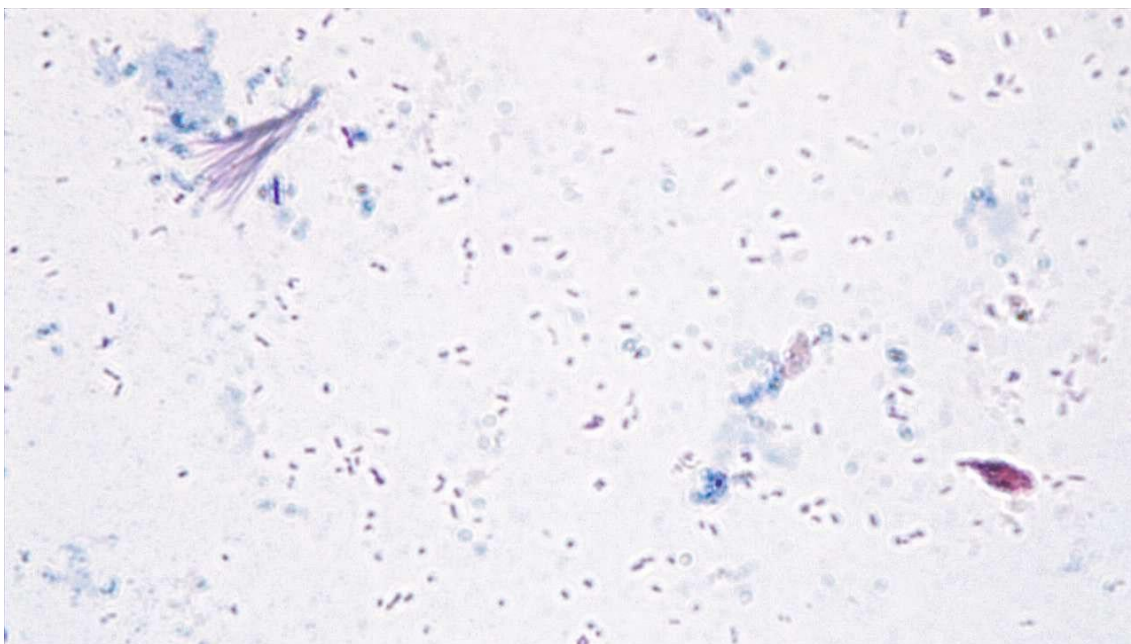


KUVA 8. Gram-negatiivinen *E. coli*, joka värjättiin 5 h ajan korkit auki säilytetyllä värjäyskitillä. (Kuva: Ida Jokela)

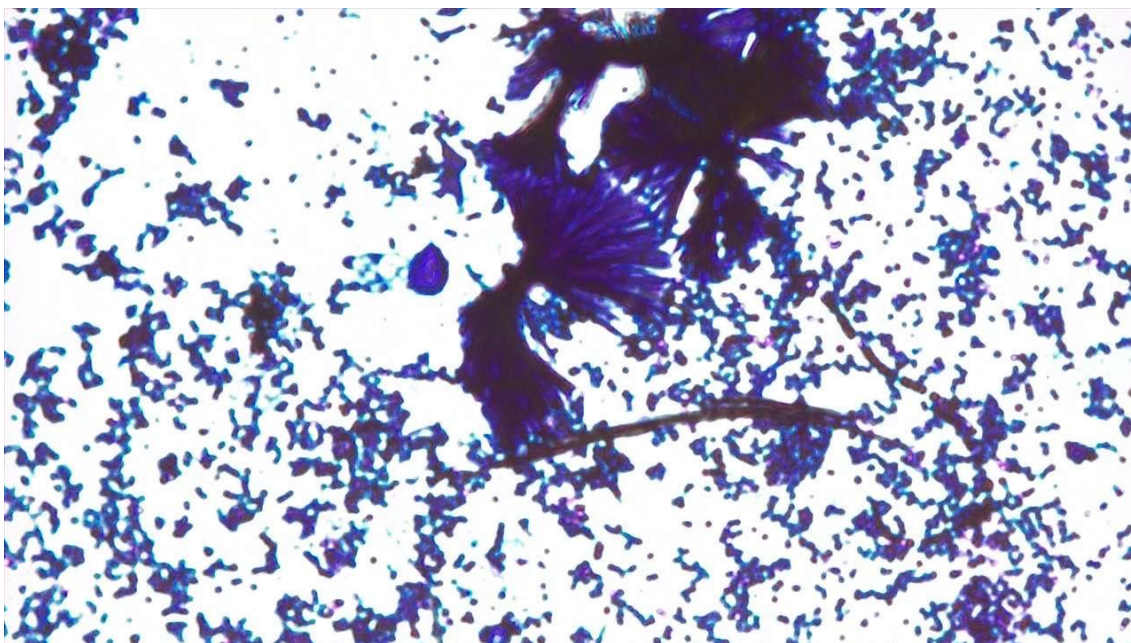
Huhtikuussa 2024 suoritetuissa värjäyksissä näkyi erilaisia artefaktoja (kuva 9) sekä hapsumaisia kiderakenteita (kuva 10), etenkin +37 °C:een lämpötilalle altistetulla kitillä värjätyillä näytelaseilla. Nämä hapsumaiset rakenteet voivat aiheuttaa niukkojen näytteiden kohdalla tulkintaongelmia. Värjäytyvyys oli kuitenkin pääsääntöisesti normaalia ja bakteerit oli mahdollista tunnistaa joko gram-positiiviksi tai -negatiiviseksi. Osassa näytteistä värjäytyvyys oli hieman epätasaista (kuva 11), mutta kyse voi olla myös taustalla mahdollisesti olevasta värjäyssakasta. Tulokset on esitetty taulukossa 4. Käytön aikaisen säilyvyyden seurannan (auki jätetyt reagenssipullot) värjäysliuokset reagoivat mikroskooppilasille laitettavan öljyn kanssa liueten sinistä väriä öljyn sekaan, joka tahraisi mikroskoopin okulaarin (kuva 12).

TAULUKKO 4. Huhtikuun 2024 värjäysten tulokset.

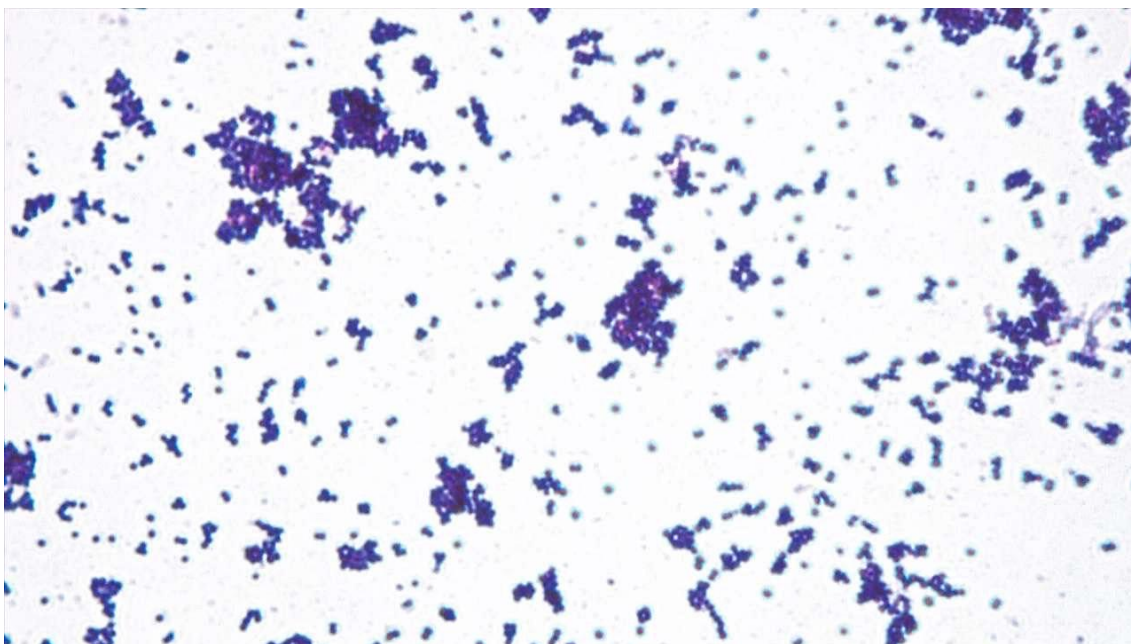
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>
Kitti säilytetty 18...25 °C:ssa	Värjäytyminen: gram-positiivinen. Värjäytyvyys hieman epätasaista.	Värjäytyminen: gram-positiivinen. Värjäytyvyys epätasaista.	Värjäytyminen: gram-negatiivinen.
Kitti altistettu +37 °C:een	Värjäytyminen: gram-positiivinen. Havaittavissa isoja kiderakenteita.	Värjäytyminen: gram-positiivinen. Värjäytyvyys epätasaista. Havaittavissa isoja kiderakenteita.	Värjäytyminen: gram-negatiivinen. Havaittavissa myös sinertävää värisakkaa, artefaktaa ja kiderakenteita.
Käytönaikainen seuranta, 6 kk sitten korkit olleet auki 24 h (18...25 °C)	Värjäytyminen: gram-positiivinen.	Värjäytyminen: gram-positiivinen.	Värjäytyminen: gram-negatiivinen.



KUVA 9. Gram-negatiivinen *E. coli*, joka värjättiin +37 °C:een lämmölle altistetulla värjäyskitillä. (Kuva: Ida Jokela)



KUVA 10. Gram-positiivinen *Str. pyogenes*, joka värjättiin +37 °C:een lämmölle altistetulla värjäyskitillä. (Kuva: Ida Jokela)



KUVA 11. Gram-positiivinen *S. aureus*, joka värjättiin huoneenlämmössä säilytyllä värjäyskitillä. (Kuva: Ida Jokela)



KUVA 12. Immersioöljyyn liuennut väri *Streptococcus pyogenes* -näytelasilla. (Kuva: Viivi Virkajärvi)

7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Tulosten perusteella voi todeta, että värjäysliuokset kestävät ohjeiden vastaista säilytystä, jos ne eivät pääse jäätymään. Ne ovat myös käyttökelpoisia säilyvyysajan jälkeen, mutta niihin muodostuvat kiderakenteet voivat aiheuttaa ongelmia niukkojen näytteiden tulkinnessa peittäen osan näkökentästä. Tulosten luotettavuutta tukee testaukset eri bakteerilajeille, joihin sisältyi kokkeja ja sauvoja sekä gram-negatiivisia että gram-positiivisia bakteereja. Toisaalta käytössä oli pieni otanta sisältäen vain kolme eri bakteerilajia. Bakteerit viljeltiin syksyllä ja keväällä eri kannoista ja ne värjäntyivät molemmilla kerroilla värjäysperiaatteen mukaisesti. Näytteiksi valittiin vain tuoreita viljelmiä. Bakteerit kiinnitettiin lasihin liekitämällä, joten muita kiinnitysmenetelmiä ei testattu.

Testaukset kuvastavat nimenomaan käsin suoritettua värjäystä, joten näiden tulosten perusteella on mahdotonta sanoa, aiheuttaisiko vanhentuneet värjäysliuokset värjäysautomaatissa esimerkiksi kertymiä, jotka haittaisivat laitteen toimintaa. Käsin värjäyksen ongelmakohtia ovat vaikutusaikojen, bakteerimäärän sekä laadun vakioiminen. Bakteereja tuli laselle eri määrä niin eri henkilön toimesta kuin käyttäessä joko viljelysauvaa tai -silmukkaa. Opinnäytetyössä käytetyt mikroskooppilasit olivat avatuista paketeista yhteen isompaan säilytysrasiaan kerättyjä, joten ne eivät täysin vastaa diagnostisessa laboratoriossa käytettäviä. On mahdollista, että niissä saattoi olla pieniä naarmuja, joihin on voinut jäädä jonkin verran värisakkaa. Käyttöön valitut lasit olivat kuitenkin silmämääräisesti hyvässä kunnossa ja ne pyyhittiin sellulla ennen käyttöä.

Lasit värjättiin joka kerralla Reagenan värjäysprotokollan mukaisesti, mutta käsin tehdessä on mahdotonta pitää vaikutusajat täysin vakioina. Osa värisakasta johtuu varmasti siitä, että värinpoistoajat sekä bakteerien määrä eivät pysyneet vakioina ja ylimääräistä kristalliviolettiä jäi hieman näytteen taustalle. Syksyllä lämpötilatuilla värjäysliuoksilla värjäytyssä *E. coli* -näytteessä oli havaittavissa hieman violettiin taittavaa värjäytymistä, joka johtui todennäköisesti värinpoistosta ja bakteerimäärästä, sillä huhtikuussa värjäytyssä erässä ei ollut havaittavissa samanlaista värjäytymistä. Lasien värjäykseen osallistui useampi henkilö, joten on

hyvin epätodennäköistä, että siinä vaiheessa olisi päässyt syntymään jokin systemaattinen virhe.

Reagenan antamissa kriteereissä oli, että lasit pitää olla ammattilaisen tulkittavissa eikä värjäystulos saa poiketa normaalista. Opinnäytetyön näytelasit tulkit-sivat opiskelijat tietäen etukäteen mitä bakteeria mikäkin objektilasi sisälsi. Vär-jäystulosten selkeyden vuoksi voisi sanoa, että ammattilainen onnistuisi tulkitse-maan lasit oikein tietämättä mitä bakteeria ne sisältävät.

Gram-värjäystä käytetään bakteerien ensivaiheen tunnistuksessa, jonka perus-teella voidaan aloittaa potilaan lääkitseminen (Murray ym. 2021). Kliinisesti mer-kittävä bakteremia ja sen aiheuttama sepsis on suuri syy vakavaan sairastumi-seen sekä kuolleisuuteen (Uehara, Yagoshi, Tanimichi, Yamada, Shimoguchi, Yamamoto, Yanai & Kumasaka 2009). Suomessa sairaalakuolleisuus sepsik-seen oli 24,1 % vuoden 2012 FINNAKI-tutkimuksessa. Kansainvälisissä tutki-muksissa vastaava luku on 27–59 %. Huonoon ennusteeseen liittyy etenkin myö-häinen mikrobilääkkeen aloitus (Sepsis (aikuiset): Käypä hoito -suositus, 2014). Potilasturvallisuuden kannalta on tärkeää, että näytteet värjäytyvät oikein ja tu-lokset ovat luotettavia, koska niiden perusteella voidaan aloittaa mahdollisimman pian tehoava lääkitys.

Opinnäytetyön toteutuksessa on huomioitu eettiset lähtökohdat. Käytetyt baktee-rikannat ovat Tampereen ammattikorkeakoulun omaisuutta eikä niissä ole min-käänlaisia potilastietoja tai muita merkintöjä, jotka olisivat yhdistettävissä johon-kin yksittäiseen henkilöön. Täten ei ollut tarpeellista erikseen miettiä henkilötieto-ten oikeanlaista käsittelyä sekä hävittämistä. Käytetyt gram-värjäysliuokset ovat hyvin haitallisia ympäristölle, joten niitä käsiteltiin varoen ja värjäysjäte laitettiin Tampereen ammattikorkeakoulun ohjeistamalla tavalla keräyssäiliöön. Tampe-reen ammattikorkeakoulu vastaa gram-värjäysjätteen hävittämisestä. Tutkimusta voisi jatkaa värjäämällä useampia bakteerilajeja hyvin toimivaksi todetulla auto-maatilla ja täten kasvattaa otosta suuremmaksi.

7.1 Tutkimuskysymykset

1. Miten värjäysliuosten pitkäaikainen säilytys vaikuttaa värjäystulokseen?

Näytteet värjäytyivät oikein, kun värjäysliuoksia oli säilytetty 7–8 kk sekä 13–14 kk. Värjäystulokset olivat kuitenkin alttiimpia häiritseville artefaktoille, kun värjäysliuoksia oli säilytetty niiden säilyvyysajan yli.

2. Pysyvätkö värjäysliuokset käyttökelpoisina, kun ne ovat altistuneet kuljetuksen aikaisille lämpötilan vaihteluille?

Värjäysliuokset pysyivät käyttökelpoisina altistuttuaan +37 °C:een lämpötilalle. Ne olivat kuitenkin alttiimpia artefaktoille kuin huoneenlämmössä säilytetyt liuokset. Värjäysliuosten pakkaukset eivät kestäneet altistusta -18...-36 °C:een lämpötilalle ja hajosivat. Tästä syystä, näitä värjäysliuoksia ei kokeiltu ollenkaan värjäystesteissä.

3. Miten reagenssipullon auki jättäminen vaikuttaa värjäystulokseen?

24 tunnin sisällä ei ilmentynyt yhtään enempää värjäysartefaktoja kuin ensimmäisellä värjäyskerralla (0 h kulunut). Kaikki näytteet värjäytyivät oikein gram-värjäysperiaatteen mukaisesti aikapisteissä 0 h, 5 h sekä 24 h.

4. Miten vanhentuneiden värjäysliuosten käyttö vaikuttaa värjäystulokseen?

Muut värjäysliuokset toimivat normaalisti myös käyttöiän ylittyttyä, mutta lämpörasitetuilla värjäysliuoksilla oli havaittavissa enemmän artefaktoja kuin aikaisemmin. Käytönaikaisen seurannan testauksessa värjäystuloksissa ei ollut eroa sillä, kauanko värjäysliuoksia oli säilytetty, mutta niiden ollessa jo vanhentuneita, sinistä väriä liukeni immersioöljyyn.

LÄHTEET

- Ahern, H. 2018. Microbiology: A Laboratory Experience. E-kirja. Geneseo, NY Milne Open Textbooks. Viitattu 24.8.2024. <https://milnepublishing.geneseo.edu/suny-microbiology-lab/chapter/differential-staining-techniques/>
- Anttila, V. 2024. Bakteriemia, sepsis ja verenmyrkytys. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 2.7.2024. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00604>
- Anttila, V. 2024. MRSA (metisilliinille resistenssi Staphylococcus aureus). Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 21.5.2024. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00586>
- Berezin, S., Aviv, Y., Aviv, H., Goldberg, E. & Tischler, Y. R. 2017. Replacing a Century Old Technique – Modern Spectroscopy Can Supplant Gram Staining. England: Nature Publishing Group. Viitattu 24.8.2024. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-02212-2>
- Berkowitz, F. E. & Jerris, R. C. 2015. Practical Medical Microbiology for Clinicians. E-kirja. Viitattu 15.8.2024. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/tampere/reader.action?docID=4305718>
- Carlson, P., Koskela, M. 2011. Bakteriologian perusmenetelmät. Infektiosairaudet. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, Viitattu 30.8.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiportti.fi/oppikirjat/isa00302#s2>
- Euroopan komissio. 2020. Tiedote in vitro -diagnostiikkaan tarkoitettujen lääkinällisten laitteiden valmistajille. Viitattu 22.8.2024. https://health.ec.europa.eu/document/download/82c113e2-7876-4405-9f5f-b2799c2f6a25_fi
- EUR-Lex. 2008. Päivitetty 2023. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetukset (EY) N:o 1271/2008. Verkkosivu. Viitattu 28.8.2024. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/fi/TXT/?uri=CELEX%3A32008R1272>
- Fimea. 2022. In vitro -diagnostisia lääkinnällisiä laitteita koskeva uusi EU-asetus voimaan 26.5.2022. Fimea uutisarkisto 25.5.2022. Viitattu 28.8.2024. <https://fimea.fi/-/in-vitro-diagnostisia-laakinnallisia-laitteita-koskeva-uusi-eu-asetus-voimaan-26.5.2022>
- Froböse, N. J., Bjedov, S., Schuler, F., Kahl, B. C., Kampmeier, S. & Schaumburg, F. 2020. Gram Staining: a Comparison of Two Automated Systems and Manual Staining. Journal of Clinical Microbiology, 2020-11, Vol. 58 (12), Article e01914-20. Viitattu 15.8.2024. <https://journals-asm.org.libproxy.tuni.fi/doi/full/10.1128/jcm.01914-20>
- Heikkinen, T., Järvinen, A., Meri, S., Vapalahti, O. & Vuopio, J. 2010. Päivitetty 2020. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. 1, Mikrobiologia. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 1.9.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiportti.fi/op/opk04495>

- Hussey, M. & Smith, A. 2005. Päivitetty 2016. Gram Stain Protocols. American Society for Microbiology. Viitattu 15.8.2024. <https://asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>
- Kovacks-Simon, A., Titball, R. W., Michell, S. L., 2010. Lipoproteins of Bacterial Pathogens. National Library of Medicine. Viitattu 2.9.2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3028857/>
- Sepsis (aikuiset) Käypä hoito -suositus. Suomen Anestesiologiyhdistys ry:n asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. 2014. Viitattu 1.9.2024. <https://www.duodecimlehti.fi/duo11520>
- Murray, P. 2018. Murray's Basic Medical Microbiology. E-kirja. 2. painos. Philadelphia, PA: Elsevier. Viitattu 24.8.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www-clinicalkey-com.libproxy.tuni.fi/student/content/toc/3-s2.0-C2015005821X>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. 2021. Medical microbiology. E-kirja. Ninth edition. Philadelphia, PA: Elsevier. Viitattu 31.8.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www-clinicalkey-com.libproxy.tuni.fi/student/content/book/3-s2.0-B9780323673228000129>
- Peltola, V., Renko, M. & Saxén, H. 2020. Lasten infektiosairaudet. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 7.8.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiportti.fi/oppikirjat/lif00051>
- Reagentia Oy. 2008. Tarkistettu 2022. Käyttöturvallisuustiedote. Gram Staining Kit. Viitattu 28.8.2024. <https://www.reagentia.com/wp-content/uploads/gram-staining-kit-102600-3.pdf>
- Reagentia Oy. 2020. Tarkistettu 2022. Käyttöturvallisuustiedote. Lugolin liuos. Viitattu 1.9.2024. <https://www.reagentia.com/wp-content/uploads/lugolin-liuos-100197-1.pdf>
- Reagentia Oy. 2021. Stability studies of IVD device. Product: Gram Staining Kit. Säilyvyystestaussuunnitelma. Laatija Eira Kelo. Versio 2. Viitattu 2.9.2024.
- Reagentia Oy. 2022. Gram Staining Kit. Käyttöohjeet. Viitattu 4.11.2024.
- Samuel, J., Balada-Llasat, J-M., Harrington, A., Cavagnolo, R. 2016. Multicenter Assessment of Gram Stain Error Rates. Viitattu 28.8.2024. <https://journals-asm-org.libproxy.tuni.fi/doi/10.1128/jcm.03066-15>
- Sandle, T. 2020. Päivitetty 2021. Assessing Gram-stain error rates within the pharmaceutical microbiology laboratory. Viitattu 28.8.2024. <https://www.ejpps.online/post/vol25-1-assessing-gram-stain-error-rates-within-the-pharmaceutical-microbiology>
- Skurnik, M., Vuopio, J. 2020. Bakteerin soluseinä. Mikrobiologia. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 2.9.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiportti.fi/oppikirjat/mbg00009>

- Terveyskirjasto. 2016. Lipopolysakkaridi. Lääketieteen sanasto. Verkkosivu. Viitattu 11.11.2024. <https://www.terveyskirjasto.fi/lit01941>
- Thermo Fisher Scientific. 2024. BLOOD AGAR BASE (SHEEP). Verkkosivu. Viitattu 30.8.2024. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0854&c=UK&lang=EN
- Thermo Fisher Scientific. 2024. BLOOD AGAR BASE NO.2. Verkkosivu. Viitattu 30.8.2024. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0271&c=UK&lang=EN
- Tieteen termipankki. 2024a. Nimitys: fakultatiiviset anaerobit. Verkkosivu. Viitattu 2.9.2024. https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:fakultatiiviset_anaerobit
- Tieteen termipankki. 2024b. Nimitys: normaalimikrobisto. Verkkosivu. Viitattu 11.11.2024. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:normalimikrobisto>
- Tripathi, N., Sapra, A. 2023. Gram staining. National Library of Medicine. Viitattu 23.8.2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- Uehara, Y., Yagoshi, M., Tanimichi, Y., Yamada, H., Shimoguchi, K., Yamamoto, S., Yanai, M. & Kumasaka, K. 2009. Impact of Reporting Gram Stain Results From Blood Culture Bottles on the Selection of Antimicrobial Agents. American Journal of Clinical Pathology. Viitattu 31.8.2024. <https://academic.oup.com/ajcp/article/132/1/18/1765669>
- Uniprot. N.d. Cellular component- S-layer. Verkkosivu. Viitattu 4.11.2024. <https://www.uniprot.org/locations/SL-0262>
- Vaara, M., Meri, S., Järvinen, A., Huovinen, P., Heikkinen, T., Alanen, A. & Hedman, K. 2011. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 3, Infektiosairaudet. E-kirja. Helsinki: Duodecim. Viitattu 30.8.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiortti.fi/oppikirjat/isa00302>
- Vuento, R. 2024. Antibiootit. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 2.7.2024. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01177>
- Vuopio, J., Kuusela, P., Järvinen, A. 2020. Staphylococcus aureuksen rakenne ja virulenssitekijät. Mikrobiologia. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 2.9.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiortti.fi/oppikirjat/mbg00043?q=lipoteikkohappo>
- Vuopio, J., Syrjänen, J. 2020. Bakteerit ja niiden aiheuttamat taudit. A-ryhmän streptokokki. Mikrobiologia. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 2.9.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiortti.fi/oppikirjat/mbg00064>
- Willis, L. M. 2020. Professional guide to diseases. E-kirja. Eleventh edition. Philadelphia: Wolters Kluwer. Viitattu 13.8.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/tampere/reader.action?docID=6269407&ppg=1322>

Yoshimura, J., Ogura, H. & Oda, J. 2023. Can Gram staining be a guiding tool for optimizing initial antimicrobial agents in bacterial infections? *Acute medicine & surgery*, 2023-01, Vol. 10 (1), p.e862-n/a. Viitattu 14.8.2024. <https://www.proquest.com/docview/2906567080?accountid=14242&parentSessionId=MJHYI-JOJ7kgwFOrwmjn5IM5biFh0sSOtW1Wm1jzL0RE%3D&pq-origsite=primo&sourcetype=Scholarly%20Journals>

LIITTEET

Liite 1 Gram Staining Kit värjäysohje (Reagen Oy)

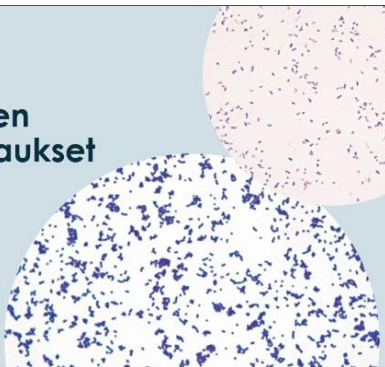
VÄRJÄYKSEN SUORITTAMINEN

1. Ilmakuivaa näyte ja kiinnitä se objektilasille joko liekillä tai 95 % metanolilla.
2. Värjää kristallivioletti 2,0 % m/V-liuoksella 1 min.
3. Poista ylimääräinen värjäysliuos.
4. Värjää Lugolin liuoksella 1 min.
5. Huuhto juoksevalla vedellä n. 5 s.
6. Suorita värinpoisto huuhtomalla preparaattia asetonisprii 1+1 -liuoksella n. 30 s.
7. Huuhto juoksevalla vedellä n. 5 s.
8. Värjää safraniiniliuoksella 30 s.
9. Huuhto nopeasti juoksevalla vedellä ja kuivaa kevyesti paperilla.

Liite 2 Kuvamateriaalista koostettu PowerPoint -esitys

Gram-värjäysliuosten säilyvystestaukset

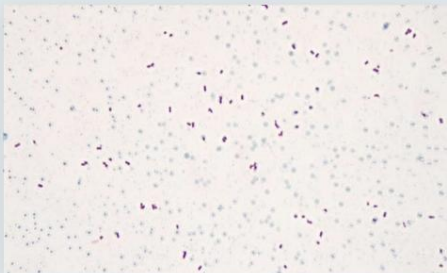
TAMK opinnäytetyö:
reaaliaikainen säilyvysajan seuranta, kuljetuksen aikaisen säilyvyyden testaus & käytönaikaisen säilyvyyden testaus



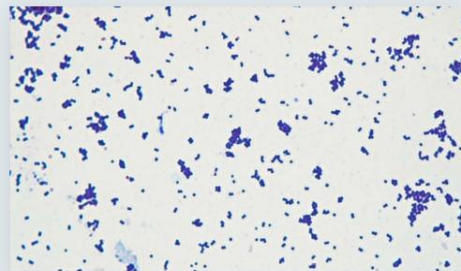
Reaaliaikainen (RA) säilyvysajan seuranta 18...25 °C:ssa

Lokakuu 2023
Säilytetty 7-8 kk

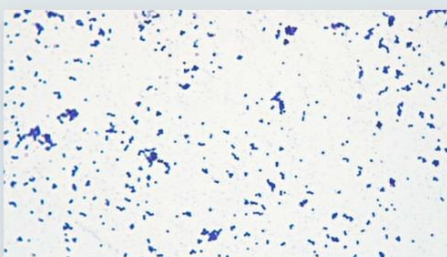
E. coli, 5 h, 7-8 kk



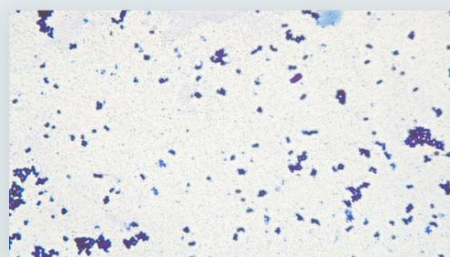
S. aureus, RA, 7-8 kk



S. aureus, RA, 7-8 kk



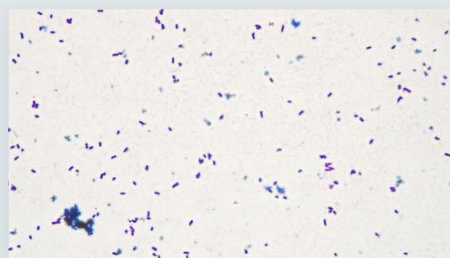
Str. pyogenes, RA, 7-8 kk



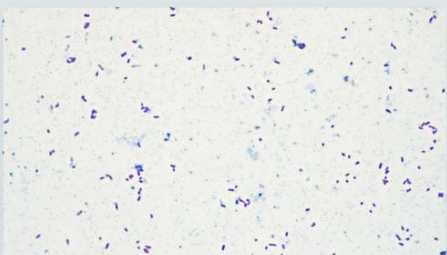
Kuljetuksen aikaisen säilyvyyden testaus, altistettu +37 °C:een

Lokakuu 2023
Säilytetty 7-8 kk

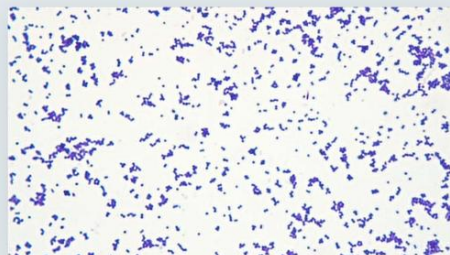
E. coli, 37 °C, 7-8 kk



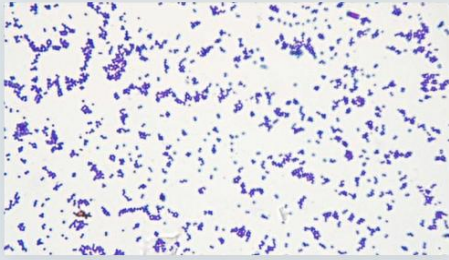
E. coli, 37 °C, 7-8 kk



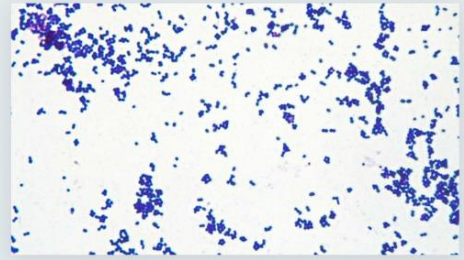
S. aureus, 37 °C, 7-8 kk



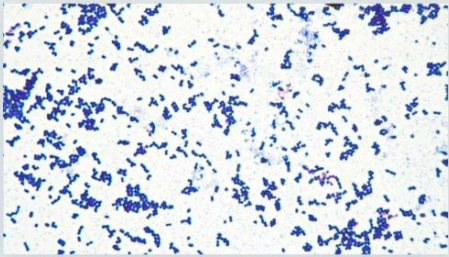
S. aureus, 37 °C, 7-8 kk



Str. pyogenes, 37 °C, 7-8 kk



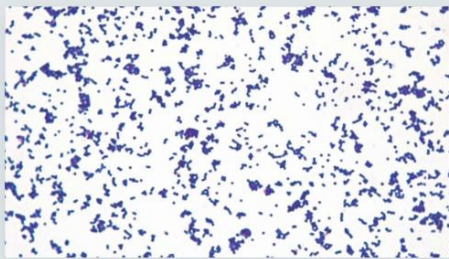
Str. pyogenes, 37 °C, 7-8 kk



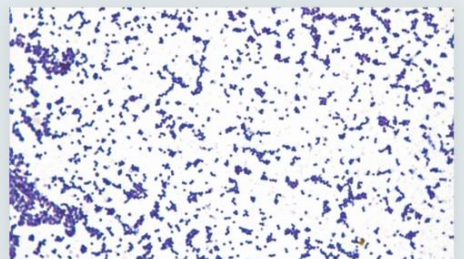
Käytönaikaisen säilyvyyden testaus aikapisteissä 0 h, 5 h, 24 h

Lokakuu 2023
Säilytetty 7-8 kk

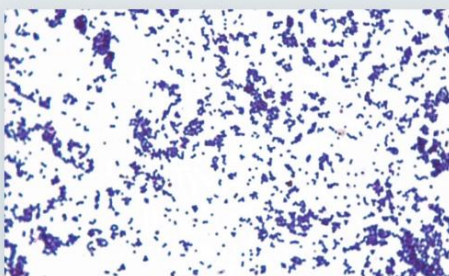
S. aureus, 0 h, 7-8 kk



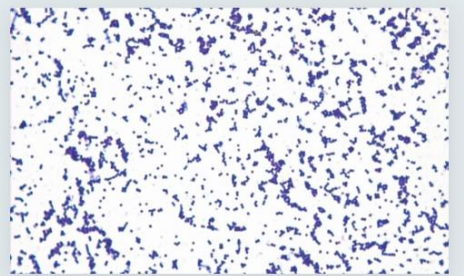
S. aureus, 0 h, 7-8 kk



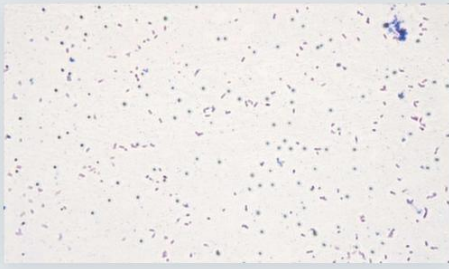
S. aureus, 0 h, 7-8 kk



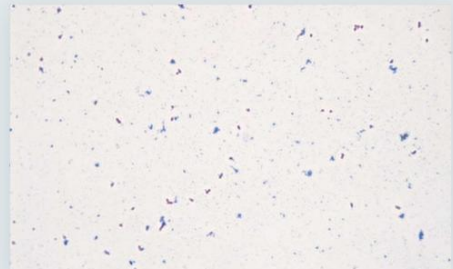
S. aureus, 0 h, 7-8 kk



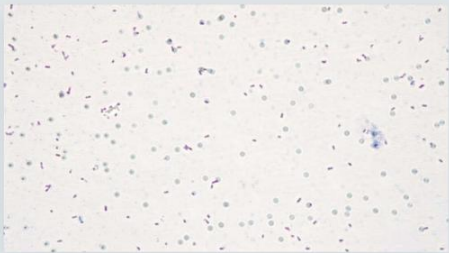
E. coli, 0 h, 7-8 kk



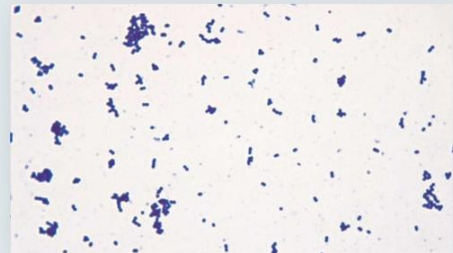
E. coli, 0 h, 7-8 kk



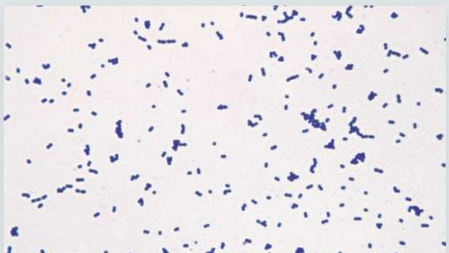
E. coli, 0 h, 7-8 kk



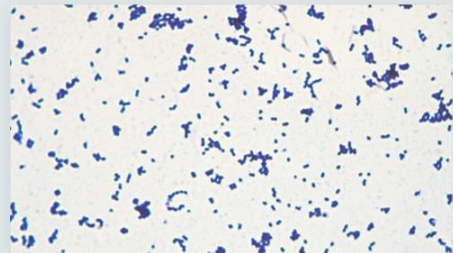
Str. pyogenes, 0 h, 7-8 kk



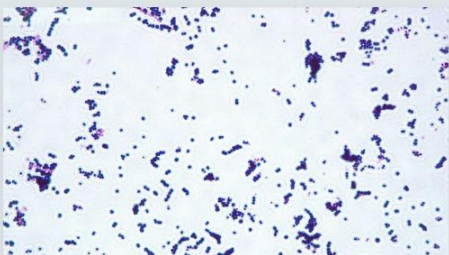
Str. pyogenes, 0 h, 7-8 kk



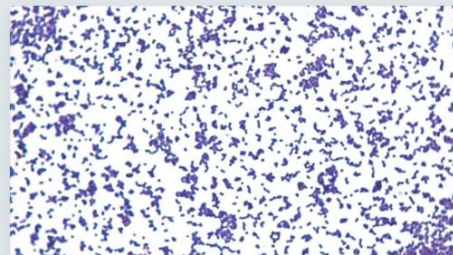
Str. pyogenes, 0 h, 7-8 kk



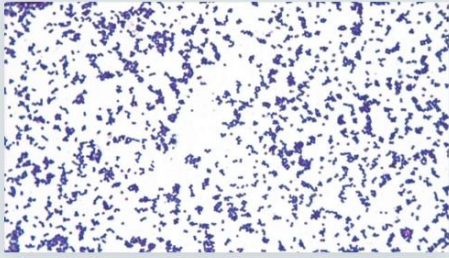
Str. pyogenes, 0 h, 7-8 kk



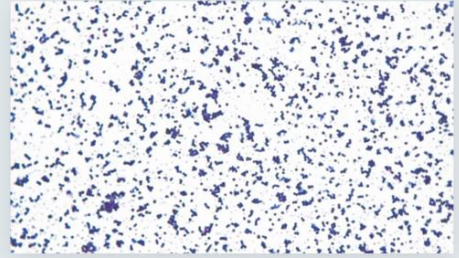
S. aureus, 5 h, 7-8 kk



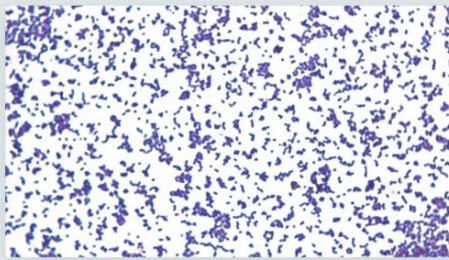
S. aureus, 5 h, 7-8 kk



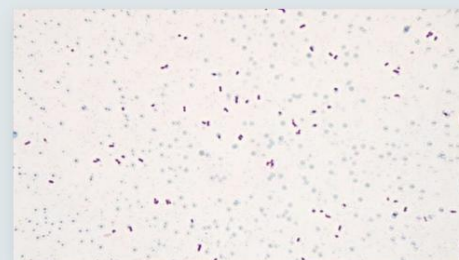
S. aureus, 5 h, 7-8 kk



S. aureus, 5 h, 7-8 kk



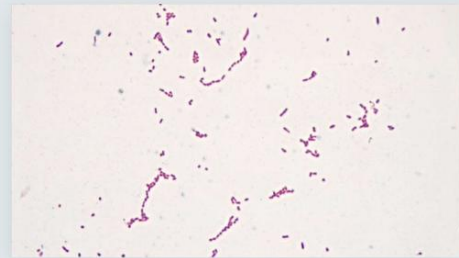
E. coli, 5 h, 7-8 kk



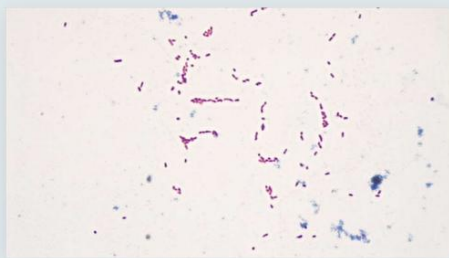
E. coli, 5 h, 7-8 kk



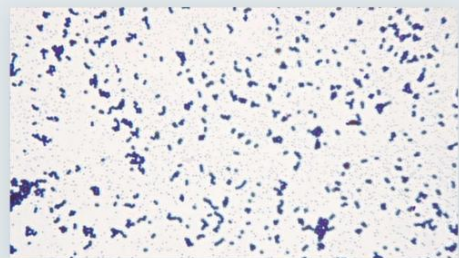
E. coli, 5 h, 7-8 kk



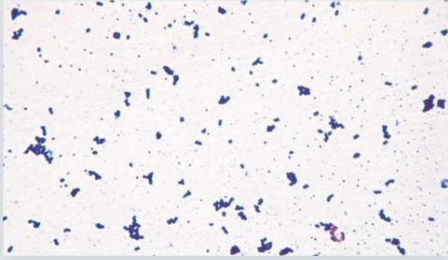
E. coli, 5 h, 7-8 kk



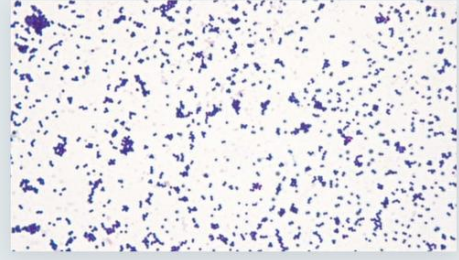
Str. pyogenes, 5 h, 7-8 kk



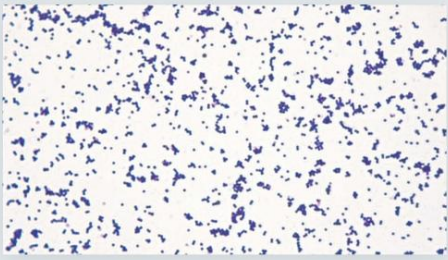
Str. pyogenes, 5 h, 7-8 kk



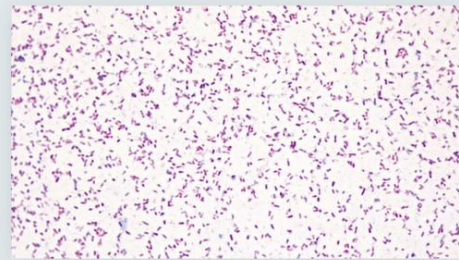
S. aureus, 24 h, 7-8 kk



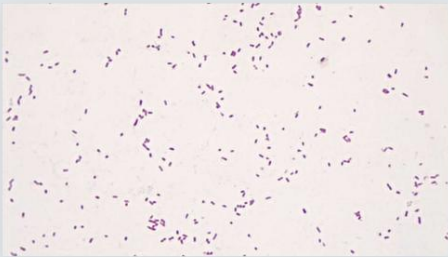
S. aureus, 24 h, 7-8 kk



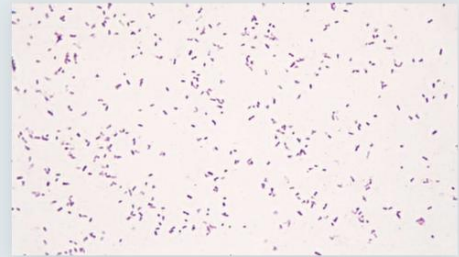
E. coli, 24 h, 7-8 kk



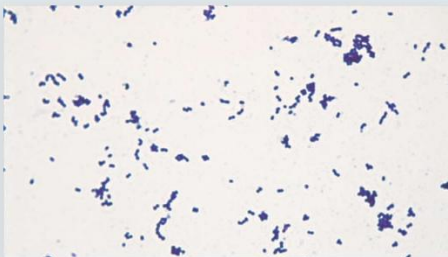
E. coli, 24 h, 7-8 kk



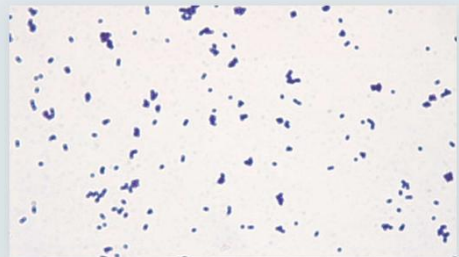
E. coli, 24 h, 7-8 kk



Str. pyogenes, 24 h, 7-8 kk



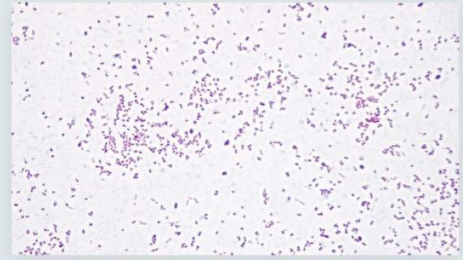
Str. pyogenes, 24 h, 7-8 kk



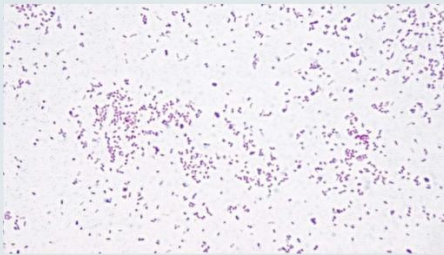
Reaaliaikainen (RA)
säilyvyyssajan seuranta
18...25 °C:ssa

Huhtikuu 2024
Säilytetty 13-14 kk

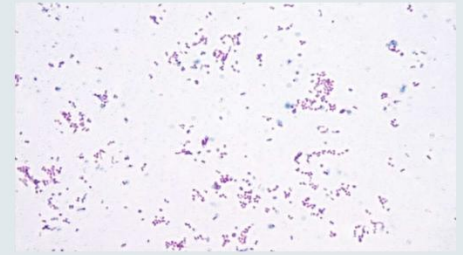
E. coli, RA, 13-14 kk



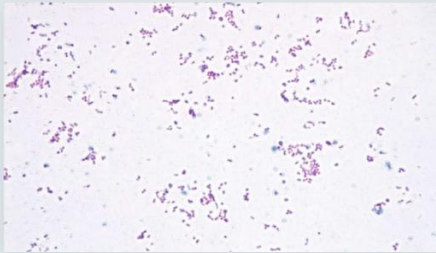
E. coli, RA, 13-14 kk



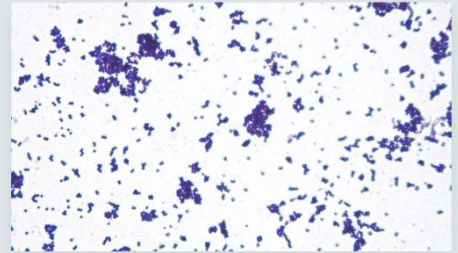
E. coli, RA, 13-14 kk



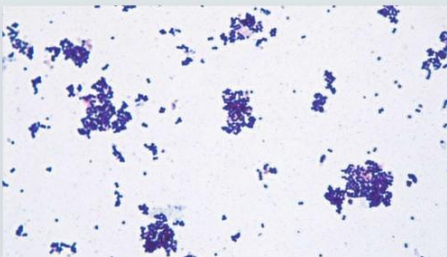
E. coli, RA, 13-14 kk



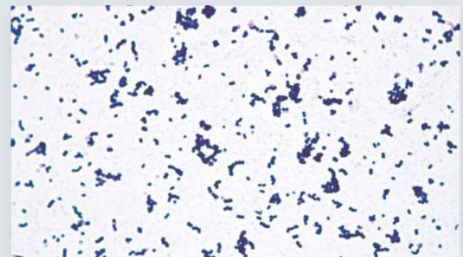
S. aureus, RA, 13-14 kk



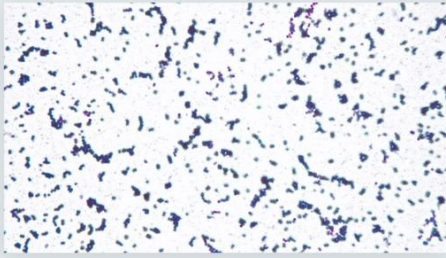
S. aureus, RA, 13-14 kk



Str. pyogenes, RA, 13-14 kk



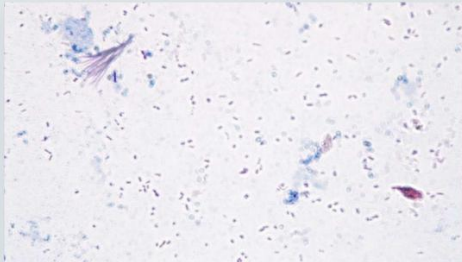
Str. pyogenes, RA, 13-14 kk



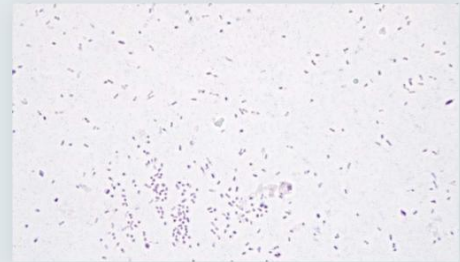
Kuljetuksen aikaisen säilyvyyden testaus, altistettu +37 °C:een

Huhtikuu 2024
Säilytetty 13-14 kk

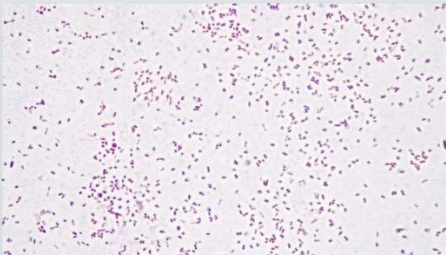
E. coli, 37 °C, 13-14 kk



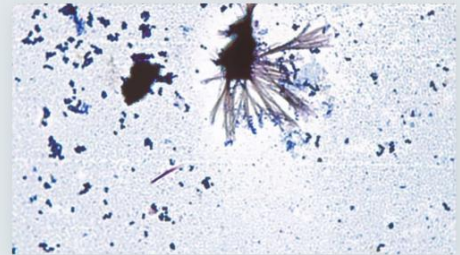
E. coli, 37 °C, 13-14 kk



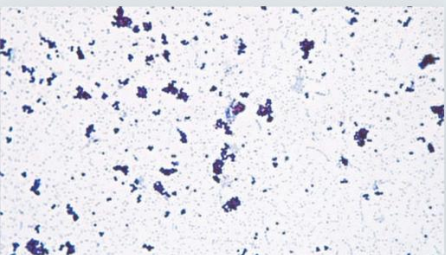
E. coli, 37 °C, 13-14 kk



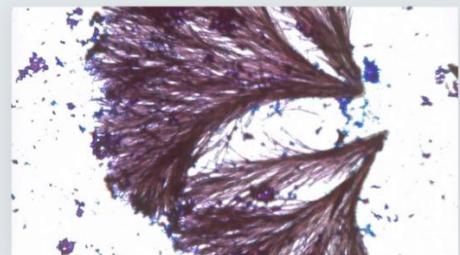
S. aureus, 37 °C, 13-14 kk

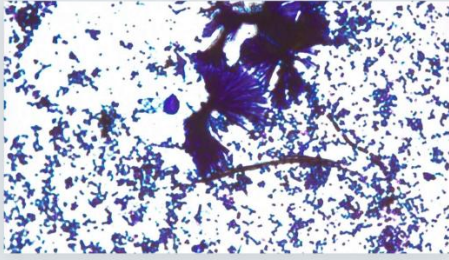
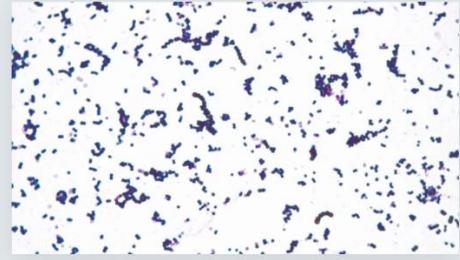


S. aureus, 37 °C, 13-14 kk



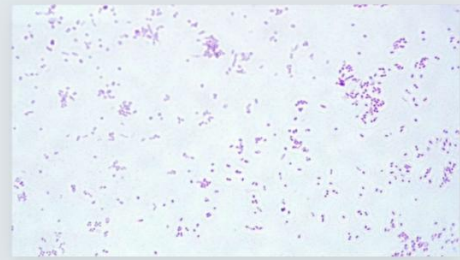
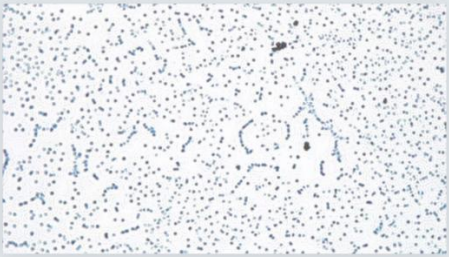
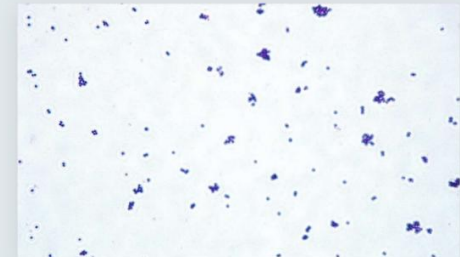
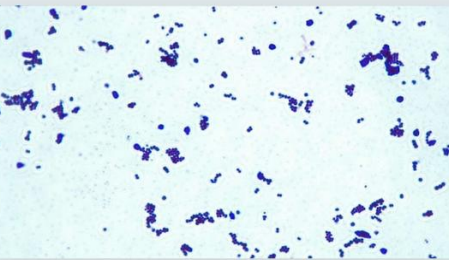
S. aureus, 37 °C, 13-14 kk



Str. pyogenes, 37 °C, 13-14 kk*Str. pyogenes*, 37 °C, 13-14 kk

Käytönaikaisen säilyvyyden testaus

Huhtikuu 2024
Säilytetty 13-14 kk

E. Coli käytönaikainen, 13-14kk*E. Coli* käytönaikainen, 13-14kk*S. Aureus* käytönaikainen, 13-14kk*Str. Pyogenes* käytönaikainen, 13-14kk*Str. Pyogenes* käytönaikainen, 13-14kk