

Marika Lehtonkivi

GRAM – VÄRJÄTYN BAKTEERIPREPARAATIN TARKASTELU

GRAM – VÄRJÄTYN BAKTEERIPREPARAATIN TARKASTELU

Marika Lehdonkivi
Opinnäytetyö
Syksy 2014
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijä(t): Marika Lehdonkivi

Opinnäytetyön nimi: Gram-värjätyen bakteeripreparaatin tarkastelu

Työn ohjaaja(t): Irja Parkkinen & Outi Mäkitalo

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2014

Sivumäärä: 36 + 2 liitettä

Oulun ammattikorkeakoulu tilasi opinnäytetyönä toteutettavan opiskelumateriaalin gram-värjätyjen bakteeripreparaattien tarkastelusta bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian peruskurssin opiskelijoille.

Gram-värjäys on yksi yleisimmin käytetyistä bakteriologian tunnistusmenetelmistä, jonka suoritus ja tulkinta opiskelijan on hallittava tulevassa ammatissaan. Potilaiden hoito ohjautuu suurelta osin laboratoriotutkimustulosten perusteella, siksi on tärkeää turvata luotettavat tulokset ja laadukas palvelu laboratorion asiakkaille. Näin potilas saa tarvitsemaansa hoitoa potilasturvallisuuden vaarantumatta.

Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda bioanalytiikan koulutusohjelman opiskelijoille yksinkertainen ja helposti lähestyttävä sekä mikrobiologiaan kiinnostusta herättävä opiskelumateriaali, joka helpottaisi gram-värjätyjen bakteeripreparaattien tarkastelun opettelua. Opiskelumateriaali sisältää myös perustiedot bakteeripreparaattien valmistuksesta, koska luotettavan tuloksen saamisen edellytyksenä on laadukkaasti valmistettu bakteeripreparaatti. Opinnäytetyö toteutettiin projektina jonka lopputuloksena on kaksiosainen tuote. Tuote sisältää kirjallisen teoriaosuuden sekä 56 kpl bakteeripreparaatteja joita opiskelijat voivat mikroskopoida itsenäisesti. Kirjallisen opiskelumateriaalin sisällön suunnittelussa käytettiin apuna kyselylomaketta, joka suunnattiin opinnäytetyön tekohetkellä mikrobiologian peruskurssia suorittaneille bioanalytiikan opiskelijoille.

Asiasanat: bakteeri, gram-värjäys, kliininen mikrobiologia, opiskelumateriaali, projekti

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences

Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Author(s): Marika Lehdonkivi

Title of thesis: The Construe of a Gram Stained Bacterial Sample

Supervisor(s): Irja Parkkinen & Outi Mäkitalo

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2014

Number of pages: 36 + 2 appendices

This thesis was made for Oulu University of Applied Sciences. The purpose of the thesis was create a simple and easy to approach study material which also arouses interest in microbiology for biomedical laboratory scientist students.

The aim of the study material is to help students to microscope and construe the gram stained bacterial sample. Study material also contains information about how to prepare the bacterial sample, because condition for a reliable result is a high-quality prepared bacterial sample.

Gram staining is one of the most commonly used methods of identification of bacteriology, for which the performance and interpretation of students have to master in their future profession. Patient care is directed in large extent on the basis of laboratory research. For this reason it is important to secure reliable results and high-quality laboratory services to customers, in which way patient receives the treatment they need without compromising patient safety.

The assignment was carried out as a project and the outcome is a two-part product which includes a theory section and 56 pieces of gram stained bacterial samples. The content of the study material was contrived through the results of a questionnaire which the second-year biomedical laboratory scientist student were able to respond.

Keywords: bacteria, gram stain, clinical microbiology, study material, the project

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	OPINNÄYTETYÖN TAUSTA JA TAVOITTEET	7
3	PROJEKTILUONTOINEN OPINNÄYTETYÖ	8
3.1	Projektiorganisaatio	9
3.2	Projektin tavoitteet	10
4	OPINNÄYTETYÖN PROSESSI	11
4.1	Tutkimustehtävä	12
4.2	Tutkimusaineiston keruu ja käsittely	12
4.3	Tutkimuksen luotettavuus ja eettiset näkökohdat	14
5	BAKTEERI	15
5.1	Bakteerin rakenne	15
5.2	Bakteerin genomi	17
6	GRAM-VÄRJÄYS	18
6.1	Värjäyksen tarkoitus	19
6.2	Menetelmä	20
6.3	Värjäyksen suoritus	20
6.3.1	Esivalmistelut	21
7	VÄRJÄTYN PREPARAATIN TARKASTELU	22
7.1	Bakteerien luokittelu	22
7.2	Mikroskopointi	24
7.3	Laadunvarmistus	24
7.4	Virhelähteet	26
7.5	Bioanalyytikosta johtuvien virheiden vähentäminen	26
8	OPISKELUMATERIAALIN LUOMINEN	28
9	POHDINTA	31
	LÄHTEET	34
	LIITTEET	37

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön aiheena oli valmistaa opiskelumateriaalia Oulun ammattikorkeakoulun sosiaali- ja terveysalan yksikön bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian peruskurssin opiskelijoille. Projektimuotoisen opinnäytetyön lopputuotteeksi syntyvän opiskelumateriaalin tarkoitus on helpottaa gram-värjättyjen preparaattien tulkinnan opettelua sekä teoreettisesti että visuaalisesti.

Gram-värjäys on kliinisen bakteriologian yksinkertaisin, halvin ja tärkein pikatesti. Sen tulkitseminen vaatii harjaantunutta silmää. Gram-värjäyksiä tehdään muun muassa suoraan bakteerinäytteistä, mutta värjäystä käytetään paljon myös elatusaineilla viljeltyjen bakteerien tunnistamisen apuna. (Carlson & Koskela 2011, 39.) Opinnäytetyö on rajattu viljeltyistä bakteeripesäkkeistä valmistettujen preparaattien tarkasteluun. Tämä poikkeaa hieman bakteerinäytteestä värjätyin preparaatin tulkinnasta.

Gram-värjäyksen tulkinta ei aina ole helppoa, se vaatii paljon kokemusta ja voi välillä olla haastavaa kokeneellekin työntekijälle. Bioanalytikolla on kuitenkin oltava hallussaan gram-värjätyin preparaatin tulkinnan perusteet, joiden avulla hän voi alkaa kehittämään preparaattien tulkinnan taitojaan.

Bakteerin tunnistukseen teorian ja kuvien muodossa ei ole tällä hetkellä olemassa kattavaa suomalaista kirjallisuutta. Ulkomaista kirjallisuutta on aiheesta valtavasti, mutta kokonaiskuvan luominen voi olla haastavaa. Opinnäytetyön tavoitteena on luoda bioanalytiikan opiskelijoille mahdollisimman yksinkertaistettu ja helposti lähestyttävä perusopas gram menetelmästä ja värjättyjen preparaattien tarkastelusta. Opiskelumateriaalin rakentamisessa on otettu huomioon opinnäytetyön tekohetkellä mikrobiologian peruskurssia suorittaneiden bioanalytiikan opiskelijoiden toiveita ja tarpeita opiskelumateriaalin sisällöstä.

2 OPINNÄYTETYÖN TAUSTA JA TAVOITTEET

Oulun ammattikorkeakoulu on tilannut opinnäytetyönä toteutettavan opiskelumateriaalin gram-värjättyjen bakteeripreparaattien tulkinnasta. Opinnäytetyön tavoitteena on valmistaa Oulun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian peruskurssille opiskelumateriaali, joka helpottaisi gram-värjättyjen bakteeripreparaattien tulkinnan opettelua. 3 op:n laajuisella mikrobiologian peruskurssilla opiskelija perehtyy muun muassa solurakenteisiin, yleisimpiin taudinaiheuttajabakteereihin sekä tavallisimpiin bakteeridiagnostisiin menetelmiin. Yksi yleisimmistä bakteriologian tunnistusmenetelmistä on gram-värjäys, jonka suoritus ja tulkinta opiskelijan on hallittava tulevassa ammatissaan bioanalytikkona. Työn tavoitteena on luoda helppolukuinen ja mikrobiologiaan kiinnostusta herättävä opas, jonka tuella opiskelijoiden olisi helpompi oppia gram menetelmä ja ennenkaikkea perehtyä sen vaativimpaan osuuteen eli preparaattien tarkasteluun.

Potilaiden hoito ohjautuu pitkälti laboratoriotutkimusten tulosten perusteella, jonka takia on äärimmäisen tärkeää turvata luotettavat ja laadukkaat tulokset. Täten potilas saa tarvitsemaansa hoitoa ilman potilasturvallisuuden vaarantumista.

Opinnäytetyön alussa käsittelen bakteerien rakennetta ja toimintaa. Tämä auttaa sisäistämään gram-värjäyksen periaatteen, joka perustuu bakteerisolujen rakenteeseen. Gram-värjäystä käsittelen kokonaisuudessaan alkaen esivalmisteluista ja gram-värjäyksen suorituksesta. Käyn opinnäyteytössä läpi värjäyksen eri vaiheet, sekä värjäyksen soluille aiheuttamat biokemialliset reaktiot. Pääpaino työssäni on tutustuttaa opiskelijat värjättyjen preparaattien tarkasteluun sekä menetelmän virhelähteisiin. Opinnäytetyön lopputuotteena syntyvä opiskelumateriaali on suunnattu tuleville Oulun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian peruskurssin opiskelijoille.

3 PROJEKTILUONTOINEN OPINNÄYTETYÖ

Metodologia tarkoittaa menetelmäoppia, useita menetelmiä yhtäaikaaisesti käytettynä se tarkoittaa käytettyjen menetelmien kokonaisuutta. Metodologia antaa projektille toimintatavat eli suuntaviivat ja prosessikuvaukset, joiden avulla päästään haluttuun lopputulokseen. Yleensä metodologia sisältää työkaluja myös prosessinhallintaan. (Solanterä 2010, 9-10. Hakupäivä: 9.3.2013).

Opinnäytetyöni toteutetaan projektimuotoisena. Rissanen kertoo projektin olevan ”johonkin määritellyn tavoitteeseen pyrkivä, harkittu ja suunniteltu hanke, jolla on aikataulu, määritellyt resurssit ja oma projektiorganisaatio” (2002, 14). Stenlund tarkentaa, että käsitykset projektin tuloksista ja tavoitteista täsmentyvät työn edetessä. Hänen mukaansa projekti on oppimisen ja omaksumisen prosessi (1999, 14).

Projektin luomiseksi tarvitaan ongelma. Oulun ammattikorkeakoulu esitti ongelmaksi gram-värjättyjen preparaattien tarkastelun ohjeistuksen puuttumisen. Projektin avulla tälle ongelmalle suunnitellaan ja toteutetaan ratkaisu, jonka päämääränä on tyydyttää tilaajan tarve. Projekti on kertaluontoisesti tehtävä työ ja siksi ainoa laatuaan. Kaikki projektit eroavat toisistaan. Keskinäiset erot voivat olla esimerkiksi riskeissä ja niiden hallinnassa tai aikatauluissa ja budjetissa. Projektille ei ole asetettu tiettyä ja tarkkaanrajattua yhdenmukaista kaavaa. Sen sijaan projektit koostuvat eri elementeistä, joille on määrätty toimintajärjestys. Elementit ovat laajakäsitteisiä, joten projektimuotoinen toiminta on hyvin joustavaa. Projektin resurssit ovat kasassa vain projektin aikana ja työntekijöiden tehtävät määräytyvät projektin lopputavoitteiden perusteella. Tärkeintä projektissa on toimiva lopputulos, toissijaista se kuinka haluttuun lopputulokseen päästään.

Projektin eri vaiheita toteutettaessa on kyettävä hallitsemaan riskejä, sekä epävarmuutta. Tämä sen takia, että projekti on tehtävänä ainutkertainen, tästä syystä siihen sisältyy epävarmuus tavoitteiden saavuttamisen suhteen. (Helsingin yliopisto 2006. Hakupäivä 7.3.2013).



KUVA 1. Projektin elementit. Mukailten: Rissanen 2002, 16, 57.

3.1 Projektioorganisaatio

Työn tilaaja on Oulun ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyön ohjaajina toimivat tuntiopettajat Irja Parkkinen ja Outi Mäkitalo. Opponenttina toimii bioanalytiikan opiskelija Henna Koopman. Bakteeripreparaattien toimivuutta ja hyödyllisyyttä ovat arvioineet bio2sn ryhmän opiskelijat mikroskoopimalla preparaatteja ja vastaamalla niihin liittyvään kyselyyn (Liite 1). Kyselyssä kartoitettiin myös opiskelijoiden toiveita ja tarpeita oppimateriaalin sisällöstä. Lopputuotteen arvioijina toimivat bioanalytiikan opiskelijat alemmilta vuosikursseilta.

Kirjoittaja urautuu uskomattoman nopeasti omiin näkökulmiinsa ja omaan ilmaisuunsa. Myös oman tekstin kieliopillisille virheille tulee nopeasti "sokeaksi". Tästä syystä tekstin luettaminen ulkopuolisilla lukijoilla on tärkeää kirjoitusprosessin useissa eri vaiheissa. Lukijoiden kysymykset ja palaute antavat hyödyllisiä vinkkejä tekstin työstämiseen ja loppusilauksen tekoon. Näin voi saada tekstistään toimivamman kokonaisuuden. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2010, 32.)

3.2 Projektin tavoitteet

Ammattikorkeakoulutuksen tarkoituksena on antaa opetusta ammatillisiin asiantuntijatehtäviin. Korkeakoulutuksessa korostuu työelämäyhteys sekä työelämän kehittämisen vaatimukseen perustuva koulutus. (Opetus- ja kulttuuriministeriö.) Opinnäytetyön tavoitteena on luoda opiskelumateriaali, jonka avulla on helpompi omaksua gram-värjättyjen preparaattien tarkastelua. Gram menetelmän ja tarkastelun perustuntemuksen avulla bioanalyytikolla on paremmat valmiudet tuottaa laadukkaita ja luotettavia tuloksia työelämässä. Opinnäytetyötä tehdessäni saan kokemusta omien asiantuntija- sekä ohjaustaitojeni kehittämisestä, jotka ovat bioanalyytikon ammatissa välttämättömiä ja lähes päivittäisiä.

4 OPINNÄYTETYÖN PROSESSI

Opinnäytetyön varsinaiseksi tuotteeksi syntyy opiskelumateriaali gram-värjättyjen preparaattien tarkastelusta. Opiskelumateriaalin luomista varten viljelen ja kasvatan koululta jo löytyviä ATCC kantoja sekä valmistan preparaattit. Mikroskopoin ja kuvaan preparaattit materiaalin kuvitukseksi. Opiskelumateriaalin lisäksi opiskelijoille jää käyttöön valmistamani preparaattit, jolloin heillä on mahdollisuus harjoitella preparaattien tarkastelua itsenäisesti. Samalla he saavat lisää kokemusta mikroskoopin käytöstä, joka on myös osa bioanalyytikon perustaitoja.

Tutkimuspäiväkirja on erinomainen apuväline tutkimuksen edistämässä ja seuraamisessa. Sen pitäisi olla vaivattomasti mukana kuljetettava vihko tai muistikirja, johon kirjataan havaintoja, ideoita ja mietteitä sekä kysymyksiä joihin on haettava vastauksia. Lisäksi suunnitelmia, suunnitelmien muutoksia ja niiden syitä, epävarmuuden aiheita, epäilyjä ja pelkoja. On muistettava kirjata myös tärkeimmät löydöt ja muut ilonaiheet tutkimuksen edetessä. Muistiin on hyvä kirjata myös lähdevinkkejä, ihmisten kommentteja sekä muita sanomisia. (Hirsjärvi ym. 2010, 45).

Valvon laboratoriotyöskentelyni laatua huolellisen työskentelyn lisäksi pitämällä päiväkirjaa työni kaikista vaiheista. Työskentelyn on oltava huolellista heti alkumetreillä, jotta aikaa ei menisi virheiden korjaamisiin. Pidän päiväkirjaa sekä preparaattien valmistusvaiheessa että tarkastelu- ja kuvausvaiheissa. Lisäksi pidän päiväkirjaa koko tutkimusprojektista, kuten Hirsjärvi ym. neuvovat tekstissään tekemään. (2010, 45).

Opinnäytetyössäni on käytössä vuonna 1925 perustetun yksityisen amerikkalaisen The Global Bioresource Centerin (BRC) tuottamia ATCC kantoja. ATCC kannat ovat laadukkaita ja käytössä maailmanlaajuisesti.

ATCC on sitoutunut tarjoamaan laadukkaita tuotteita ja palveluja biotieteiden laitoksille. Sitoumus sisältää seuraavat sertifiointit ja akkreditoinnit;

- ISO 9001:2008 Sertifikaatio
- ISO/IEC 17025:2005 Akkreditointi
- ISO Guide 34:2009 Akkreditointi

ISO standardien noudattamista valvoo kokenut laadun johtoryhmä.

(ATCC 2012, hakupäivä 9.3.2012).

4.1 Tutkimustehtävä

Työni toteutuu kuvailevan tutkimustarkoituksen mukaisesti. Kuvaileva tutkimustarkoitus ”esittää tarkkoja kuvauksia henkilöistä, tapahtumista tai tilanteista”. Lisäksi se dokumentoi tietystä ilmiöstä keskeisiä ja kiinnostavia piirteitä. (Hirsjärvi ym. 2010, 139.) Tutkimustehtäväni on toteuttaa opiskelumateriaali bakteeripreparaattien tarkasteluun. Työssäni kerron gram-värjäyksen menetelmästä ja menetelmän biokemiallisista reaktioista. Tieto on jo tutkittua tietoa, joka on saatavilla hyvin hajanaisesti ja pääsääntöisesti ulkomaisista lähteistä. Opinnäytetyön tarkoitus on helpottaa tulevia Oulun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian peruskurssin opiskelijoita bakteeripreparaattien tarkastelun opettelussa. Tavoitteena on kerätä ja yhdistää teoretietoa eri lähteistä ja koota samojen kansien väliin perustiedot gram menetelmästä ja tämän vaikutuksista bakteereihin. Pääpaino työssä on kuvitettu opiskelumateriaali bakteeripreparaateista sekä niiden tarkastelusta. Materiaalin kuviin yhdistetään teoreettiset pääkohdat. Tämä helpottaa teorian ja visuaalisen osion yhdistämistä toisiinsa ja näin syventää opiskelijan tietoutta.

4.2 Tutkimusaineiston keruu ja käsittely

Teoreettisen tutkimusaineiston keruu tapahtuu eri lähteitä tutkimalla ja näistä tietoa keräämällä ja yhdistelemällä. Opiskelumateriaalin kuvituksen hoidan pääasiassa itse kuvaamalla mikroskooppinäkyvät työtä varten valmistamistani preparaateista.

Tavoitteena on luoda laadukas eli opiskelijoiden tarpeisiin vastaava ja opiskelua tukeva opiskelumateriaali. Käytin oppaan sisällön suunnittelussa apuna bio2sn vuosikurssin eli toisen vuoden bioanalytiikan opiskelijoita, joilla oli parhaillaan menossa mikrobiologian peruskurssi.

Olin mukana heidän harjoitustunnillaan, johon vein mikroskoopitavaksi tekemäni bakteeripreparaatit. Mikroskoopoinnin lisäksi opiskelijat saivat vastata kyselylomakkeeseen (Liite 1). Opiskelijoita oli 31kpl ja kyselylomakkeeseen heistä vastasi 30kpl, joten vastausprosentti oli 96,7%.

Olin suunnitellut alustavasti opiskelumateriaaliin tulevan sisällön ennen mikrobiologian harjoitustunnille osallistumista. Opiskelijoiden vastauksia kyselylomakkeilta lukiessani nousi esiin kyselyn opinnäytetyöhön mukanaan tuoma arvo. Sain opiskelijoilta paljon hyviä neuvoja ja toiveita opiskelumateriaalin sisällöstä. Saamani vastaukset täydensivät suunnitelmiani enemmän kuin osasin ennakkoon odottaa, joten olen tyytyväinen kyselyn tuottamiin tuloksiin.

Kirjallisuuslähteiden ja tieteellisten julkaisujen tutkiminen vie paljon aikaa. Koska lopputuotteeksi syntyy opiskelumateriaali, minun on huomioitava opinnäytteessäni myös pedagoginen näkökulma. Pedagogiikka on minulle täysin vieras osa-alue, joten sen tutkiminen ja eri näkökulmien ymmärtäminen tulee olemaan haastavaa.

Kyselytutkimusta pidetään hyvänä aineiston keruun menetelmänä, koska sen avulla voidaan saada kerättyä laaja tutkimusaineisto. Etuna tässä menetelmässä on sen tehokkuus. Tutkimukseen voidaan saada mukaan paljon henkilöitä ja heille voidaan esittää kysymyksiä hyvin laaja-alaisesti. Kyselymenetelmä säästää lisäksi tutkijan aikaa ja vaivannäköä, mikäli hän on osannut laatia käytännöllisen kyselylomakkeen, joka on nopeasti analysoitavissa. Kyselytutkimuksesta löytyy myös heikkoja kohtia. Kyselylomaketta analysoitaessa ei ole mahdollista varmistua siitä, kuinka hyvin vastaajat ovat perehtyneet arvioinnin kohteena olevaan materiaaliin ja kuinka huolellisesti ja rehellisesti ovat vastanneet kyselyyn. Haastetta tuo lisäksi kyselylomake; onko annetut vastausvaihtoehdot onnistuneita vastaajien kannalta. Hyvän lomakkeen laatiminen vaatii tutkijalta monenlaista tietoa ja taitoa ja on tästäkin huolimatta haastavaa laatia. Joissain tapauksissa kyselyyn vastaamattomuus nousee suureksi. (Hirsjärvi ym. 2010, 195).

4.3 Tutkimuksen luotettavuus ja eettiset näkökohdat

Tutkimusaineistoa kerätessä on arvioitava käytettävien lähteiden luotettavuutta, tätä luotettavuuden arviointia kutsutaan *lähdekritiikiksi*. Tutkijan pitää pyrkiä lähteiden kriittiseen arviointiin sekä lähteitä valitessaan että niitä tulkitessaan. Kaikki painettu tieto ei ole relevanttia. Lähteitä arvioidessa tulisi kiinnittää huomiota kirjoittajan tunnettavuuteen ja hänen arvostettavuuteen. Lisäksi tärkeitä seikkoja ovat lähteen ikä, lähdetiedon alkuperä, lähteen uskottavuus ja julkaisijan arvovalta. (Hirsjärvi ym. 2010, 113,114).

Olen käyttänyt opinnäytetyössäni tuoreiden lähteiden lisäksi myös vanhoja lähteitä. Vanhat lähteet ovat liittyneet gram menetelmään, joka on pysynyt lähes muuttumattomana yli 100- vuoden ajan.

Hirsjärven ym. mukaan tutkimusaineiston luotettavuutta arvioitaessa tulisi kiinnittää huomiota myös kirjoittajan vastuuseen sekä tekstin totuudellisuuteen ja puolueettomuuteen (2010, 113,114). Mielestäni nämä seikat ovat tärkeitä myös eettisyyden näkökulmasta.

5 BAKTEERI

Maapallollamme elävistä miljoonista erilaisista soluista mukautuvimpia ja elinvoimaisimpia ovat prokaryootit eli bakteerit (Puhakka & Salkinoja-Salonen 2002, 92). Ne ovat jakautuneet kahdeksi eri lajiksi, eukabakteeriksi ja arkkibakteeriksi. Arkkibakteereihin ei kuulu tauteja aiheuttavia bakteereja, vaan taudinaiheuttajat ovat eukabakteerilajeja. Eukabakteerit ovat jatkaneet kehitystään useiksi omiksi ryhmikseen. Suurimmat näistä ryhmistä ovat gram-positiiviset bakteerit ja proteobakteerit. Muita kliinisesti merkittäviä ryhmiä ovat klamydiat, spirokeetat ja bacteroides – flavobakteeriryhmä. (Vaara, Sarvas & Mäkelä 1998, 294.)

5.1 Bakterin rakenne

Bakteerit ovat kooltaan hyvin pieniä, vain noin 1-2 µm kokoisia eikä niitä pysty havaitsemaan silmillä. Bakteerit ovat rakenteeltaan tumattomia, yksisoluisia eliöitä, jotka eivät tarvitse lisääntyäkseen isäntää, koska ne lisääntyvät jakautumalla. Bakteri saa muodon ja mekaanisen lujuuden soluseinästään. Monilla bakteereilla on ulkopinnallaan eli soluseinän päällä vielä hyytelömäinen kapseli, joka suojaa bakteeria elimistön reaktioilta, kuten komplementilta ja fagosytoosilta. Bakteereita on useita eri muotoisia ja yleisimmät muodot ovat; kokki, sauva, spirilli, spirokeetta sekä ulokkeelliset muodot. (Puhakka & Salkinoja-Salonen 2002, 92, 97-98; Heikkilä & Meurman 2005, 31; Carlson & Koskela 2011, 37.)

Bakteereilla ei ole soluelimiä, siltä puuttuu esimerkiksi mitokondriot, kloroplastit, endoplasminen retikulum sekä Golgin laite. Soluelinten puuttumisen vuoksi bakteerien kemialliset reaktiot tapahtuvat joko sytoplasmassa tai sytoplasmaa ympäröivässä solukalvossa eli sytoplasmisessa membraanissa. Bakteerien DNA on kiinnittynyt solukalvoon ja solukalvot hoitavat muunmuassa DNA:n replikoitumisen, soluhengityksen ja soluseinän rakenneosien synteesin. Lisäksi solukalvo toimii erilaisten molekyylien kuljettajana sekä solun permeabiliteetin säätelijänä. (Vaara ym. 1998, 294, 297.)

Eläinsoluista poiketen useimmilla bakteereilla on solukalvon ulkopuolella soluseinä. Bakteerien soluseinässä ei ole hiilihydraattipolymeerejä, kuten selluloosaa, hemiselluloosaa ja pektiiniä, jotka ovat ominaisia kasvisoluille. Bakteerien soluseinästä puuttuu myös sienille ominainen kitini.

Bakteerien soluseinät eroavat toisistaan merkittävästi, riippuen siitä onko bakteeri gram-positiivinen vai gram-negatiivinen. Bakteerien solukalvoista puuttuu kolesteroli, joka on tyypillinen eläinsolukalvoille. Poikkeuksellisesti muutamat mykoplasmat sisältävät kolesterolia, mutta neköän eivät pysty sitä itse tuottamaan vaan saavat sen yleensä isännältään. (Vaara ym. 1998, 295, 297.)

Lähes kaikilla bakteereilla on solukalvon ulkopuolella solun muodon ja koon määräävä jäykkä peptidoglykaanikerros eli mureiinerros. Se on jättikokoinen molekyyli, joka sisältää polymeerirakenteista peptidoglykaania ja peittää bakteerisolun pussin tapan. Peptidoglykaanimolekyyli muodostuu disakkariditrapeptideistä, jotka ovat polymerisoituneet verkkomaiseksi pussiksi. Peptidisillat yhdistävät pitkiä polysakkaridiketjuja, joissa on vain kahta eri sokeria. N – asetyyliglukosamiinia eli GNAC ja sen johdannaista N – asetyylimuraminaattia eli MNAC. Peptidoglykaanin synteesi alkaa bakteerisolun sisällä ja se on monivaiheinen. Sen useita vaiheita voidaan häiritä tai estää kemiallisesti esimerkiksi eri mikrobilääkkeillä. (Vaara ym. 1998, 298.)

Peptidoglykaaniverkon makrorakenne ei ole identtinen solun joka kohdassa. Esimerkiksi sauvamaisen solun päissä rakenne on pallomainen ja solun keskellä putkimainen. Lisäksi bakteerisolun jakautumiskohdassa syntyvä uusi väliseinä on erilainen rakenteeltaan, kuin vanhempien solun osien peptidoglykaani. Peptidoglykaaniverkon muotoilussa olennainen tehtävä on PBP – proteiinilla eli penisilliiniä sitovalla proteiinilla. Peptidoglykaani vastaa soluseinän rigiditeetistä eli jäykkyydestä. (Vaara ym. 1998, 299.)

Osalla bakteereista on solun pinnalla flagelloja eli värekarvoja. Niitä voi olla yksi tai useampia ja värekarvojen avulla bakteeri pystyy liikkumaan aktiivisesti. Useilla gram-negatiivisilla bakteereilla on fimbrioita eli tarttumiskarvoja. Niiden avulla bakteeri pystyy tarttumaan kiinni esimerkiksi limakalvoihin. (Heikkilä & Meurman 2005, 32.)

Mykoplasmat ovat ainoat itsenäisesti lisääntymiskykyiset eukabakteerit, joilla ei ole peptidoglykaania. Tästä syystä niiden solut ovat osmoottisesti hauraita eikä niillä ole ominaista muotoa (Vaara ym. 1998, 300).

Gram-positiivisen bakteerin soluseinä

- Sisempi solukalvo, ulompi kalvo puuttuu.
- Soluseinä koostuu pääasiassa peptidoglykaanista, jota on 90% soluseinästä. Lisäksi soluseinä koostuu seinäteikkohaposta ja lipoteikkohaposta.
- Seinämässä on useita kymmeniä päällekkäisiä peptidoglykaanikerroksia.
- Proteiinit.

Gram-negatiivisen bakteerin soluseinä

- Sisempi sekä ulompi solukalvo
- Seinämä koostuu yhdestä peptidoglykaanikerroksesta, joka on 10% soluseinästä. Lisäksi soluseinä koostuu periplasmisesta tilasta, lipoproteiinista, lipopolysakkarideista, fosfolipideistä sekä useista entsyymeistä.

(Tortora, Funke & Case 1995, 79; Vaara ym. 1998, 298; Puhakka & Salkinoja-Salonen 2002, 98; Heino & Vuento 2004, 73; Smith & Hussey 2012, hakupäivä 27.1.2012.)

5.2 Bakteerin genomi

Bakteereilta puuttuu tuma ja tästä niille tulee nimitys esitumallinen. Bakteerien genomi on hyvin yksinkertainen ja se koostuu yhdestä pitkästä, rengasmaisesta DNA – molekyylistä, niin sanotusta bakteerikromosomista, joka on kietoutunut tiukaksi vyyhdeksi ja sisältää useita kymmeniä eri osia. Kromosomimolekyylin koon havainnollistamiseksi otetaan esimerkiksi *Escherichia Coli* jonka solun pituus on noin 2µm. Sen vyyhdeksi pakkautuneen kromosomin pituus suoristettuna olisi noin 1mm. Kromosomin lisäksi bakteerisolussa voi olla ekstrakromosomaalisia geneettisiä elementtejä eli plasmideja. Bakteerisolut ovat haploidisia, eli solussa on vain yksi kromosomi tai joskus harvoin useampia identtisiä kromosomeja. Bakteereilla ei ole mitoosia eikä myöskään suvulliseen lisääntymiseen liittyvää meioosia, koska ne lisääntyvät aina suvuttomasti jakautumalla. Vaikka bakteerisolut eivät sulaudu yhteen voivat bakteerigeenit rekombinoitua eri mekanismein. Bakteerin DNA:n kahdentumisessa syntyvät tytärkromosomit liikkuvat yleensä bakteerin päitä kohti ja joutuvat eri tytärsoluihin bakteerisolun jakautuessa. (Vaara ym. 1998, 295.)

6 GRAM-VÄRJÄYS

Bakteerinäytteitä voi tarkastella joko natiivina tai värjättyinä. Bakteerit ovat yleensä vaikeita nähdä jopa mikroskoopin avulla niiden läpikuultavuuden ja värittömyyden takia, sen vuoksi ne yleensä värjätään orgaanisilla väriainella. Yksinkertainen värjäys eli vain yhdellä värillä käsitelty näyte lisää kontrastia näytteen ja taustan välillä. Gram-värjäys on tunnetuin differentiaalivärjäys. Siinä käytetään kahta väriä, joista ensisijainen väriaine värjää rakenteet ja vastaväri luo kontrastin. Värjäys sisältää useamman värjäys- sekä värinpoisto vaiheen. Gram-värjäystä käytetään erottamaan soluja toisistaan niiden värjäytymisominaisuuksien perusteella. (Lim 1998, 25; Alcamo 2001, 78-79.)

Gram-värjäyksen kehitti Tanskalainen lääkäri Hans Christian Gram työskennellessään Berliinin kaupunginsairaalan ruumishuoneella vuonna 1884 (Tortora ym. 1995, 61; Lim 1998, 26;). Vaikka menetelmä on kehitetty yli 100 vuotta sitten, se on säilynyt lähes muuttumattomana ja on edelleenkin eräs tärkeimmistä, edullisimmista ja yleisimmin käytetyistä värjäysmenetelmistä mikrobiologian laboratorioissa. Suurin osa bakteerisolujen tutkimuksista suoritetaan värjättyjä preparaatteja mikroskopoimalla. Värjäys tarkoittaa yksinkertaisimmillaan sitä, että bakteerit värjätään väriaineilla, joilla saadaan korostettua tiettyjä bakteerin rakenteita. (Tortora ym. 1995, 61; Carlson & Koskela 2011, 38.) Vaikka gram-värjäys ei tarjoa lopullista tunnistusta bakteerille se on kuitenkin rutiinikäytössä niin kliinisen kuin teollisenkin mikrobiologian laboratorioissa yhtenä ensimmäisen vaiheen bakteerintunnistus menetelmistä. Kun gram-värjäyksen tulokset yhdistetään solun morfologiaan, järjestäytymiseen sekä sen biokemiallisiin ominaisuuksiin, voidaan ratkaiseva tunnistaminen bakteerille yleensä tehdä. (Lim 1998, 26.)

Nykyään gram-värjäykset suoritetaan pääasiassa värjäysautomaateilla, tämä vapauttaa bioanalyytikon kädet lasien värjäytymisen ajaksi muihin työtehtäviin. Tekniikka ei kuitenkaan ole pettämätöntä, joten ei ole tavatonta, että värjäysautomaatti joutuu välillä huollettavaksi. Myöskin yksittäiset ja kiireelliset preparaatit värjätään usein käsin. Tällöin bioanalyytikon on osattava suorittaa värjäykset manuaalisesti. Epäonnistunutta värjäystä ei voi aina uusida, esimerkiksi huomattavan vähäisen näytemäärän vuoksi. Gram-värjäystä voidaan tarvittaessa käyttää myös kiireelliseen päivystysdiagnostiikkaan menetelmän nopeuden vuoksi, koska värjäämiseen kuluu vain muutamia minuutteja (Lappalainen & Vuento 2007, 824). Näistä syistä bioanalytiikan opiskelijan on tärkeää opetella suorittamaan värjäykset manuaalisesti.

6.1 Värjäyksen tarkoitus

Bakteriologisilla laboratoriotutkimuksilla selvitetään, onko potilaalla infektio tauti ja onko bakteereilla osuutta taudin etiologiassa. Yleensä bakteerivärjäyksellä saadaan näytteestä alustava tieto, jota täydennetään muilla tarvittavilla mikrobiologisilla tutkimuksilla. Viljelyn avulla eristetyt bakteerit tunnistetaan sekä suku- että lajitasolle. Mikrobiologisten laboratoriotutkimusten käyttöarvo riippuu siitä kuinka nopeasti tulokset saadaan potilasta hoitavien henkilöiden tietoon ja kuinka he voivat hyödyntää tuloksia muun muassa lääkkeitä tehdessään. (Carlson & Koskela 2011, 37.)

Gram-värjäyksen tarkoituksena on jaotella bakteerit kahteen suureen pääryhmään, **gram-positiivisiin** ja **gram-negatiivisiin** bakteereihin. Päämääränä on tarkentaa lääkärille potilaan anamneesin ja kliinisten löydösten sekä laboratoriotutkimusten perusteella saatua kuvaa potilaan sairaudesta. Gram-positiiviset ja gram-negatiiviset bakteerit eroavat toisistaan muun muassa kemiallisten aineiden herkkyden, kuten mikrobilääkkeiden perusteella. Gram-positiiviset bakteerit ovat herkempiä penisilliinille kun taas gram-negatiiviset ovat herkempiä tetrasykliinille. Värjäytuloksen perusteella lääkäri saa tietoa tarvittavasta mikrobilääkehoidosta, koska mikrobilääkehoitoa voidaan ohjata melko luotettavasti näytteessä mahdollisesti näkyvien bakteerien gram-värjäytyvyyden perusteella. Mikrobiologisen diagnostiikan avulla lääkäri saa tietoa myös bakteerien lääkeherkkyystilanteesta, infektion epidemiologiasta ja tätä kautta potilaan mahdollisesta tartuntavaarasta. (Tortora ym. 1995, 61; Alcamo 2001, 80; Lappalainen & Vuento 2007, 824.)

Gram-värjäyksen yhteydessä voidaan käyttää fluoresoivia väriaineita bakteerivärjäyksen herkkyden parantamiseksi. Yleisimmin käytettyjä fluoresoivia väriaineita ovat auramiini ja akridiini. Lasilta on yleensä helppo havaita tummaa taustaa vasten loistavat bakteerit ja mikroskopoitaessa voidaan käyttää pienempiä suurennoksia. Akridiinia käytetään gram-värjäyksen lisäksi muunmuassa likvornäytteitä mikroskopoitaessa. Sekä auramiinia että akridiinia voidaan käyttää myös haettaessa näytteestä haponkestäviä sauvoja esimerkiksi mykobakteeridiagnostiikassa. (Lappalainen & Vuento 2007, 824.)

6.2 Menetelmä

Gram-värjäyksen reagensseina toimii tänä päivänä kristallivioletti alun perin käytetyn metyyli violetin sijaan (Smith & Hussey 2012, hakupäivä 27.1.2013). Muita reagensseja ovat jodipitoinen lugolin liuos, etanoliasetoni ja safraniini liuos. Värjäyksen ensimmäisessä vaiheessa kuivattu ja kiinnitetty preparaatti upotetaan kristalliviolettiin. Emäksinen kristallivioletti värjää sekä gram-positiiviset että gram-negatiiviset bakteerit sinisiksi. Toisessa vaiheessa preparaatti upotetaan lugoliin, joka toimii kristallivioletin fixatiivina. Kristallivioletti ja lugolin jodi reagoivat keskenään muodostaen solun sisällä liukenemattoman CV – I kompleksin (*crystal violet – iodine complex*). CV – I kompleksi on molekyylikooltaan suurempi, kuin pelkkä kristallivioletti soluun tunkeutuessaan. Kompleksin koon takia se ei pysty peseytymään pois jodikäsittelyä seuraavan alkoholipesun aikana ehjän ja paksun peptidoglykaani kerroksen läpi, joka löytyy gram-positiivisilta bakteereilta. Tästä syystä gram-positiiviset bakteerit säilyttävät kristalliviolettiväriin sisällään. Lugoli liuoksen reagoidessa kristallivioletin kanssa bakteerit muuttavat väriään sinisestä violetiksi. Kolmannen vaiheen alkoholipesun tarkoitus on toimia värinpoistajana. Alkoholipesu etanoliasetoni liuksella häiritsee gram-negatiivisten bakteerien uloimpaa lipopolysakkaridikerrosta ja CV – I kompleksi peseytyy pois ohuen peptidoglykaanikerroksen läpi. Gram-negatiiviset muuttuvat violeteista värittömiksi ja näkymättömiksi. Värittömiä soluja ei voida tutkia, tämän takia menetelmässä käytetään vastaväriä safraniini liuosta. Safraniini värjää gram-negatiiviset bakteerit punaisiksi. Solut pitävät punaisen värin sisällään, koska enää ei suoriteta uutta värinpoistoa alkoholilla. Safraniini ei vaikuta gram-positiivisiin bakteereihin, sillä ne ovat säilyttäneet violetin värin solujensa sisällä. (Tortora ym. 1995, 62 – 63; Lim 1998, 26; Alcamo 2001, 79; Reagena 2003, hakupäivä 27.1.2013.)

6.3 Värjäyksen suoritus

Värjäys voidaan suorittaa värjäysautomaatilla, käsimenetelmällä upottamalla värjäyskelkat kellontarkkuudella eri väriaine ja värinpoistoaine astioihin tai yhdelle lasille kerrallaan suorittamalla värjäys lasin pinnalla. Värjäyksen suorittaminen lasin pinnalla on nopea tapa saada yksi preparaatti mikroskopoitavaksi esimerkiksi päivystyksellisissä tutkimuksissa. Värjäyksen reagensseina käytetään kaupallisia valmisteita, vaihtoehtoisesti reagenssit voi valmistaa itse.

Gram-värjäys voidaan tehdä kaikista näytteistä, joissa ei ole mukana normaaliflooraa häiritsemässä tulosten tulkintaa. Värjäykseen soveltuu parhaiten nestemäiset näytteet, kuten punktoidut märkänäytteet, likvorit ja bakteeripesäkkeestä valmistetut suspensiot. Näytteeksi sopivat myös nivelneste, pintamärkänäyte, vatsaonteloerite, välikorvaerite, silmän sidekalvoerite ja alahengitystienäyte. Gram menetelmään sopimattomia näytteitä ovat nielu- ja ulostenäytteet korkean normaalifloora pitoisuutensa vuoksi. Näyte levitetään preparaatile joko ruiskulla tai pumpulipuikolla. (Reagena 2003, hakupäivä 27.1.2013; Lappalainen & Vuento 2007, 824.)

6.3.1 Esivalmistelut

Tuore bakteeripesäke tai bakteerisuspensio levitetään lasille hellästi pyörivin liikkein. Ennen värjäystä on näyte fiksoitava eli kiinnitettävä lasille. Värjättyjen solujen tulee muistuttaa elävää solua niin paljon kuin mahdollista. Fiksointi säilyttää solun sisäiset ja ulkoiset rakenteet ja mikroorganismit ja kiinnittää ne paikoilleen. Lisäksi fiksointi inaktivoi entsyymit, jotka voivat häiritä solujen morfologiaa ja samalla vahvistaa solurakennetta niin, että se ei muutu värjäyksessä. (Harley, Klein & Prescott 1996, 25.) Ilman kunnollista fiksointia väriaineet voivat huuhtoa näytteen pois lasilta, tällöin väriaineet ovat käyttökelvottomia kontaminaation vuoksi. Fiksoinnissa on kaksi eri vaihetta, ilmakuivaus ja liekitys. Kun näyte on levitetty lasille annetaan sen ilmakuivua kunnolla, ilmakuivauksen aikana näyte on suojattava pölyltä. Ilmakuivauksen jälkeen lasi liekitetään varovasti bunsenliekillä kolme kertaa näytopuoli ylöspäin. Ilmakuivaus ja liekitys kiinnittää pieneliöt lasille ja tappaa ne eli tekee bakteerit tartuttamiskyvyttömiksi. (Tortora ym. 1995, 61; Reagena 2003, hakupäivä 27.1.2013.) Liekitys säilyttää solujen morfologian, mutta ei rakenteita solujen sisällä. Mikäli on tarvetta säilyttää myös solunsisäisen rakenteet, käytetään silloin kemiallista fiksaatiota (Harley ym. 1996, 25).

Laadukas fiksointi bunsenliekillä vaatii bioanalytikolta harjoittelua. Valmistin opinnäytetyötä varten 70 kappaletta bakteeripreparaatteja. Halusin taata valmistamilleni laseille tasalaatuisen fiksoinnin ja tästä syystä käytin fiksointina vaihtoehtoista alkoholi kiinnitystä. Alkoholi kiinnityksessä ilmakuivattu lasi upotetaan metanoliin yhden minuutin ajaksi. Lasin annetaan kuivua kokonaan ennen värjäyksen aloitusta.

7 VÄRJÄTYN PREPARAATIN TARKASTELU

Bakteereita ei pystytä havaitsemaan paljain silmin niiden pienen koon takia.

Bakteerinäytteen värjäyksen ja mikroskopoinnin avulla saadaan nopeasti alustava arvio näytteen sisältämistä bakteereista. Bakteerit eivät yleensä erotu valomikroskoopissa värjäämättömänä kunnolla taustastaan. (Carlson & Koskela 2011, 37-38.)

Viljelynäytteestä valmistetun preparaatin tulkinta on yleensä helpompaa, kuin suoraan näytteestä valmistetun preparaatin tulkinta. Viljelynäytteessä bakteeria on yleensä runsaammin. Bakteerinäytteen laatu on parempi, häiritsevä taustamateriaali puuttuu koska lasille valitaan näytteeksi vain kasvanutta pesäkettä eikä muuta turhaa elatusmaljalla mahdollisesti kasvavaa. (Meurman 2010, 56.)

7.1 Bakteerien luokittelu

Bakteerin tunnistamiseen ei riitä vain sen tietty muoto, vaan on otettava huomioon monia muitakin bakteerin ominaisuuksia. Yksi tärkeimmistä bakteeritunnistuksen ominaisuuksista on bakteerin gram-värjäytyvyys. Eri bakteerit reagoivat eri tavoin gram-värjäykseen. Värjäytyvyyden lisäksi on otettava huomioon muunmuassa bakteerin biokemialliset ominaisuudet, elintavat ja DNA:n emäskoostumus. (Tortora ym. 1995, 62; Puhakka & Salkinoja – Salonen 2002, 92.)

Bakteereita on useaa eri kokoa, muotoa ja järjestäytymistä. Nämä tuntomerkit, jotka yleensä ovat lajityypillisiä auttavat tunnistamaan ja luokittelemaan bakteerit. Bakteerin morfologia eli muoto ja rakenne antaa yleensä jo ensimmäisen vihjeet bakteerin lajista. Vaikka bakteerit ovat pienimpiä tunnettuja mikro-organismeja, on niidenkin koossa suuria vaihteluja. Pienimmät bakteerit ovat *Mycoplasma* suvun jäseniä. Ne ovat todennäköisesti myös pienimmät itsenäiseen kasvuun kykenevät bakteerit. *Mykoplasma* esiintyy normaalisti hengitysteissä ja virtsatiehyissä sekä ihmisillä että eläimillä. Se voi aiheuttaa esimerkiksi virtsatieinfektioita ja keuhkokuumetta. *Mycoplasma*ta puuttuu tunnusomainen soluseinämä, joka löytyy muilta bakteerilajeilta. Tästä syystä sillä ei ole tiettyä muotoa vaan se on pleomorfinen eli voi olla monenmuotoinen. Toinen ääripää bakteerien koossa on *Spirillum*. *Spirillum* suvun bakteerit voivat olla niin suuria, että ne pystyy erottamaan ilman mikroskooppia. (Lim 1998, 18-19.)

Bakteereita on kahta perusmuotoa, pallomainen kokki ja sylinterimäinen sauva. Näistä kahdesta perusmuodosta on olemassa useita eri variaatioita. Esimerkiksi kokkobasilli on muodoltaan kokin ja sauvan sekoitus. Pilkun mallisia käyristyneitä sauvoja kutsutaan vibrioiksi. Spiraalin muotoisia bakteereita kutsutaan spirilloiksi tai spirokeetoiksi riippuen niiden liikkumismekanismista. Spirilla on jäykkä ja se liikkuu flagellan avulla. Spirokeetta on spirillaa suurempi, se joustaa koko kehosta ja liikkuu pitkittäisen rihmansa avulla joko aaltoillen tai pyörien. Rihmabakteerit muodostavat pitkiä solumassa säikeitä, jotka voivat haarautua eri suuntiin ja olla pituudeltaan jopa useita satoja mikrometrejä. (Lim 1998, 19; Carlson & Koskela 2011, 38.)

Tietyt bakteerit muuttavat muotoaan elinkaarensa aikana. Esimerkiksi *Chlamydia*, joka aiheuttaa trakoomaa eli tarttuvaa side- ja sarveiskalvon tulehdusta. Se voi esiintyä kahdessa täysin eri muodossa. Pienempi muoto Chlamydiasta on kestävä ja selviytymiskykyinen mutta ei pysty jakautumaan, suurempi muoto jakautuu isäntäsolujen sisällä. (Lim 1998, 19.) Saman bakteerilajikkeen muodon vaihtelut tuovat lisähaastetta oikeaan tulkintaan. Gram-positiiviset kokit voivat esiintyä myöskin pitkulaisina ja gram-negatiiviset sauvat voivat olla lyhyitä ja kokkimaisia. Joissain tapauksissa ero kokin ja sauvan välillä voi olla niin pieni, että on hankalaa sanoa kumpaa muotoa bakteeri on. Gram-positiivisuuden ja gram-negatiivisuuden erottaminen on hoidon kannalta tärkeämpää, kuin bakteerin muodon erottaminen (Meurman 2010, 55).

Bakteereilla on erilaisia solujen järjestäytymismalleja. Bakteerien nimet ilmentävät usein sekä solun morfologiaa että sen järjestäytymistä. Esimerkiksi Streptokokki suvun nimi kuvaa bakteeria joka tavataan yleisimmin kokkien ketjuna johtuen bakteerisolujen epätäydellisestä erottumisesta. Stafylokokki suvun bakteerit ovat myös kokkeja, mutta ne ovat kiinnittyneet ryhmiiksi. Diplokokit esiintyvät pareittain eli kahden solun kiinnittymänä. Muita bakteerien järjestäytymismuotoja on esimerkiksi kuution mallinen sarcina, johon on kiinnittynyt kahdeksan bakteeria sekä kulmikkaan mallinen korynebakteeri. Lisäksi on olemassa hiusmaisista bakteereita, kuten *Leptothrix* suvun bakteerit. Solujen järjestäytyminen voi muuttua ympäristöolosuhteiden mukaan. Esimerkiksi streptokokki tavataan yleensä ketjumuodostelmassa, kun se on eristetty ja kasvatettu laboratorio olosuhteissa. Kun sama bakteeri eristetään aktiivisesti leviävästä vammasta ihmiskehossa, voikin se esiintyä yksinäisenä kokkina tai diplokokkina. (Lim 1998, 20; Carlson & Koskela 2011, 38.) Parhaiten bakteerien ryhmittäminen näkyy liemiviljelyistä, esimerkiksi veriviljelypullosta valmistetussa preparaattissa (Meurman 2010,54).

Hiivoilla on paksu soluseinä, tästä syystä ne värjäytyvät aina grampositiiviksi (Puhakka & Salkinoja – Salonen 2002, 96).

7.2 Mikroskopointi

Mikroskooppeja on kahta päätyyppiä, valomikroskooppi ja elektronimikroskooppi. Valomikroskooppi on mikrobiologian tärkein työväline. Sen avulla pystymme tarkastelemaan bakteerien lisäksi niiden muotoa, rakenteellisia ominaisuuksia ja järjestäytymistä. (Lim 1998, 21; Carlson & Koskela 2011, 38.)

Normaalisti valomikroskoopissa on kolme objektiivia, 10x, 40x ja 100x objektiivit. 10x okulaarin avulla preparaatin todellinen suurennos on 100x, 400x ja 1000x. Preparaattien kelvollisuutta tutkitaan aluksi pienellä suurennoksella, tällöin voidaan etsiä lasilta edustavaa kohtaa jota aletaan tarkastelemaan lähemmin isommalla suurennoksella. Preparaatteja tarkastellaan 100x objektiivilla, jolloin bakteereista saadaan 1000-kertainen suurennos. Yleensä 100x objektiivit ovat öljyimmersio-objektiiveja. Immersioöljy on tarpeellinen preparaatin ja objektiivin välissä valon taitekertoimen vuoksi. (Alcamo 2001, 75, 77; Meurman 2010, 55.)

Gram-värjättyjen preparaattien tarkastelu on haastavaa ja se vaatii laajaa kokemusta, jotta näyte tulkitaan ja vastataan varmasti oikein. Bakteerit eivät aina värjäydy oppikirjan mukaan. Esimerkiksi vanhentuneet gram-positiiviset solut värjäytyvät usein pinkeiksi eivätkä violeteiksi, tämä tuo haastetta oikean tulkinnan tekemiseen. (Harley ym. 1996, 27; Church, Melnyk & Unger 2000, hakupäivä 26.1.2014.)

7.3 Laadunvarmistus

On havaittu että gram-värjäysten tulkinnassa voi tulkitsijasta riippuen olla hyvinkin laajaa vaihtelua. Usein lääkärit luottavat alkuperäiseen gram-värjäyksen tulokseen hoitopäätöksiä tehdessään. Siksi gram-värjäyksen tarkan tulkinnan onnistumista on seurattava laboratorioden sisäisellä ja ulkoisella laadunvarmistuksella. Lääkärit luottavat mikrobiologian laboratorion antamaan vastaukseen, niinpä bakteeripreparaatin väärä tulkinta voi oleellisesti vaikuttaa potilaan hoidon laatuun. (Church ym. 2000, hakupäivä 26.1.2014.)

Suomessa klinisen mikrobiologian laboratorioiden ulkoisesta laadunarvioinnista vastaa Labquality Oy. Jotta mikrobiologian laboratorio saa pitää toimilupansa on sen osallistuttava vuosittain jokaiseen neljään järjestettävään ulkoiseen laadunarviointikierrokseen. Ulkoisessa laadunarviointikierroksessa on oma osionsa bakteeripesäkkeestä tehdyille gram-värjäykselle. Mikrobiologian laboratorion tulee itse värjätä ja mikroskopoida laadunarviointinäyte. Laadunarviointikierrosten tarkoituksena on muun muassa mitata laboratorion laatujärjestelmän toimivuutta, tukea laboratorion sisäistä laadunarviointia ja testata henkilöstön ammattitaitoa. (Labquality Oy, hakupäivä 11.4.2014.)

Terveydenhuollon mikrobiologisen diagnostiikan korkeaa laatua valvotaan myös virastotasolla. Kuka tahansa ei pysty tuottamaan terveydenhuollolle mikrobiologisia laboratoriotutkimuksia. Sekä julkisen että yksityisen terveydenhuollon klinisen mikrobiologian laboratorion on haettava määräaikaista toimilupaa aluehallintovirastosta. Aluehallintovirasto tekee yhteistyötä Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen kanssa, josta aluehallintovirasto pyytää laboratorioden lupahakemuksiin asiantuntijalausuntoja. (Aluehallintovirasto, 2013, hakupäivä 11.4.2014.)

Bakteriologian tutkimukset ovat alttiita useille eri virheille, koska ne tehdään pääsääntöisesti käsityönä ja näytteet ovat biologisia. Virheiden minimoimiseksi mikrobiologian laboratoriossa on käytössä säännöllinen sisäinen ja ulkoinen laaduntarkkailu. Esimerkiksi elatusaineet, mikrobilääkeherkkyysmääritykset ja bakteerien tunnistustestit testataan tunnetuilla bakteerikannoilla, yleensä ATCC kannoilla. Laitteiden kuten lämpö- ja hiilidioksidikaappien toimintaa seurataan päivittäin tarkkailemalla lämpötiloja. (Carlson & Koskela 2011, 53.)

Laboratoriohenkilökunnan osaamista sekä tutkimusmenetelmien toimivuutta testataan Labquality Oy:n laaduntarkkailunäytteillä. Laaduntarkkailunäytteen tutkitaan samoin kuin potilasnäytteet. Laboratorion laatu varmistetaan ennenkaikkea uuden työntekijän huolellisella perehdyttämällä työtehtäviinsä sekä muun henkilökunnan täydennyskoulutuksilla. Osaamisen ja laadun tärkeys korostuu etenkin niissä tutkimuksissa, joissa tulkinta perustuu silmämääräiseen arvioon. Näiden tutkimusten osalta on tärkeää, että laboratoriohenkilökunnalla on tulkinnassa yhtenäinen käytäntö jota kaikki noudattavat. (Carlson & Koskela 2011, 53.)

7.4 Virhelähteet

Vaikka gram-värjäys on laajasti käytetty ja yksi tärkeimmistä värjäystekniikoista, se ei kuitenkaan ole 100% varma tunnistusmetodi. Gram-värjäykseen liittyy monia virhelähteitä, joiden vuoksi bakteerit voivat värjäytyä poikkeavasti. Virheet tuloksissa voivat aiheutua esimerkiksi vääränlaisesta näytteen käsittelystä tai potilaalle ennen bakteerinäytteenottoa aloitetusta mikrobilääkehoidosta. (Meurman 2010, 54.)

Suurin osa bakteereista luokitellaan joko gram-positiiviseksi tai gram-negatiiviseksi lajikkeeksi. Kaikki bakteerit eivät kuitenkaan anna selkeää gram-reaktiota esimerkiksi niiden soluseinän paksuuden tai rakenneominaisuuksien vuoksi. Näitä bakteereita kutsutaan gram-variaabeleiksi eli vaihteleviksi ja ne näkyvät mikroskoopissa sekä gram-positiivisinä että gram-negatiivisinä bakteereina. (Tortora ym. 1995, 63; Lim 1998, 26.)

Bakteerit voivat värjäytyä huonosti, ne voivat myös jäädä kokonaan värjäytymättä (Tortora ym. 1995, 63). Jotkin bakteerit, jotka normaalisti värjäytyisivät gram-positiiviseksi nuorena kasvustossa, menettävät kykynsä värjäytyä gram-positiiviseksi vanhemmassa kasvustossa. Tämä siksi, että vanhemmissa kasvustoissa on usein mukana kuolevia soluja, joilla on mädäntyvät soluseinät jotka eivät kykene pitämään kristallivioletin ja jodin kompleksia sisällään värinpoiston aikana alkoholin haurastuttaessa mädäntyviä soluseinämiä entisestään. (Lim 1998, 26.)

Gram-reaktio on luotettava, mikäli käytetään nuoria, kasvavia bakteereita. Monissa tapauksissa bakteerin gram-reaktio tuottaa taudin hoitoon liittyvää arvokasta tietoa lääkärille. Tästä esimerkkinä gram-positiiviset bakteerit, jotka saadaan yleensä tapettua helposti penisilliineillä. Vastaavasti gram-negatiiviset bakteerit kykynevät vastustamaan penisilliinien tehoa, mutta ovat heikompia tetrasykliineille. Jo pelkkä bakteerin gram luokitus voi auttaa määrittämään mikä lääke tehoaa tautiin parhaiten. (Tortora ym. 1995, 63; Lim 1998, 26.)

7.5 Bioanalyytikosta johtuvien virheiden vähentäminen

Vaikka gram menetelmä vaikuttaa hyvin yksinkertaiselta on siinäkin mahdollisuus pilata hyvin otettu näyte väärällä käsittelyllä laboratoriossa. Huolellinen laboratoriotyöskentely on tärkeää, jotta vältytään bioanalyytikon aiheuttamilta virheiltiltä (Meurman 2010, 54).

Oikean näytemäärän ja sopivanpaksuisen preparaatin valmistaminen vaatii harjoittelua. Liian niukasta näytemäärästä lasilla ei pystytä antamaan luotettavaa tulosta. Liian paksussa valmisteessa gram-negatiiviset bakteerit voivat jäädä sinisiksi värinpoistosta huolimatta. Tästä syystä on tärkeää etsiä preparaatista edustavia kohtia ja tarkastella preparaattia useista eri kohdista. (Meurman 2010, 55.)

Gram-värjäyksessä näytteen kiinnitys lasille on hyvin tärkeä vaihe. Etenkin oikeanlainen lasin liekitys vaatii bioanalytikolta kokemusta. Liekkikiinnityksessä on kolme eri vaihtoehtoa; liian viileä liekitys, sopiva liekitys, liian kuuma liekitys. Liian viileällä liekityksellä näyte ei kiinnity kunnolla lasiin ja näyte saattaa huuhtoutua värjäys reagensseihin tehden niistä käyttökelvottomia kontaminaation takia. Liian kuuma liekitys vääristää solun ominaisuuksia. Tällä vääristymällä ei ole kovin suurta merkitystä, mikäli halutaan tutkia vain bakteerien värjäytymistä ja solumorfologiaa hyvin pintapuolisesti. Vääristymä aiheuttaa kuitenkin ongelmia diagnostiikassa, mikäli bakteerisoluja halutaan tutkia tarkemmin esimerkiksi muotojen ja ryhmittymisten perusteella. (Lim 1998, 26; Smith & Hussey 2012, hakupäivä 27.1.2013.)

8 OPISKELUMATERIAALIN LUOMINEN

Oulun ammattikorkeakoulun Mikrobiologia I kurssin opintojaksokuvauksen mukaan opiskelija osaa muun muassa tunnistaa mikrobien solurakenteet ja yleiset ominaisuudet sekä niiden kasvuun ja lisääntymiseen vaikuttavat tekijät. Lisäksi opiskelija on perehtynyt yleisimpiin mikrobiologian menetelmiin ja osaa arvioida kliinisen mikrobiologian laboratorion tutkimusprosessia sekä menetelmien laatua. Opiskelijan on hallittava tärkeimmät taudinaiheuttajabakteerit, niiden ominaisuudet ja esiintyvyys sekä diagnostiikka. (Oulun ammattikorkeakoulu, hakupäivä 8.6.2014.)

Tavoitteena on tehdä opiskelumateriaalista mahdollisimman yksinkertainen ja helppolukuinen niin, että se on ymmärrettävissä opiskelijalle jolla ei ole aikaisempaa kokemusta mikrobiologiasta. Tekstin sisällön yksinkertaisuuden lisäksi kiinnitetään huomiota myös ulkoasun yksinkertaisuuteen. Ulkoasultaan ja tekstityypiltään yksinkertainen materiaali on helpommin lähestyttävissä. Se on myös mielekkäämpi ja nopealukuisempi, kuin visuaalisesti haastavannäköinen.

Noudatan opiskelumateriaalissa typograafisia perusohjeita, joihin tutustuin materiaalin luontia varten. Itkosen mukaan silmä seuraa luettavaa tekstiriviä ja hahmottaa kerrallaan 5 – 10 kirjainta eli noin kaksi sanaa. Silmän totumuksen perusteella on saatu määriteltyä ihantaallinen pituus tekstiriville. Helppolukuisella rivillä pitäisi olla vähintään 35 – 40 merkkiä. Tätä lyhyemmät rivit saavat lukijalle aikaan turhia rivinvaihtoja jotka aiheuttavat katkoja lukemiseen ja näin hankaloittaa tekstin seuraamista. Ihanteelliseksi rivin mitaksi on arvioitu 55 – 60 merkkiä. Rivien luettavuus alkaa huononemaan, mikäli merkkimäärä kasvaa yli arvion. (1999, 11.)

Pienaakkoset ovat nopeammin ja helpommin luettavissa kuin suuraakkoset. Tästä huolimatta pienaakkosissakin on selkeitä eroja eri kirjasintyyppien välillä. Useissa tutkimuksissa on todettu, että antiikvateksti on helppolukuisempaa kuin groteski teksti. Tämä johtuu antiikva merkkien vaakasuorista pääteviivoista, jotka ohjaavat silmää ja auttavat pysymään rivillä. *Leipätekstin* pistekokona käytetään normaalisti kokoja 9 – 12. Suositusta pienemmät koot ovat vaikealukuisia ja suositusta suuremmat koot ovat käytössä otsikoinnissa. (Itkonen 1999, 9,16-17.)

Opinnäytetyön raportissa olen käyttänyt Oulun ammattikorkeakoulun opinnäytetyön ohjeen suosittamaa groteski kirjasintyyppiä *Arial Narrowia*. Toteuttamaani opiskelumateriaaliin haluan kuitenkin valita luettavammaksi todetun antiikvatekstin ja kirjasintyypiksi valitsin *Times New Romanin*. Käytän sekä raportissa että opiskelumateriaalissa Oulun ammattikorkeakoulun opinnäytetyön ohjeen suosittamaa pistekokoa 12, joka todetaan myös typografian teoksissa normaaliin leipätekstiin sopivaksi kirjasinkooksi.

Opiskelumateriaalin oli alun perin tarkoitus sisältää vain preparaatin tarkasteluun liittyvää materiaalia. Opiskelumateriaalin sisältöön liittyvään kyselyyn vastanneista opiskelijoista 63,3% oli kuitenkin sitä mieltä, että opiskelumateriaalin olisi hyvä olla sisällöltään hieman laajempi. Esimerkiksi tietoa värjäyksen toimintaperiaatteista ja virhelähteistä kaivattiin. Opiskelumateriaalin on tarkoitus vastata mahdollisimman hyvin opiskelijoiden tarpeisiin, joten päätin laajentaa materiaalin sisällön laajuutta. Kävin läpi kyselylomakkeista saamiani ehdotuksia ja täydensin materiaalin sisältöä niiden pohjalta.

Eräs kyselyyn vastanneen opiskelijan kommentti ilahdutti minua erityisesti. Hänkin toivoi sisällöltään laajempaa opiskelumateriaalia ja kommentoi näin: "Nyt joutuu käyttämään paljon aikaa tiedon hakuun eri lähteistä." Tuohon kommenttiin kiteytyy koko ajatus siitä, miksi teen opinnäytetyönä opiskelumateriaalia. Tarkoitus on helpottaa opiskelijoiden työtaakkaa. Mikrobiologiasta on olemassa paljon materiaalia, mutta gram-värjäyksen syvällisempi tietous on hyvin hajanaisesti saatavilla.

Kyselystä poimittuja opiskelijoiden kommentteja, kun kysymyksenä oli; Kaipaisitko oppimateriaaliin osiota gram- värjäyksestä? Esimerkiksi värjäyksen suorittamisesta, toimintaperiaatteista tai virhelähteistä.

"Ois kiva, jos osiossa kerrotaisiin mitä eri vaiheet tekee ja vaikuttaa lopputulokseen"

"Olisi hyvä selittää gram- värjäyksen periaate"

"Virhelähteistä voisi olla hyvä olla jotakin, mutta silloin kai pitäisi olla myös perusasiat värjäyksen suorittamisesta ja toimintaperiaatteista"

”Enemmän tietoa värjäyksen toimintaperiaatteista ja tulkinnasta”

Kyselyn vastauksista kävi myös ilmi opiskelijoiden erilaisuus. Opiskelijoilla on erilaiset tottumukset tiedonhaussa sen löytämisessä sekä hyödyntämisessä. 13,3% vastanneista oli sitä mieltä, että informaatiota on paljon saatavilla ja tietoa gram- värjäyksestä kokonaisuudessaan löytyy jo olemassa olevasta opiskelumateriaalista. Joten he eivät kaivanneet oppimateriaaliin mitään ylimääräistä tietoa preparaattien tarkastelu osion rinnalle. Vastanneista 16,6% totesi, että opiskelumateriaalin sisällön laajentamisesta ”ei olisi haittaa” ja 6,7% jätti vastaamatta kysymykseen.

9 POHDINTA

Tutkiessani bakteereiden molekyyliarakenteita ja biokemiaa sekä gram reagenssien reagointia bakteereihin alkoi työni aihe tuntua omalta ja olen tyytyväinen saamaani aiheeseen. Vaikka aiheeni on gram värjättyjen lasien tarkastelu oli mielestäni oleellista syventyä myös bakteereiden rakenteeseen tarkemmin. Tämä auttoi sisäistämään gram menetelmän toimintatapaa ja tätä kautta pääsin syventymään opinnäytetyön aihealueen taustatekijöihin.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli luoda opiskelumateriaalia gram-värjättyjen bakteeripreparaattien tarkastelusta bioanalytiikan opiskelijoille, mikrobiologian peruskurssille. Tavoitteena oli kerätä opiskelijoille selkeä tietopaketti gram-värjäyksen tarkastelun pääkohdista, joiden avulla pääsee alkuun preparaattien mikroskopoinnissa. Opinnäytetyön haasteena oli saada opiskelumateriaalista mahdollisimman kattava, mutta kuitenkin helppolukuinen sekä mielenkiintoa herättelevä myös heille, joita mikrobiologia ei juurikaan kiinnosta. Opinnäytetyö on kaksiosainen. Kirjallisen opiskelumateriaalin lisäksi opinnäytetyö sisältää bakteeripreparaatteja. Oulun ammattikorkeakoululla on gram-värjättyjä bakteeripreparaatteja jo ennestään, mutta osa niistä on vanhoja joissa värit ovat haalistuneita eivätkä ne enää ole mikroskopointi kelpoisia. Koulun toiveena oli saada päivitystä preparaatteihin, joten kirjallisen tuotoksen lisänä kasvatin bakteereita ja valmistin niistä preparaattit opiskelijoiden käyttöön. Opiskelija voi preparaatteja mikroskopoidessa käyttää tukenaan kirjallista opiskelumateriaalia.

Huolellisesta laboratoriotyöskentelystä huolimatta preparaattien valmistus ei mennyt aivan suunnitelmien mukaan. Osa ATCC bakteerikannoista ei alkanut kasvamaan useammasta viljely yrityksestä huolimatta. Tässä vaiheessa opinnäytetyön ulkopuolelle karsiutui kasvamattomat bakteerit. Myöskään värjäys ei sujunut ongelmitta ja osa bakteereista värjäytyi väärin. Täysin väärin värjäytyneet bakteerit karsittiin pois opinnäytetyöstä, jotta ne eivät turhaan sekoita peruskurssin opiskelijoita. Opinnäytetyöhön jäi kuitenkin mukaan myös laseja, joista opiskelija voi havainnoida tietyn bakteerin erilaista värjäytyvyyttä. Valmistin opinnäytetyötä varten 70 kpl bakteeripreparaatteja, joista lopulta 56 kpl päätyi mukaan opinnäytetyöhön. 14 kpl preparaatteja hylättiin erinäisten virheiden vuoksi.

Työn suurimpana haasteena oli relevantin kirjallisuuden löytäminen sekä opiskelumateriaalin sisällön rakentaminen. Kuinka opiskelumateriaalista saataisiin mahdollisimman tarpeita vastaava. Sisällön suunnittelussa käytin tukena bio2sn vuosikurssin opiskelijoita, jotka parhaillaan suorittivat mikrobiologian peruskurssia. He saivat mikroskopoida opinnäytetyötä varten valmistettuja bakteeripreparaatteja sekä vastata laatimaani kyselylomakkeeseen. Kyselyn avulla sain arvokkaita vastauksia opiskelumateriaalin sisältöön liittyen. Vastauksissa oli nähtävillä yksi päälinja jonka pohjalta muutin opiskelumateriaalin sisällön laajemmaksi, vastaamaan paremmin opiskelijoiden toiveita ja tarpeita.

Vaikka menetelmä on vanha se on edelleen yksi tärkeimmistä bakteriologian tunnistusmenetelmistä. Gram-värijäys vaikuttaa teknisesti hyvin yksinkertaiselta menetelmältä, mutta se sisältää kuitenkin useita vaiheita jotka väärin suoritettuina voivat vaikuttaa virheellisesti värjäystulokseen. Haastavin osuus gram-värijäyksessä on preparaatin tulkinta, joka ei aina ole helppoa kokeneellekään bioanalyttikolle. Luotettava tulkinta vaatii teoretiedon lisäksi paljon harjoittelua ja kokemusta. Bakteeripreparaattia mikroskopidessa on otettava huomioon paljon pieniä tekijöitä, joista vain pieni osa käydään läpi mikrobiologian peruskurssilla.

Opiskelumateriaalia tehdessä oli otettava huomioon kurssin sisältö ja opiskelijoiden taso. Ei ole tarkoituksenmukaista laittaa peruskurssin opiskelumateriaaliin liian yksityiskohtaista ja monimutkaista ”nippelitietoutta.” Pyrin säilyttämään opiskelumateriaalin sisällön yksinkertaisena ja tuomaan esille tärkeimmät pääkohdat, joiden pohjalta pysyy aloittamaan bakteeripreparaattien mikroskopoinnin harjoittelun.

Gram-värijäyksestä löytyy paljon kirjallisuutta, mutta tieto on hyvin hajanaista ja pääasiassa vain pintapuolista tietoa menetelmästä. Oli haastavaa löytää kirjallisuutta, jossa syvennyttään menetelmän lisäksi valmiiden preparaattien tulkintaan. Olen käyttänyt työssäni uusien lähteiden lisäksi myös vanhoja lähteitä. Gram-värijäyksen ja bakteriologian perusteet eivät ole juurikaan muuttuneet vuosikymmenten aikana, siksi uskalsin käyttää lähteenä usein mikrobiologian teoksien lisäksi myös 90-luvulta peräisin olevia teoksia. Kattavin tieto löytyi ulkomaisista lähteistä ja ajantasaisin tieto internet lähteistä, joista pystyi myös vertailemaan pitääkö painetun kirjallisuuden perustiedot paikkaansa vielä tänäpäivänä.

Olen kuvannut itse opiskelumateriaalin mikroskooppinäkyä kuvat. Olisin toivonut kuvista parempilaatuisia, mutta mielestäni onnistuin kuitenkin saamaan niin hyvät kuvat kuin mahdollista käytössä olevan kaluston huomioon ottaen. Opiskelumateriaali on tarkoitus laittaa opiskelijoille jakoon sähköisesti muiden mikrobiologian kurssimateriaalien tavoin. Bakteeripreparaattikansion yhteyteen laitetaan kuitenkin kirjallinen kappale opiskelumateriaalista. Tulostus heikentää mikroskooppinäkyä kuvien laatua entisestään. Toivon, että opiskelumateriaali päätyisi aktiiviseen käyttöön opiskelijoiden keskuuteen vaikka valokuvien laatu ei olekaan paras mahdollinen. Ennenkaikkea toivon, että opiskelumateriaalista on oikeasti hyötyä bakteeripreparaattien mikroskopointia aloitteleville opiskelijoille.

LÄHTEET

Alcamo, I. E. 2001. Fundamentals of Microbiology. 6th edition. London: Jones -and Bartlett Publishers International, 75-80.

Aluehallintovirasto. 2013. Mikrobiologian luvat. Hakupäivä 11.4.2014.
<https://www.avi.fi/web/avi/mikrobiologian-luvat#.U0glZldlvoQ>.

ATCC 2012. About ATCC. Hakupäivä 9.3.2013.
http://www.lgcstandards-atcc.org/en/About/About_ATCC/Who_We_Are.aspx.

Aula, P. 2006. Paikannuksen uudet innovaatiot ja yksityisyyden arvot. Teoksessa T. Inkinen & J. Jauhiainen (toim.) Tietoyhteiskunnan maantiede. Helsinki: Gaudeamus, 191–208.

Carlson, P. & Koskela, M. 2011. Bakteriologiset tutkimukset. Teoksessa K. Hedman, T. Heikkinen, P. Huovinen, A. Järvinen, S. Meri & M. Vaara (toim.) Infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 37-39, 53.

Church, D., Melnyk, E. & Unger, B. 2000. Quantitative gram stain interpretation criteria used by microbiology laboratories in Alberta, Canada. Journal of Clinical microbiology. American Society for Microbiology. Hakupäivä 26.1.2014. <http://jcm.asm.org/content/38/11/4266.full?sid=12eada05-27c9-4de5-8259-9d5923905ed4>.

Harley, J. P., Klein, D. A. & Prescott, L. M. 1996. Microbiology. Third edition. Dubuque, IA: Wm. C. Brown Publishers, 25, 27.

Heikkilä, R. & Meurman, O. 2005. Bakteriologia. Teoksessa S. Hellstén (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Suomen Kuntaliitto. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 31-32.

Heino, J. & Vuento, M. 2004. Solun rakenne ja evoluutio. 2. uusitettu painos. Porvoo: WS Bookwell Oy, 73.

Helsingin yliopisto. 2006. Projektinhallinta. Yleisen kielitieteen laitos, Humanistinen tiedekunta. Hakupäivä 7.3.2013.

<http://www.ling.helsinki.fi/kit/2006k/ct310pro/yleista/maaritelma.shtml>.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2010. Tutki ja kirjoita. 15. — 16. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi, , 32, 45, 113-114, 139, 195

Itkonen, M. 1999. Typoteesejä. Tarkan typografian opas. Tampere: Tammer-Paino Oy, 9,11, 16-17.

Labquality. Gramvärjäys, pesäkevärjäys. Pesäkkeiden gramvärjäyksen ulkoinen laadunarviointikierrros. Hakupäivä 11.4.2014.

<http://www.labquality.fi/fi/laatu-ulkoinen-laadunarviointi/kierroskuvaukset/mikrobiologia-bakteriologia/5040-gram/>.

Lappalainen, M. & Vuento, R. 2007. Mikrobiologinen diagnostiikka. Teoksessa M. Mäyränpää (toim.) Therapia Fennica. Yhdeksäs laitos. Kandidaattikustannus Oy & Lääketieteenkandidaattiseura ry. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 824.

Lim, D. 1998. Microbiology. United States of America: The McGraw – Hill Companies, Inc., 18-21, 25-26.

Meurman, O. 2010. Gramvärjäykset. Moodi 2010 (1), 54-56.

Opetus- ja kulttuuriministeriö. Ammattikorkeakoulutus ja sen kehittäminen. Hakupäivä 11.4.2014. <http://www.minedu.fi/OPM/Koulutus/ammattikorkeakoulutus/?lang=fi>.

Opetushallitus 2007. Näyttävä hanke. Henkilökohtaistamisstrategia näyttötutkinnoissa. Hakupäivä 9.3.2013. http://www.nayttava.fi/Projektinhallinta_kouluttajamateriaali.pdf.

Oulun ammattikorkeakoulu. Opintojaksokuvaus, Mikrobiologia I. Hakupäivä 8.6.2014.
https://oiva.oamk.fi/tietoa_opiskelusta/opintojen_suunnittelu/opintojen_rakenne/opas/koulutusohje_lmat/?sivu=oj_kuvaus&koodi1=O1048BA&kieli=FI&opas=2014-2015&vuosi=14S15K.

Puhakka, J. & Salkinoja – Salonen M. 2002. Mikrobisolujen rakenne. Teoksessa M. Salkinoja – Salonen (toim.) Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 92 – 98.

Reagena Oy. 2003. Gram värjäysliuokset, käyttöohjeet. Hakupäivä 27.1.2013
http://www.reagena.fi/www/en/products/pdf/instructions/Gram_fin.pdf.

Rissanen, T. 2002. Projektilla tulokseen. Jyväskylä: Gummerus kirjapaino Oy, 14,16, 57.

Smith, A. & Hussey, M. 2012. Gram Stain Protocols. Hakupäivä 27.1.2013
<http://www.microbelibrary.org/component/resource/gram-stain/2886-gram-stain-protocols>.

Solanterä, T. 2010. Projektihallintamenetelmien pm methodology ja scrum yhdistäminen. Opinnäytetyö. Kymenlaakson ammattikorkeakoulu. Hakupäivä 9.3.2013.
http://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/12459/Solantera_Terhi.pdf?sequence=1.

Stenlund, H. 1999. Projektijohtamisen perusteet. Espoo: Promanet Oy, 14.

Tortora, G., Funke, B. & Case, C. 1995. Microbiology. 5th edition. United States of America: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 61-63, 79

Vaara, M., Sarvas, M. & Mäkelä, P. 1998. Bakteerien rakenne. Teoksessa A. Tiilikainen, M. Vaara & A. Vaehri (toim.) Lääketieteellinen mikrobiologia. 8. uudistettu painos. Kustannus Oy Duodecim. Vammala: Vammalan Kirjapaino Oy, 294 – 300.

LIITTEET

VÄRJÄYSOHJE

LIITE 1

1. Kiinnitä näyte lasille ilmakeivauksella ja liekityksellä tai 1min. metanolissa.
2. Värjää näyte kristallivioletilla 1min.
3. Pese lasi juoksevan hanaveden alla 2sek.
4. Kiinnitä kristallivioletti lugolin liuoksella 1min.
5. Pese lasi juoksevan hanaveden alla 2sek.
6. Pese asetonietanolilla 20 – 30 sek.
7. Pese lasi juoksevan hanaveden alla 2sek.
8. Värjää sarfariinilla 30sek. – 1min.
9. Pese preparaatti nopeasti juoksevan hanaveden alla, kunnes ylimääräinen väri on irronnut.
10. Kuivaa preparaatti imupaperilla.

(Smith & Hussey 2012, hakupäivä 27.1.2013; Reagen 2003, hakupäivä 27.1.2013.)

Huomioitavaa:

- Pidä lasi viistossa veden virtaukseen nähden, älä laske vettä suoraan näytteeseen.
- Imeytä enimmäkseen vedet paperiin vesipesujen jälkeen, jottei ylimääräinen vesi laimenna liuoksia

1. Mitä bakteeripreparaattia tarkastelit?

2. Mitä lasilla näkyi? (Oliko bakteeri gram-positiivinen vai gram-negatiivinen, kokki vai sauva)

3. Näkyikö preparaatissa jotain muuta? Mitä?

4. Oliko preparaatti mielestäsi laadukas? Perustele lyhyesti.

5. Mikä preparaattien tarkastelussa on mielestäsi haasteellista?

6. Minkälaista oppimateriaalia kaipaisit tarkastelun tueksi?

7. Onko sinulle selvää miten ja miksi gram-värjäystä käytetään?

8. Kaipaisitko oppimateriaaliin osiota gram- värjäyksestä? (Esimerkiksi värjäyksen suorittamisesta, toimintaperiaatteista tai virhelähteistä)

9. Vapaa sana.

Kiitos vastauksesta!