

KARELIA-AMMATTIKORKEAKOULU  
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Jaana Koivisto  
Sarianna Repo

GRAMNEGATIIVISTEN SAUVABAKTEERIEN NÄKYMINEN  
SYVISTÄ MÄRKÄNÄYTTEISTÄ GRAMVÄRJÄYKSESSÄ

Opinnäytetyö  
Helmikuu 2014



**OPINNÄYTETYÖ**  
**Helmikuu 2014**  
**Bioanalytiikan koulutusohjelma**

Tikkarinne 9  
80220 JOENSUU  
p. 050 405 4816

**Tekijät**  
Jaana Koivisto, Sarianna Repo

**Nimeke**  
Gramnegatiivisten sauvabakteerien näkyminen syvistä märkänäytteistä gramvärjäyksessä  
Toimeksiantaja  
Itä-Suomen laboratorokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä (Islab), Joensuun mikrobiologianlaboratorio

**Tiivistelmä**

Gramvärjäys on mikrobiologiassa bakteriologinen perustutkimus. Sitä voidaan käyttää nopeaan diagnostiikkaan, sillä se antaa tärkeää ensitietoa mahdollisesta taudinaiheuttajasta. Gramvärjäytymisen perusteella bakteerit pystytään jakamaan karkeasti grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin bakteereihin sekä muodon perusteella sauvoihin ja kokkeihin. Gramvärjäysautomaatti nopeuttaa työskentelyä, koska automaatilla pystytään värjäämään useampien näytteiden objektilasit samanaikaisesti.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää näkyvätkö gramnegatiiviset sauvabakteerit syvistä märkänäytteistä gramvärjäyksessä, kun vastavärin voimakkuutta nostetaan. Työ saatiin toimeksiantona Itä-Suomen laboratorikeskuksen liikelaitoskuntayhtymän (Islab) Joensuun mikrobiologian aluelaboratoriolta. Laboratorion ongelmana on ollut syvien märkänäytteiden gramnegatiivisten sauvabakteerien näkyminen gramvärjäyksessä.

Opinnäytetyö toteutettiin värjäämällä potilasnäytteiden objektilasit voimakkaammalla vastavärin asetuksella kuin millä laboratorio on normaalisti objektilasit värjännyt. Värjätyt objektilasit mikroskoipoitiin ja havainnot verrattiin laboratorion värjäämiin objektilaseihin sekä bakteeriviljelytuloksiin. Tulokset kerättiin taulukoihin, joista niitä pystyttiin vertailemaan.

Tuloksien perusteella vastavärin voimakkuuden nostamisella gramvärjäyksessä ei ollut merkitystä gramnegatiivisten sauvabakteerien näkyvyyteen. Jatkotutkimusaiheena voisi olla vastavärin vaihtaminen kokonaan toiseksi tai näytteen laadun vaikutuksen tutkiminen gramvärjäyksessä.

**Kieli**  
suomi

Sivuja 36  
Liitteet 10

**Asiasanat**  
gramvärjäys, gramnegatiivinen, sauvabakteeri



**THESIS**  
**February 2014**  
**Degree Programme in Biomedical Sciences**  
Tikkarinne 9  
FIN 80220 JOENSUU  
FINLAND  
Tel. +358-13-260 6600

**Authors**  
Jaana Koivisto, Sarianna Repo

**Title**  
Gramnegative rod bacteria seeing of the deep wet samples in gram stain

**Commissioned by**  
Eastern Finland Laboratory Centre Joint Authority Enterprise (Islab), Microbiology Laboratory

**Abstract**  
Gram stain is a bacteriological basic analysis in microbiology. Gram stain can be used in quick diagnostics, because it gives important first information of a possible pathogen. Based on gramdiscoloration bacteria can be divided roughly into grampositive and gramnegative bacteria. Based on the form bacteria can be divided in to rods and coccus. An automated gram stainer speeds up the work, because more samples can be stained with it simultaneously.

The purpose of this study was to solve if gramnegative rodbacteria are more viewable from the deep wet samples, when the intensity of the counterstaining is raised in the gram stain. This study was commissioned by Eastern Finland Laboratory Centre Joint Authority Enterprise (Islab), Microbiology Laboratory of Joensuu. The laboratory has had problems with the visibility of gramnegative rodbacteria from deep wet samples in gram stain.

This study was accomplished by staining patient samples' objectslides with stronger intensity of the counterstain setting than what the laboratory has normally stained the objectslides with. The stained objectslides were examined at a microscope and the findings were compared to the objectslides which the laboratory had stained and also to the results of the bacterial culture made by the laboratory. The results were collated in a worksheet, where they could be compared.

Based on the results, raising the intensity of counterstaining in gram staining, had no relevance in the visibility of gramnegative rodbacteria. A topic for further research could be changing counterstaining entirely to some other counterstaining or investigating how the quality of the samples effects the staining.

**Language**  
Finnish

Pages 36

Appendices 10

**Keywords**

gram staining, gramnegative, rodbacteria

# SISÄLTÖ

## TIIVISTELMÄ ABSTRACT

1	JOHDANTO.....	6
2	BAKTEERIT .....	7
2.1	Yleistä bakteereista .....	7
2.2	Bakteerien rakenne.....	8
2.3	Grampositiivisten bakteerien rakenne.....	10
2.4	Gramnegatiivisten bakteerien rakenne.....	10
2.5	Gramnegatiiviset sauvabakteerit .....	11
3	MIKROBIOLOGISET SYVÄT MÄRKÄNÄYTTEET .....	11
3.1	Syvien märkänäytteiden näytteenotto .....	12
3.2	Syvien märkänäytteiden käsittely ja säilytys .....	13
4	BAKTEERIVILJELY .....	14
5	GRAMVÄRJÄYS .....	14
5.1	Gramvärjäyksen periaate.....	15
5.2	Gramvärjäyksen käyttöalueet.....	16
5.3	Näyteobjektin valmistus .....	16
5.4	Gramvärjäyksen tulkinta ja virhelähteet .....	17
5.5	Gramvärjäysautomaatti .....	18
6	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMA .....	19
7	MENETELMÄVALINNAT .....	20
7.1	Kvantitatiivinen kokeellinen tutkimus .....	20
7.2	Aineiston analysointi.....	21
8	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS .....	21
8.1	Toimintaympäristö .....	22
8.2	Näyttemateriaali .....	23
8.3	Esitestaus.....	24
8.4	Tutkimuksen suoritus .....	25
9	TULOKSET .....	26
9.1	Tulosten analysointi .....	27
9.1.1	Gramnegatiivisten bakteerien näkyvyys .....	27
9.1.2	Taustan värjäytyvyys .....	28
10	POHDINTA.....	29
10.1	Opinnäytetyön luotettavuus .....	32
10.2	Opinnäytetyön eettisyys .....	33
10.3	Jatkotutkimusaiheet.....	34
	LÄHTEET.....	35

## Liitteet

Liite 1	Taulukko 4. Mikroskopointitulostaulukko
Liite 2	Taulukko 5. Tulostaulukon vastausten merkitykset
Liite 3	Taulukko 6. Mikroskopointitulokset
Liite 4	Taulukko 7. Vertailutaulukko, vastavärin voimakkuus 5
Liite 5	Taulukko 8. Vertailutaulukko, vastavärin voimakkuus 5

Liite 6	Taulukko 9. Vertailutaulukko, vastavärin voimakkuus 8
Liite 7	Taulukko 10. Vertailutaulukko, vastavärin voimakkuus 8
Liite 8	Taulukko 11. Taustan värjäytyvyyden muutos, opiskelijoiden tulkinta
Liite 9	Taulukko 12. Taustan värjäytyvyyden muutos, laboratorioasiantuntijan tulkinta
Liite 10	Opinnäytetyön toimeksiantosopimus

## 1 JOHDANTO

Bakteereita on kaikkialla. Suurin osa niistä on hyödyllisiä, ja ne toimivat tärkeänä osana luontoa. Pieni osa bakteereista kuitenkin aiheuttaa ihmisille tauteja ja tulehduksia. (Hedman, Heikkinen, Huovinen, Järvinen, Meri & Vaara 2010, 34.) Kun taudinaiheuttajana on bakteeri, potilaan hoidon kannalta on hyvin tärkeää saada selville, mistä bakteerista on kyse. Mitä nopeammin bakteeri tunnistetaan, sitä nopeammin pystytään aloittamaan oikeanlainen hoito. (Hedman, Heikkinen, Huovinen, Järvinen, Meri & Vaara 2011, 37.)

Gramnegatiiviset sauvabakteerit voivat aiheuttaa eriasteisia tauteja. Gramnegatiivisista sauvabakteereista vakavimpia taudinaiheuttajia ovat meningokokki eli *Neisseria meningitidis*, *Hemofilus influenzae*, *Bordetella pertussis* ja *Echerichia*. Meningokokin aiheuttamia vakavia tauteja ovat muun muassa bakteerimeningiitti, nivel tulehdus, ylähengitystieinfektio ja keuhkokuume. Kapselillinen *Hemofilus influenzae* voi aiheuttaa hengenvaarallisia tauteja, kuten muun muassa aivokalvontulehdusta ja keuhkokuumetta. *Bordetella pertussis* aiheuttaa tavallisimmin hinkuyskän, jota edelleen esiintyy toisinaan rokotuksista huolimatta. (Hedman ym. 2010, 160–202.) *Echerichia coli* on yleisimmin syynä virtsatieinfektioon, mutta sen aiheuttamia voivat olla myös muut infektiot, bakteremia ja sepsis (Baron, Murray, Pfaller, Tenover & Yolken 1995, 450).

Syvät märkänäytteet voivat olla joko nestettä tai kudosta. Infektiokohdasta pyritään saamaan tutkittavaksi näyte, joka sisältää mahdollisen taudinaiheuttajan. Näytteet otetaan yleensä joko leikkauksen yhteydessä tai punktoimalla. (Hedman ym. 2011, 50.)

Gramvärjäys on mikrobiologiassa bakteriologinen perustutkimus. Gramvärjäyksellä bakteerit pystytään jakamaan karkeasti värjäytymisen perusteella grampositiivisiin tai gramnegatiivisiin sekä muodon perusteella sauvoihin tai kokkeihin. Värjäystä voidaan käyttää nopeaan diagnostiikkaan, sillä se antaa tärkeää ensitietoa mahdollisesta taudinaiheuttajasta. Gramvärjäyksen perusteella pystytään aika luotettavasti valitsemaan mahdollinen mikrobilääkitys. (Vaara 2007.)

Toimeksianto saatiin Itä-Suomen laboratorokeskuksen liikelaitoskuntayhtymän Joensuuun mikrobiologian laboratoriosta. Toimeksianto oli gramvärjäysautomaatin vastaväriin

voimakkuuden muuttaminen gramnegatiivisten sauvabakteerien esiin saamiseksi syvistä märkänäytteistä gramvärjäyksessä. Tarkoituksena oli keskittyä pelkästään gramvärjäysautomaattiin. Käsien värjäystä ei käsitelty opinnäytetyössä, eikä gramvärjäysautomaattia verrattu käsin värjäykseen.

## **2 BAKTEERIT**

Bakteereita esiintyy eläinten iholla, suolistossa, kasvien pinnalla, maaperässä, vesistöissä, jäätiköillä ja jopa kuumissa lähteissä. Bakteerit ovat välttämättömiä luonnolle, koska ne osallistuvat merkittävästi ravinteiden kiertokulkuun. Vaikka bakteereilla on alkeellinen rakenne, ne pystyvät elämään vaatimattomissakin olosuhteissa ja silti lisääntymään jakaantumalla nopeasti. Osa bakteereista on patogeenisia eli ihmisille tauteja aiheuttavia. (Hedman ym. 2010, 34.) Monille patogeenisille bakteereille otollisin kasvulämpötila on 35–37 °C (Heikkilä, Hellstén, Koukila-Kähkölä, Kurkinen, Meurman, Nummelin, Pastila, Richardson & Ylönen 2005, 35). Patogeeniset bakteerit tunnistetaan kasvuolosuhteiden, värjäytyvyyden ja muodon perusteella (Vaara 2007).

Yksittäisten bakteerien rakenteissa on eroja, ja bakteerien rakenteiden määrässä ja laadussa voi olla vaihtelua (Hedman ym. 2010, 15). Esimerkiksi grampositiivisten ja gramnegatiivisten bakteerien soluseinän rakenteissa on eroa (Hedman ym. 2011, 38).

### **2.1 Yleistä bakteereista**

Bakteerit kuuluvat laajaan yksisoluisten alkeistumallisten organismien ryhmään (Björklöf, Kivisalmi, Korhola, Rasimus, Schauman & Salmela 2008, 17; Hedman ym. 2010, 15). Bakteerit jaetaan niiden muodon perusteella karkeasti sylinterimäisiin sauvoihin tai pallomaisiin kokkeihin sekä värjäytyvyyden perusteella grampositiivisiin tai gramnegatiivisiin bakteereihin. Lisäksi bakteereita löytyy muodoltaan kokkibasilleita, vibrioita, spirokeetoja ja spirillejä. (Hedman ym. 2011, 38.) Mikroskoopilla katsottuna kokkibakteerit esiintyvät yksin, pareittain, ryhminä tai eripituisina ketjuina. Sauvabakteerit voivat esiintyä erillään, lyhyinä ketjuina tai ryhmittyneinä. (Hedman ym. 2011, 38; Heikkilä ym. 2005, 32.) Bakteerit jaetaan myös kasvuolosuhteiden perusteella aerobisiin ja anae-

robisiin bakteereihin. Osa bakteereista elää vain aerobisissa eli hapellisissa olosuhteissa, ja osa vaatii elääkseen anaerobisen eli hapettoman ympäristön. On myös bakteereita, jotka voivat elää sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa. (Heikkilä ym. 2005, 35.)

Osalla bakteereista on erilaisia selviytymismuotoja, joiden avulla ne pystyvät elämään epäedullisissa oloissa. Bakterin lepomuoto on itiö, ja itiöinä bakteerit pystyvät selviämään esimerkiksi kuivuudesta tai muista epäedullisista ajoista. Bakterien tärkein taudinaiheuttamisominaisuus on kyky tarttua karvojen avulla kohteeseen. (Hedman ym. 2010, 14.) Tauteja aiheuttavat ja normaaliflooran bakteerit ovat kuitenkin tarkkoja ravinteista, ja isäntäelimestössä ne saavatkin tarvitsemansa vitamiinit, nukleotidit ja aminohapot. Esimerkiksi hemofilukset ovat hyvin vaativia kasvualustastaan ja ne saadaan kasvamaan laboratorio-oloissa vain kuumennettua verta sisältävillä suklaamaljoilla, missä niillä on käytettävissä punasolujen ravinteet. (Hedman ym. 2010, 36–37.)

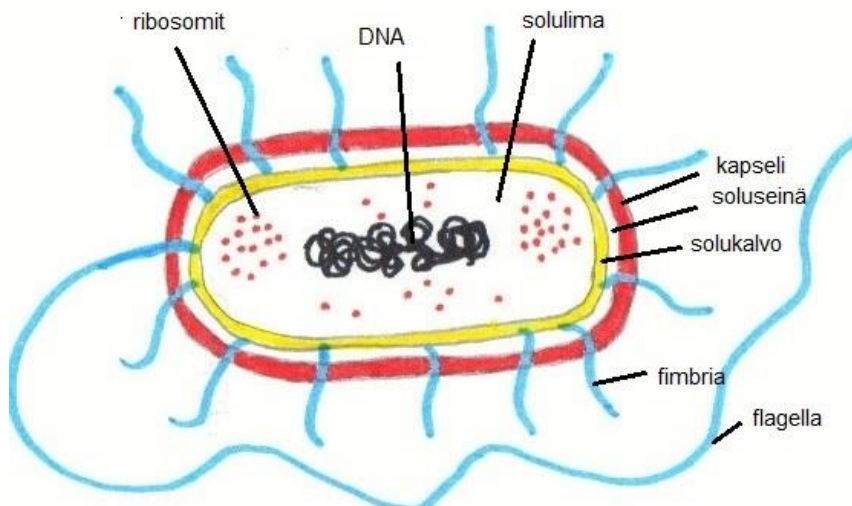
Normaalilla terveellä ihmisellä on mikrobistoa eli normaaliflooraa ruoansulatuskanavassa, iholla ja genitaalialueella. Ihmisen normaaliflooran suurin ja monipuolisin mikrobiryhmä on bakteerit. Lisäksi ihmisen normaalifloorassa on pienempiä määriä arkkeja ja eukaryootteja. (Hedman ym. 2010, 76–78.) Osa gramnegatiivisista sauvabakteereista kuuluu ihmisten normaaliflooraan. Mutta osa normaaliflooraan kuuluvista bakteereista voi kuitenkin olla myös taudinaiheuttajina tarttumalla limakalvoihin, kolonisoimalla eli leviämällä niiden pinnalle ja pääsemällä näin verenkiertoon lisääntymään. (Hedman ym. 2010, 177–204.) Normaaliflooran bakteereita ovat muun muassa *Escherichia*-, *Proteus*- ja *Klebsiella*-lajit. (Ihon bakteeri-infektiot työryhmä 2010).

## 2.2 Bakteerien rakenne

Bakteerien rakenne on yksinkertainen, mutta niiden aineenvaihdunta voi olla hyvin erikoistunut, minkä ansiosta ne voivat käyttää melkein mitä tahansa orgaanista rakennetta hyväkseen (Solunetti 2006a). Yksittäisten bakteerien rakenteet voivat olla hyvinkin erilaisia, ja rakenteiden määrä sekä laatu voivat vaihdella (Hedman ym. 2010, 15).



Bakteerien ulkorakenteet koostuvat kokonaisuudessaan solukalvosta, soluseinästä, kapselista, limakerroksesta ja flagelloista, fimbrioista tai pileista (Solunetti 2006b; Hedman ym. 2010, 14–15). Yleisesti bakteerien sisäisiin rakenteisiin kuuluvat solulimassa olevat ribosomit ja DNA (Hedman ym. 2010, 15). Bakteerien yleisimmät sisä- ja ulkorakenteet ovat nähtävissä seuraavassa kuvassa (kuva 1).



Kuva 1. Yleisbakteerin rakenne (Mukaiillen Hedman ym. 2010, 15).

Bakteerien solukalvo on lipideistä koostuva kaksoiskalvo, joka rajaa solun ympäristöstään ja säätelee solun läpäisevyyttä. Solukalvo osallistuu soluseinän rakenteosien valmistukseen, entsyymien ja toksiinien eritykseen sekä hengitykseen. Lisäksi solukalvo osallistuu erilaisten molekyylien kuljetukseen ja solun jakaantumiseen. Solukalvon ulkopuolella on soluseinä tukemassa solua ja suojaamassa sitä. Soluseinä muodostaa solunjakautumisessa tytärsolujen välille väliseiniä. (Solunetti 2006b; Hedman ym. 2010, 20–21.) Bakteereita on sekä kapselillisiä ja kapselittomia. Kapselin avulla bakteerisolun on helpompi kiinnittyä isäntäsolun pintaan. Lisäksi kapseli suojaa bakteeria isännän immuunijärjestelmältä. Limakerros vaikuttaa bakteerin taudinaiheuttamiskykyyn, kuten myös flagellat, fimbriat tai pilit, jotka lisäksi ovat kiinnittymistä, liikkumista ja geneettisen materiaalin siirtoa varten. (Solunetti 2006b; Hedman ym. 2010, 30–31.)

Bakteerit voivat olla kokonaan soluseinättömiä tai niillä voi olla peptidoglykaania sisältävä soluseinä (Björklöf ym. 2008, 17). Bakteerien DNA on kiinni niiden solukalvossa, eikä niillä ole varsinaista tumaa lainkaan. Bakteereilta puuttuvat myös kloroplastit, endoplasminen retikulum, Golgin laite ja mitokondriot. Bakteerit eli prokaryootit

jaetaan grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin niiden soluseinän rakenteen perusteella. (Solunetti 2006a; Hedman ym. 2010, 21.)

### **2.3 Grampositiivisten bakteerien rakenne**

Gramvärjäytyvyydellä on hyvin suuri merkitys infektioiden varhaistoteamisessa (Hedman ym. 2010, 65). Grampositiivisilla bakteereilla soluseinä muodostuu peptidoglykaanikerroksesta sekä muun muassa teikkohapoista, ja solukalvossa on myös havaittavissa mesomeiksi kutsuttuja rakenteita. Mesomit syntyvät sisäänpainautumalla solukalvosta, ja niitä esiintyy DNA:n kahdentumisen sekä eritystoiminnan aikana. (Solunetti 2006a; Hedman ym. 2010, 25.)

### **2.4 Gramnegatiivisten bakteerien rakenne**

Gramnegatiivisten bakteerien peptidoglykaanikerros on ohuempi kuin grampositiivisilla, ja gramnegatiivisilla bakteereilla on lisäksi endotoksiineina toimivia lipopolysakkarideja sisältävä ulkokalvo. (Solunetti 2006b; Heikkilä ym. 2005, 34). Gramnegatiivisilla bakteereilla on monimutkaisempi soluseinä kuin grampositiivisilla bakteereilla (Huovinen, Meri, Peltola, Vaara, Vaheri & Valtonen 2003, 63; Heikkilä ym. 2005, 33).

Gramnegatiivisten bakteerien rakenteellinen erikoispiirre on ulkokalvo, niin sanottu ulkomembraani, mikä on plasmamembraanin ja ohuen peptidoglykaanikerroksen ulkopuolinen kalvo (Huovinen ym. 2003, 63–64; Heikkilä ym. 2005, 33–34). Ulkomembraanista noin puolet on lipopolysakkaridia, ja muuten se koostuu fosfolipideistä ja proteiineista. Plasmamembraaniin verrattuna ulkomembraanissa on vähemmän erilaisia proteiinilajeja ja vain vähän entsyymejä. Yleensä vesiliukoinen ravinne tarvitsee tietyn kuljetusjärjestelmän päästäkseen lipidikelman läpi. Ulkomembraani on erilainen, sillä se päästää vesiliukoisten kanaviensa läpi kaikkia pieniä vesiliukoisia molekyylejä, mutta isompien molekyyliden, esimerkiksi proteiinien, läpikäymisen se estää. Vain harvoja hyvin tärkeitä ravinteita (B12-vitamiini ja rauta) varten ulkomembraanissa on spesifisiä kuljetusmolekyylejä. (Huovinen ym. 2003, 63–64.)

Ulkomembraanin tärkein tehtävä on suojella bakteeria ulkopuolisilta haitallisilta aineilta. Sen ansiosta gramnegatiiviset bakteerit ovat resistenttejä monille bakteerilääkkeille. Samat bakteerilääkkeet voivat kuitenkin tehotta grampositiivisiin bakteereihin. Ulkomembraani estää suurimolekyylisiä vesiliukoisia aineita pääsemästä solun sisempiin kerroksiin. Gramnegatiiviset bakteerit ovat myös grampositiivisia resistentimpiä useille detergenteille ja rasvaliukoisille aineille. (Huovinen ym. 2003, 63–64.)

## 2.5 Gramnegatiiviset sauvabakteerit

Infektioita aiheuttavista gramnegatiivisista sauvabakteereista enterobacteriaceae-heimon bakteerisukuja ovat *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* ja *Shigella*. Enterobacteriaceae-heimon bakteerisukuja kutsutaan usein yhteisnimellä enterobakteerit, ja niiden yleisin kasvuympäristö on eläinten tai ihmisten suolisto. Muita yleisimmin infektioita aiheuttavia gramnegatiivisia sauvabakteereita ovat muun muassa Klebsiellat, Proteukset, Serratiat, Pseudomonakset, Stenotrophomonakset, Burkholderiat, *Achromobacter*-suvun jäsenet, *Acinebacter*-lajit ja *Enterobacter*-lajit. (Hedman ym. 2010, 177–204.)

Tunnetuin gramnegatiivinen sauvabakteeri on *E. coli*, joka on tärkeä osa suoliston normaaliflooraa. *E. coli* on kuitenkin myös yleisimmin virtsatieinfektion aiheuttaja, ja se voi olla syynä vakavempiinkin tulehduksiin. Muita gramnegatiivisia sauvabakteereita, jotka toimivat vakavempien tautien aiheuttajina, ovat *Neisseria meningitidis*, *Hemofilus influenzae* ja *Bordetella pertussis*. Meningokokki eli *Neisseria meningitidis* voi aiheuttaa muun muassa bakteerimeningiittia, nivel tulehdusta, ylähengitystieinfektiota ja keuhkokuumetta. Hengenvaarallista keuhkokuumetta ja aivokalvontulehdusta voi aiheuttaa myös kapselillinen *Hemofilus influenzae*. *Bordetella pertussis* on tavallisimmin hinkuyskän aiheuttaja. (Hedman ym. 2010, 160–202.)

## 3 MIKROBIOLOGISET SYVÄT MÄRKÄNÄYTTEET

Syvät märkänäytteet ovat syvien, kehon normaalisti puhtaiden eli steriilien alueiden infektionäytteitä. Syvä märkänäyte voi olla nestemäistä tai kudosta. (Hedman ym. 2011,

47.) Syviä märkänäytteitä otetaan muun muassa pleuraontelosta, nivelnesteestä, poskionteloista, vatsaonteloista, abskessista, fistelistä ja Bartholinin rauhasesta (Yhtyneet Medix Oy 2011). Syviin märkänäytteisiin lasketaan kuuluvaksi myös osa pinnallisista märkänäytteistä, jotka ovat yleisimmin nestemäisiä. Näitä näytteitä otetaan muun muassa välikorvasta, poskiontelosta, haavoista ja silmän sidekalvolta. (Hedman ym. 2011, 47.) Kun selvitetään infektion syytä, on otettava huomioon aerobisten ja anaerobisten bakteerien osuus. Näin toimitaan erityisesti kroonisten infektioiden, abskessien, leikkaushaavojen ja muiden syvien haavojen selvittelyssä. (Yhtyneet Medix Oy 2011.) Viljelymenetelmiin tarvitaan elinvoimaisia bakteereita, minkä vuoksi oikeanlainen näytteenotto, säilytys ja kuljetus ovat tärkeitä (Heikkilä ym. 2005, 95).

Kun etsitään anaerobisia ja aerobisia taudinaiheuttajia syvistä ja normaalisti puhtaista kehon alueista, kyseessä on märän bakteeriviljely1-tutkimus (Pu-BaktVi1). Pinnallisten näytteiden aerobinen bakteeriviljely-tutkimus on märän bakteeriviljely2 (Pu-BaktVi2). (Hedman ym. 2011, 47.)

### 3.1 Syvien märkänäytteiden näytteenotto

Mikrobiologisissa bakteriologisissa tutkimuksissa edustavan näytteen saaminen on tärkeää. Epäilystä infektiokohdasta otetaan nestettä tai kudosta. Tutkittavaksi yritetään saada näyte, joka sisältää taudinaiheuttajan. Syvien normaalisti puhtaiden eli steriilien kehon alueiden näytteet otetaan joko punktoimalla limakalvon tai ihon läpi tai leikkauksen yhteydessä. Desinfiointi ja aseptinen työskentely ovat tärkeitä, ettei ihon normaali-flooran bakteereja ja hiivoja pääse näytteeseen. (Hedman ym. 2011, 50.)

Kudosnäytteeksi otetaan kiinteää kudosta sellaisenaan steriiliin astiaan. Nestemäinen näyte voidaan ottaa ruiskuun tai steriiliin koeputkeen. (Hedman ym. 2011, 47.) Melkein kaikista kehon onteloista ja kudoksista saadaan näytteitä punktiolla. Tavallisimmin punktoimalla otetaan näytteitä kehon onteloista selvittäessä infektion tai vamman olemassaoloa. (Lalla 2000, 54.) Punktiossa näytteitä otetaan ruiskulla ja neulalla (Heikkilä ym. 2005, 109). Näyte siirretään kuljetusampulliin läpäisemällä kumikorkki, joka on myös puhdistettu desinfioivalla aineella. Neula pitää vaihtaa ennen kuin näyte siirretään ampulliin. Myös tavallista kuljetusputkea voidaan käyttää, jos kuljetusampulleja ei

ole saatavilla. Märkänäyte voidaan ottaa myös vanutikkuun imeyttämällä. (Yhtyneet Medix Oy 2011; Hedman ym. 2011, 47.)

Haavanäytettä otettaessa haava-alueelta poistetaan märkä ja mahdollinen nekroottinen kudos, jonka jälkeen alue puhdistetaan huolellisesti fysiologisella keittosuolaliuoksella. Haavasta otetaan näyte syvältä haavan pohjasta vanutikulla hankaamalla. Näyte laiteetaan kuljetusputkeen. Jos on mahdollista, haavanäyte voidaan ottaa myös punktoimalla. Puremahaavoista kannattaa ottaa viljely vain, jos haava on tulehtunut. Välikorvan kroonisista tulehduksista näyte otetaan imulla ruiskuun tai imukärkeen samalla, kun tehdään tärykalvopisto. Infektion ollessa akuutti näytteestä riittää pelkkä aerobiviljely. (Yhtyneet Medix Oy 2011.) Näytteitä voidaan ottaa myös diagnoosin varmistamiseksi tai hoidon ja taudinkulun seuraamiseksi (Lalla 2000, 54).

### **3.2 Syvien märkänäytteiden käsittely ja säilytys**

Syvien märkänäytteiden lähetetiedoissa tulee olla näytetyyppi sekä näytteenotto kohta tarkasti. Lisäksi lähetetiedoista tulee selvittää kliiniset tiedot, haavan syntymistapa, mahdollinen bakteerilääkitys ja onko näyte otettu steriilisti punktoimalla. Mahdollisesta kontaminoitumisesta tulee mainita läheteessä. Syvät märkänäytteet eivät kestä pitkäaikaista säilyttämistä, joten näytteet olisi hyvä toimittaa laboratorioon mielellään näytteenottopäivän aikana. Tarvittaessa näytteitä voidaan säilyttää jääkaapissa, mutta kuljetusta varten näytteet on pakattava siten, etteivät ne talvella pääse jäätymään. (Heikkilä ym. 2005, 102–103.)

Mikrobiologian laboratoriossa märkänäytteitä käsitellään vetokaapissa. Vetokaappityöskentelyllä varmistetaan, etteivät näytteet kontaminoituisi eivätkä työntekijät ja työympäristö kontaminoituisi näytteistä. Syville märkänäytetutkimuksille on oma työpisteensä laboratoriossa. (Hedman ym. 2011, 52.) Syvät märkänäytteet rikastusviljellään nestemäisessä elatusaineessa ennen aerobista ja anaerobista bakteeriviljelyä. Bakteeriviljelymaljat valitaan näytteen laadun mukaan. (Yhtyneet Medix Oy 2011.)

## 4 BAKTEERIVILJELY

Bakteeriviljely on ensisijainen tutkimusmenetelmä monien tautien diagnosoinnissa. Kliinisissä mikrobiologisissa laboratoriotutkimuksissa potilasnäytteestä selvitetään, onko taudinaiheuttaja bakteeri ja onko kyseessä infektio tauti. Alustava tieto näytteestä saadaan gramvärjäyksellä. Bakteeriviljelyllä ja muilla tutkimuksilla tietoa saadaan tarkennettua. Mahdolliset bakteerit, jotka on eristetty bakteeriviljelystä, tunnistetaan sukua ja lajitasolla. Lopullinen diagnoosi perustuu bakteeriviljelyyn. (Nissinen 2008, 195; Hedman ym. 2011, 37; Risteli 2006, 58.)

Bakteerien tyypityksessä menetelmien valintaan vaikuttavat menetelmien nopeus, yksinkertaisuus ja toistettavuus. Infektio tutkimuksissa menetelmien toimivuus käytännössä perustuu myös siihen, että kliinisistä näytteistä eristettyjä ihmisille tauteja aiheuttavia bakteereita on aika vähäinen määrä. Tietyn bakteeriryhmän tunnistamisessa edellytyksenä on bakteriologinen asiantuntemus, jotta bakteerin määrittämiseksi osataan käyttää oikeita testejä. (Hedman ym. 2010, 64.)

Mikrobiologiassa bakteeriviljely on tärkein diagnostinen menetelmä, joka mahdollistaa erilaiset jatkotutkimukset, kuten esimerkiksi antibioottien herkkyysmääritykset (Heikkilä ym. 2005, 95). Herkkyysmäärityksellä selvitetään bakteerin taipumusta reagoida mikrobilääkkeisiin eli antibiootteihin. Herkkyysmäärityksestä selviää, mitkä antibiootit tehoavat bakteeriin, joko hidastamalla sen kasvua tai tuhoamalla sen. (Björklöf ym. 2008, 12; Hedman ym. 2011, 43.) Bakteeri voi olla luonnostaan resistenssi osalle mikrobilääkkeistä, joten hoidon kannalta herkkyysmääritys on hyvin tärkeä, jotta tehoava lääke löydetään (Hedman ym. 2011, 43).

## 5 GRAMVÄRJÄYS

Gramvärjäys on tärkein bakteerivärjäysmenetelmä. Värjäyksen periaatteen kehitti tanskalainen Hans Christian Joachim Gram vuonna 1883. (Meurman 2010, 54; Baron ym. 1995, 39.) Gram värjäsi bakteerit kristallivioletilla ja käsitteli ne sitten jodiliuoksella.

Käsittelyn seurauksena Gram havaitsi, että osalta bakteereista väri voitiin pestä alkoholilla pois ja osalta ei. (Meurman 2010, 54; Hussey & Smith 2005.) Myöhemmin saksalainen patologi Carl Weigert lisäsi menetelmään vastavärjäyksen safraniinilla (Meurman 2010, 54). Bakteerit, jotka eivät värjäytyneet kristallivioletilla, saatiin värjäytymään safraniinilla punaisiksi, ja näin ne saatiin helpommin havaittaviksi. Värjäyksen pääsääntönä on, että grampositiiviset bakteerit värjäytyvät violeteiksi ja gramnegatiiviset punaisiksi. (Baron ym. 1995, 39.) Gramvärjäksiä tehdään käsinvärjäysmenetelmällä, mutta nykyisin käsinvärjäyksen rinnalle on tullut myös värjäysautomaatteja (Meurman 2010, 54).

## 5.1 Gramvärjäyksen periaate

Gramvärjäyksessä kaikki bakteerit värjäytyvät kristallinviolettivärillä sinivioletiksi. Kun sinivioletteja bakteereja huuhdellaan alkoholilla, gramnegatiivisista bakteereista huuhtoutuu kristallivioletti väri pois. Grampositiiviset bakteerit pysyvät kuitenkin sinivioletteina. (Liimatainen 2000, 127.) Tämä johtuu siitä, että gramnegatiivisilla bakteereilla ulkoseinässä oleva peptidoklykaanikerros on niin ohut, että alkoholi pääsee vaurioittamaan sitä aiheuttaen reikiä, joiden kautta solu vapauttaa värit ulos. Grampositiivisten bakteereiden peptidoklykaanikerros on riittävän paksu, jolloin alkoholi ei pysty vaurioittamaan sitä riittävästi, eikä väri vapaudu. (Meurman 2010, 54; Hussey & Smith 2005.) Huuhtelun jälkeen gramnegatiiviset bakteerit näkyvät värittöminä, ja ne voidaan saada näkyviksi värjäämällä bakteerit safraniinivastavärillä. Safraniinivärjäys värjää gramnegatiiviset bakteerit punaisiksi. (Liimatainen 2000, 127; Hussey & Smith 2005.)

Gramvärjäyksen suorituksesta on olemassa kuitenkin monia toisistaan poikkeavia ohjeita. Lisäksi värjäysreagensseissa saattaa valmistajasta riippuen olla eroja. (Liimatainen 2000, 126.) Bakteerit voidaan tunnistaa niiden gramvärjäytyvyydestä ja solumorfologiasta ja näin saadaan arvokasta tietoa hoitaville lääkäreille (Meurman 2010, 54).

## 5.2 Gramvärjäyksen käyttöalueet

Gramvärjäyksellä on suuri merkitys, kun diagnosoidaan esimerkiksi märkäistä aivokalvontulehdusta, miesten tippuria tai Clostridium-bakteerien aiheuttamaa kaasukuoliota (Hedman ym. 2011, 39). Parhaimmillaan gramvärjäystä voidaan käyttää pikadiagnostisena menetelmänä vakavissa infektioissa. Näytteestä voidaan tehdä suoraan gramvärjäys, jonka perusteella voidaan tehdä alustava päätelmä infektion aiheuttajasta ja aloittaa potilaalle sopiva antibioottihoito. (Liimatainen 2000, 126–127; Hedman ym. 2011, 39.)

Gramvärjäystä käytetään myös bakteerien tunnistustestinä, jolloin värjäys suoritetaan jo kasvaneesta bakteeripesäkkeestä. Tällä tavalla suoritettu gramvärjäys toimii muiden tunnistustestien tukena bakteerin nimeämisessä. (Liimatainen 2000, 126–127.) Gramvärjäys voidaan siis tehdä suoraan kliinisestä näytteestä, maljalla kasvaneesta pesäkkeestä tai esimerkiksi veriviljelypullosta. Parhaiten solumorfologia ja ryhmittäminen saadaan näkymään, kun värjäys tehdään bakteerisuspensiosta eli bakteerimassaa sekoitettuna tippaan keittosuolaliuosta näyteobjektillasilla. (Meurman 2000, 54.)

## 5.3 Näyteobjektillasin valmistus

Ennen gramvärjäystä on valmistettava näyteobjektillasit. Näyte levitetään objektillasille ohuena kerroksena, jolloin näytteen värjäminen ja mikroskopointi on helpompaa. Näin tulisi tehdä näytteen suorassa värjäyksessä ja bakteeripesäkkeestä suoritettussa värjäyksessä. (Liimatainen 2000, 126.)

Bakteeripesäkkeestä tehdyssä värjäyksessä bakteerimassaa voidaan ottaa suoraan pesäkkeestä puutikulla ja levittää se objektillasille. Jos bakteeripesäke on hyvin pieni, otetaan pesäkkeestä massaa objektillasilla olevaan keittosuolapisaraan. Nestemäisestä märkänäytteestä näytettä voidaan tiputtaa suoraan objektillasille ja levittää se ohueksi kerrokseksi. Näyteobjektillasin annetaan kuivua huoneenlämmössä tai lämpölevyllä. Värjäystä tehdessä on syytä muistaa aseptinen työskentely. (Liimatainen 2000, 126.)



#### 5.4 Gramvärjäyksen tulkinta ja virhelähteet

Gramvärjäysten tulkinnassa on tärkeää osata perustiedot tietyistä bakteereista sekä niiden morfologiasta ja värjäytyvyydestä. Potilasnäytteestä tehdyn gramvärjäyksen tulkinnassa on syytä keskittyä seuraaviin seikkoihin: näytteen edustavuus ja kelvollisuus, mikrobien esiintyvyys, gramvärjäytyvyys ja morfologia. (Meurman 2010, 54.) Edustavan näytteen saaminen on tärkeää. Epäilystä infektiokohdasta yritetään saada näyte, joka sisältää taudinaiheuttajan. (Hedman ym. 2011, 50.) Näytteen kelvollisuutta arvioidaan värjäytyvyyden perusteella. Näytteen mikroskopointi kannattaa aloittaa pienellä suurennoksella, jolloin saadaan yleissilmäys näytteen edustavuudesta. Bakteerien ja mikrobien tunnistukseen käytetään 100-kertaista öljyimmersiosuurennusta, jolloin morfologia on paremmin nähtävissä. (Liimatainen 2000, 127.)

Gramvärjäykseen liittyy paljon virhelähteitä, joista johtuen bakteerit voivat värjäytyä poikkeavasti. Jotkin virhelähteet voivat olla potilaasta johtuvia, esimerkiksi antibioottihoito saa bakteerit näyttämään kärsineiltä niin, että ne voidaan tulkita artefaktaksi. Huolellisella laboratoriotyöskentelyllä voidaan pois sulkea osa virhelähteistä. (Meurman 2010,54.)

Mahdollisen hoidon kannalta on hyvin tärkeää erottaa grampositiivisuus ja gramnegatiivisuus. Värien tulkinta voi olla vaikeaa, ja joskus värin lisäksi on katsottava muitakin ominaisuuksia. Muuttamalla mikroskoopin tarkennusta, esimerkiksi punaiseksi värjäytynyt bakteeri voi näyttää läpikuultavalta, ja se on silloin todennäköisesti oikea gramnegatiivinen bakteeri. (Meurman 2010, 56.)

Viljelmästä tehdyt gramvärjäykset ovat yleensä helpompia tulkita kuin suoraan näytteestä tehdyt gramvärjäykset. Yleensä ne ovat parempilaatuisia, bakteereita esiintyy enemmän, eikä häiritsevää taustamateriaalia ole. Gramvärjäysvastauksissa on vaarallisempaa laittaa vastaukseksi väärä bakteeri kuin että bakteeria ei olisi havaittu lainkaan. Virheellinen vastaus saattaa viedä potilaan hoitoa väärään suuntaan, ja siksi gramvärjäystulos kannattaa vastata harkitusti. (Meurman 2010, 56.) Taulukossa1 mahdollisia selityksiä virheellisille gramvärjäyksille.

Taulukko 1. Gramvärjäyksen virhelähteitä (Mukaillen Meurman 2010, 54).

<b>Grampositiivinen bakteeri värjäytyy gramnegatiiviseksi</b>	<b>Gramnegatiivinen bakteeri värjäytyy grampositiiviseksi</b>
Valmiste on ohut.	Valmiste on paksu.
Bakteerin stationäärinen kasvuvaihe.	Lasi on liian kuiva ennen värinpoistoa.
Antibiootihoidon vaurioittamat bakteerit.	Värinpostoliuoksessa on kristalliviolettiä.
Näytteen lasille hankaus vaurioittanut bakteereita.	Värinpostoliuoksessa on jodia.
Liika kuumennus kiinnityksessä.	Näytteessä on detergenttiä.
Liian pitkät vesipesut.	
Vanha jodiliuos.	
Värinpoistoliuoksessa on vettä.	

## 5.5 Gramvärjäysautomaatti

BioMérieux kehitti Previ-Color gram-värjäysautomaatin, joka on nopea ja automaattinen laite gramvärjäysten tekoon. Se vapauttaa laboratoriohenkilöstön muihin työtehtäviin värjäyksen ajaksi. (BioMérieux S.A. 2009a, 1.) Toimeksiantajamme mukaan Suomessa Previ-Color gram-värjäysautomaatti on suosituin gramvärjäysautomaatti. Muitakin gramvärjäysautomaatteja on olemassa, esimerkiksi VWR:n Mirastainer® II. (Islabin Mikrobiologian laboratorioasiantuntija 2013.)

BioMérieuxin Previ-Color gram-laitteessa käytettäviä reagensseja ovat kristallivioletti-väriliuos, jodiliuos, acetoni-safranini-vastaväriliuos, tislattu vesi ja etanoli. Vastavärinä voidaan käyttää myös pelkästään safraninia tai acetoni-fuchsina. Kiinnitykseen voidaan käyttää vaihtoehtoisesti metanolia. Laitteen värjäysmekanismi perustuu siihen, miten kristallivioletti-jodi-väriliuosseos läpäisee soluseinän. Värjäys näyttää grampositiiviset bakteerit väriltään violetteina tai mustina ja gramnegatiiviset vaaleanpunaisina tai punaisina. (BioMérieux S.A. 2009a, 2-3.)

Laitteelle voidaan määrittää erilaisia värjäysasetuksia valitsemalla vastavärin voimakkuus asteikolta 1-9. Jos näytteen paksuus on hyvin ohut tai ohut, valitaan vastavärin voimakkuudeksi 1-2, esimerkiksi vanhoille näytteille tai virtsanäytteille. Jos näyte on

keskipaksu, valitaan vastaväriin voimakkuudeksi 3-4, esimerkiksi vagina-, yskös-, virtsa- ja keuhkonäytteille. Jos näyte luokitellaan paksuksi, vastaväriin voimakkuus on 5, esimerkiksi veriviljely, yskös-, keuhko- ja kudoksenäytteille. Hyvin paksulle näytteelle valitaan vastaväriin voimakkuudeksi 6-9, esimerkiksi uloste- ja veriviljelynäytteille. Laitteelle voidaan tallentaa erilaisia värjäysohjelmia, jotka helpottavat laitteen rutiinikäyttöä. (BioMérieux S.A. 2009b, 13.)

Laitteiden luotettavuutta ja laatua ylläpidetään osallistumalla Labqualityn järjestämiin laaduntarkkailukierroksiin. Labquality järjestää laaduntarkkailukierroksia neljä kertaa vuodessa. Labquality lähettää laboratoriolle kolme valmiiksi gramvärjättyä objektilasia, jotka laboratorio mikroskopoi. Tulokset laboratorio lähettää Labqualitylle, joka antaa myöhemmin palautteen tulosten oikeellisuudesta. (Labquality 2013.)

Laboratorioilla on vastuu kaikessa toiminnassaan tuotettujen palveluiden laadusta ja kehittämisestä. Asiakkaiden on voitava luottaa analyysitulosten oikeellisuuteen. Laboratorion laatukäsikirjasta selviää kyseisen laboratorion keskeiset toimintatavat ja vastuut sekä laatutoiminnan taso. Laatukäsikirjassa ja menettelytapaohjeissa kuvataan miten laatu ja tulosten luotettavuus saavutetaan. Kaikkia ohjeita, jotka liittyvät analyysimenetelmien suorittamiseen, välineiden ja laitteiden käyttöön sekä ylläpitoon, kutsutaan menettelytapaohjeiksi. (Jaarinen & Niiranen 2005, 8-9.)

## **6 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMA**

Opinnäytetyön aihe saatiin toimeksiantona Itä-Suomen laboratoriukskuksen liikelaitoskuntayhtymän (Islab) Joensuun kliinisen mikrobiologian aluelaboratorion laboratorioasiantuntijalta. Mikrobiologian laboratorio halusi selvittää saadaanko gramnegatiiviset sauvabakteerit näkymään syvistä märkänäytteistä gramvärjäyksessä, kun gramvärjäysautomaatin vastaväriin voimakkuutta lisätään.

Opinnäytetyön tutkimuskysymykset olivat:

1. Näkyvätkö gramnegatiiviset sauvabakteerit syvistä märkänäytteistä gramvärjäysautomaatilla tehdyssä värjäyksessä, kun vastavärin voimakkuutta lisätään?
2. Vaikuttaako taustavärin voimakkuus gramnegatiivisten sauvabakteerien näkyvyyteen?

## 7 MENETELMÄVALINNAT

Kvantitatiivinen tutkimus keskittyy muuttujien mittaamiseen, tilastollisten menetelmien käyttöön ja muuttujien välisten yhteyksien tarkasteluun. Kvantitatiivisia tutkimuksia voidaan luokitella, jaotella ja nimetä eri tavoin. (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2013, 55–56.)

### 7.1 Kvantitatiivinen kokeellinen tutkimus

Kvantitatiivinen tutkimus on määrällistä tutkimusta. Tutkimuksen avulla pyritään selvittämään asioita, jotka ovat yhteydessä prosenttiosuuksiin ja lukumääriin. Usein kvantitatiivinen tutkimus keskittyy selvittämään riippuvuuksia ja muutoksia. Luotettavuuden kannalta otoksen on oltava tarpeeksi suuri ja edustava. Tutkimusten tulokset antavat yleensä viitteen muutoksesta, mutta eivät selitä, miksi muutos tapahtuu. Tulokset voidaan esittää numeroiden avulla, mutta ne on kuitenkin selitettävä sanallisesti. Tutkimusprosessin, sekä tuloksien tulee olla puolueettomia. (Heikkilä 2008, 16.)

Kokeellisessa tutkimuksessa tavoitteena on pyrkiä tekemään kontrolloituja ja systemaattisia havaintoja sekä mahdollisimman luotettavien tutkimustulosten saaminen. Kokeellisessa tutkimuksessa tutkimustilanne muodostetaan siten, että tutkijan on mahdollista havainnoida ilmiöiden vaikutuksia ja syy-seuraus-suhteita kontrolloimalla kaikkia ilmiöön liittyviä tekijöitä. (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2013, 57.)

Tämä opinnäytetyö on kokeellinen kvantitatiivinen tutkimus, jossa mitataan vastavärin voimakkuuden vaikutusta gramnegatiivisten sauvabakteerien näkyvyyteen. Tässä opinnäytetyössä muuttujina on vastavärin voimakkuus ja gramnegatiivisten bakteerien värjäytyvyys. Tutkimuksessa perusjoukkona ovat syvät märkänäytteet, joiden maljaviljelystä on löytynyt gramnegatiivinen sauvabakteeri. Otos koostuu mikrobiologian laboratorion kesän 2013 aikana keräämistä näytteistä. Tutkimusotoksen koko määräytyy aineiston keräämiseen käytettävissä olevan ajan ja potilasnäytemäärien perusteella.

## **7.2 Aineiston analysointi**

Kvantitatiivisen tutkimuksen aineistoa pyritään kuvaamaan ja tulkitsemaan numeroiden ja tilastojen avulla. Aineiston analysointiin on käytettävissä runsaasti erilaisia laskennallisia ja tilastollisia menetelmiä. Kun aineiston analyysiin on valittu sopiva tilastollinen kuvaava analyysi, voidaan tutkimuksesta riippuen edetä yhteisvaihtelun, riippuvuussuhteiden tai aikasarjan analysointiin, tai tekemään erilaisia luokitteluita. Kvantitatiivisen tutkimuksen analysoinnin kannalta on erittäin tärkeää hahmottaa etukäteen koko tutkimusprosessin kulku, koska ongelmanasetteluun, aineiston hankintaan sekä analyysimenetelmään liittyvät valinnat vaikuttavat toisiinsa. (Jyväskylän yliopisto 2014.)

Tutkimuksessa ei saatu varsinaisia numeerisia tuloksia, vaan värjäytyistä objektilaseista havainnoidaan systemaattisesti näytemateriaalin värjäytyvyyttä ja bakteerien näkyvyyttä. Tulokset haluttiin muuttaa numeerisiksi ja näin helpommin esitettävään muotoon. Suhteellinen oikeellisuus-laskukaavan avulla tulokset saatiin muutettua prosenttiluvuiksi. Suhteellisella oikeellisuudella tarkoitetaan validoitavalla ja referenssimenetelmällä saatujen tulosten yhteneväisyyttä, kun tutkitaan samoja näytteitä. (Elintavikeviraston validointiohje 1997.)

## **8 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS**

Tutkimustehtävänä oli saada gramnegatiiviset sauvabakteerit näkymään syvistä märkänäytteistä gramvärjäyksessä. Erilaiset gramvärjäysvariaatiot selvitettiin ja niistä keskus-

teltiin toimeksiantajan kanssa. Islabin Joensuun mikrobiologian aluelaboratoriolla on käytössä gramvärjäysautomaatti BioMérieux Previ-Color gram. Päädyttiin siihen, että gramvärjäysautomaatin vastavärin voimakkuutta muutettiin vahvemmaksi. Tarkoituksena oli kokeilla kahta eri vahvuustasoa. Joensuun mikrobiologian aluelaboratorio värjää gramvärjäysautomaatilla syvät märkänäytteet vastavärin asetuksella viisi. Tutkimuksessa päädyttiin kokeilemaan värjäyksessä vastavärin asetusta kuusi ja kahdeksan.

## 8.1 Toimintaympäristö

Tutkimus suoritettiin Islabin Joensuun mikrobiologian aluelaboratoriossa. Islab eli Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä on perustettu vuonna 2008. Islabin tehtävänä on tarjota kliinisen kemian, kliinisen mikrobiologian ja genetiikan erikoisalojen laboratoriopalveluita. Islab on jaettu Savonlinnan, Mikkelin, Joensuun ja Kuopion aluelaboratorioihin. (Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä 2013.)

Islabin Joensuun mikrobiologian aluelaboratoriossa tehdään erilaisia mikrobiologisia tutkimuksia. Laboratorio on jaettu näytteiden perusteella erilaisiin työpisteisiin. Työpisteitä on yhteensä kuusi, ja niissä tutkitaan virtsa-, uloste-, pintamärkä-, syviä märkä-, klamydia- ja sieninäytteitä. Lisäksi on erillinen työpiste elatusaineiden valmistamiselle. Laboratoriossa on myös toimisto ja kokoustiloja sekä postituspiste. (Islabin Mikrobiologian laboratorioasiantuntija 2013.)

Syviä märkänäytteitä tulee laboratorion tehtäväksi vuodessa noin 4000–5000. Syvät märkänäytteet voivat olla joko kudosta tai nestemäistä. Syviä märkänäytteitä otetaan esimerkiksi pleuraontelosta, nivelnesteestä, poskionteloista ja vatsaonteloista. Tutkimusten laatua ja luotettavuutta laboratoriossa arvioidaan osallistumalla Labqualityn järjestämille laaduntarkkailukierroksille neljä kertaa vuodessa. Laboratoriossa tutkitaan kerran viikossa kontrollinäyte eli näyte, jonka tulos on tiedossa. (Islabin Mikrobiologian laboratorioasiantuntija 2013.)

Laboratorioprosessin laatuun vaikuttavat useat eri seikat. Laadunarvioinnissa on otettava huomioon ennen näytteen analyysia vaikuttavat seikat ja näytteen analysoinnin jäl-

keiset seikat, jotka vaikuttavat laboratorioprosessin kokonaislaatuun. Laadukkaan laboratoriotuloksen edellytyksenä on laadukas näyte. Näytteenottajan on otettava näyte oikeasta paikasta, oikeaan aikaan ja oikealla tavalla. Näytteenottajalla tulee olla käytettävissä laboratorion ohjekirja, jossa on riittävän tarkat ohjeet laadukkaan näytteenoton varmistamiseksi. Lisäksi on huomioitava näytteen oikea säilytys ja toimitus laboratorioon pikaisesti. Näytteen mukana tulee olla tutkimuspyyntö. (Liimatainen 2010, 57.)

Henkilökunnan on oltava koulutettua ja riittävän perehtynyttä työtehtäviinsä. Muuttuvien ja kehittyvien menetelmien takia laboratorion on järjestettävä sisäisiä koulutuksia tai osallistuttava järjestettyihin koulutustilaisuuksiin. Uudet laitteet ja menetelmät on validoitava ennen varsinaista käyttöönottoa, jotta voidaan varmistua tulosten oikeellisuudesta ja toistettavuudesta. Labquality järjestää ulkoista laadunarviointia. Sisäisen laadunarvioinnin jokainen laboratorio järjestää itse seuraamalla laboratoriotutkimuksen laatuun vaikuttavia tekijöitä. Seurattavia tekijöitä ovat muun muassa elatusaineet, reagenssit ja laitteet. Poikkeavat tulokset vaativat välitöntä reagointia ja toimenpiteitä ongelmien korjaamiseksi. Tutkimukset tulee tehdä aina samalla tavalla noudattaen kirjallisia ohjeita. (Liimatainen 2010, 58.)

## 8.2 Näytemateriaali

Mikrobiologian laboratorio keräsi tarvittavan näytemateriaalin kesän 2013 aikana. Laboratorio oli kerännyt tutkimusta varten 59 näytettä. Näiden näytteiden bakteeriviljelytulokset käytiin läpi, ja tulosten perusteella tutkimukseen valikoitiin vain ne näytteet, joiden bakteeriviljelylöydöksenä oli gramnegatiivinen sauvabakteerilaji. Lopulliseen tutkimukseen valikoitui 18 näytettä.

Laboratorio oli tehnyt valikoiduista 18 näytteestä kolme näyteobjekttilasia, joiden bakteeriviljelytulos oli gramnegatiivisten sauvabakteerien suhteen positiivinen. Esitestauksen perusteella suunniteltu värjäys vastavärin voimakkuuden asetuksella kuusi päätettiin jättää tekemettä. Näin ollen kolmesta näyteobjekttilasista yksi jäi pois. Yhtä näytettä varten oli siis yhteensä kaksi näyteobjekttilasia, joista yksi näyteobjekttilasi oli mikrobiologianlaboratorion värjäämä ja diagnosoima. Värjäysasetuksena laboratorio oli käyttänyt vastavärin voimakkuutta viisi, mikä on normaalisti käytössä oleva asetus syville

märkänäytteille. Toiselle näyteobjekttilasille tehtiin värjäys muuttamalla gramvärjäysautomaatin vastaväriin asetukseksi kahdeksan. Yhteensä analysoitavana oli 18 näytettä eli 36 näyteobjekttilasia, joista 18 näyteobjekttilasia oli laboratorion värjäämiä. Toiset 18 näyteobjekttilasia värjättiin muuttamalla vastaväriin asetukseksi kahdeksan. Kaikki 36 objekttilasia mikroskoipoitiin.

Kaikissa analysoitavissa näyteobjekttilaseissa oli laboratorion merkitsemät potilasnumerot. Koko tutkimuksen suoritusvaiheessa näyteobjekttilaseja käsiteltiin potilasnumeroiden mukaan. Tulosten taulukoimisvaiheessa potilasnumerot muutettiin juokseviksi numeroiksi alkaen numerosta yksi, jotta potilaita ei voitaisi yhdistää tuloksiin.

### 8.3 Esitestaus

Esitestauksella on suuri merkitys tutkimuksen luotettavuuteen ja validiteettiin. Esitestauksella testataan valittuja menetelmiä ja niiden toimivuutta. Sen perusteella tutkimuksen menetelmiä voidaan vielä muokata, jos havaitaan puutteita tai ongelmia. Esitestauksella hahmotetaan lopullisen tutkimuksen kulku, ja tutkimuksen suorittaminen on helpompaa. (KvantiMOTV 2007.) Opinnäytetyön esitestauksessa testattiin värjäysautomaatin käyttöä ja selvitettiin valittujen vastaväriasetusten toimivuutta. Esitestauksen perusteella määritettiin lopullisen tutkimuksen kulku ja arvioitiin tutkimukseen tarvittava aika. Esitestaukselle varattiin yksi työskentelypäivä.

Esitestauksessa käytettiin laboratorion omista ATCC-bakteerikannoista (American Type Culture Collection) eli kontrollibakteerikannoista valmistettuja näyteobjekttilaseja. Tähän päädyttiin, koska potilasnäytteistä valmistettuja näyteobjekttilaseja haluttiin säästää lopulliseen tutkimukseen. ATCC-bakteerikannoista esitestaukseen valittiin *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* ja *Proteus mirabilis*. Edellä mainituista bakteerikannoista valmistettiin esitestaukseen tarvittavat näyteobjekttilasit sienityöpisteessä. Objekttilasille pudotettiin pisara steriiliä vettä ja veteen sekoitettiin hammastikulla bakteerimassaa. Kustakin bakteerista valmistettiin neljä näyteobjekttilasia värjäyksiä varten. Näyteobjekttilasit kuivattiin lämpölevyllä (41 °C) syvien märkänäytteiden työpisteessä. Kaksi näyteobjekttilasia värjättiin gramvärjäysautomaatilla Islabin työohjeen mukaisesti, mutta vastaväriin voimakkuudeksi vaihdettiin kuusi ja kaksi näyteobjekttilasia värjätettiin vaih-



tamalla vastavärin voimakkuudeksi kahdeksan. Värjäysten jälkeen näyteobjektilasit mikroskopoititiin valomikroskoopilla 100-öljyimmersiosuurennuksella. Myös värjäykset ja mikroskopointi suoritettiin syvämärkäpisteessä.

Esitestauksessa värjäytyistä näyteobjektilaseista havaittiin mikroskopoinnissa, että näyteobjektilasien värjäytyvyydessä ei ollut juurikaan eroa vastavärin voimakkuuden kuusi ja kahdeksan välillä. Kummallakin vastavärin voimakkuudella värjäytyvyys oli hyvä, ja bakteerit olivat selkeästi nähtävissä. Voimakkuudella kahdeksan värjäytyissä näyteobjektilaseissa havaittiin, että väri oli vain hieman voimakkaampi kuin voimakkuudella kuusi värjäytyissä näyteobjektilaseissa.

Koska ATCC-bakteerikannat värjäytyivät niin selkeästi molemmilla vastavärin voimakkuuksilla, päätettiin värjätä lisäksi yksi potilasnäytteen näyteobjektilasi vastavärin voimakkuudella kahdeksan. Tätä näyteobjektilasia verrattiin laboratorion, vastavärin voimakkuudella viisi värjättyyn näyteobjektilasiin. Näidenkään näyteobjektilasien värjäytyvyydessä ei ollut havaittavissa merkittävää eroa gramnegatiivisten sauvabakteerien näkyvyydessä. Toimeksiantajan kanssa päätettiin, että tutkimuksessa potilasnäytteiden näyteobjektilasit värjättäisiin ensin vastavärin voimakkuudella kahdeksan. Näyteobjektilasit mikroskopoititiin, minkä jälkeen arvioitiin, onko tutkimuksen kannalta merkityksellistä suorittaa värjäystä vastavärin voimakkuudella kuusi.

#### **8.4 Tutkimuksen suoritus**

Toimeksiantajan kanssa päätettiin esitestauksen perusteella, että on tarpeetonta suorittaa värjäystä vastavärin voimakkuudella kuusi. Vastavärin voimakkuudella kahdeksan värjäytyissä esitestausnäyteobjektilaseissa ei havaittu merkittävää eroa bakteerien näkyvyydessä verrattuna vastavärin voimakkuudella viisi värjättyihin näyteobjektilaseihin.

Potilasnäytteistä valmistetut 18 näyteobjektilasia värjättiin Islabin työohjeen mukaisesti, mutta vastavärin voimakkuudeksi vaihdettiin kahdeksan. Koska värjäysautomaatin näytekaruselliin mahtuu 12 näyteobjektilasia kerrallaan, värjäys suoritettiin kahdessa erässä. Yhden karusellin värjäyksessä meni aikaa noin viisi minuuttia.

Näyteobjektilasit laitettiin värjäysautomaatin karuselliin näytepuoli myötöpäivään päin. Karuselin täyttäminen aloitettiin järjestyksessä alkaen paikasta yksi. Koska näytteitä oli pariton määrä, karuselli tasapainotettiin tyhjällä objektilasilla. Karusellin kansi suljettiin tiiviisti, minkä jälkeen suljettiin laitteen kansi. Tämän jälkeen valittiin värjäyksen asetukset. Vastavärin haluttu voimakkuus valittiin asteikolta 1-9. Valinnan jälkeen laite palasi perustilaan. Jos karuselli ei ollut täynnä, numeropainikkeesta valittiin näyteobjektilasien määrä. Sen jälkeen värjäys käynnistettiin. Laite piippasi värjäyksen valmistuttua, minkä jälkeen kannen sai avata ja näyteobjektilasit poistaa. (Pentikäinen, Perola & Räsänen 2012.)

Värjätyt näyteobjektilasit mikroskoipoitiin valomikroskoopilla 100-kertaisella öljyimersiosuurenoksella. Näyteobjektilaseilta katsottiin yleisesti näytemassan värjäytyvyyttä, mahdolliset bakteerihavainnot ja niiden värjäytyvyys. Erityisesti etsittiin gram-negatiivisia sauvabakteereita ja arvioitiin niiden värjäytyvyyttä. Laboratorion vastavärin voimakkuudella viisi värjäämät näyteobjektilasit mikroskoipoitiin läpi ennen vastavärin voimakkuudella kahdeksan värjättyjen näyteobjektilasien mikroskoipoitia.

Näyteobjektilaseilta tehdyt havainnot kirjattiin taulukkoon (taulukko 4), joka tehtiin esitestauksen perusteella. Taulukkoon 4 merkittiin näytteet juoksevalla numerolla allekkain ja omat osiot vastavärin voimakkuudelle viisi ja kahdeksan. Näiden osioiden alle tehtiin sarakkeet bakteerien näkyvyydelle ja taustan värjäytyvyydelle.

## 9 TULOKSET

Mikroskoipoititulostaulukkoon (taulukko 4) kirjattiin rinnakkain opiskelijoiden ja laboratorioasiantuntijan havainnot näyteobjektilaseilta. Havainnoinnissa arvioitiin bakteerien näkyvyyttä ja taustan värjäytyvyyttä. Tulostaulukkoon merkittiin viiva, jos näyteobjektilasilla ei näkynyt bakteereita. Jos bakteereita esiintyi, kirjattiin niiden värjäytyvyys ja muoto. Taustan värjäytyvyyttä arvioitiin tähdillä. Yksi tähti merkitsee haaleaa värjäytyvyyttä, kaksi tähteä normaalia tai näkyvää värjäytyvyyttä ja kolme tähteä voimakasta värjäytyvyyttä. Laboratorioasiantuntijan havainnoimat tulokset kirjattiin eri värillä, jotta tulosten luku olisi helpompaa.

## 9.1 Tulosten analysointi

Tuloksia pystyttiin helpommin analysoimaan ja esittämään muuttamalla ne numeeriseen muotoon. Taulukoissa 7-10 (liitteet 4-7) verrattiin gramvärjäystulosten ja bakteeriviljelytulosten yhteneväisyyttä. Numeerinen arvo 1 (yksi) tarkoittaa gramvärjäystuloksen vastaavan vertailtavaa bakteeriviljelytulosta. Numeerinen arvo 0 (nolla) tarkoittaa, että tulokset eivät vastanneet toisiaan. Taulukoissa 11-12 (liitteet 8-9) verrattiin muuttuiko näyteobjekttilasien taustan värjäytyvyys voimakkaammaksi, kun vastavärin asetus nostettiin viidestä kahdeksaan. Numeerinen arvo 1 (yksi) tarkoittaa, että taustan värjäytyvyys voimistui, kun vastavärin asetuksen voimakkuutta nostettiin kahdeksaan. Numeerinen arvo 0 (nolla) tarkoittaa, ettei taustan värjäytyvyys voimistunut vastavärin voimakkuutta nostamalla.

### 9.1.1 Gramnegatiivisten bakteerien näkyvyys

Gramnegatiivisten bakteerien näkyvyyttä pystyttiin paremmin kuvaamaan muuttamalla tulokset numeerisiksi ja laskemalla niiden suhteellinen oikeellisuus. Numeerinen arvo 1 (yksi) tarkoittaa gramvärjäystuloksen vastaavan vertailtavaa bakteeriviljelytulosta. Numeerinen arvo 0 (nolla) tarkoittaa, että tulokset eivät vastanneet toisiaan.

Suhteellinen oikeellisuusprosentti laskettiin tulostaulukoista (taulukot 7-10) seuraavalaisella laskukaavalla:

Suhteellinen oikeellisuus (%) =  $\frac{a}{b} \times 100$  %, jossa

a = näytteiden lukumäärä, joiden gramvärjäystulos vastasi bakteeriviljelytulosta

b = määritettyjen näytteiden kokonaislukumäärä

Esimerkiksi taulukosta 7 (liite 4) laboratorioasiantuntijan havaintojen numeeriset tulokset muutettiin prosenteiksi seuraavalla laskukaavalla. Suhteellisen oikeellisuuden laskukaavaan saatiin luku 6, mikä on niiden näytteiden summa, joiden tulokset olivat yhtenevät. Luvut saatiin tulosten yhteneväisyys-sarakkeesta. Kuuden näytteen gramvärjäystulos ja viljelytulos vastasivat toisiaan. Luku 18 tulee näytteiden kokonaismäärästä. Jakolaskun tulos kerrottiin sadalla, jotta tulos saatiin muutettua prosenteiksi.

$$\text{Suhteellinen oikeellisuus (\%)} = \frac{6}{18} \times 100 \% = 33 \%$$

Sama laskutoimitus tehtiin ottamalla tulosten yhteneväisyyttä vastaavat luvut taulukoista 8-10.

Taulukon 2 tuloksista näkee prosentteina, miten monen näytteen bakteerien näkyvyys gramvärjäyksessä vastasi laboratorion bakteeriviljelytulosta.

Taulukko 2. Tulosten suhteellinen oikeellisuus prosentteina.

	Suhteellinen oikeellisuus (%) n=18
Vastaväriin voimakkuus 5 / laboratorioasi- antuntija	33 %
Vastaväriin voimakkuus 5 / opiskelijat	11 %
Vastaväriin voimakkuus 8 / laboratorioasi- antuntija	39 %
Vastaväriin voimakkuus 8 / opiskelijat	28 %

### 9.1.2 Taustan värjäytyvyys

Myös taustan värjäytyvyyden voimistumista pystyttiin paremmin kuvaamaan muuttamalla tulokset numeerisiksi ja laskemalla ne samalla kaavalla kuin suhteellinen oikeellisuus. Numeerinen arvo 1 (yksi) kertoo taustan värjäytyvyyden voimistumisesta vastaväriin voimakkuutta muuttamalla. Numeerinen arvo 0 (nolla) kertoo, ettei vastaväriin voimakkuuden muuttaminen vaikuttanut taustan värjäytyvyyden voimistumiseen. Tuloksissa verrataan taustan värjäytyvyyden voimistumista vastaväriin voimakkuuden viisi ja kahdeksan välillä.

Taustan värjäytyvyyden voimistuminen prosentteina laskettiin tulostaulukoista (liitteet 8-9) seuraavanlaisella laskukaavalla:

$$\text{Taustan värjäytyvyyden voimistuminen (\%)} = \frac{a}{b} \times 100 \%, \text{ jossa}$$

a = määritettyjen näytteiden lukumäärä, joissa taustan värjäytyvyys voimistui

b = määritettyjen näytteiden kokonaislukumäärä

Esimerkiksi taulukosta 12 (liite 9) laboratorioasiantuntijan havaintojen numeeriset tulokset muutettiin prosenteiksi seuraavalla laskukaavalla. Suhteellisen oikeellisuuden laskukaavaan saatiin luku 9, mikä on niiden näytteiden summa, joiden taustan värjäytyvyys voimistui. Luvut saatiin vastavärin muuttuminen-sarakkeesta. Yhdeksän näytteen taustan värjäytyvyys voimistui. Luku 18 tulee näytteiden kokonaismäärästä. Jakolaskun tulos kerrottiin sadalla, jotta tulos saatiin muutettua prosenteiksi.

$$\text{Suhteellinen oikeellisuus (\%)} = \frac{9}{18} \times 100\% = 50\%$$

Sama laskutoimitus tehtiin ottamalla vastaava luku taulukosta 11 (liite 8).

Taulukon 3 tuloksista näkee prosentteina, kuinka monen näytteen taustan värjäytyvyys voimistui, kun vastavärin voimakkuutta muutettiin viidestä kahdeksaan.

Taulukko 3. Taustan värjäytyvyyden voimistuminen prosentteina.

	Taustan värjäytyvyyden voimistuminen (%) n=18
Laboratorioasiantuntijan tulkinta taustan värjäytyvyydestä	50 %
Opiskelijoiden tulkinta taustan värjäytyvyydestä	44 %

## 10 POHDINTA

Opinnäytetyö onnistui kokonaisuudessaan hyvin. Hankaluuksia aiheutti aikataulujen sovittaminen, varsinkin työosuuden toteuttamisen ajankohta siirtyi useamman kerran. Alkuperäinen aikataulu ei toteutunut muiden opintojen ja työsuhteiden takia. Yhteistyö mikrobiologian laboratorion kanssa sujui kuitenkin ongelmitta, ja saimme hyvän pereh-

dytyksen laboratorion tiloihin, toimintaan ja gramvärjäysautomaatin käyttöön. Lisäksi saimme tarvittaessa opastusta mikroskopointiin.

Esitestauksella oli suuri merkitys tutkimuksen toteutukseen, koska esitestauksessa havaittiin vastaväriasetuksen kuusi käyttö hyödyttömäksi tutkimuksen kannalta. Esitestauksessa vastaväriasetuksella kuusi ja kahdeksan värjätyt esitestaustäyteobjektilasit värjäytyivät hyvin samankaltaisesti. Vastaväriasetuksella kahdeksan värjätyt näyteobjektilasit värjäytyivät taustaltaan vähän voimakkaammin kuin asetuksella kuusi värjätyt näyteobjektilasit. Kummallakin asetuksella värjäytyissä näyteobjektilaseissa bakteerien näkyvyydessä ei ollut huomattavaa eroa. Lopulliseen tutkimukseen otettiin vastaväriasetukseksi kahdeksan, koska asetukset kuusi oli liian lähellä normaalisti käytössä olevaa vastaväriasetusta viisi. Hyvän suunnittelun ja esitestauksen johdosta työosuuden suorittaminen sujui helposti. Esitestauksen perusteella päätettiin, että värjätyiltä näyteobjektilaseilta havainnoidaan bakteerien näkyvyyttä ja taustan värjäytyvyyttä.

Tutkimuksessa haastavinta opiskelijoille oli värjätyjen näyteobjektilasien mikroskopointi, koska syvien märkänäytteiden mikroskopoinnista opiskelijoilla oli niin vähän kokemusta. Eniten aikaa käytettiin värjätyjen näyteobjektilasien mikroskopointiin ja havainnointiin. Vaikka tiedossa oli, että viljelytuloksen perusteella näytteissä oli gram-negatiivisia sauvabakteereita, tieto ei vaikuttanut näyteobjektilasien havainnointiin väärin. Mikroskopoinnissa olivat vaarana väärät havainnot, mukailemalla bakteeriviljelyn tulosta. Laboratorioasiantuntijan havaintojen perusteella näin ei kuitenkaan käynyt. Tutkimuksen luotettavuuden kannalta oli tärkeää, että myös mikrobiologian laboratorioasiantuntija mikroskopoi kaikki värjätyt näyteobjektilasit ja kirjasi havaintonsa taulukkoon 4 (liite 1). Taulukosta 6 (liite 3) voidaan nähdä opiskelijoiden ja laboratorioasiantuntijan havainnot bakteerien näkyvyydestä ja taustan värjäytyvyydestä mikroskopoiduilta näyteobjektilaseilta. Taulukosta näkee, että vastauksissa on eroavaisuuksia. Ne selittyvät varsinkin bakteerien näkyvyydessä laboratorioasiantuntijan kokemuksella. On mahdollista, että opiskelijoiden havainnointituloksiin on voinut vaikuttaa tieto gram-negatiivisten sauvabakteerien esiintyvyydestä bakteeriviljelyssä. Opiskelijat ja laboratorioasiantuntija arvioivat itse taustan värjäytyvyyden voimakkuutta. Voimakkuuksille sovittiin määritelmät tähtimerkein, mutta tulkinnoissa tuli selviä eroja riippuen mikroskopijasta. Tulkintaeroilla ei kuitenkaan ole merkitystä, koska tuloksista (liitteet 8-9)

nähdään, voimistuiko taustan värjäytyvyys vai ei. Tutkimuksen johtopäätöksiä pohdittiin yhdessä laboratorioasiantuntijan kanssa.

Tutkimustulosten analysoinnissa käytettiin suhteellisen oikeellisuuden laskukaavaa. Laskukaavan avulla tulokset muutettiin prosenteiksi. (taulukko 2). Kaikissa näytteissä bakteeriviljelylöydöksenä oli gramnegatiivinen sauvabakteeri. Vastavärin voimakkuudella viisi värjäytyistä näyteobjektilaseista laboratorioasiantuntija havaitsi gramnegatiivisia sauvabakteereita 33 %:ssa koko näytemäärästä. Kaikista näytteistä vain 33 %:ssa gramvärjäystulos ja bakteeriviljelytulos vastasivat toisiaan. Opiskelijoiden vastaavissa havainnoissa 11 %:ssa näytteistä tulokset vastasivat toisiaan. Vastavärin voimakkuudella kahdeksan laboratorioasiantuntijan tulokseksi tuli 39 % ja opiskelijoiden 28 %. Laboratorioasiantuntijan tuloksista on nähtävissä, että vastavärin voimakkuuden nostaminen ei merkittävästi vaikuttanut gramnegatiivisten sauvabakteerien näkyvyyteen. Laboratorioasiantuntijan ja opiskelijoiden tuloksia ei missään vaiheessa verrattu toisiinsa. Tuloksia pohdittaessa tarkasteltiin laboratorioasiantuntijan saamia tuloksia, koska hänellä on huomattavasti parempi kokemus tällaisten näytteiden mikroskopoinnista. Bioanalytiikoiden koulutukseen kuuluu kolmen viikon mikrobiologian harjoittelu, jossa tutustutaan koko mikrobiologianlaboratorion toimintaan. Harjoittelusta vain muutama päivä tutustutaan syvien märkänäytteiden tutkimiseen, joten opiskelijoiden kokemus esimerkiksi näytteiden mikroskopoinnista jää vähäiseksi ja tietotaito ei ole välttämättä riittävää (vrt. luvusta 8.1, kaksi viimeistä tekstikappaletta).

Lisäksi taustan värjäytyvyyden voimistumista laskettiin samankaltaisella kaavalla kuin suhteellinen oikeellisuus. Kaavalla laskettiin, kuinka monen näytteen taustan värjäytyvyys voimistui, kun vastavärin asetuksen voimakkuutta nostettiin viidestä kahdeksaan. Taulukossa 3 on esitetty prosenteina saadut tulokset. Laboratorioasiantuntijan tulkinnoissa 50 %:ssa näytteistä taustan värjäytyvyys voimistui, ja opiskelijoiden vastaava tulos oli 44 %. Taustan värjäytyvyydellä ei ollut juurikaan merkitystä bakteerien näkyvyyden kannalta.

Tutkimuksen perusteella vastavärin voimakkuuden vahvistamisella ei ollut vaikutusta gramnegatiivisten sauvabakteerien näkyvyyteen gramvärjäyksessä. Kuitenkin tutkimuksessa havaittiin, että näytteen laadulla voi olla merkitystä bakteerien näkyvyyteen ja yleiseen värjäytyvyyteen. Esimerkiksi vastavärin voimakkuudella kahdeksan värjäyty

niin sanottu paksu näyte värjäytyi taustaltaan voimakkaasti, jolloin bakteerien havaitseminen vaikeutui. Säättämällä vastavärin voimakkuutta näytteen laadun mukaan voitaisiin helpottaa mikroskopointia. Mikrobiologisten menetelmien kehittämisessä haasteellisinta on näytemateriaalin laadun vaikutus tuloksiin.

### **10.1 Opinnäytetyön luotettavuus**

Kvantitatiivisen tutkimuksen luotettavuutta voidaan arvioida tarkastelemalla validiteettia ja reliabiliteettia. Validiteetilla selvitetään, mittaako tutkimus juuri sitä, mitä on haluttukin mitata. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, miten hyvin teoreettiset käsitteet on saatu luotettavasti yhdistettyä tutkimuksessa havaittaviin mitattaviin ominaisuuksiin. Tulosten yleistettävyyden kannalta on hyvä arvioida, miten tutkimusotos edustaa perusjoukkoa. (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2009, 152.)

Reliabiliteetti arvioi tulosten pysyvyyttä ja mittarin kykyä antaa odotettuja tuloksia. Tuloksien ei pitäisi olla sattumanvaraisia. Samalla tutkimuksella sekä mittarilla pitäisi pystyä tutkimaan jotain toista samankaltaista aineistoa. Jos tulokset ovat samankaltaisia, voidaan tutkimusta pitää reliaabelina. (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2009, 152.)

Tutkimuksessa tutkimusotos jäi lopulta suhteellisen pieneksi. Todettiin, ettei sillä kuitenkaan ollut vaikutusta tutkimuksen luotettavuuteen, koska tulokset olivat niin yhtenäiset ja selkeät. Kaikki tutkimuksessa olleet näyteobjektilasit käsiteltiin systemaattisesti samalla tavalla, ja värjäysautomaatti värjäsi näyteobjektilasit asetetulla ohjelmalla. Tutkimustulosten samankaltaisuuden perusteella voidaan päätellä, että tutkimus on reliaabeli. Laboratorioasiantuntija mikroskopoi kaikki näyteobjektilasit, mikä lisäsi tutkimuksen luotettavuutta. Oppimispäiväkirjaa pidettiin koko tutkimuksen ajan. Oppimispäiväkirjaan merkittiin kaikki työskentelyn vaiheet ja tapahtumat. Oppimispäiväkirjan avulla työn eri vaiheisiin voitiin palata vielä jälkeenpäin, ja näin ollen oppimispäiväkirja lisäsi tutkimuksen luotettavuutta.

Mikrobiologisissa tutkimuksissa näytteen laadulla on suuri merkitys toistettavien tulosten saamiseksi. Tutkimuksessa huomattiin, että saman näytteen kaksi näyteobjektilasia



saattoivat olla näytelaadultaan täysin erilaiset. Tämä vaikuttaa laadukkaiden tulosten saamiseen.

## 10.2 Opinnäytetyön eettisyys

Eettisyyden lähtökohtana on se, ettei tutkimusaineistoa väärennetä tai oteta tyhjästä. Eettisyyteen liittyy myös se, että mietitään ennalta, miten tutkimustuloksia raportoidaan, kenen aineistoja käytetään tutkimusalueessa ja ketkä osallistuvat tutkimuksen kirjoittamiseen. Eettisyys edellyttää kriittisyyttä arvioitaessa omia toimintatapoja ja perusteita. (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2009, 173.) Tutkimus suoritettiin suunnitelman mukaisesti. Teoriatiedon hankinnassa pyrittiin lähdekriittisyyteen sekä välttämään sekundaarisia lähteitä. Kaikki tutkimuksen työvaiheet suoritettiin laboratorio-ohjeiden mukaisesti, missään oikomatta. Tutkimustulokset kirjattiin sellaisina kuin ne olivat, mitään pois jättämättä tai muuttamatta.

Tutkijan on helpompi tehdä tutkimusta, kun tutkittavat ovat anonymoijia. Näin tutkittaville ei koidu tutkimuksesta haittaa. Tutkittavien henkilöllisyys voidaan salata erilaisin keinoin. Tutkittavat voidaan esimerkiksi numeroida. (Mäkinen 2006, 114–115.) Toimeksiantajan kanssa sovittiin, että potilastietoja ei käytetä missään muodossa tutkimusessamme. Tutkittavat näytteet numeroitiin juoksevilla numerolla. Näillä toimintatavoilla pyrittiin takaamaan luotettava tutkimus.

Plagiointi eli toisen laatiman tiedon, kuten ideoiden, tutkimustulosten tai sanamuodon esittäminen omanaan on kiellettyä ja sen välttämiseksi tässä opinnäytetyössä on kiinnitetty erityisen tarkkaan huomiota lähteiden huolelliseen merkitsemiseen. Plagiointi ilmenee yleensä piittaamattomuutena. Se havaitaan lähdeviitteen puuttumisena tai epämääräisenä viittaamisena. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 122.) Opinnäytetyötä kirjoittaessa käytettiin mahdollisimman uusia ja luotettavia lähteitä. Opinnäytetyön teksteihin on lisätty tarkat lähdeviittaukset ja lähteet.

### 10.3 Jatkotutkimusaiheet

Jatkotutkimusaiheina voisi olla esimerkiksi gramvärjäysautomaatissa käytettävän acetonisafraninivastavärin vaihtaminen acetonifuchsinivastaväriin. Toisena jatkotutkimusaiheena voisi olla syvistä märkänäytteistä valmistettujen näyteobjektilasien näytemäärän paksuuden arviointi ja sopivan vastavärin voimakkuuden valinta.

## LÄHTEET

- Baron, E., Murray, P., Pfaller, M., Tenover, F. & Tenover, R. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington. American Society for Microbiology.
- BioMérieux S.A. 2009a. General. Previ-Color Gram user's manual. Ranska: Lyon.
- BioMérieux S.A. 2009b. Operating the PREVI™ Color Gram. Previ-Color Gram user's manual. Ranska: Lyon.
- Björklöf, K., Kivisalmi, V., Korhola, M., Rasimus, S., Schauman, K. & Salmela, H. 2008. *Mikrobiologian sanasto*. Tampere: Kopio Niini Finland Oy.
- Elitarvikevirasto. 1997. *Mikrobiologisten menetelmien validointiohje*. Helsinki: Oy Edita Ab.
- Hautala, P. 2013. Laboratoriasiantuntija. Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä. Suullinen tiedonanto 29.10.2013.
- Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. 2011. *Infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. 2010. *Mikrobiologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Heikkilä, R., Hellstén, S., Koukila-Kähkölä, P., Kurkinen, T., Meurman, O., Nummelin, R., Pastila, S., Richardson, M. & Ylönen, H. 2005. *Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa*. Helsinki: Suomen kuntaliitto.
- Heikkilä, T. 2008. *Tilastollinen tutkimus*. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. *Tutki ja kirjoita*. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. 2003. *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Hussey, M.A. & Smith, A.C. 2005. *Gram Stain Protocols*. American society for microbiology. <http://www.microbelibrary.org/component/resource/gram-stain/2886-gram-stain-protocols>. 18.12.2013.
- Ihon bakteeri-infektiot työryhmä. 2010. *Normaaliflooran koostumus*. Duodecim. [http://www.terveyskirjasto.fi/terveysportti/tk.koti?p\\_artikkeli=nix01637](http://www.terveyskirjasto.fi/terveysportti/tk.koti?p_artikkeli=nix01637). 13.2.2014.
- Islab. 2013. Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä. [http://www.islab.fi/index.asp?menuname=Etusivu&menu\\_id=3639](http://www.islab.fi/index.asp?menuname=Etusivu&menu_id=3639). 3.12.2013.
- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. *Laboratorion analyysitekniikka*. Helsinki: Edita.
- Jyväskylän yliopisto. 2014. *Määrällinen analyysi*. <https://koppa.jyu.fi/avoimet/hum/menetelmapolkuja/menetelmapolku/aineiston-analyysimenetelmat/maarallinen-analyysi>. 6.2.2014.
- Kankkunen, P. & Vehviläinen-Julkunen, K. 2009. *Tutkimus hoitotieteessä*. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Kankkunen, P. & Vehviläinen-Julkunen, K. 2013. *Tutkimus hoitotieteessä*. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- KvantiMOTV. 2007. *Mittaaminen*. <http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/mittaaminen/mittaaminen.html>. 5.12.2013.
- Labquality Oy. 2013. *Bakteeriviljely, aerobit ja anaerobit*. <http://www.labquality.fi/fi/laatu-ulkoinen-laadunarviointi/kierroskuvaukset/mikrobiologia-bakteriologia/5080-5081-bakteeriviljely/>. 3.12.2013.

- Lalla, M. 2000. Kudosnesteiden käsittely ja kliininen merkitys. *Moodi* (2), 54.
- Liimatainen, O. 2000. Gramvärjäys. *Moodi* (4-5), 126-128.
- Mäkinen, O. 2006. Tutkimusetiikan ABC. Helsinki: Tammi.
- Meurman, O. 2010. Gramvärjäykset. *Moodi* (1), 54-56.
- Nissinen, A. 2008. Bakteerien ja hiivojen tunnistus ja herkkyysmääritykset automaateilla. *Moodi* (5), 195.
- Pentikäinen, J., Perola, O. & Räsänen, T. 2012. Previ-color gram-värjäysautomaatin työohje. Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä.
- Risteli, J. 2006. Nivelnesteen löydökset. *Moodi* (1), 57-58.
- Solunetti 2006a. Bakteerit. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerit/2/>. 20.5.2013.
- Solunetti 2006b. Bakteerisolun ulkoiset rakenteet. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerien\\_ulkoiset\\_rakenteet/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerien_ulkoiset_rakenteet/). 20.5.2013.
- Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy. 2011. Bakteeri, viljely 1. <http://www.yhtyneetlaboratoriot.fi/do.xsp?viewType=productview&redirect1=%2Fdo.xsp%3FobjectType%3Dproduct%26viewType%3Dlistview&objectType=product&directoryType=&productOID=50>. 3.6.2013.
- Vaara, M. 2007. Therapia Fennica.fi. Mikrobiologinen diagnostiikka. [http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Mikrobiologinen\\_diagnostiikka](http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Mikrobiologinen_diagnostiikka). 3.9.2013.



**Taulukko 5. Tulostaulukon vastausten merkitykset.**

Mikroskopointitulostaulukossa (taulukko 6) käytettävien merkkien selitykset.

-	ei bakteereita
*	haalea taustaväri
**	näkyvä taustaväri
***	voimakas taustaväri

**Taulukko 6. Mikroskopointitulokset.**

Opiskelijoiden ja laboratorioasiantuntijan havainnot bakteerien näkyvyydestä ja taustan värjäytyvyydestä mikroskopoiduilta objektilaseilta.

Näyte	Vastavärin voimakkuus 5				Vastavärin voimakkuus 8			
	Bakteerien näkyvyys		Taustan värjäytyvyys		Bakteerien näkyvyys		Taustan värjäytyvyys	
	Opiskelijat	Laboratorio- asiantuntija	Opiskelijat	Laboratorio- asiantuntija	Opiskelijat	Laboratorio- asiantuntija	Opiskelijat	Laboratorio- asiantuntija
1	-	-	**	*	-	-	***	**
2	gram+kokki	gram+kokki	**	**	gram+kokki	-	***	**
3	gram+kokki	gram+kokki	***	**	gram-sauva, gram+kokki	gram+kokki	***	**
4	-	-	**	*	-	-	***	**
5	-	-	**	*	-	gram-sauva	***	*
6	-	-	**	***	-	-	***	***
7	-	-	**	*	gram-sauva	gram-sauva	***	**
8	-	-	**	*	-	-	***	**
9	-	-	*	*	-	-	**	**
10	gram+kokki	gram-sauva	***	*	gram+kokki	gram-sauva	***	*
11	gram+kokki, gram-sauva	gram-sauva	**	*	gram+kokki, gram-sauva	gram-sauva	**	*
12	gram+kokki	-	***	**	gram+kokki	-	***	***
13	gram+kokki, gram-sauva, gram-sauva	gram-sauva, gram-sauva	**	*	gram+kokki, gram-sauva, gram-sauva	gram-sauva, gram-sauva, gram+kokki	**	**
14	-	gram-sauva	**	*	-	-	**	**
15	-	-	**	*	-	-	**	**
16	-	-	***	*	-	-	***	*
17	-	gram-sauva	**	**	-	gram-sauva	**	**
18	gram+kokki	gram-sauva, gram+kokki	**	***	gram+kokki, gram-sauva	gram-sauva, gram+kokki	**	***

**Taulukko 7. Vertailutaulukko, vastaväriin voimakkuus 5.**

Taulukkoon on merkitty laboratorioasiantuntijan havainnot bakteerien näkyvyydestä ja laboratorion bakteeriviljelytulos. Tulosten yhteneväisyssarakkeeseen on verrattu näiden kahden tuloksen yhteneväisyyttä. Numeerinen arvo 1 (yksi) tarkoittaa tulosten yhteneväisyyttä ja numeerinen arvo 0 (nolla) kertoo, etteivät tulokset vastanneet toisiaan.

<b>Vastaväriin voimakkuus 5</b>			
Näyte	Bakteerien näkyvyys	Viljelytulos	Tulosten yhteneväisyys
	Laboratorioasiantuntija	Laboratorio	
1	-	gram-sauva	0
2	gram+kokki	gram-sauva, anaerobibakteeri	0
3	gram+kokki	gram-sauva	0
4	-	gram-sauva, gram+kokki	0
5	-	gram-sauva, gram+kokki	0
6	-	gram-sauva	0
7	-	gram-sauva	0
8	-	gram-sauva	0
9	-	gram-sauva	0
10	gram-sauva	gram-sauva, gram+kokki	1
11	gram-sauva	gram-sauva, gram+kokki	1
12	-	gram-sauva, gram-kokki	0
13	gram-sauva, gram+sauva	gram-sauva, gram+kokki	1
14	gram-sauva	gram-sauva	1
15	-	gram-sauva, gram+kokki	0
16	-	gram-sauva, gram+kokki	0
17	gram-sauva	gram-sauva	1
18	gram-sauva, gram+kokki	gram-sauva, gram+kokki	1



**Taulukko 8. Vertailutaulukko, vastavärin voimakkuus 5.**

Taulukkoon on merkitty opiskelijoiden havainnot bakteerien näkyvyydestä ja laboratorion bakteeriviljelytulos. Tulosten yhteneväisyssarakkeeseen on verrattu näiden kahden tuloksen yhteneväisyyttä. Numeerinen arvo 1 (yksi) tarkoittaa tulosten yhteneväisyyttä ja numeerinen arvo 0 (nolla) kertoo, etteivät tulokset vastanneet toisiaan.

<b>Vastavärin voimakkuus 5</b>			
Näyte	Bakteerien näkyvyys	Viljelytulos	Tulosten yhteneväisyys
	Opiskelijat	Laboratorio	
1	-	gram-sauva	0
2	gram+kokki	gram-sauva, anaerobibakteeri	0
3	gram+kokki	gram-sauva	0
4	-	gram-sauva, gram+kokki	0
5	-	gram-sauva, gram+kokki	0
6	-	gram-sauva	0
7	-	gram-sauva	0
8	-	gram-sauva	0
9	-	gram-sauva	0
10	gram+kokki	gram-sauva, gram+kokki	0
11	gram-sauva, gram+kokki	gram-sauva, gram+kokki	1
12	gram+kokki	gram-sauva, gram-kokki	0
13	gram-sauva, gram+sauva, gram+kokki	gram-sauva, gram+kokki	1
14	-	gram-sauva	0
15	-	gram-sauva, gram+kokki	0
16	-	gram-sauva, gram+kokki	0
17	-	gram-sauva	0
18	gram+kokki	gram-sauva, gram+kokki	0

**Taulukko 9. Vertailutaulukko, vastaväriin voimakkuus 8.**

Taulukkoon on merkitty laboratorioasiantuntijan havainnot bakteerien näkyvyydestä ja laboratorion bakteeriviljelytulos. Tulosten yhteneväisyssarakkeeseen on verrattu näiden kahden tuloksen yhteneväisyyttä. Numeerinen arvo 1 (yksi) tarkoittaa tulosten yhteneväisyyttä ja numeerinen arvo 0 (nolla) kertoo, etteivät tulokset vastanneet toisiaan.

<b>Vastaväriin voimakkuus 8</b>			
Näyte	Bakteerien näkyvyys	Viljelytulos	Tulosten yhteneväisyys
	Laboratorioasiantuntija	Laboratorio	
1	-	gram-sauva	0
2	-	gram-sauva, anaerobibakteeri	0
3	gram+kokki	gram-sauva	0
4	-	gram-sauva, gram+kokki	0
5	gram-sauva	gram-sauva, gram+kokki	1
6	-	gram-sauva	0
7	gram-sauva	gram-sauva	1
8	-	gram-sauva	0
9	-	gram-sauva	0
10	gram-sauva	gram-sauva, gram+kokki	1
11	gram-sauva	gram-sauva, gram+kokki	1
12	-	gram-sauva, gram-kokki	0
13	gram-sauva, gram-sauva, gram+kokki	gram-sauva, gram+kokki	1
14	-	gram-sauva	0
15	-	gram-sauva, gram+kokki	0
16	-	gram-sauva, gram+kokki	0
17	gram-sauva	gram-sauva	1
18	gram-sauva, gram+kokki	gram-sauva, gram+kokki	1

**Taulukko 10. Vertailutaulukko, vastaväriin voimakkuus 8.**

Taulukkoon on merkitty opiskelijoiden havainnot bakteerien näkyvyydestä ja laboratorion bakteeriviljelytulos. Tulosten yhteneväisyssarakkeeseen on verrattu näiden kahden tuloksen yhteneväisyyttä. Numeerinen arvo 1 (yksi) tarkoittaa tulosten yhteneväisyyttä ja numeerinen arvo 0 (nolla) kertoo, etteivät tulokset vastanneet toisiaan.

<b>Vastaväriin voimakkuus 8</b>			
Näyte	Bakteerien näkyvyys	Viljelytulos	Tulosten yhteneväisyys
	Opiskelijat	Laboratorio	
1	-	gram-sauva	0
2	gram+kokki	gram-sauva, anaerobibakteeri	0
3	gram-sauva, gram+kokki	gram-sauva	1
4	-	gram-sauva, gram+kokki	0
5	-	gram-sauva, gram+kokki	0
6	-	gram-sauva	0
7	gram-sauva	gram-sauva	1
8	-	gram-sauva	0
9	-	gram-sauva	0
10	gram+kokki	gram-sauva, gram+kokki	0
11	gram+kokki, gram-sauva	gram-sauva, gram+kokki	1
12	gram+kokki	gram-sauva, gram-kokki	0
13	gram+kokki, gram-sauva, gram+sauva	gram-sauva, gram+kokki	1
14	-	gram-sauva	0
15	-	gram-sauva, gram+kokki	0
16	-	gram-sauva, gram+kokki	0
17	-	gram-sauva	0
18	gram+kokki, gram-sauva	gram-sauva, gram+kokki	1

**Taulukko 11. Taustan värjäytyvyyden muutos, opiskelijoiden tulkinta.**

Taulukossa on opiskelijoiden havainnot taustan värjäytyvyydestä. Yksi tähti (\*) tarkoittaa taustan haaleaa värjäytyvyyttä, kaksi tähteä (\*\*) taustan näkyvää värjäytyvyyttä ja kolme tähteä (\*\*\*) taustan voimakasta värjäytyvyyttä. Numeerinen arvo 1 (yksi) tarkoittaa taustavärin voimistumista ja numeerinen arvo 0 (nolla) tarkoittaa, ettei taustan värjäytyvyys voimistunut.

Taustan värjäytyvyys			
Näyte	Opiskelijat västäväri 5	Opiskelijat vastaväri 8	Värjäytyvyyden voimistuminen
1	**	***	1
2	**	***	1
3	***	***	0
4	**	***	1
5	**	***	1
6	**	***	1
7	**	***	1
8	**	***	1
9	*	**	1
10	***	***	0
11	**	**	0
12	***	***	0
13	**	**	0
14	**	**	0
15	**	**	0
16	***	***	0
17	**	**	0
18	**	**	0

**Taulukko 12. Taustan värjäytyvyyden muutos, laboratorioasiantuntijan tulkinta.**

Taulukossa on laboratorioasiantuntijan havainnot taustan värjäytyvyydestä. Yksi tähti (\*) tarkoittaa taustan haaleaa värjäytyvyyttä, kaksi tähteä (\*\*) taustan näkyvää värjäytyvyyttä ja kolme tähteä (\*\*\*) taustan voimakasta värjäytyvyyttä. Numeerinen arvo 1 (yksi) tarkoittaa taustavärin voimistumista ja numeerinen arvo 0 (nolla) tarkoittaa, ettei taustan värjäytyvyys voimistunut.

Taustan värjäytyvyys			
Näyte	Laboratorio-asiantuntija vastaväri 5	Laboratorio-asiantuntija vastaväri 8	Värjäytyvyyden voimistuminen
1	*	**	1
2	**	**	0
3	**	**	0
4	*	**	1
5	*	*	0
6	***	***	0
7	*	**	1
8	*	**	1
9	*	**	1
10	*	*	0
11	*	*	0
12	**	***	1
13	*	**	1
14	*	**	1
15	*	**	1
16	*	*	0
17	**	**	0
18	***	***	0

## Opinnäytetyön toimeksiantosopimus



## OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSiantosopimus

<b>Toimeksiantaja</b>	
Organisaation nimi:	Islab, Joensuun mikrobiologian aluelaboratorio
Toimeksiantajan edustaja:	Pirkko Hautala
Osoite:	Tikkamäentie 16, 80210 Joensuu
Puhelinnumero:	
Sähköposti:	
<b>Opiskelijan/opiskelijoiden tiedot</b>	
Koulutusohjelma:	Bioanalytiikka
Opiskelijanumero(t) ja nimi(et):	0900081, 0900065 Jaana Koivisto, Sarianna Repo
Puhelinnumero:	
Sähköposti:	jaana.koivisto@edu.pcamk.fi, sarianna.repo@edu.pcamk.fi
<b>Toimeksiantajan sitoumukset</b>	
Käytetään mikrobiol. lab. tiloja, materiaaleja ja laitteita.	
<b>Opiskelijan sitoumukset</b>	
Salanapitovelvollisuus, ei käytetä kotitietoja.	
<b>Opinnäytetyön ohjaus Karelia-amk:ssa</b>	
Ohjaaja(t):	Eliina Lyytikäinen, Satu Martiskainen
<b>Opinnäytetyön julkisuus</b>	
Opinnäytetyö on julkinen asiakirja ja se voidaan julkaista Theseus-verkkokirjastossa.	
<b>Allekirjoitukset</b>	
Päiväys	Opiskelijan allekirjoitus ja nimenselvennys
21.1.2014	Jaana Koivisto JAANA KOIVISTO Sarianna Repo SARIANNA REPO
Päiväys	Toimeksiantajan edustajan allekirjoitus ja nimenselvennys
21.1.2014	Pirkko Hautala PIRKKO HAUTALA mik. lauk.