

Anna Nokkanen ja Ira Tikkanen

# Tunnettujen ATCC-kantojen säilyvyys kahdessa eri nestekuljetusputkessa

Opinnäytetyö

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

30.10.2014

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Anna Nokkanen ja Ira Tikkanen Tunnettujen ATCC-kantojen säilyvyys kahdessa eri nestekuljetusputkessa 36 sivua + 2 liitettä 30.10.2014
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Risto Hilla, Kliininen asiantuntija Riitta Lumme, Yliopettaja
<p>Perinteisesti bakteriologisten näytteiden ottoon ja kuljetukseen on käytetty geelikuljetusputkia, jolloin näytteet täytyy viljellä manuaalisesti. Viljelyautomaation yleistyttyä on alettu käyttää viljelyautomaatteihin soveltuvia nestekuljetusputkia. Näyteastiassa (nestekuljetusputki ja geelikuljetusputki) tulee olla oikeat olosuhteet eri bakteereille ja mahdollisten taudinaiheuttajien tulee säilyä hengissä sekä rikastumatta säilytyksen ja kuljetuksen ajan, jotta näytteen laatu pysyisi luotettavana.</p> <p>Opinnäytetyössä tutkittiin tunnettujen American Type Culture Collection (ATCC) -bakteerikantojen säilyvyyttä eSwab®- sekä Puritan Liquid Amies Transport system (PLAT®) -nestekuljetusputkissa. Opinnäytetyöhön valittiin kasvu- ja säilytysvaatimuksiltaan eroavia aerobisia sekä anaerobisia kokki- ja sauvabakteereita. Opinnäytetyö suoritettiin HUSLABin kliinisen bakteriologian osastolla. Bakteerien säilyvyyttä tutkittiin 0, 6, 24, 48 sekä 72 tunnin kuluttua kuvitellusta näytteenottohetkestä sekä huoneenlämmössä että jääkaappilämpötilassa säilytettynä. Näytteet viljeltiin maljoille eri aikapisteissä ja bakteeripesäkkeet laskettiin 18–48 tunnin kuluttua viljelystä.</p> <p>Opinnäytetyön tulosten perusteella voimme todeta käytettyjen ATCC-kantojen säilyvän tutkimuskelpoisina eSwab®-nestekuljetusputkessa 48 tunnin säilytyksen ajan, mikäli putki on säilytetty jääkaappilämpötilassa. PLAT®-nestekuljetusputkessa säilytettynä käytetyt ATCC-kannat säilyivät jääkaappilämpötilassa 48 tunnin säilytyksen ajan, poikkeuksena <i>Prevotella melaninogenica</i> sekä <i>Haemophilus influenzae</i>, joiden säilyvyys oli näillä kannoilla huonompi. Tulosten perusteella ei suositella nestekuljetusputkien säilytystä huoneenlämpötilassa, mikäli säilytysaika on yli 6 tuntia. Jääkaappilämpötilassa säilytettynä bakteerien määrä näytteessä kuvaa lähtötasoa (näytteenottohetkeä) jopa 72 tunnin säilytyksen ajan (poikkeuksena <i>N. gonorrhoeae</i>, <i>H. influenzae</i>). Jotta kaikki mahdolliset patogeeniset löydökset kuitenkin saataisiin kiinni, olisi näytteet viljeltävä viimeistään 48 tunnin kuluttua.</p>	
Avainsanat	ATCC, nestekuljetusputki, bakteerien säilyminen, eSwab®, PLAT®

Authors Title Number of Pages Date	Anna Nokkanen ja Ira Tikkanen Survival of ATCC- samples in Two Different Liquid Amino Transport Tubes 36 pages + 2 appendices 30 October 2014
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Risto Hilla, Clinical Expert Riitta Lumme, Principal Lecturer
<p>The traditional way to collect bacteriological samples is to use gel transports tubes that are cultured manually. Automated inoculation instrument becoming general the use of liquid amino transport tubes is now more common. The transport tube has to have right conditions for different bacteria, possible pathogens has to stay viability through the storage and transport.</p> <p>The purpose of our final project was to find out the survival of American Type Culture Collection (ATCC)-samples in liquid amino transport tubes. For the final project were used aerobic and anaerobic gram-positive and gram-negative bacteria. We discovered preservation in two different liquid amino transport tube: eSwab® and Puritan Liquid Amino Transport System (PLAT®)-Liquid amies transport tubes. Final project was done in a co-operation with HUSLAB, the division of clinical microbiology, Helsinki, Finland. Samples were cultured to maintenance medium after 0, 6, 24, 48 and 72 hours. The colony formit units were calculated after 18-48 from the culture. The specimens were stored both at the room temperature and refrigerator temperature.</p> <p>In our final project we detected that the used ATCC-samples survived 48 hours in eSwab®-tube if they were stored in refrigerator temperature. ATCC-samples survived 48 hours in PLAT®-tube if they were stored in refrigerator temperature, exception <i>Prevotella melaninogenca</i> and <i>Haemophilus influenzae</i> which did not survive that well. Based on our study we do not recommend storage at room temperature if the storage time is more than 6 hours. Storage in refrigerator temperature is generally recommendable.</p>	
Keywords	ATCC, liquid transport tube, survival of bacteria, eSwab®, PLAT®

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Bakteerien säilyvyyteen ja kasvuun vaikuttavat tekijät	1
2.1	Opinnäytetyössä käytetyt nestekuljetusputket	4
2.1.1	eSwab®- ja PLAT®-nestekuljetusputkien ominaisuudet	4
2.2	Opinnäytetyössä käytetyt kasvualustat	5
3	American Type Culture Collection -kannat	7
3.1	Tutkittavat ATCC-kannat	8
3.1.1	Aerobibakteerit	8
3.1.2	Anaerobibakteerit	10
4	Opinnäytetyön tarkoitus ja tutkimuskysymykset	10
5	Toteutus	11
5.1	Käytännön toteutus	12
5.1.1	Suspensioiden valmistus	13
5.1.2	Laimennossarja	13
5.1.3	Viljely	14
6	Tulokset	16
6.1	Opinnäytetyössä käytettyjen ATCC-kantojen säilyvyys, aerobibakteerit	16
6.1.1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> säilyvyys	17
6.1.2	<i>Streptococcus pyogenes</i> säilyvyys	18
6.1.3	<i>Staphylococcus aureus</i> säilyvyys	20
6.1.4	<i>Escherichia coli</i> säilyvyys	21
6.1.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> säilyvyys	23
6.1.6	<i>Haemophilus influenzae</i> säilyvyys	24
6.2	Opinnäytetyössä käytettyjen ATCC-kantojen säilyvyys, anaerobibakteerit	25
6.2.1	<i>Bacteroides fragilis</i> säilyvyys	26
6.2.2	<i>Prevotella melaninogenica</i> säilyvyys	27
6.3	Tulosten yhteenveto	28
7	Luotettavuus ja eettisyys	31
8	Pohdinta	32

Liitteet

Liite 1. Bakteripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä eSwab®-nestekuljetusputkessa

Liite 2. Bakteripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä PLAT®-nestekuljetusputkessa

## 1 Johdanto

Perinteisesti bakteriologisten näytteiden ottoon ja kuljetukseen on käytetty geelikuljetusputkia, jolloin näytteet täytyy viljellä manuaalisesti. Viljelyautomaation yleistymisen myötä on alettu käyttää viljelyautomaatteihin soveltuvia nestekuljetusputkia. Näyteastiassa (nestekuljetusputki ja geelikuljetusputki) tulee olla oikeat olosuhteet eri bakteereille ja mahdollisten taudinaiheuttajien tulee säilyä hengissä sekä rikastumatta säilytyksen ja kuljetuksen ajan, jotta näytteen laatu pysyisi luotettavana.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia tunnettujen American Type Culture Collection (ATCC) -bakteerikantojen säilyvyyttä kahdessa eri nestekuljetusputkessa. Työhön valittiin kasvu ja säilytysvaatimuksiltaan eroavia aerobisia sekä anaerobisia kokki- ja sauvabakteereita. Opinnäytetyössä käytettiin Copanin valmistamaa eSwab®-nestekuljetusputkea sekä Puritan diagnosticsin valmistamaa Puritan Liquid Amies Transport system (PLAT®) -nestekuljetusputkea. Opinnäytetyö suoritettiin HUSLABin kliinisen bakteriologian osastolla. Bakteerien säilyvyyttä tutkittiin eSwab®- sekä PLAT®-nestekuljetusputkessa 0, 6, 24, 48 sekä 72 tunnin kuluttua kuvitellusta näytteenottohetkestä sekä huoneenlämmössä että jääkaappilämpötilassa säilytettynä. Näytteet viljeltiin maljoille eri aikapisteissä ja bakteeripesäkkeet laskettiin 18–48 tunnin kuluttua viljelystä. Bakteriologisten näytteiden pidempiaikaista säilyttämistä ei suositella, mutta joskus näytteitä joudutaan säilyttämään esimerkiksi viikonlopun yli ja siksi on tärkeää tietää, kuinka kauan bakteerit näytteessä säilyvät ja missä lämpötilassa niitä olisi parasta säilyttää.

Ohjaajina toimivat HUSLABin bakteriologian osaston kliininen asiantuntija Risto Hilla ja Metropolia ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman yliopettaja Riitta Lumme. Opponoina toimivat bioanalytiikan opiskelijat Asta Viljanen ja Piia-Riikka Pippola.

## 2 Bakteerien säilyvyyteen ja kasvuun vaikuttavat tekijät

Bakteerit ovat yksisoluisia, mikroskooppisen pieniä sekä suhteellisen yksinkertaisia organismeja joiden tarkastelu vaatii yleensä mikroskoopin käyttöä. Kiinteällä kasvualustalla kasvanut bakteeri havaitaan silminnähdessä pesäkkeinä, jotka koostuvat sadoista miljoonista tai jopa tuhannesta miljoonasta erillisestä bakteerisolusta. (Vaara – Skurnik –

Sarvas 2010: 14–15.) Bakteerit jaetaan soluseinänsä rakenteen perusteella gramnegatiivisiin ja grampositiivisiin lajeihin. Gramnegatiivisilla bakteereilla on ohuempi peptidoglykaanikerros kuin grampositiivisilla bakteereilla ja niillä on sen lisäksi myös ulkomembraani. (Bakteerisolun ulkoiset rakenteet. Solunetti 2006.) Myös muoto vaikuttaa bakteerien jaotteluun. Muotoja on pääpiirteittäin neljä: sylinterinmuotoiset sauvat, pyöreät tai munan muotoiset kokit, kierteiset spirillit sekä tiukasti kiertyneet spirokeetat. (Morfologia. Solunetti 2006.)

Bakteerinäytteiden analytiikassa on ensiarvoisen tärkeää preanalyttiset tekijät. Näyte tulee ottaa oikeasta paikasta oikealla näytteenottovälineellä sekä kuljettaa oikeassa lämpötilassa tutkivaan laboratorioon välttämällä pitkiä seisotusaikoja. Näytteen tulee siis kuvastaa mahdollisimman todenmukaisesti näytteenottokohdan sen hetkistä bakteerimäärää. Bakteeripesäkkeiden määräsuhteet vaikuttavat tehtäviin jatkotutkimuksiin. (Tuokko – Rautajoki – Lehto 2008: 90-91.)

Näytettä otettaessa tulee kiinnittää huomiota oikeaan näytteenottotekniikkaan ja aseptiikkaan välttämällä näytteenottotikun kosketusta terveeseen ihoon tai limakalvoon. Näyte tulee ottaa infektoituneesta kohdasta. Näytteenottotikun osuessa muualle kuin näytteenottokohtaan elimistön normaaliflooraa voi joutua näytteeseen, mahdollisesti peittäen alteen patogeeniset löydökset. (Tuokko – Rautajoki – Lehto 2008: 90–91.)

Näytteenottovälineiden ja kuljetusastioiden on oltava käyttökelpoisia ottaen huomioon viimeiset käyttöpäivämäärät. Kuljetusastiat, kuten geelikuljetusputket sekä nestekuljetusputket, tarjoavat bakteereille suojan kuivumiselta ja hapelta sekä estävät niiden lisäkasvua. (Tuokko – Rautajoki – Lehto 2008: 90–91.)

Bakteerien kasvuun vaikuttavat mm. ympäristön lämpötila, happipitoisuus ja pH sekä kasvualustan koostumus. Bakteereiden kasvuun vaikuttaa myös ympäristön kosteus, jota monet bakteerit tarvitsevat kasvaakseen. (Salkinoja-Salonen 2002: 191, 200).

Bakteerien ominainen kasvulämpötila-alue saattaa vaihdella -15–105 °C välillä. Kasvulämpötila-alue saattaa vaihdella esimerkiksi ravinteiden saatavuudesta riippuen. Optimi-  
lämpötila, jossa bakteerit kasvavat parhaiten, on ihmisten yleisimmillä taudinaiheuttajilla noin 37°C. (Niemelä 2002: 191–193.)

Bakteereita jaotellaan myös hapentarpeen mukaan. Happea elääkseen tarvitsevia bakteereita kutsutaan aerobeiksi ja happea sietämättömät bakteerit ovat anaerobeja. Monet bakteerit pystyvät elämään sekä hapekkaassa että vähähappisessa ympäristössä: näitä kutsutaan fakultatiivisiksi anaerobeiksi tai fakultatiivisiksi aerobeiksi. Mikroaerobeiksi kutsutaan niitä bakteereita, jotka kykenevät kasvamaan pienissä happipitoisuuksissa. Eräät bakteerit tarvitsevat kasvaakseen ilmaa, johon on lisätty 10 % hiilidioksidia, nämä ovat nimeltään kapnofiilisiä bakteereita. (Vaara ym. 2010: 35–36). Useimmat patogeeniset bakteerit kasvavat parhaiten hieman alkalisessa pH:ssa, pH 7.2–7.6 (Elliott – Worthington – Osman – Gill 2007: 9).

Bakteereiden kasvatusalustana voidaan käyttää niin kiinteää kuin nestemäistä kasvualustaa. Opinnäytetyössä käytettiin kiinteitä agarpohjaisia viljelymaljoja kasvualustoina.

Agarpohjaisten kasvualustojen ominaisuuksia:

- Monet bakteerit kasvavat yksinkertaisella kasvatusalustalla, johon on lisätty polypeptidejä, aminohappoja sekä suoloja ja vitamiineja sisältäviä ainesosia.
- Rikastettuihin kasvualustoihin on lisätty lisäravinteita; vaativampia kasvuolosuhteita tarvitsevat bakteerit viljellään yleisesti näille maljoille. Maljoja ovat mm. veri- ja suklaamaljat.
- Selektiivisten kasvualustojen tarkoitus on edistää tiettyjen bakteerien kasvua, samalla estäen toisten bakteerien kasvun. Maljat voivat sisältää sappisuoloja, jotka mahdollistavat sappea sietävien bakteerien kasvun, sekä antibiootteja, jotka mahdollistavat vain näitä antibiootteja kestävien bakteerien kasvun samalla vaihtaen tai tappaen muut bakteerit.
- Indikaattorikasvualustojen tarkoituksena on havaita tietyt bakteerit jo maljan värinmuutoksen perusteella. Maljojen toiminta perustuu yleisesti sokerien fermentoitumiseen, joka aiheuttaa pH:n muutoksen takia maljan indikaattorin värin muuttumisen. Eri bakteerit käyttävät eri sokereita.

(Elliott ym. 2007: 10.)



## 2.1 Opinnäytetyössä käytetyt nestekuljetusputket

Perinteisesti bakteriologiset näytteet on otettu geelikuljetusputkeen, mutta ne eivät sovellu viljelyautomaattiin, sillä WASP®-viljelyautomaatti vaatii viljelyn suorittamiseen nestemäisen näytteen. Nestekuljetusputket voidaan viljellä WASP®-viljelyautomaatilla. Automaattiviljelyn yleistyttyä myös nestekuljetusputkien käyttö on lisääntynyt.

Opinnäytetyöhön valittiin kaksi markkinoilla olevaa rakenteeltaan ja käytöltään saman tyyppistä nestekuljetusputkea, joiden oletetaan soveltuvan markkinoilla olevien viljelyautomaattien käyttöön. Molemmat testatut putket ovat saman kokoisia ja kierrekorkillisia. Näytetikku jää kiinni putkessa olevaan korkkiin, mikä helpottaa näytteiden käsittelyä laboratoriossa.

### 2.1.1 eSwab®- ja PLAT®-nestekuljetusputkien ominaisuudet

eSwab®-nestekuljetusputkea voidaan käyttää anaerobisten, aerobisten ja vaativien bakteerien näytteenottoon ja kuljetukseen. eSwab®-nestekuljetusputkea voidaan käyttää myös antigeenien ja nukleiinihappojen osoitukseen. Putki on steriilissä paketissa, joka sisältää nailonkuitupäisen näytteenottotikun ja tarroitettun kierrekorkillisen polypropeeni näytteenottoputken. Näytteenottotikun pää on pehmeää nukkamaista nailonkuitua. Nailonkuidun tarkoitus on estää bakteerien tunkeutumista liian syvälle nukkaan, mikä edistää bakteerin irtoamista kuljetusnesteeseen. Näytteenoton jälkeen nailonkuitupäinen tikku katkaistaan putkeen, jolloin bakteerit liukenevat kuljetusnesteeseen. Näytteenottoputki sisältää 2 ml kuljetusnestettä, jonka tarkoitus on säilyttää bakteerit elinkykyisinä. Nesteessä ei ole entsyymejä tai inhibiittoreita, jotka saattavat vaikuttaa bakteerien säilymiseen. Valmistajan ohjeistuksen mukaan nestekuljetusputki tulee toimittaa tutkivaan laboratorioon huoneenlämmössä mahdollisimman pian näytteenotosta, mieluiten kahden tunnin kuluessa. Muussa tapauksessa putki tulee säilyttää jääkaappi- tai huoneenlämpötilassa riippuen näytteestä. Näytteet olisi suositeltavaa tutkia viimeistään 48 tunnin kuluessa näytteenotosta. Poikkeuksena on muun muassa *Neisseria gonorrhoeae*, joka tulee tutkia viimeistään 24 tunnin kuluttua näytteenotosta. (Copan Flock Technologies 2012.)

PLAT®-nestekuljetusputkea voidaan käyttää anaerobisten, aerobisten ja vaativien bakteerien näytteenottoon ja kuljetukseen. Viruksia, klamydiaa ja mykoplasmaa ei kuiten-

kaan suositella otettavaksi PLAT®-putkeen, sillä ne vaativat erilliset kuljetusnesteet. Kuljetusputki on steriilissä paketissa, joka sisältää vanutetun polyesterikuituisen näytteenottotikun sekä kierrekorkillisen polypropeeniputken. Näytteenottotikun polyesterikuidut mahdollistavat näytteen nopean absorption näytteenottotikkuun sekä bakteerin vapautumisen näytteenottotikusta nesteeseen. Kuljetusnestettä on 2 ml ja se sisältää ei-ravitsevaa fosfaattipuskuria. Nesteen tarkoituksena on säilyttää bakteerit elinkelpoisina. Näytteenoton jälkeen näytteenottotikku katkaistaan putken sisälle. Valmistajan ohjeituksen mukaan näyte tulee lähettää tutkivaan laboratorioon mahdollisimman pian, mielellään kahden tunnin kuluessa. Muussa tapauksessa PLAT® -nestekuljetusputki tulee säilyttää joko jääkaappi- tai huoneenlämpötilassa riippuen näytteestä. Näytteet olisi suositeltavaa tutkia viimeistään 48 tunnin kuluessa näytteenotosta. Poikkeuksena mm. *Neisseria gonorrhoeae*, joka tulee tutkia viimeistään 24 tunnin kuluttua näytteenotosta. PLAT®-putken toimivuutta ei ole arvioitu, jos säilytysaika ylittää 48 tuntia. (Puritan Medical Products.)

Nestekuljetusputket ovat ominaisuuksiltaan lähellä toisiaan. eSwab®-nestekuljetusputken näytteenottotikun nukka on nailonkuitua, kun taas PLAT®-nestekuljetusputkessa on käytetty polyesterikuitua. Näiden molempien kuitujen tarkoituksena on maksimoida näytteen absorpoituminen näytteenottotikkuun sekä vapautuminen kuljetusnesteeseen. Putkien toimivuuden kannalta on tärkeää, että näytteenottotikku katkaistaan nestekuljetusputkeen. PLAT®-nestekuljetusputken kuljetusneste sisältää ei-ravitsevaa fosfaattipuskuria, jota eSwab®-nestekuljetusputki ei sisällä.

## 2.2 Opinnäytetyössä käytetyt kasvualustat

Kasvualustat valittiin opinnäytetyössä käytettyjen ATCC-kantojen kasvuvaatimusten perusteella. (Taulukko 1.)

CLED agar on yleismalja jolla erotellaan tyypillisesti virtsan bakteereita, mutta se soveltuu myös muille näytteille. CLED-malja sisältää L-kystiiniä ja bromtymolisiniä, ravinteina toimivat haimauute, lihaekstrakti, gelatiini, kaseiini ja laktoosi. Laktoosia lisätään luomaan energialähde organismeille, jotka pystyvät käyttämään laktoosia fermentoimalla. L-Kystiini mahdollistaa pienipesäkkeisten koliformisten bakteerien kasvun. Bromtymolisini toimii pH-indikaattorina, joka erottelee laktoosia fermentoivat laktoosia fermentoimattomista bakteereista. Ne bakteerit jotka kykenevät fermentoimaan laktoosia laskevat

maljan pH:ta jolloin maljan väri muuttuu sinertävästä keltaiseksi. (BD Diagnostic Systems 2003: 116–117.)

Verimaljaa käytetään muun muassa  $\alpha$ - ja  $\beta$ -hemolyyttisten bakteerien erottelemiseen. Se soveltuu myös likvor- ja märkänäyteviljelyihin, sillä suurin osa bakteereista kasvaa verimaljalla. Verimalja sisältää yleisesti lampaan tai hevosen verta. Malja sisältää ravinteina tryptikaasi-soijaa, lihauutetta, kaseiinin hapanta hydrolysaattia ja tärkkelystä. Kaseiinin hapan hydrolysaatti sekä lihaekstrakti tarjoavat hyvät aminohapot ja tyypipitoiset aineet, mineraalit ja muut ravinteet tukevat bakteerien kasvua. Tärkkelys suojaa myrkyiltä, joita saattaa esiintyä mediumissa. (BD Diagnostic Systems 2003: 83,583.)

Suklaamalja on rikas yleismalja, jolla kasvaa suurin osa bakteereista. Malja sisältää lampaan tai hevosen verta. Punasolut hemolysoidaan eli hajotetaan etukäteen, jolloin hemoglobiini vapautuu punasoluista. Hemoglobiini vapauttaa X-faktorin (hemiinin) haemophilus-lajien käyttöön. Malja sisältää verta sekä ravinteina tryptikaasi soijaa, lihauutetta, kaseiinin hapanta hydrolysaattia ja tärkkelystä. (BD Diagnostic Systems 2003: 139.) Maljalle on lisätty myös Vitalex osa 1 ja 2, jotka toimivat rikasteina (BD Diagnostic Systems 2003: 241).

Fastidious Anaerobe Agar -malja (FAA-malja) on anaerobibakteereille tarkoitettu yleismalja. Malja sisältää peptoniseosta, natriumkloridia, tärkkelystä, natriumbikarbonaattia ja pyrofosfaattia. Ravinteina glukoosia (hiilen lähde), l-kysteiiniä, natrium pyruvaattia sekä kasvutekijöinä natriumsukkinaattia, hemiiniä ja K-vitamiinia. Peptoni toimii typpi- ja vitamiinilähteenä, natriumkloridi säilyttää osmoottisen tasapainon agarilla, tärkkelyksen tehtävänä on absorboida toksiset aineet, joita saattaa esiintyä agarilla. Natriumbikarbonaatti lisää bakteerin hapensietokykyä toimimalla hapensitojana ja pyrofosfaatti toimii puskurina. (Acumedia. Fastidious Anaerobe Agar 2011.)

Thayer Martin 5 -malja (TM5-malja) on pääasiallisesti suunniteltu *Neisseria gonorrhoeae* sekä *Neisseria meningitidis* kasvualustaksi. Malja sisältää proteoosipeptonia ravinteeksi, fosfaattipuskuria pH:n kontrolloimiseksi, maissitärkkelystä maljalta mahdollisesti löytyvien toksisten rasvahappojen neutraloimiseksi ja IsoVitaleXia rikasteeksi. Lisäksi malja sisältää hevosen tai lampaan defibriloitua verta sekä patogeenisen *Neisserian* kasvua edistävinä tekijöinä vitamiineja, aminohappoja, koentsymejä, ferri-ioneja sekä muita faktoreita. (BD Diagnostic Systems 2003: 246.) Maljalle on lisätty kontaminanttien kasvun estämiseksi vankomysiinia, kolistiinia, trimetopriimiä, klindamysiinia sekä amfotersiinia, jotka antibiootteina estävät muiden bakteerien ja hiivojen kasvua.

Esimerkiksi kolistiini estää gramnegatiivisten ja vankomysiini grampositiivisten bakteerien kasvua. (BD Diagnostic Systems 2003: 242.)

Taulukko 1. Viljelymaljat ja niille viljellyt nestekuljetusputkissa säilytetyt ATCC-kannat.

<b>CLED-malja</b>	Osittain selektiivinen yleismalja	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923), <i>E. coli</i> (ATCC 25922), <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)
<b>Verimalja</b>	Yleismalja esim. erilaisilla streptokokeille	<i>S. pyogenes</i> (ATCC 19615)
<b>Suklaamalja</b>	Rikas yleismalja	<i>H. influenzae</i> (ATCC 49247)
<b>Fastidious anaerobe agar = FAA-malja</b>	Anaerobibakteereiden yleismalja	<i>B. fragilis</i> (ATCC 25285), <i>P. melaninogenica</i> (ATCC 25845)
<b>Thayer Martin 5 - malja</b>	<i>Gonococcus</i> -viljelyyn (GC-malja)	<i>N. gonorrhoeae</i> (ATCC 49226)

### 3 American Type Culture Collection -kannat

American Type Culture Collectionilla (ATCC) tarkoitetaan sellaisia tunnettuja mikrobikantoja, joita laboratorioissa käytetään mikrobiviljely- ja tunnistusmenetelmien sisäiseen laadunohjaukseen ja menetelmien validointiin. Kannoista käytetään myös nimityksiä referenssikannat ja vertailukannat. Kantojen avulla varmistetaan menetelmien toimivuus, tulosten oikeellisuus ja toistettavuus. Kannat ovat useimmiten peräisin kansainvälisistä kantalaboratorioista, jotta ne olisi helppo jäljittää tarpeen vaatiessa. Ennen uuden kannan käyttöönottoa tulee sen ominaisuudet varmistaa ja validoida. Laboratorion sisäisellä laadunohjausmenettelyllä seurataan, että halutut ominaisuudet säilyvät mikrobikannalla muuttumattomina. Seurannan tulee olla säännöllistä sekä selkeästi ohjeistettua ja dokumentoitua. (Mikrobiologiset vertailukannat 2005: 11.)

### 3.1 Tutkittavat ATCC-kannat

Opinnäytetyöhön valittiin kasvu ja säilytysvaatimuksiltaan eroavia aerobisia sekä anaerobisia kokki- ja sauvabakteereita. Opinnäytetyöhön valittiin aerobisista kokkibakteereista gramnegatiivinen *Neisseria gonorrhoeae* sekä grampositiiviset *Streptococcus pyogenes* ja *Staphylococcus aureus*. Sauvabakteereista valittiin gramnegatiiviset *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Haemophilus influenzae*. Anaerobibakteereista työhön valittiin gramnegatiivinen sauvabakteeri *Bacteroides fragilis* sekä gramnegatiivinen kokkibakteeri *Prevotella melaninogenica*

#### 3.1.1 Aerobibakteerit

Aerobibakteereilla tarkoitetaan happea elääkseen tarvitsevia bakteereita (Katso Luku 2 Bakteerien säilyvyyteen ja kasvuun vaikuttavat tekijät: 3.).

Gonokokki eli *Neisseria gonorrhoeae* on gramnegatiivinen kokkibakteeri. Se on tippuri-infektion aiheuttaja ja sukupuolielinten limakalvot ovatkin bakteerin infektion kohteita. Gonokokki leviää sukupuoliyhdynnässä tai äidistä lapseen 29 raskausviikosta eteenpäin. Gonokokki on erittäin herkkä kuivumiselle ja kaikille ulkopuolelta tuleville kemiallisille ja fysikaalisille ominaisuuksille. Se ei siis säily kovinkaan kauan ihmiskehon ulkopuolella. (Vuento – Seppälä 2010: 156.) *N. gonorrhoeae* kasvaa mm. GC-maljalla (Thayer Martin 5- malja). Kasvu voi näyttää joko kimaltelevalta ja homogeeniselta tai sitten se voi olla suurta ja siitä puuttuu kimalteleva vaikutus (Koneman, Elmer – Allen, Stephen – Janda, William – Schreckenberger, Paul – Winn, Washington 1997: 508). Gonokokkia ei suositella säilytettäväksi yli 48 tuntia, sillä se ei säily pitkään varastoituna. Suositeltu lämpötila kasvulle on 35–37 °C hiilidioksidiympäristössä. (Lai-King – Martin 2005).

A-streptokokiksi kutsuttu *Streptococcus pyogenes* on aerobinen, beetahemolyyttinen ja grampositiivinen kokkibakteeri. Sen yleisimmin aiheuttama infektio on nielurisatulehdus eli tonsilliitti, mutta se voi aiheuttaa myös iho- ja pehmytkudosinfektioita. (Vuopio-Varkila – Syrjänen – Kotilainen 2010: 102.) *S. pyogenes* kestää hyvin kuljetusta, mutta on silti säilytettävä ja kuljetettava oikeaoppisesti. *S. pyogenes* kasvaa tavallisella verimaljalla +35–37 °C:ssa ja viihtyy erityisesti hiilidioksidipitoisessa ympäristössä. (Vuopio-Varkila – Syrjänen ym. 2010: 106). *S. pyogenes* erottuu selkeän verimaljan hemolyyysin vuoksi (Elliot ym. 2007: 24). Optimi kasvulämpötila on 35–37 °C hiilidioksidiympäristössä.

*Staphylococcus aureus* on grampositiivinen kokkibakteeri, ja se on osa ihmisen normaaliflooraa. Se voi aiheuttaa infektioita perusterveille henkilöille sekä vastustuskyvyltään heikentyneille. Bakteeri leviää kosketus- tai aerosolitartuntana esimerkiksi ihorikkojen kautta. Tärkeimpiä kliinisiä infektioita ovat märkäiset iho- ja pehmytkudosinfektiot, leikkaushaava-, luu- ja nivelinfektiot ja vakavat yleisinfektiot. (Vuopio-Varkila – Kuusela – Kotilainen 2010: 83–86). *S.aureus* kasvaa helposti tavallisilla elatusaineilla. Se kestää kuljetusta ja kuivumista hyvin. (Vuopio-Varkila ym. 2010: 83–86.) *S. aureus* kasvaa laajalla lämpötila-alueella, 10–42 °C:ssa. Bakteerin optimi kasvulämpötila on 35–37 °C (Elliott ym. 2007: 19). Kasvusto on noin 1–2 mm leveää ja sileäpintaista. Se voi olla keltaista, kellertävää tai jopa vaaleaa tai harmaata. (Koneman – Allen – Janda Schreckenberger – Winn. 1997: 549).

Kolibakteeria nimeltä *Escherichia coli* löytyy ihmisen suolistossa normaalifloorana. *E. coli* on gramnegatiivinen aerobinen sauvabakteeri. Se on isännälleen hyödyllinen sillä *E. coli* tuottaa K-vitamiinia ja estää muiden bakteerien kasvua. Se voi kuitenkin aiheuttaa infektioita päästessään esimerkiksi vamman kautta suoliston ulkopuolelle. Tavallisin *E. colin* aiheuttama infektio on virtsatieinfektio. (Siitonen – Vaara 2010: 178.) CLED-malja sisältää laktoosia, jota *E. coli* fermentoi, ja malja muuttuu keltaiseksi. *E. coli* -pesäkkeet kasvat yleensä keltaisena. Optimi kasvulämpötila on 35–37 °C. (BD CLED Agar. 2006.)

*Pseudomonas aeruginosa* on gramnegatiivinen aerobinen sauvabakteeri. Kosteat olosuhteet ovat sille otolliset kasvun kannalta. Se viihtyy ihmisellä tavallisesti välilihassa, kainaloissa sekä korvissa. *P. aeruginosa* on tavallisin ulkokorvatulehduksen aiheuttaja. Sairaalaolosuhteissa sen on todettu aiheuttavan virtsatieinfektioita. (Tissari – Anttila 2010: 200–201.) *P. aeruginosa* kasvaa useimmilla maljoilla ja sen tunnistaa luonteenomaisesta vihreästä kasvupigmentistä. Optimi kasvulämpötila on 35–37 °C. (Elliot ym. 2007:49.) *P. aeruginosan* tunnistaa makeahkosta, kukkamaisesta tuoksusta.

*Haemophilus influenzae* on gramnegatiivinen aerobinen sauvabakteeri (joissakin tilanteissa fakultatiivinen anaerobi). Hemophilukset kuuluvat ihmisen lähengitysteiden normaaliflooraan. Eli se ei aiheuta vähäisinä määrinä välttämättä infektiota. Vakavia *H. influenzaen* aiheuttamia infektioita ovat aivokalvontulehdus, kurkunkansitulehdus, keuhkokuume ja septikemia. (Käyhty – Peltola 2010: 166–167). *H. influenzae* on kasvuolosuhteiltaan vaativa ja tarvitsee kasvaakseen hemiiniä ja NAD<sup>+</sup>:a (Elliott ym. 2007: 44). *H. influenzae* kasvaa suklaamaljalla läpinäkyvinä, pieninä pesäkkeinä (BD Chocolate agar 2013: 2). Optimi kasvulämpötila on 35–37 °C hiilidioksidiympäristössä.

### 3.1.2 Anaerobibakteerit

Anaerobibakteereilla tarkoitetaan happea vähän sietäviä tai sietämättömiä bakteereita (Katso Luku 2 Bakteerien säilyvyyteen ja kasvuun vaikuttavat tekijät: 3.).

*Bacteroides fragilis* on gramnegatiivinen anaerobinen sauvabakteeri. Se kuuluu suoliston limakalvon normaaliflooraan. *B. fragilis* voi aiheuttaa paiseita eri puolille elimistöä karatessaan suolistosta, esimerkiksi tulehtuneesta umpilisäkkeestä. (Rautio – Vuento 2010: 243–244.) *B. fragilis* kasvaa maljalla vaaleana tai harmahtavana, kuperana pesäkkeenä (Jousimies-Somer – Summanen – Citron – Baron – Wexler – Finegold 2002: 84). Optimi kasvulämpötila on 35–37 °C anaerobisissa kasvuolosuhteissa.

*Prevotella melaninogenica* on anaerobinen pigmentoiva gramnegatiivinen sauvamainen kokki. *P. melaninogenica* esiintyy suuontelossa ihmisen normaalifloorana. *P. melaninogenica* voi kuitenkin aiheuttaa infektoita pään, kaulan ja ylempien hengitysteiden alueella. (Prevotella melaninogenica ATCC 25845; Koneman ym. 1997: 756.) *P. melaninogenica* voi kasvaa tarpeeksi pitkän kasvatuksen jälkeen rusehtavina pesäkkeinä (Rautio ym. 2010: 244). Optimi kasvulämpötila on 35–37 °C anaerobisissa kasvuolosuhteissa.

## 4 Opinnäytetyön tarkoitus ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia tunnettujen American Type Culture Collection (ATCC) -bakteerikantojen säilyvyyttä kahdessa eri nestekuljetusputkessa. Opinnäytetyössä käytettiin eSwab®- sekä Puritan Liquid Amies Transport system (PLAT®) -nestekuljetusputkea. Opinnäytetyö suoritettiin HUSLABin kliinisen bakteriologian osastolla. Bakteerien säilyvyyttä tutkittiin eSwab®- sekä PLAT®-nestekuljetusputkessa 0, 6, 24, 48 sekä 72 tunnin kuluttua kuvitellusta näytteenottohetkestä sekä huoneenlämmössä että jääkaappilämpötilassa säilytettyinä. Näytteet viljeltiin maljoille eri aikapisteissä ja bakteeripesäkkeet laskettiin 18–48 tunnin kuluttua viljelystä. Joskus näytteitä joudutaan säilyttämään esimerkiksi viikonlopun yli ja siksi on tärkeää tietää, kuinka kauan bakteerit näytteessä säilyvät ja missä lämpötilassa niitä olisi parasta säilyttää. Työmme oli empiirinen kvantitatiivinen, kokeellinen tutkimus.

Tutkimuskysymyksiä olivat:

- Kuinka opinnäytetyössä käytetyt ATCC-kannat säilyvät 0, 6, 24, 48 ja 72 tunnin säilytyksen jälkeen jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa eSwab®- ja PLAT®-nestekuljetusputkissa?
  - Säilyvätkö bakteerien määrät samana, rikastuvatko tai kuolevatko bakteerit eri säilytysaikojen kuluessa?

## 5 Toteutus

Työ toteutettiin HUSLABin bakteriologian osastolla 20.5–26.5.2014 välisenä aikana. Työn toteutus suunniteltiin yhdessä HUSLABin bakteriologian kliinisen asiantuntijan Risto Hillan kanssa. Eri aikapisteet ja säilytyslämpötilat valittiin aikaisempien tutkimusten sekä yleisiä laboratoriokäytänteitä hyödyntäen. Metropolian AMK:n opinnäytetyössä (Pasanen – Pirdil 2013) käytettiin samoja säilytysaikoja, mutta työhön lisättiin vielä 72 tunnin aikapiste, jotta voitiin ottaa huomioon viikonlopun yli menevät säilytykset. Van Horn, Audette, Sebeck ja Tucker (2008: 1655–1658) käyttivät osin samoja bakteereita tutkiessaan bakteerien säilyvyyttä eSwab®-nestekuljetusputkessa. Van Horn ym. tutkimuksen tulosten perusteella voimme olettaa bakteerien rikastuvan huoneenlämpötilassa säilytettynä. Tutkimuksesta saatiin pohjaa opinnäytetyöhön.

Työt jaettiin siten, että molemmat pääsivät tekemään sekä laimennossarjoja että bakteerien laskentaa. Taulukossa 2 on esillä opinnäytetyöprosessin aikataulu. Toteutusta ohjasi Risto Hilla. Ennen varsinaista toteutusta seurattiin Risto Hillan tekemiä koesarjoja, jotta pystyttiin arvioimaan aikataulutusta sekä työn sujuvuutta paremmin.

Taulukko 2. Opinnäytetyön aikataulu

<b>AIKATAULU</b>	<b>Ajankohta</b>
<b>Opinnäytetyön valinta</b>	vko 5 2014
<b>I tapaaminen</b>	10.2.2014
<b>Jäsenyysseminaari</b>	13.–14.2.2014
<b>Työpaja (kypsyysnäyteinfo sekä työsuunnitelman kirjoittaminen)</b>	5.3.2014
<b>II tapaaminen</b>	6.3.2014
<b>Työpaja (lupa-asiat)</b>	18.3.2014



<b>Suunnitelman hahmottelu</b>	vko 11–12
<b>III tapaaminen (harjoittelusarjojen teko)</b>	26. ja 28.3.
<b>Työpaja (suunnitelman kirjoittaminen)</b>	9.4.2014
<b>Suunnitelman kirjoittaminen</b>	vko 14–18
<b>Suunnitelman palautus</b>	viim. 6.5.2014
<b>Työpaja (lähteet, viitteet, otsikointi)</b>	7.5.2014
<b>Suunnitelmaseminaari</b>	13.–14.5.2014
<b>Tutkimusluvan anominen</b>	vko 20
<b>Opinnäytetyön toteutus</b>	vko 21–22
<b>Raportin kirjoitus</b>	vko 21–22 sekä elo-lokakuu 2014
<b>Raportin palautus</b>	30.10.2014
<b>Kypsyysnäyte</b>	4.11.2014
<b>Opinnäytetyöseminaari</b>	vko 45

### 5.1 Käytännön toteutus

Opinnäytetyössä tutkittiin tunnettujen ATCC-bakteerikantojen säilyvyyttä kahdessa eri nestekuljetusputkessa 0, 6, 24, 48 ja 72 tunnin säilytysaikojen jälkeen. Tutkimuskohteenä oli bakteerien säilyvyys ja muuttujina lämpötilat ja säilytysaika. Opinnäytetyössä vakioitiin säilytyslämpötilat (jääkaappi- ja huoneenlämpö), maljojen viljely (WASP®-viljelyautomaatti) ja näytteiden bakteeripitoisuudet.

Ennen työn aloitusta HUSLABin kliinisen bakteriologian osaston henkilökunta viljeli ja kasvatti tunnetut ATCC-kannat. Bakteriologian laboratorion elatusainekontrolli-työpiste pitää yllä ATCC-kantoja. Työssä käytettiin näitä tuoreita, edellisenä päivänä valmiiksi viljeltyjä maljoja bakteerisuspensioiden tekoon. Kaikki tarvittavat työvälineet, kuten viljelymaljat ja nestekuljetusputket, saatiin HUSLABin kliinisen bakteriologian osastolta.

Bakteerikannoista tehtiin bakteerisuspensiot 0,9 % natriumkloridi-liuokseen (NaCl-liuokseen), josta suspensio jaettiin kahteen eri nestekuljetusputkeen. Putkia säilytettiin 0, 6, 24, 48 ja 72 tuntia jääkaappi- sekä huoneenlämpötiloista. Viljelyt suoritettiin jokaisen aikapisteen kohdalla. Bakteereilla testattiin viljelyssä käytettävä bakteerisuspension määrä ensimmäisen aikapisteen kohdalla (0 tunnin säilytyksen jälkeen). WASP®-viljely-

automatilla voi viljellä joko 10 µl tai 30 µl viljelysilvällä. Testaus suoritettiin näillä kahdella tilavuudella. 10 µl todettiin olevan luotettavampi näytemäärä, sillä bakteeripesäkkeet olivat selkeämmin laskettavissa. 30 µl käytettäessä bakteerit kasvoivat tiheänä mattona maljalla, jolloin pesäkkeitä ei voitu erottaa toisistaan.

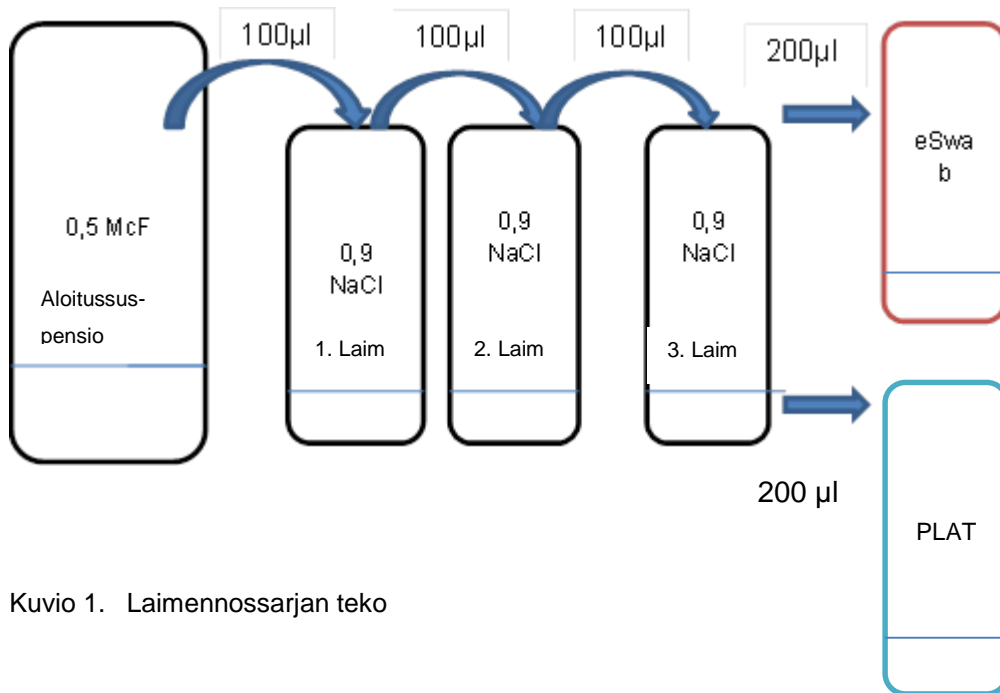
#### 5.1.1 Suspensioiden valmistus

Kannoista valmistettiin 0,5 McFarland vahvuinen suspensio 0,9 % NaCl-liuokseen. Näin vakioitiin suspensiossa olevien bakteeripesäkkeiden määrä. Pesäkkeitä tulisi olla maljalla yli 50 mutta alle 300 – näin bakteeripesäkkeiden laskeminen on mahdollista. Ennen suspension valmistusta NaCl-liuosta sisältävän putken tausta-arvo mitattiin ja tausta-arvo vähennettiin mittaustuloksesta, jotta saatiin tietoon pelkän bakteerisuspension vahvuus (0,5 McFarland). Suspensiot valmistettiin laminaarikaapissa. Bakteeria otettiin maljalta pieniä pesäkkeitä kerrallaan joko silvällä tai hajotussauvalla. Bakteeripesäkkeet liuotettiin NaCl-liuokseen. Pesäkkeitä lisättiin kunnes saavutettiin 0,5 McFarlandin vahvuinen suspensio. Bakteerien lisäyksen jälkeen suspensio sekoitettiin huolella. Vahvuus mitattiin Densicheck-lukulaitteella, joka ilmoitti tuloksen mittaamalla liuoksen sameuden.

#### 5.1.2 Laimennossarja

Aerobiset bakteerit *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* sekä *S. aureus* laimennettiin  $10^4$  cfu/ml (Colony-formit unit/ml = pesäkkeiden määrä/ml) vahvuiseksi. Laimennos suoritettiin seuraavasti: bakteerisuspensiosta valmistettiin laimennossarja. 0,5 McFarlandin vahvuisesta bakteerisuspensiosta pipetoitiin 100 µl 0,9 ml NaCl-liuokseen (1. laimennos) ja tästä laimennoksesta pipetoitiin seuraavaan putkeen 100 µl suspensiota bakteerittomaan 0,9 ml NaCl-liuokseen (2. laimennos), tästä putkesta (2. laimennoksesta) pipetoitiin taas 100 µl suspensiota seuraavaan bakteerittomaan NaCl-liuokseen (3. laimennos), 3. laimennoksesta pipetoitiin 200 µl suspensiota sekä eSwab®- sekä PLAT®- putkeen, joissa tuli olla näytetikut mukana. Kuviossa 1 on kuvattu laimennosten teko. Nestekuljetusputkissa on 2 ml nestettä, näin molempien putkien bakteeripitoisuus on noin  $10^4$  cfu/ml. Vaativille kannoille *H. influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *B. fragilis* sekä *P. melaninogenica* suoritettiin yksi laimennos vähemmän, jolloin nestekuljetusputkeen saatiin  $1,5 \cdot 10^5$  cfu/ml vahvuinen liuos (3. laimennos). Taulukossa 3 kuvataan pesäkkeiden määrä/laimennos. Jokaisen laimennoksen jälkeen putket sekoitettiin huolella, jotta liuok-

sesta saatiin mahdollisimman homogeeninen. Pipetin kärjet vaihdettiin jokaisen laimennoksen jälkeen. Näin saatiin mahdollisimman tarkka laimennos, eikä likaisesta kärjestä siirtynyt bakteereita seuraavaan putkeen.



Kuvio 1. Laimennossarjan teko

Taulukko 3. Laimennosten bakteerimäärä

**Aloitussuspensio**

- 1. laimennos**
- 2. laimennos**
- 3. laimennos (vaativat kannat)**
- 4. laimennos nestekuljetusputkiin**

**0,5 Mc Farland =  $1,5 \cdot 10^8$  cfu/ml**

1:10 =  $1,5 \cdot 10^7$  cfu/ml

1:100 =  $1,5 \cdot 10^6$  cfu/ml

1:1000 =  $1,5 \cdot 10^5$  cfu/ml

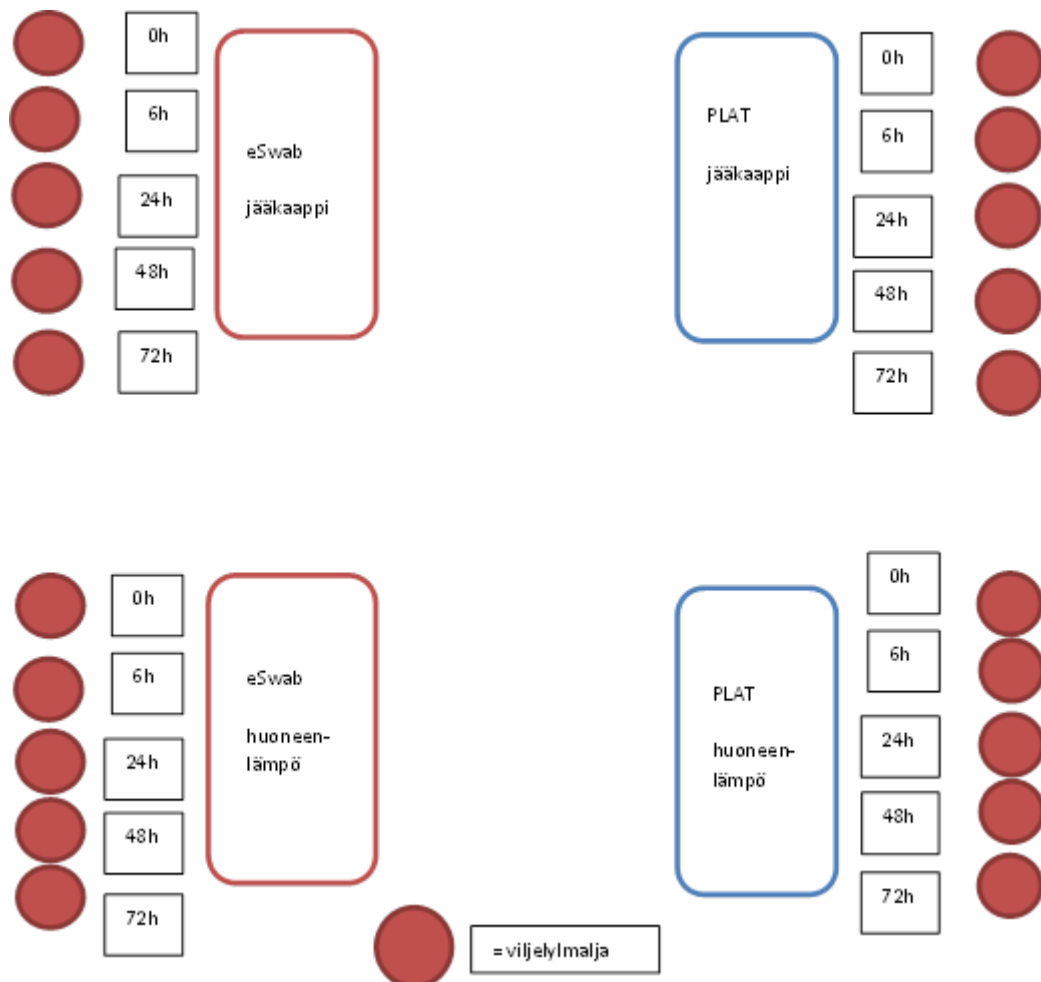
1:10000 =  $1,5 \cdot 10^4$  cfu/ml

### 5.1.3 Viljely

Näytteet viljeltiin WASP®-viljelyautomaatilla. WASP®-viljelyautomaatti on nestepohjaisten mikrobiologisten näytteiden käsittelyyn suunniteltu viljelyautomaatti. Laitteella voidaan viljellä nestekuljetusputkissa olevat näytteet. WASP®-viljelyautomaattiin voidaan ohjelmoida tarvittavat näytteenkäsittelymenetelmät muistiin, kuten esimerkiksi tarvittavat viljelyiden vakioidut mikrolitramäärät. WASP® poimii näytteen, tunnistaa näyteastian tyyppin, ja tekee automaattisesti kaikki näytteelle ohjelmoidut toimintavaiheet. Lopuksi

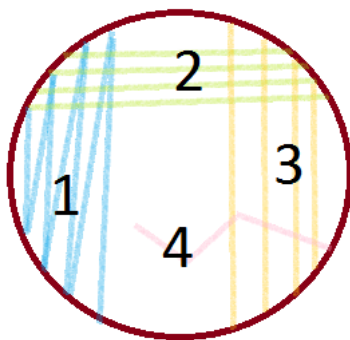
WASP® steriloi silmukan. (WASP 2014.) Automaatti viljeli maljalle 10 µl näytettä hajotusviljelmällä (kuvio 3).

Näytteet viljeltiin huoneenlämpöisille viljelymaljoille. Jokaisesta putkesta viljeltiin maljat ennen säilytystä ja inkubointia (0 tuntia). Jokaisesta bakteerikannasta viljeltiin siis neljä maljaa jokaista aikapistettä kohden. Kummastakin putkesta tehtiin viljelyt, huoneenlämmössä säilytetyistä nestekuljetusputkista sekä jääkaappilämpötilassa säilytetyistä putkista. Viljelyt tehtiin 0, 6, 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua laimennosten valmistuksesta. Kuviossa 2 on esitetty yhdestä bakteerikannasta tulevien maljojen määrä. Viljelyjä tehtiin yhdestä putkesta viisi kappaletta ja yhdestä bakteerikannasta tuli neljä nestekuljetusputkeä, joista tehtiin viljelyt (kaksi jääkaappilämpötilaan ja kaksi huoneenlämpöön). Yhdestä bakteerikannasta viljeltiin siis yhteensä 20 maljaa.



Kuvio 2. Yhdestä ATCC-kannasta viljeltyjen maljojen määrä.

Maljoja kasvatettiin 18–48 tuntia riippuen siitä oliko kyseessä aerobi-, anaerobibakteeri vai *Neisseria gonorrhoeae*. Aerobeja kasvatettiin 18 tuntia ja anaerobeja sekä *Neisseria gonorrhoeaeta* 48 tuntia jokaista aikapistettä kohden. Maljojen bakteeripesäkkeet laskettiin manuaalisesti, aerobibakteereista aina seuraavana päivänä viljelystä ja anaerobibakteereista sekä *Neisseria gonorrhoeaesta* kaksi päivää viljelyn jälkeen. Bakteeripesäkkeet laskettiin koko maljalta yhteen ja pesäkkeiden määrät eroteltiin hajotusviljelmän eri alueilta (kuvio 3, liite 1 ja liite 2). Näin pystyttiin vertaamaan runsaskasvuisia maljoja toisiinsa. Mikäli bakteerit kasvoivat jokaisella hajotusviljelmän eri alueilla siten, ettei bakteeripesäkkeitä kyennyt erottamaan toisistaan, määräksi merkittiin >400.



Kuvio 3. Hajotusviljelmän bakteeripesäkkeiden kasvualueet. Alue 1 sisältää suurimman määrän bakteeripesäkkeitä ja bakteeripesäkkeiden määrä yleisesti pienenee mentäessä kohti neljättä aluetta.

## 6 Tulokset

Tunnettujen ATCC-kantojen säilyvyyttä eSwab®- ja PLAT®-nestekuljetusputkissa tarkasteltiin vertaamalla eri aikapisteissä (6, 24, 48 ja 72 tunnin säilytys) viljeltyjä ja eri lämpötiloissa (jääkaappi- ja huoneenlämpö) säilytettyjä näytteitä heti (0 tunnin säilytys) viljeltyihin ja kasvatettuihin maljoihin.

### 6.1 Opinnäytetyössä käytettyjen ATCC-kantojen säilyvyys, aerobibakteerit

Tulokset esitetään bakteerikannoittain. Bakteerien säilyvyys eSwab®- ja PLAT®-nestekuljetusputkissa sekä säilytysaikojen ja -lämpötilojen vaikutukset bakteerien säilyvyyteen on kuvattu kaavioilla. Bakteeripesäkkeiden määrä on kuvattu lyhenteellä cfu = Colony-formit unit = pesäkkeiden määrä.

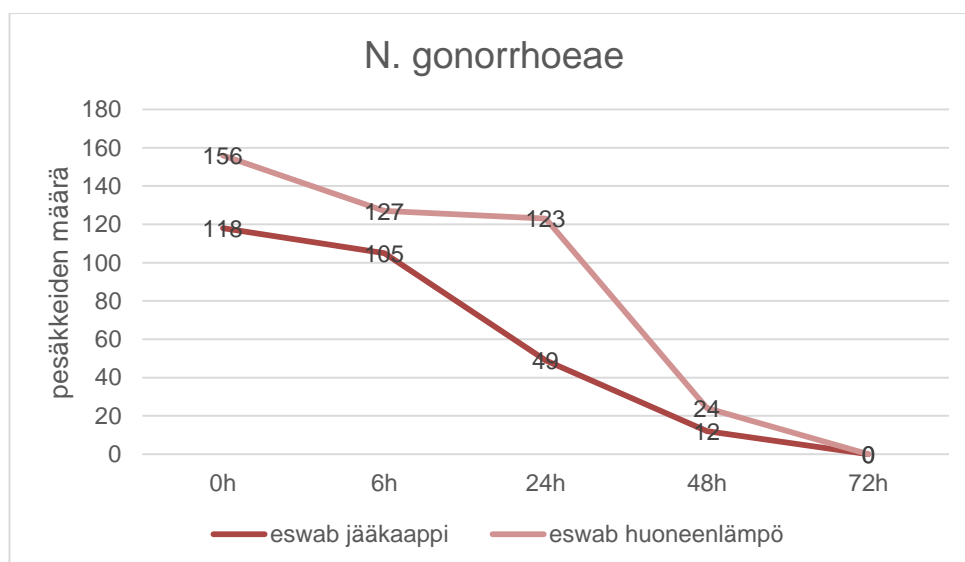
### 6.1.1 *Neisseria gonorrhoeae* säilyvyys

eSwab®-nestekuljetusputki:

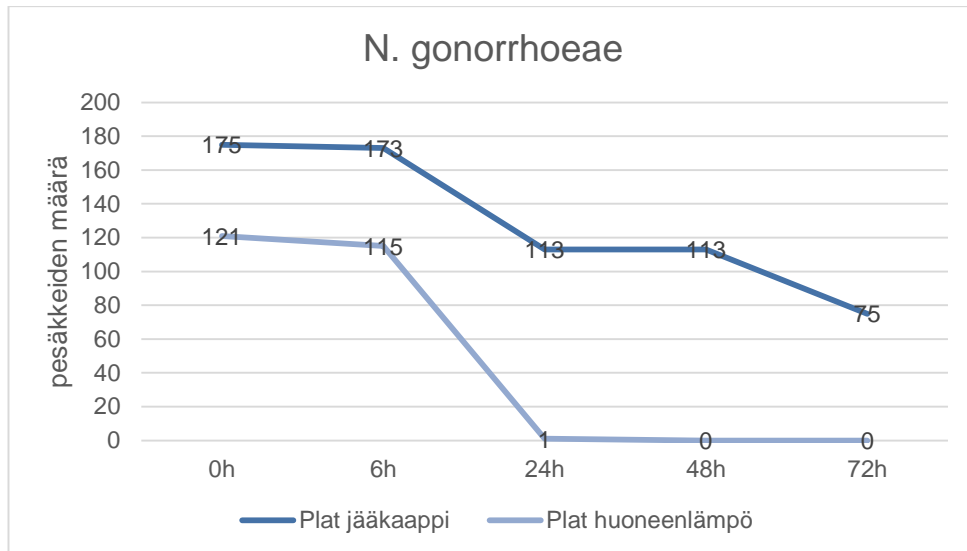
Kuuden tunnin jääkaappisäilytyksen jälkeen *N. gonorrhoeae* -bakteeripesäkkeiden määrä laski 11 % lähtötilanteeseen verrattuna. Lähtötilanteessa pesäkkeitä oli 118 cfu. 24 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä laski 53 %. 48 tunnin säilytyksen jälkeen määrä oli 12 cfu (-76 %). 72 tunnin kuluttua bakteeripesäkkeitä ei enää ollut (0 cfu). Huoneenlämpötilassa säilytettynä *N. gonorrhoeae* säilyi 24 tuntiin saakka (-21 %), mutta 48 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli laskenut jo 85 %. 72 tunnin kohdalla bakteeripesäkkeitä ei ollut laskettavissa. (Kuvio 4, liite 1.)

PLAT®-nestekuljetusputki:

*N. gonorrhoeae* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytetyssä PLAT®-nestekuljetusputkessa jopa 72 tuntiin saakka, bakteeripesäkkeiden määrä laski kuitenkin tasaisesti lähtötilanteesta. 6 tunnin säilytyksen jälkeen määrä oli laskenut vain 1 %, 48 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeitä oli jäljellä 113 cfu (- 35 % lähtötilanteeseen verrattuna, 175 cfu). 72 tunnin kuluttua bakteeripesäkkeiden määrä oli laskenut noin puoleen alkuperäisestä (-57 %). Huoneenlämpötilassa säilytettynä *N. gonorrhoeae* säilyi vain 6 tuntiin saakka, jolloin oli laskettavissa 115 cfu (-15 %). 24 tunnin säilytyksen jälkeen oli vain yksi bakteeripesäke havaittavissa, jonka jälkeen määrä oli 0 cfu. (Kuvio 5, liite 2.)



Kuvio 4. *N. gonorrhoeae* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä eSwab®-nestekuljetusputkissa.



Kuvio 5. *N. gonorrhoeae* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä PLAT®-nestekuljetusputkissa.

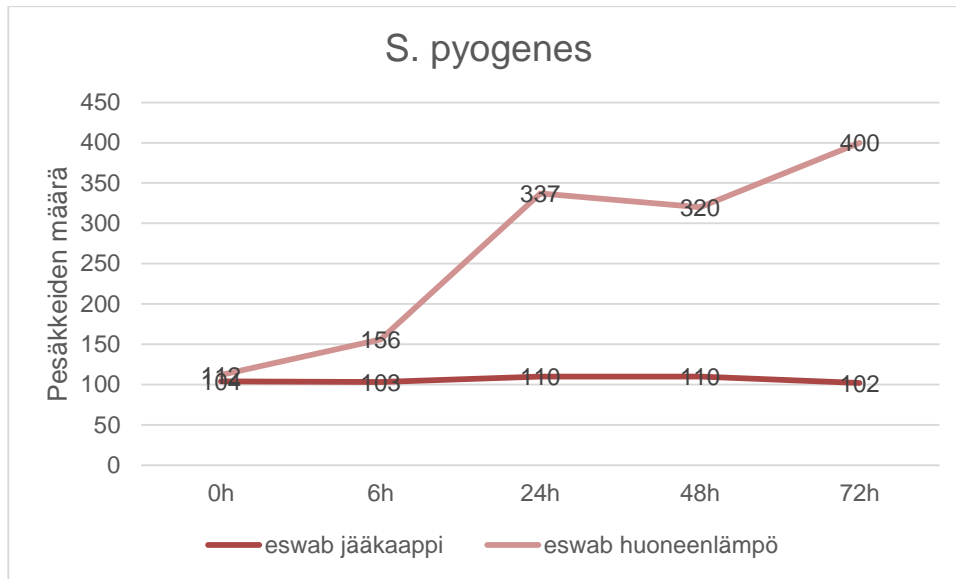
### 6.1.2 *Streptococcus pyogenes* säilyvyys

eSwab®-nestekuljetusputki:

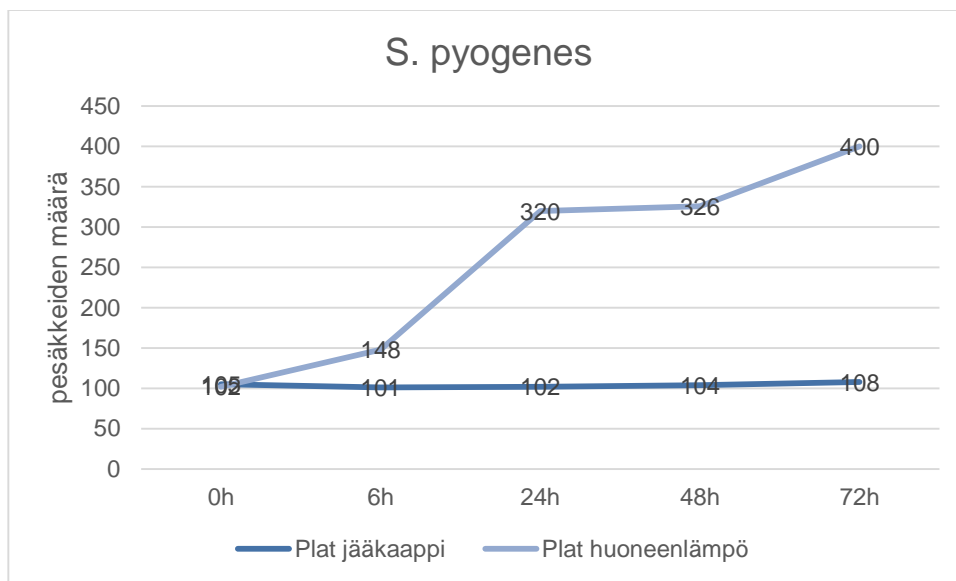
*S. pyogenes* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytetyssä eSwab®-nestekuljetusputkessa aina 72 tuntiin saakka lähes samana, kuin lähtötilanteessa. Lähtötilanteessa bakteeripesäkkeiden määrä oli 104 cfu. 72 tunnin säilytyksen jälkeen määrä oli laskenut vain 2 %. Huoneenlämpötilassa 6 tunnin säilytyksen jälkeen *S. pyogenes* -bakteeripesäkkeiden määrä nousi 39 %, lähtötilanteessa 112 cfu. Bakteeripesäkkeiden määrä nousi säilytysaikojen pidentyessä. 72 tunnin säilytyksen jälkeen määrä nousi 257 %. (Kuvio 6, liite 1.)

PLAT®-nestekuljetusputki:

*S. pyogenes* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytetyssä PLAT®-nestekuljetusputkessa aina 72 tuntiin saakka lähes samana, kuin lähtötilanteessa. Lähtötilanteessa bakteeripesäkkeiden määrä oli 105 cfu. 72 tunnin säilytyksen jälkeen määrä nousi vain 3 %. Huoneenlämpötilassa 6 tunnin säilytyksen jälkeen *S. pyogenes* -bakteeripesäkkeiden määrä nousi 45 %, lähtötilanteessa 102 cfu. Bakteeripesäkkeiden määrä nousi säilytysaikojen pidentyessä. 72 tunnin säilytyksen jälkeen määrä nousi 292 %. (Kuvio 7, liite 2.)



Kuvio 6. *S. pyogenes* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä eSwab®-nestekuljetusputkissa.



Kuvio 7. *S. pyogenes* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä PLAT®-nestekuljetusputkissa.



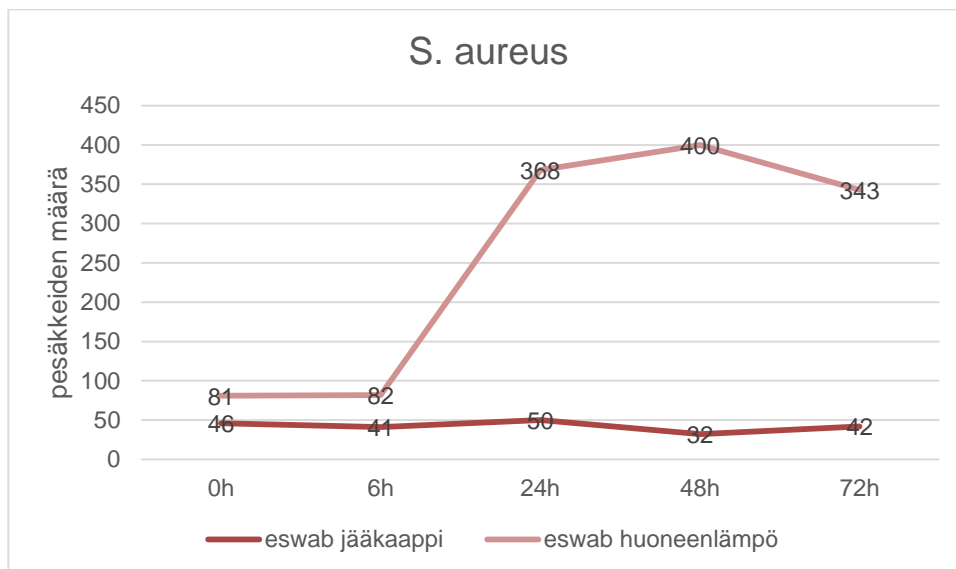
### 6.1.3 Staphylococcus aureus säilyvyys

eSwab®-nestekuljetusputki:

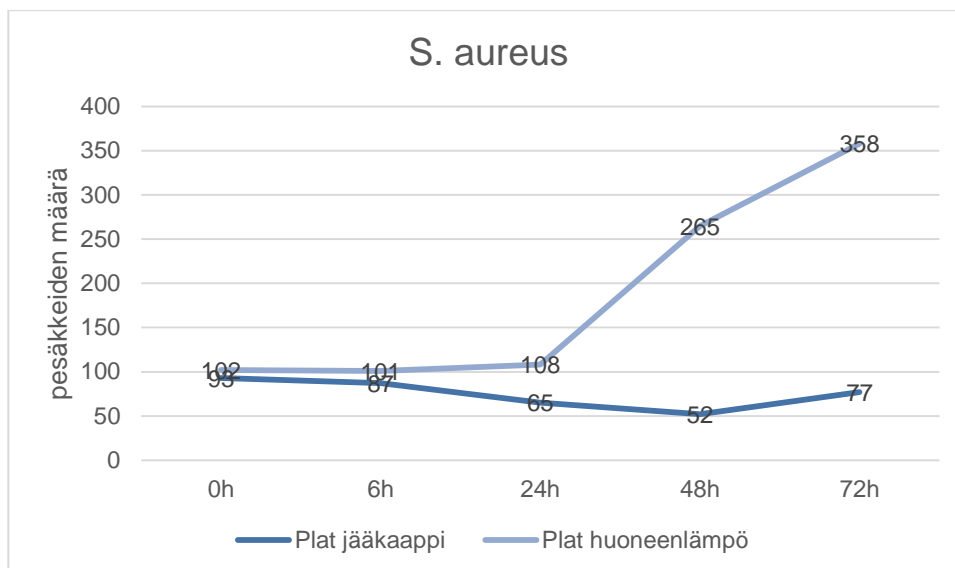
*S. aureus* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytetyssä eSwab®-nestekuljetusputkessa aina 72 tuntiin saakka lähes samana, kuin lähtötilanteessa. Lähtötilanteessa bakteeripesäkkeitä oli 46 cfu, 72 tunnin säilytyksen jälkeen määrä oli laskenut 9 %. Huoneenlämpötilassa 6 tunnin säilytyksen jälkeen *S. aureus* -bakteeripesäkkeiden määrä nousi 1 % lähtötilanteeseen, 81 cfu, verrattuna. 24 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä nousi 354 %, jonka jälkeen määrä nousi 48 tunnin säilytyksen jälkeen 394 % ja 72 tunnin säilytyksen jälkeen 323 %. (Kuvio 8, liite 1.)

PLAT®-nestekuljetusputki:

*S. aureus* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytetyssä PLAT®-nestekuljetusputkessa aina 72 tuntiin saakka lähes samana, kuin lähtötilanteessa. Lähtötilanteessa bakteeripesäkkeitä oli 93 cfu, 72 tunnin säilytyksen jälkeen määrä oli laskenut 17 %. Huoneenlämpötilassa 24 tunnin säilytyksen jälkeen *S. aureus* -bakteeripesäkkeiden määrä nousi 6 % lähtötilanteeseen, 102 cfu, verrattuna. 48 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä nousi 160 % ja 72 tunnin säilytyksen jälkeen 251 %. (Kuvio 9, liite 2.)



Kuvio 8. *S. aureus* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä eSwab®-nestekuljetusputkissa.



Kuvio 9. *S. aureus*-bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä PLAT®-nestekuljetusputkissa.

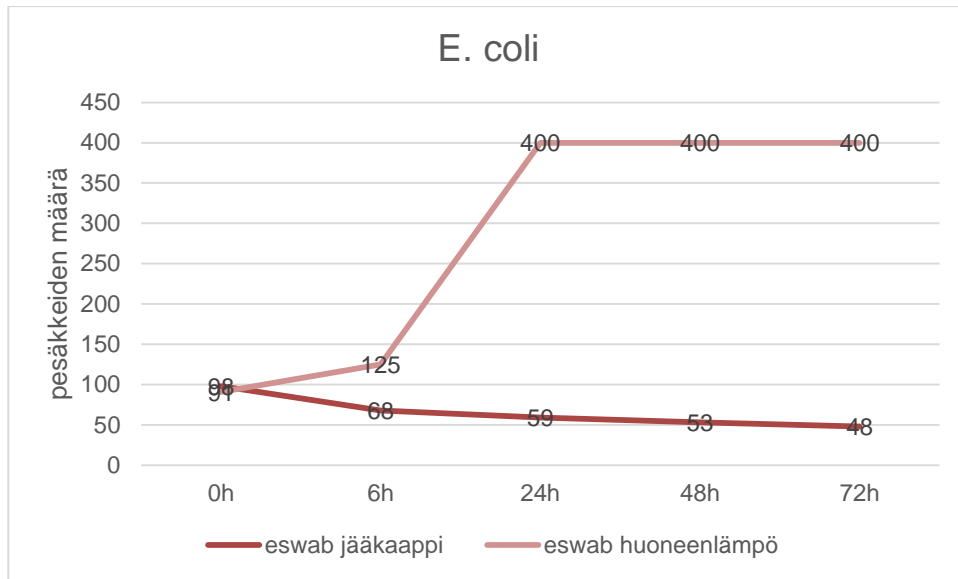
#### 6.1.4 *Escherichia coli* säilyvyys

eSwab®-nestekuljetusputki:

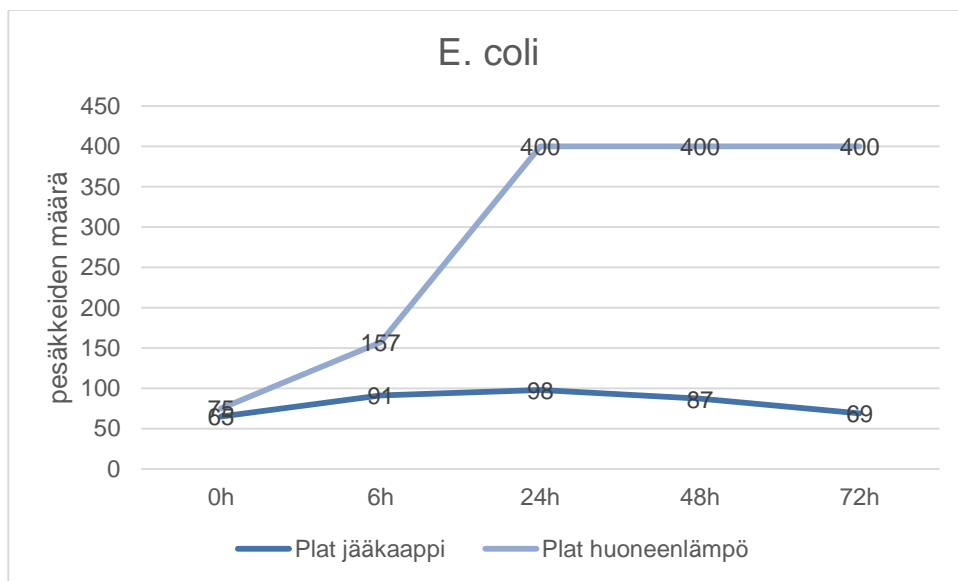
*E. coli* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytetyssä eSwab®- nestekuljetusputkessa 72 tuntiin saakka, mutta bakteeripesäkkeiden määrä laski säilytyksen pidentyessä. Lähtötilanteessa bakteeripesäkkeitä oli 98 cfu, 72 tunnin säilytyksen jälkeen määrä oli laskenut 51 %. Huoneenlämpötilassa säilytettynä *E. coli* bakteeripesäkkeiden määrä säilyi lähes samana lähtötilanteeseen verrattuna 6 tuntiin saakka (+37 %), mutta jo 24 tunnin säilytyksen jälkeen määrä oli noussut 340 % (lähtötilanteessa 91 cfu, 72 tunnin kuluttua yli 400 cfu). (Kuvio 10, liite 1.)

PLAT®-nestekuljetusputki:

*E. coli* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytetyssä PLAT®-nestekuljetusputkessa 72 tuntiin saakka, mutta bakteeripesäkkeiden määrä nousi 6–48 tunnin säilytyksen jälkeen. Lähtötilanteessa bakteeripesäkkeitä oli 65 cfu. Suurin nousu tapahtui 24 tunnin säilytyksen kohdalla, jolloin määrä oli noussut 51 %. 72 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli laskenut lähelle lähtötasoa, 69 cfu. Huoneenlämpötilassa säilytettynä *E. coli*-pesäkkeiden määrä nousi jo 6 tunnin säilytyksen jälkeen 109 %, lähtötilanteessa 75 cfu. 24 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli noussut 433 %, määrä pysyi yhtä korkealla aina 72 tunnin säilytykseen saakka. (Kuvio 11, liite 2.)



Kuvio 10. *E. coli* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä eSwab®-nestekuljetusputkissa.



Kuvio 11. *E. coli* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä PLAT®-nestekuljetusputkissa.

### 6.1.5 *Pseudomonas aeruginosa* säilyvyys

eSwab®-nestekuljetusputki:

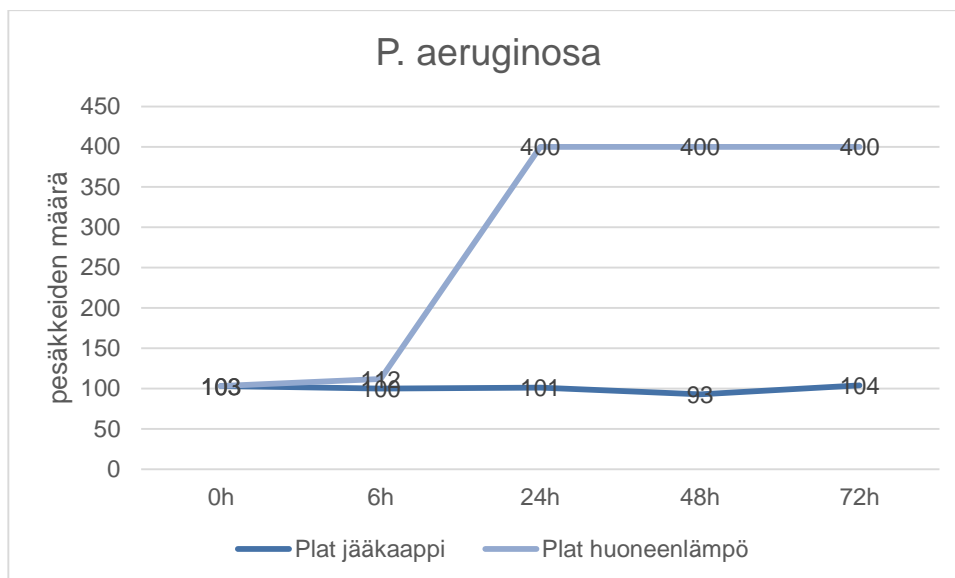
*P. aeruginosa* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytetyssä eSwab®-nestekuljetusputkessa tasaisena aina 72 tuntiin saakka. Lähtötilanteessa bakteeripesäkkeitä oli 110 cfu, 72 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli 105 cfu (-5 %). Huoneenlämpötilassa säilytettynä *P. aeruginosa* säilyi lähtötilanteeseen verrattuna 6 tuntiin saakka lähes samana (+3 %), mutta jo 24 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli noussut 285 % (lähtötilanteessa 104 cfu, 72 tunnin säilytyksen kuluttua > 400 cfu). (Kuvio 12, liite 1.)

PLAT®-nestekuljetusputki:

*P. aeruginosa* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytetyssä PLAT®-nestekuljetusputkessa tasaisena aina 72 tuntiin saakka. Lähtötilanteessa bakteeripesäkkeitä oli 103 cfu, 72 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli 104 cfu (+1 %). Huoneenlämpötilassa säilytettynä *P. aeruginosa* säilyi lähtötilanteeseen verrattuna 6 tuntiin saakka lähes samana (+9 %), mutta jo 24 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli noussut 288 % (lähtötilanteessa 103 cfu, 72 tunnin säilytyksen jälkeen > 400 cfu). (Kuvio 13, liite 2.)



Kuvio 12. *P. aeruginosa* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä eSwab®-nestekuljetusputkissa.



Kuvio 13. *P. aeruginosa* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä PLAT®-nestekuljetusputkissa.

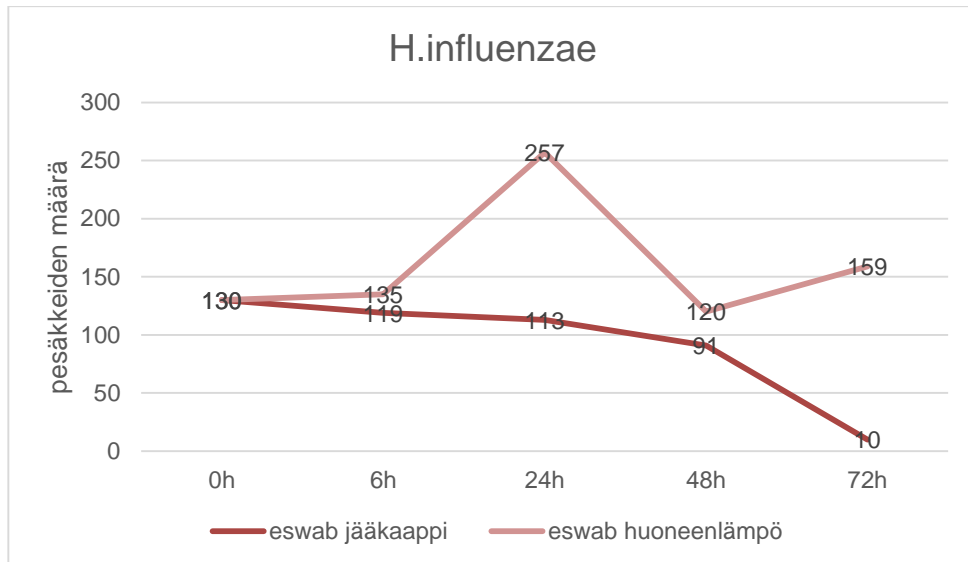
#### 6.1.6 *Haemophilus influenzae* säilyvyys

eSwab®-nestekuljetusputki:

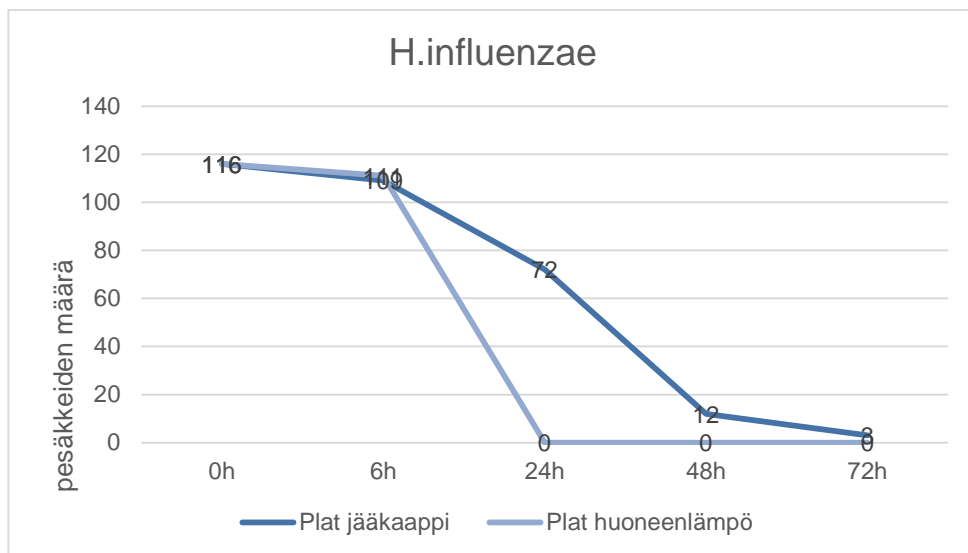
*H. influenzae* säilyi eSwab®-nestekuljetusputkessa 72 tuntia. Suurin bakteeripesäkkeiden määrän lasku tapahtui kuitenkin 48 ja 72 tunnin säilytyksen välillä. 48 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli laskenut 30 % ja 72 tunnin säilytyksen jälkeen 92 %. Lähtötilanteessa bakteeripesäkkeiden määrä oli 130 cfu. Huoneenlämpötilassa säilytettynä *H. influenzae* -bakteeripesäkkeiden määrä nousi lähes kaksinkertaiseksi 24 tunnin säilytyksen jälkeen (+98 %), lähtötilanteessa 130 cfu. 48 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli palannut lähelle lähtötasoa (-8 %). 72 tunnin säilytyksen jälkeen määrä oli noussut 22 % lähtötilanteeseen verrattuna. (Kuvio 14, liite 1.)

PLAT®-nestekuljetusputki:

*H. influenzae* säilyi PLAT®- nestekuljetusputkessa jääkaappilämpötilassa säilytettynä 24 tuntiin saakka (-48 %), jonka jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä laskee 90 % (48 tunnin säilytyksen jälkeen). 72 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeitä oli 3 cfu (-97 %), lähtötilanteessa 116 cfu. Huoneenlämpötilassa säilytettynä *H. influenzae* säilyi 6 tunnin säilytykseen saakka (-4 %, lähtötilanteessa 116 cfu) jonka jälkeen bakteeripesäkkeitä ei enää kasvanut (0 cfu). (Kuvio 14, liite 2.)



Kuvio 14. *H. influenzae* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä eSwab®-nestekuljetusputkissa.



Kuvio 15. *H. influenzae* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä PLAT®-nestekuljetusputkissa.

## 6.2 Opinnäytetyössä käytettyjen ATCC-kantojen säilyvyys, anaerobibakteerit

Tulokset esitetään bakteerikannoittain. Bakteerien säilyvyys eSwab®- ja PLAT®-nestekuljetusputkissa sekä säilytysaikojen ja -lämpötilojen vaikutukset bakteerien säilyvyyteen on kuvattu kaavioilla. Bakteeripesäkkeiden määrä on kuvattu lyhenteellä cfu = Colony-formit unit = pesäkkeiden määrä.

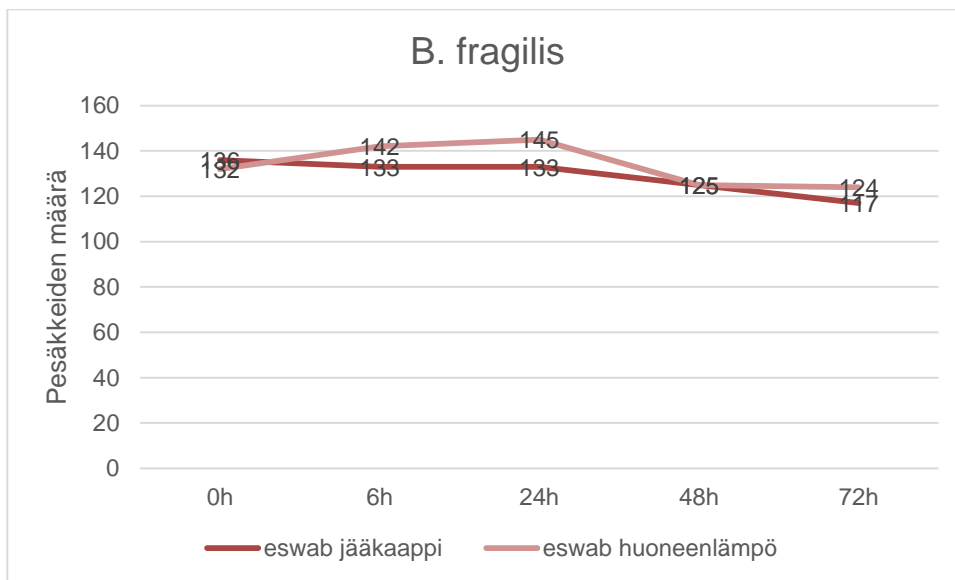
### 6.2.1 *Bacteroides fragilis* säilyvyys

eSwab®-nestekuljetusputki:

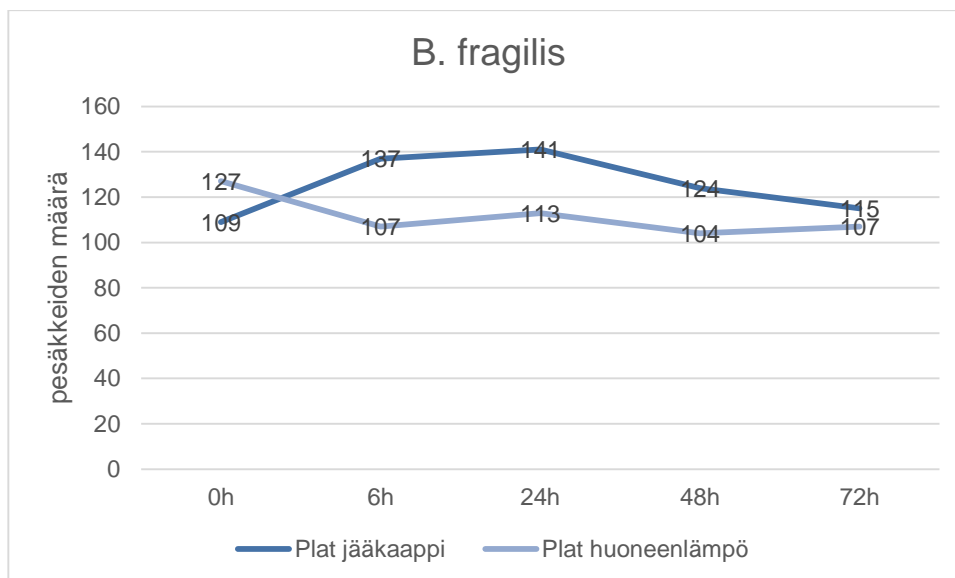
*B. fragilis* säilyi eSwab®-nestekuljetusputkessa, sekä jääkaappi- että huoneenlämpötilassa, lähes samana alkutilanteeseen nähden. Jääkaappilämpötilassa säilytetyn nestekuljetusputken lähtötilanne oli 136 cfu, 72 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli laskenut 14 %. Huoneenlämpötilassa säilytetyn nestekuljetusputken lähtötilanne oli 132 cfu, 72 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli laskenut 6 %. (Kuvio 16, liite 1.)

PLAT®-nestekuljetusputki:

*B. fragilis* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytetyssä PLAT®-nestekuljetusputkessa 72 tuntiin saakka. Lähtötilanteen (109 cfu) jälkeen pesäkkeiden määrä nousi 24 tunnin säilytyksen jälkeen 29 %. 72 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli lähellä lähtötasoa (+6 %). Huoneenlämpötilassa säilytettynä *B. fragilis* -bakteeripesäkkeiden määrä laskee 16 % lähtötilanteesta (127 cfu) 6 tunnin säilytyksen jälkeen, jonka jälkeen pesäkkeiden määrä pysyy lähes samana 72 tunnin säilytykseen saakka (-16 %). (Kuvio 17, liite 2.)



Kuvio 16. *B. fragilis* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä eSwab®-nestekuljetusputkissa.



Kuvio 17. *B. fragilis* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä PLAT®-nestekuljetusputkissa.

### 6.2.2 *Prevotella melaninogenica* säilyvyys

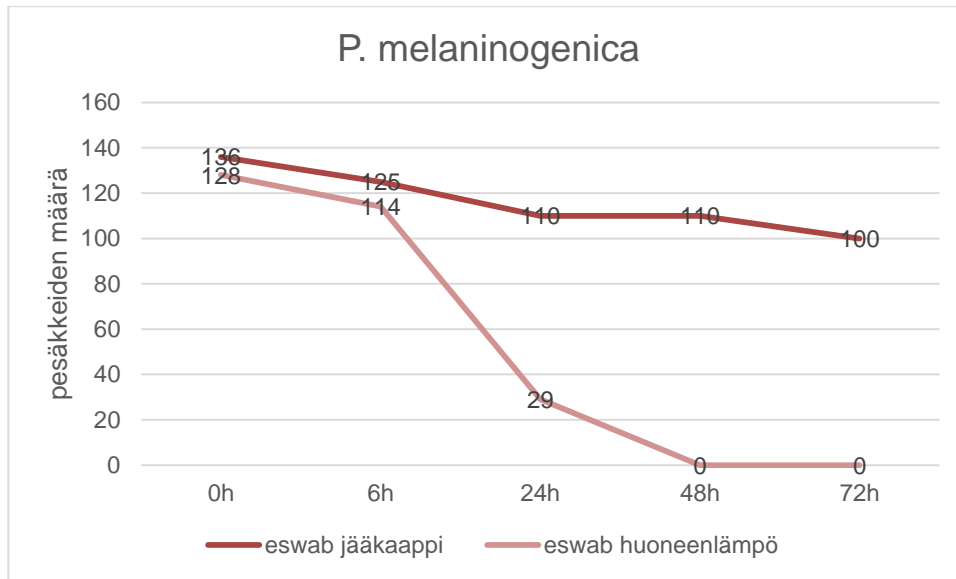
eSwab®-nestekuljetusputki:

*P. melaninogenica* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytetyssä eSwab®-nestekuljetusputkessa aina 72 tuntiin saakka. Lähtötilanteessa oli 136 cfu, 24 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli laskenut 19 % ja 72 tunnin säilytyksen jälkeen 26 %. Huoneenlämpötilassa säilytettynä *P. melaninogenica* säilyi 24 tuntiin saakka. Lähtötilanteessa oli 128 cfu, 24 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä oli laskenut 77 % jonka jälkeen bakteeripesäkkeitä ei enää kasvanut (0 cfu). (Kuvio 18, liite 1.)

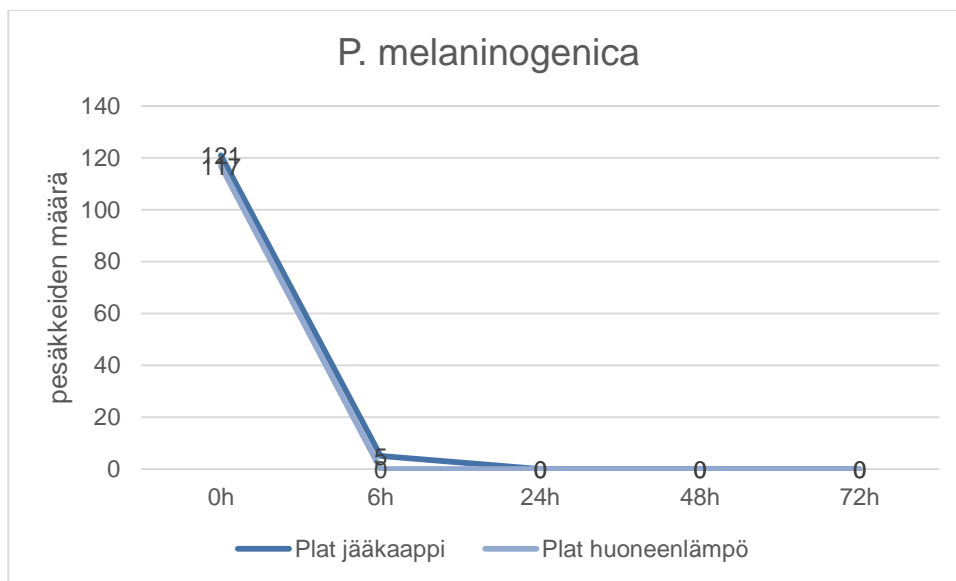
PLAT®-nestekuljetusputki:

Jääkaappilämpötilassa *P. melaninogenica* säilyi huonosti, 6 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeitä oli havaittavissa 5 cfu (lähtötilanteessa 121 cfu), bakteeripesäkkeiden määrä oli vähentynyt 96 %. Muissa aikapisteissä bakteeripesäkkeitä ei enää kasvanut (0 cfu). *P. melaninogenica* ei säilynyt huoneenlämpötilassa säilytetyssä PLAT®-nestekuljetusputkessa. 6 tunnin säilytyksen jälkeen ei ollut havaittavissa yhtään pesäkettä. (Kuvio 19, liite 2.)





Kuvio 18. *P. melaninogenica* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä eSwab®-nestekuljetusputkissa.



Kuvio 19. *P. melaninogenica* -bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytetyissä PLAT®-nestekuljetusputkissa.

### 6.3 Tulosten yhteenveto

Aerobinen gramnegatiivinen kokkibakteeri *Neisseria gonorrhoeae* säilyi eSwab®-nestekuljetusputkessa sekä jääkaappilämpötilassa että huoneenlämpötilassa säilytettynä 48 tuntiin saakka. Bakteeripesäkkeiden määrä laski säilytysajan pidentyessä. PLAT®-nes-

tekuljetusputkessa säilytyslämpötilalla oli suuri vaikutus bakteerien säilymiseen. Jääkaappilämpötilassa säilytettynä *N. gonorrhoeae* säilyi 6 tunnin säilytykseen asti lähes muuttumattomana, jonka jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä laski tasaisesti, bakteerin kuitenkin kuolematta. Huoneenlämpötilassa *N. gonorrhoeae* kesti vain 6 tunnin säilytyksen, jonka jälkeen bakteeri kuoli. Aerobisten grampositiivsten kokkibakteerien (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*) määrät säilyivät sekä eSwab®- että PLAT®-nestekuljetusputkessa rikastumatta jääkaappilämpötilassa säilytettynä. Huoneenlämpötilassa säilytettynä *S. pyogenes* säilyi 6 tunnin säilytykseen saakka molemmissa nestekuljetusputkissa suuremmin rikastumatta, mutta jo 24 tunnin säilytyksen jälkeen bakteereiden määrä lähti nousuun. *S. aureus* säilyi huoneenlämpötilassa säilytettynä eSwab®-nestekuljetusputkessa 6 tunnin säilytykseen saakka rikastumatta, kun taas PLAT®-nestekuljetusputkessa 24 tuntiin saakka. Näiden aikapisteiden jälkeen bakteeripesäkemäärät lähtivät jyrkkään nousuun.

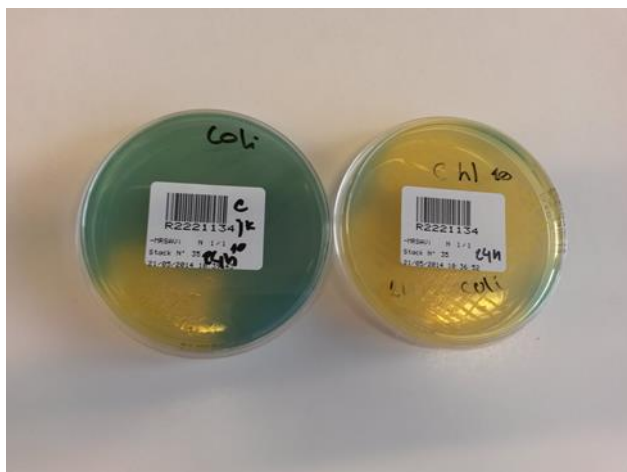
Aerobisten gramnegatiivisten sauvabakteerien (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) määrät säilyivät tasaisina sekä eSwab®- että PLAT®-nestekuljetusputkessa rikastumatta jääkaappilämpötilassa säilytettynä. Huoneenlämpötilassa säilytettynä kyseisten bakteereiden bakteeripesäkemäärät lisääntyivät voimakkaasti jo 24 tunnin säilytyksen jälkeen. *Haemophilus influenzae* (gramnegatiivinen sauva) säilyi jääkaappilämpötilassa säilytettynä eSwab®-nestekuljetusputkessa 48 tuntiin saakka, jonka jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä lähti laskuun. Huoneenlämpötilassa säilytettynä eSwab®-nestekuljetusputken sisältämät rikastavat kasvutekijät ja *H. influenzae* vaativat kasvuolosuhteet näkyivät bakteeripesäkemäärien runsaana kasvuna ja sen jälkeisenä pesäkemäärien laskuna. PLAT®-nestekuljetusputkessa *H. influenzae* -bakteeripesäkkeiden määrä laski säilytysajan pidentyessä jääkaappilämpötilassa säilytettynä. Huoneenlämpötilassa säilytettynä vain kuuden tunnin säilytys oli suotavaa, sillä opinnäytetyössä käytetty *H. influenzae* kanta kuoli pidemmän säilytysajan jälkeen.

Anaerobinen gramnegatiivinen sauvabakteeri *Bacteroides fragilis* säilyi rikastumatta tai kuolematta sekä eSwab®- että PLAT®-nestekuljetusputkessa niin jääkaappi- kuin huoneenlämpötilassa säilytettynä.

Anaerobinen gramnegatiivinen kokkibakteeri *Prevotella melaninogenica* säilyi jääkaappilämpötilassa säilytettynä eSwab®-nestekuljetusputkessa 72 tuntiin saakka vain vähäisellä bakteeripesäkemäärien laskulla. Nestekuljetusputki sisältää kasvua edistäviä tekijöitä, jotka mahdollistavat vaativan bakteerin kasvun, oikeassa lämpötilassa säilytettynä.

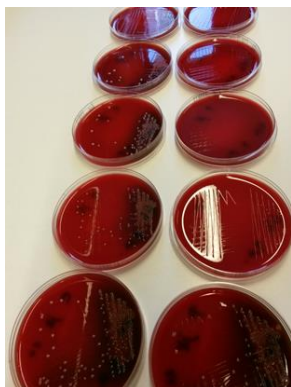
Huoneenlämpötilassa säilytettynä *P. melaninogenica* säilyi vain 6 tuntiin saakka, jonka jälkeen bakteeripesäkkeiden määrä laski rajusti. 48 tunnin säilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeitä ei ollut havaittavissa. PLAT®- nestekuljetusputkessa *P. melaninogenica* kuoli eikä 6 tunnin säilytyksen jälkeen ollut havaittavissa bakteeripesäkkeitä.

eSwab®-nestekuljetusputkea käytettäessä olisi suositeltavaa säilyttää nestekuljetusputkea jääkaapissa, mikäli näytteenoton ja viljelyn välillä on yli 6 tuntia. Kuviossa 20 näkyy bakteeripesäkkeiden määrän ero jääkaappi- ja huoneenlämpötilassa säilytettynä. eSwab®-nestekuljetusputki soveltuu opinnäytetyössä käytettyjen ATCC- kantojen säilytykseen. Journal of Clinical Microbiology -lehden julkaisema tutkimus (Van Horn - Audette - Sebeck - Tucker 2008) tukee näitä tuloksia.



Kuvio 20. *E. coli*-kanta 24 tunnin säilytyksen jälkeen eSwab®-nestekuljetusputkessa jääkaappi- (vas.) ja huoneenlämpötilassa (oik.) säilytettynä.

PLAT®-nestekuljetusputken säilyttämistä jääkaapissa suositellaan, mikäli näytteenoton ja viljelyn välillä on yli 6 tuntia. Etenkin vaativat bakteerit (*H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*) tulisi ehdottomasti säilyttää jääkaappilämpötilassa tai viljellä 6 tunnin kuluttua näytteenotosta. PLAT®-nestekuljetusputki ei sovellu opinnäytetyön tulosten perusteella käytetyn anaerobi *P. melaninogenican* -kannan säilytykseen. Kuviossa 21 on havaittavissa, että jo 6 tunnin jääkaappilämpötilasäilytyksen jälkeen bakteeripesäkkeitä ei ole muutamaa enempää. Puritan Diagnosticin teettämän tutkimuksen perusteella bakteerin tulisi säilyä PLAT®-nestekuljetusputkessa 48 tuntiin saakka sekä jääkaappi- että huoneenlämpötilassa, joten jatkotutkimukset olisivat suotavia (Puritan Medical Products: 6).



Kuvio 21. *P. melaninogenica* säilytettynä eSwab®- (vas.) ja PLAT®-nestekuljetusputkessa (oik.) jääkaappilämpötilassa säilytettynä.

## 7 Luotettavuus ja eettisyys

Työ suunniteltiin huolellisesti yhdessä bakteriologian osaston klinisen asiantuntijan Risto Hillan kanssa ja yhtenäisistä työskentelytavoista sovittiin. Opinnäytetyössä käytettiin luotettavia ja ajankohtaisia lähteitä. Työskentely tapahtui bakteriologian laboratoriossa noudattaen Suomen bioanalytikkoliiton määäämiä eettisiä ohjeita (Suomen bioanalytikkoliitto ry 2006), kehittäen omaa ammatillista osaamista ja häiritsemättä työntekijöiden työrauhaa. Työssä ei käytetty potilasnäytteitä. Laboratoriossa käsiteltiin työntekijöiden toimesta potilasnäytteitä ja näiden osalta tuli noudattaa salassapitovelvollisuutta opinnäytetyön toteutuksen ajan.

Opinnäytetyössä käytettyjen ATCC-kantojen, viljelymaljojen, lämpökaappien ja viljelyautomaatin toimivuutta ja puhtautta valvoo bakteriologian laboratorio. Käytetyt ATCC-kannat ja viljelymaljat olivat tuoreita ja puhtaita lisäksi nestekuljetusputket olivat käyttökunnossa. Työskentely tapahtui aseptisesti ja työturvallisesti. Bakterisuspensiot valmistettiin laminaarikaapissa suojakäsineitä käyttäen. Bakterisuspensiot olivat noin 0,5 McFarlandin vahvuisia, jolla pyrittiin vakioimaan bakteripesäkkeiden määrä nestekuljetusputkessa. Viljely WASP®-viljelyautomaatilla on toistettavampi kuin käsin suoritettu viljely (Suuronen 2013). Näin tulosten vertaaminen toisiinsa oli luotettavampaa. Putkia säilytettiin samassa lämpötilassa koko prosessin ajan ja putkien seisotusaikoja noudatettiin täsmällisesti. Näin pystyttiin takaamaan tulosten luotettavuus. Laadittuja ohjeita noudatettiin ja varmistettiin työtapojen yhteneväisyys. Laskutapojen yhteneväisyyden varmistaminen

miseksi molemmat opinnäytetyöntekijät laskivat kahdeksan viljelymaljan bakteeripesäkemäärät. Nestekuljetusputkien ja viljelymaljojen numerosarjojen täsmävydestä pidettiin huoli.

Opinnäytetyö suoritettiin tiettyjen resurssien puitteissa mahdollisimman kattavasti. Opinnäytetyön tulosten luotettavuuden takaamiseksi työ olisi kuitenkin hyvä toistaa useammalla rinnakkaismäärityksellä, käyttäen samoja ATCC-kantoja. Jatkotutkimuksena voisi testata bakteerien säilyvyyttä myös eri ATCC-kannoilla ja potilasnäytteillä.

## 8 Pohdinta

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää käytettyjen ATCC-kantojen säilyvyys kahdessa eri nestekuljetusputkessa, jääkaappi- sekä huoneenlämpötilassa säilytettynä 0, 6, 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua näytteenotosta.

Opinnäytetyön tulosten perusteella voidaan todeta käytettyjen ATCC-kantojen säilyvän tutkimuskelpoisina eSwab®-nestekuljetusputkessa 48 tunnin säilytyksen ajan, kun putki säilytetään jääkaappilämpötilassa. PLAT®-nestekuljetusputkessa säilytettynä käytetyt ATCC-kannat säilyivät jääkaappilämpötilassa 48 tunnin säilytyksen ajan, poikkeuksena *Prevotella melaninogenica* sekä *Haemophilus influenzae*, joiden säilyvyys oli tutkituilla ATCC-kannoilla huonompi. Tulosten perusteella ei suositella nestekuljetusputkien säilytystä huoneenlämpötilassa, mikäli säilytysaika on yli 6 tuntia. Yleisesti ottaen jääkaappilämpötilassa säilytettynä bakteerien määrä näytteessä kuvaa lähtötasoa (näytteenottohetkeä) jopa 72 tunnin säilytyksen ajan poikkeuksena *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*. Jotta kaikki mahdolliset patogeeniset löydökset kuitenkin saataisiin kiinni, olisi näytteet viljeltävä viimeistään 48 tunnin kuluttua. Huoneenlämpötilassa säilytettynä suurin osa ATCC-kantojen bakteeripesäkkeiden määrästä nousi putkesta riippumatta, poikkeuksena *P. melaninogenica* ja *N. gonorrhoeae* sekä PLAT®-nestekuljetusputkessa säilytetty *H. influenzae*, joiden määrä laski huoneenlämpötilassa säilytettynä. *B. fragilliksen* säilyvyyteen lämpötilalla ei ollut suurta merkitystä kummassakaan putkessa.

Bakteerien säilyvyyteen vaikuttavat monet tekijät, mm. onko potilas saanut antibioottia, näytteenottoa, näytteen bakteerimäärä ja onko näytteessä muita bakteereita. Opinnäytetyössä tutkittiin yksittäisten ATCC-kantojen säilyvyyttä kyseisissä nestekuljetusputkissa, äsken mainittujen tekijöiden vaikutusta säilyvyyteen ei tiedetä.

Tulosten perusteella nestekuljetusputket soveltuvat lähes kaikkien käytettyjen kantojen säilytykseen ja viljelyyn. Viljelyautomaatin viljelemät näytteet ovat tulostasoltaan korkeampia, joten automaattiin soveltuvien nestekuljetusputkissa säilytettävien näytteiden taso on toistettavampaa, kuin manuaalisesti viljeltävien geelikuljetusputkien (Suuronen 2013). Markkinoilla olevien nestekuljetusputkien toimivuutta on tärkeää testata niiden toimintaympäristössä, vaikka tuotteen valmistaja onkin omat testauksensa suorittanut. Onkin hyödyllistä todeta vastaavatko eri toimijoiden suorittamien testausten tulokset toisiaan. Opinnäytetyön tuloksia voidaan hyödyntää bakteriologisia näytteitä tutkivissa laboratorioissa, jotka vertailevat eri nestekuljetusputkia. Opinnäytetyön tuloksia voidaan hyödyntää mietittäessä näytteiden säilytyksen ohjeistusta ja tarvitseeko ohjeistusta muuttaa. Opinnäytetyön ja aikaisempien tutkimusten perusteella voidaan suositella nestekuljetusputkien käyttöä bakteriologisten näytteiden säilytyksessä, ottaen huomioon säilytyslämpötilat ja säilytysajat.

Opinnäytetyössä käytettyjen ATCC-kantojen määrä oli työn aikatauluun ja resursseihin suhteutettuna sopiva. Suuremman näytemäärän myötä työ olisi kasvanut liian suureksi. Käytännönsuus suoritettiin kahden viikon aikana ja rinnakkaisten määritysten suorittaminen olisi vaatinut enemmän aikaa. Työ aikataulutettiin käytännönsuuden sekä raportin kirjoittamiseen sopivaksi ja aikataulussa pitäytyttiin.

Opinnäytetyön aikana opimme niin bakteriologian laboratorion toiminnasta kuin käyttämistämme bakteerikannoista. Tieteellisen tekstin luominen luotettavia lähteitä käyttäen osoittautui odotettua haastavammaksi. Opinnäytetyön raporttia kirjoitettaessa opimme arvioimaan lähteiden luotettavuutta ja sisältöä kriittisemmin. Tieteellisen tekstin tuottaminen kehittyi työn edetessä. Opimme opinnäytetyön aikana tieteellisen tutkimuksen lähtökohdat ja suorittamisen. Saimme tukea koko prosessin ajan ja ohjaajat antoivat kriittistä kannustavaa palautetta, jonka avulla kehitimme toimintaamme. Haasteena työn toteutukselle ja teorian sisäistämiseksi oli käytännön toteuttamisen vaiheessa vähäinen bakteriologian tuntemus. Bakteriologian harjoittelu suoritettiin vasta varsinaisen käytännönsuuden jälkeen. Työn edetessä oma osaamisemme bakteriologian tuntemuksessa kuitenkin kehittyi.

## Lähteet

Acumedia. Fastidious Anaerobe Agar (7531) 2011. Tuoteseloste.<[www.neo-gen.com/Acumedia/pdf/.../7531\\_PI.pdf](http://www.neo-gen.com/Acumedia/pdf/.../7531_PI.pdf)>. Luettu 24.9.2014.

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

Bakteerien ulkoiset rakenteet. 2006. Solunetti. Verkkodokumentti. <[http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerien\\_ulkoiset\\_rakenteet/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerien_ulkoiset_rakenteet/)>. Luettu 10.5.2014.

BD Brain Heart Infusion Agar with 5% Horse Blood and Bacitracin. 2013. Verkkodokumentti. <<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8986>>. Luettu 6.5.2014.

BD Diagnostic Systems 2003. Difco™ & BBL™ Manual. Manual of Microbiological Culture Media. Maryland: Becton, Dickinson and Company.

BD. Chocolate Agar with IsoVitaleX• and Bacitracin. BD.BBL™ CLED Agar. 2006. Verkkodokumentti. <<https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007367%2804%29%280506%29.pdf>>. Luettu 10.4.2014.

Copan Flock Technologies. 2012. ESwab collection & preservation. Tuoteseloste. <[http://www.copanflocktech.com/media/packinserts/50C\\_ESwab-PackInsertREV03-2010.pdf](http://www.copanflocktech.com/media/packinserts/50C_ESwab-PackInsertREV03-2010.pdf)>. Luettu 11.09.2014

Elliott, Tom – Worthington Husam Osman, Tony – Gill, Martin 2007. Medical microbiology & infection. Neljäs painos. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd  
Gandhi, Bharat - Mazzuli, Tony 2003. Evaluation of Three Flocked Swabs and Two Liquid Amies Transport Systems for the Recovery of Fastidious Bacteria. Mount Sinai Hospital. <[http://hardydiagnostics.com/pdf/sc\\_posters/TransPRO%20and%20Fastidious%20Bacteria%20Study%20II.pdf](http://hardydiagnostics.com/pdf/sc_posters/TransPRO%20and%20Fastidious%20Bacteria%20Study%20II.pdf)>.

Hilla, Risto. Kirjallinen tiedonanto. 26.5.2014.

Jousimies-Somer, Hannele R. – Summanen, Paula – Citron, Diane M. – Baron, Ellen jo – Wexler, Hannah M. – Finegold, Sydney M. 2002: Anaerobic bacteriology manual. Kuudes painos. Helsinki: Star Publishing Company.

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

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

Oy Duodecim.

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

Lai-King, Ng – Irene E. Martin 2005. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095009/>>. Luettu 15.4.2014

Mikrobiologiset vertailukannat 2005. Mittatekniikan keskus. Metrologian neuvottelukunta. Mikrobiologian työryhmä. 1/2005. Helsinki. Verkkodokumentti. <<http://www.mikes.fi/frameset.aspx?url=search.aspx>>. Luettu 17.09.2014.

Morfologia. 2006. Solunetti. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/morfologia/>>. Luettu 10.4.2014.

Niemelä, Seppo 2002: Lämpötila. Teoksessa: Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Pasanen, Alisa – Pirdil, Zila 2013. Säilyvätkö bakteerilajit antikoagulattia sisältävssä putkissa?. Opinnäytetyö. Metropolia AMK. Helsinki. <[https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/66535/Pasanen\\_Alisa\\_ja\\_Pirdil\\_Zila.pdf?sequence=1](https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/66535/Pasanen_Alisa_ja_Pirdil_Zila.pdf?sequence=1)>.

Prevotella melaninogenica ATCC 25845 chromosome II, complete sequence. Tuoteseloste. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP002123.1>>. Luettu 21.5.2014.

Puritan Medical Products. Puritan Liquid Amino Transport System. Tuoteseloste. <[http://www.puritanmedproducts.com/assets/uploads/general/FLiquid\\_Amies\\_PackageInsert-HWP\\_LQA\\_R4.pdf&h=4AQFoOK0N](http://www.puritanmedproducts.com/assets/uploads/general/FLiquid_Amies_PackageInsert-HWP_LQA_R4.pdf&h=4AQFoOK0N)>. Luettu 11.09.2014

Rautio, Merja – Vuento, Risto 2010: *Bacteroides fragilis* ja muita anaerobisia gram-negatiivisia bakteereja. Teoksessa Vaara, Martti (toim.) – Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo 2010: Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

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

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



Seppälä, Ilkka J.T. – Vuento, Risto 2010: Neisseria gonorrhoeae. Teoksessa Vaara, Martti (toim.) – Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo 2010: Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

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

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

Suuronen, Anna-Leena 2013. Viljelyautomaatilla ja manuaalisesti suoritettujen bakteeriviljelyn vertailututkimus. Opinnäytetyö. Metropolia AMK.

Tuokko, Seija – Rautajoki, Anja – Lehto, Liisa 2008. Kliiniset laboratorionäytteet - opas näytteiden ottoa varten. Latvia: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Van Horn, Kenneth G – Audette, Carol D. – Sebeck, Denise – Tucker, Kelly A. 2008. J Clin Microbiol. 2008 April; 46(5): 1655–1658. Comparison of the Copan ESwab System with Two Amies Agar Swab Transport Systems for Maintenance of Microorganism Viability. Journal of Clinical Microbiology. 2008 April; 46(5): 1655–1958. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2395074/>>.

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

WASP-viljelyautomaatti. Käyttöohjeet. 2014. Mekalasi. Nurmijärvi.

### Bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä eSwab®-nestekuljetusputkessa

eSwab®												
	Bakteeri	kasvualueet	0h jk	0h hl	6h jk	6h hl	24h jk	24h hl	48h jk	48h hl	72h jk	72h hl
1.	H.influen- zae	I	100	100	100	100	100	100	91	100	10	100
		II	23	20	14	28	11	100	0	15	0	50
		III	6	8	2	5	0	47	0	3	0	6
		IV	1	2	3	2	2	10	0	2	0	3
	<b>yhteensä</b>		<b>130</b>	<b>130</b>	<b>119</b>	<b>135</b>	<b>113</b>	<b>257</b>	<b>91</b>	<b>120</b>	<b>10</b>	<b>159</b>
<b>%</b>		<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>92 %</b>	<b>104 %</b>	<b>87 %</b>	<b>198 %</b>	<b>70 %</b>	<b>92 %</b>	<b>8 %</b>	<b>122 %</b>	
2.	Neisseria gonorrhoeae	I	100	100	100	100	47	100	12	24	0	0
		II	14	37	5	21	2	18	0	0	0	0
		III	4	17	0	6	0	4	0	0	0	0
		IV	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0
	<b>yhteensä</b>		<b>118</b>	<b>156</b>	<b>105</b>	<b>127</b>	<b>49</b>	<b>123</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>%</b>		<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>89 %</b>	<b>81 %</b>	<b>42 %</b>	<b>79 %</b>	<b>10 %</b>	<b>15 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	
3.	S. pyogenes	I	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		II	3	11	3	41	7	100	8	100	1	100
		III	0	1	0	15	2	100	2	100	1	100
		IV	1	0	0	0	1	37	0	20	0	100
	<b>yhteensä</b>		<b>104</b>	<b>112</b>	<b>103</b>	<b>156</b>	<b>110</b>	<b>337</b>	<b>110</b>	<b>320</b>	<b>102</b>	<b>400</b>
<b>%</b>		<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>99 %</b>	<b>139 %</b>	<b>106 %</b>	<b>301 %</b>	<b>106 %</b>	<b>286 %</b>	<b>98 %</b>	<b>357 %</b>	
4.	S. aureus	I	45	81	41	79	48	100	32	100	40	100
		II	0	0	0	1	0	100	0	100	1	100
		III	1	0	0	0	1	100	0	100	1	100
		IV	0	0	0	2	1	68	0	100	0	43
	<b>yhteensä</b>		<b>46</b>	<b>81</b>	<b>41</b>	<b>82</b>	<b>50</b>	<b>368</b>	<b>32</b>	<b>400</b>	<b>42</b>	<b>343</b>
<b>%</b>		<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>89 %</b>	<b>101 %</b>	<b>109 %</b>	<b>454 %</b>	<b>70 %</b>	<b>494 %</b>	<b>91 %</b>	<b>423 %</b>	

5.	E. coli	I	97	90	68	100	59	100	53	100	48	100
		II	1	1	0	21	0	100	0	100	0	100
		III	0	0	0	4	0	100	0	100	0	100
		IV	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100
<b>yhteensä</b>			<b>98</b>	<b>91</b>	<b>68</b>	<b>125</b>	<b>59</b>	<b>400</b>	<b>53</b>	<b>400</b>	<b>48</b>	<b>400</b>
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>69 %</b>	<b>137 %</b>	<b>60 %</b>	<b>440 %</b>	<b>54 %</b>	<b>440 %</b>	<b>49 %</b>	<b>440 %</b>
6.	Bac- teroides fragilis	I	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		II	31	26	21	29	27	31	20	20	12	18
		III	5	5	11	12	6	9	4	4	4	6
		IV	0	1	1	1	0	5	1	1	1	0
<b>yhteensä</b>			<b>136</b>	<b>132</b>	<b>133</b>	<b>142</b>	<b>133</b>	<b>145</b>	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>117</b>	<b>124</b>
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>98 %</b>	<b>108 %</b>	<b>98 %</b>	<b>110 %</b>	<b>92 %</b>	<b>95 %</b>	<b>86 %</b>	<b>94 %</b>
7.	Prevotella melani- nogenica	I	100	100	100	100	100	28	100	0	100	0
		II	28	19	17	13	5	1	8	0	0	0
		III	7	8	8	1	5	0	1	0	0	0
		IV	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
<b>yhteensä</b>			<b>136</b>	<b>128</b>	<b>125</b>	<b>114</b>	<b>110</b>	<b>29</b>	<b>110</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>92 %</b>	<b>89 %</b>	<b>81 %</b>	<b>23 %</b>	<b>81 %</b>	<b>0 %</b>	<b>74 %</b>	<b>0 %</b>
8.	P. aeru- ginosa	I	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		II	8	3	2	5	6	100	7	100	3	100
		III	1	1	0	2	2	100	2	100	2	100
		IV	1	0	0	0	1	100	1	100	0	100
<b>yhteensä</b>			<b>110</b>	<b>104</b>	<b>102</b>	<b>107</b>	<b>109</b>	<b>400</b>	<b>110</b>	<b>400</b>	<b>105</b>	<b>400</b>
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>93 %</b>	<b>103 %</b>	<b>99 %</b>	<b>385 %</b>	<b>100 %</b>	<b>385 %</b>	<b>95 %</b>	<b>385 %</b>

### Bakteeripesäkkeiden määrä eri aikapisteissä PLAT®-nestekuljetusputkessa

PLAT®												
	Bakteeri	kasvualueet	0h jk	0h hl	6h jk	6h hl	24h jk	24h hl	48h jk	48h hl	72h jk	72h hl
1.	H.influenzae	I	100	100	100	100	72	0	11	0	2	0
		II	14	14	6	8	0	0	1	0	1	0
		III	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0
		IV	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	<b>yhteensä</b>		<b>116</b>	<b>116</b>	<b>109</b>	<b>111</b>	<b>72</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>94 %</b>	<b>96 %</b>	<b>62 %</b>	<b>0 %</b>	<b>10 %</b>	<b>0 %</b>	<b>3 %</b>	<b>0 %</b>
2.	Neisseria gonorrhoeae	I	100	100	100	100	100	1	100	0	75	0
		II	46	15	36	11	10	0	9	0	0	0
		III	26	5	36	4	3	0	4	0	0	0
		IV	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	<b>yhteensä</b>		<b>175</b>	<b>121</b>	<b>173</b>	<b>115</b>	<b>113</b>	<b>1</b>	<b>113</b>	<b>0</b>	<b>75</b>	<b>0</b>
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>99 %</b>	<b>95 %</b>	<b>65 %</b>	<b>1 %</b>	<b>65 %</b>	<b>0 %</b>	<b>43 %</b>	<b>0 %</b>
3.	S. pyogenes	I	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		II	4	2	1	35	2	100	3	100	6	100
		III	1	0	0	8	0	100	1	100	1	100
		IV	0	0	0	5	0	20	0	26	1	100
	<b>yhteensä</b>		<b>105</b>	<b>102</b>	<b>101</b>	<b>148</b>	<b>102</b>	<b>320</b>	<b>104</b>	<b>326</b>	<b>108</b>	<b>400</b>
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>96 %</b>	<b>145 %</b>	<b>97 %</b>	<b>314 %</b>	<b>99 %</b>	<b>320 %</b>	<b>103 %</b>	<b>392 %</b>
4.	S. aureus	I	91	100	87	100	63	100	52	100	75	100
		II	0	2	0	1	0	7	0	100	2	100
		III	1	0	0	0	1	0	0	54	0	100
		IV	1	0	0	0	1	1	0	11	0	58
	<b>yhteensä</b>		<b>93</b>	<b>102</b>	<b>87</b>	<b>101</b>	<b>65</b>	<b>108</b>	<b>52</b>	<b>265</b>	<b>77</b>	<b>358</b>
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>94 %</b>	<b>99 %</b>	<b>70 %</b>	<b>106 %</b>	<b>56 %</b>	<b>260 %</b>	<b>83 %</b>	<b>351 %</b>

5.	E. coli	I	65	75	91	100	97	100	86	100	68	100
		II	0	0	0	44	1	100	1	100	1	100
		III	0	0	0	12	0	100	0	100	0	100
		IV	0	0	0	1	0	100	0	100	0	100
<b>yhteensä</b>			<b>65</b>	<b>75</b>	<b>91</b>	<b>157</b>	<b>98</b>	<b>400</b>	<b>87</b>	<b>400</b>	<b>69</b>	<b>400</b>
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>140 %</b>	<b>209 %</b>	<b>151 %</b>	<b>533 %</b>	<b>134 %</b>	<b>533 %</b>	<b>106 %</b>	<b>533 %</b>
6.	Bac- teroides fragilis	I	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		II	6	17	19	6	28	10	17	2	10	5
		III	2	8	18	1	11	1	5	2	5	2
		IV	1	2	0	0	2	2	2	0	0	0
<b>yhteensä</b>			<b>109</b>	<b>127</b>	<b>137</b>	<b>107</b>	<b>141</b>	<b>113</b>	<b>124</b>	<b>104</b>	<b>115</b>	<b>107</b>
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>126 %</b>	<b>84 %</b>	<b>129 %</b>	<b>89 %</b>	<b>114 %</b>	<b>82 %</b>	<b>106 %</b>	<b>84 %</b>
7.	Prevotella melani- nogenica	I	100	100	5	0	0	0	0	0	0	0
		II	18	9	0	0	0	0	0	0	0	0
		III	3	7	0	0	0	0	0	0	0	0
		IV	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>yhteensä</b>			<b>121</b>	<b>117</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>4 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>
8.	P. aeru- ginosa	I	100	100	100	100	100	100	91	100	100	100
		II	3	2	0	10	1	100	2	100	3	100
		III	0	1	0	0	0	100	0	100	1	100
		IV	0	0	0	2	0	100	0	100	0	100
<b>yhteensä</b>			<b>103</b>	<b>103</b>	<b>100</b>	<b>112</b>	<b>101</b>	<b>400</b>	<b>93</b>	<b>400</b>	<b>104</b>	<b>400</b>
<b>%</b>			<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>97 %</b>	<b>109 %</b>	<b>98 %</b>	<b>388 %</b>	<b>90 %</b>	<b>388 %</b>	<b>101 %</b>	<b>388 %</b>