

Marja Aalto & Niina Hyrkäs

AUTOMAATTISEN Previ®Color GRAMVÄRJÄYSLAITTEEN VALIDOINTI

AUTOMAATTISEN Previ®Color GRAMVÄRJÄYSLAITTEEN VALIDOINTI

Marja Aalto
Niina Hyrkäs
Opinnäytetyö
Syksy 2015
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijät: Marja Aalto ja Niina Hyrkäs

Opinnäytetyön nimi: Automaattisen Previ@Color gramvärjäyslaitteen validointi

Työn ohjaajat: Sairaalakemisti Jaana Ikonen-Toivanen ja konsultoiva kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri Markku Koskela. Ohjaavat opettajat Outi Mäkitalo ja Irja Parkkinen.

Työn valmistumislukukausi- ja vuosi: Syksy 2015

Sivumäärä: 41 + 8 liitesivua

Gramvärjäys on yksi käytetyimmistä mikrobien tunnistustavoista kliinisessä mikrobiologiassa. Gramvärjäykseen on kehitetty laite, joka tekee värjäyksen vaiheet automatisoidusti.

Pohjois-Suomen laboratorokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä NordLab Kemin aluelaboratorion mikrobiologian laboratorioon on hankittu Biomerieuxin valmistama Previ@Color gramvärjäysautomaatti. Laitteen validointi ja ajo-ohjelmien laadinta olivat tekemättä. Opinnäytetyömme oli projektiluontoinen tutkimus, jonka tavoitteena oli tehdä Previ@Color gramvärjäysautomaatille validointi sekä testata tarvittava määrä ajo-ohjelmia eri näytetyypeille, koska laitteen perusohjelmalla suoritettut värjäykset eivät ole olleet laadultaan tarpeeksi hyviä.

Työn tietoperusta hankittiin pääasiallisesti alan kirjallisuudesta, koska gramvärjäyksestä ja sen perusteista oli vain erittäin vanhoja artikkeleita alan tietokannoissa. Varsinainen tutkimustyö toteutettiin NordLabin Kemin aluelaboratorion mikrobiologian laboratorioissa Länsi-Pohjan keskussairaalassa.

Esitestauksessa värjäysautomaatin parametrit optimoitiin valmistamalla laboratorion omista tunnetuista ATCC-bakteerikannoista riittävä määrä levityspreparaatteja ja värjäämällä ne. Laitteen värjäyksen laatua testattiin myös normaaleilla potilasnäytteillä. Kaikki värjätyt objektilasit mikroskopoiitiin. Optimaalisen värjäysohjelman löydyttyä tehtiin uudet puhtasviljely standardikannoista ja valmistettiin objektilaseille levityspreparaatit. Vakiokantojen lisäksi valmistettiin levityspreparaatteja tuoreista potilasnäytteistä, joiden bakteeriviljelytulos tunnettiin. Näytteiden avulla testattiin laitteen toimivuutta. Validoinnissa testattiin sekä toistettavuutta että uusittavuutta ajamalla samoja näytteitä 10 kertaa optimaalisella värjäysohjelmalla ja ottamalla vakiokannat mukaan jokaiseen ajoon. Myös kaikki validoinnin objektilasipreparaatit mikroskopoiitiin. Vertailumenetelmänä laitteen värjäystulokselle käytettiin manuaalista gramvärjäystä.

Tuloksena saatiin määritettyä laitteelle ajo-ohjelma, jolla tutkittavat näytteet värjäytyivät optimaalisesti. Laitteelle oli laitevalmistajan tekemän ohjeen lisäksi tehty NordLabin Rovaniemen laboratorioissa lyhyt käyttöohje. Tämä ohje tarkistettiin ja otettiin käyttöön myös Kemin aluelaboratoriossa. Laitteen käyttäjille, kliinisen mikrobiologian laboratorion henkilöstölle, annettiin laitteen käyttökoulutus.

Työn tuloksia voidaan hyödyntää myös muissa värjäyslaitteen käyttöönotoissa sekä mikrobiologisten menetelmien validoinneissa.

Asiasanat: gramvärjäys, grampositiivinen, gramnegatiivinen, validointi

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Authors: Marja Aalto and Niina Hyrkäs
Title of thesis: Validation of Automatic Gram Staining Device
Supervisors: Jaana Ikonen-Toivanen and Markku Koskela, NordLab,
Outi Mäkitalo and Irja Parkkinen, OAMK.
Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2015
Number of pages: 41 + 8 appendix pages

Gram staining is one of the most common identification methods in bacteriology. It is a differential staining process, which divides bacteria into two categories; gram negative and gram positive. NordLab Kemi area laboratory owns a Previ®Color gram staining device manufactured by BiorMerieux. This automated device does all the gram staining stages automatically, which leaves more time to analyse microbiological samples.

This paper reports a project study of Previ®Color gram staining device validation and staining parameter optimization. Assigner of this project was NordLab Kemi area laboratory in Länsi-Pohja Central Hospital.

Pretests were carried out with two different ATCC bacterial species and numerous patient samples to find optimal staining parameters. After pretests validation stainings were done with new samples from ATCC bacterial species and patients. 10 copies were made out of each microbiological sample and stained separately to find out repeatability of the device and sample variation between stainings.

Results revealed that Previ®Color gram staining process is stable and can be used in daily basis at the laboratory. Optimal staining parameters give good contrast between gram positive and gram negative bacteria. Microbiology laboratory personnel were given instructions on how to use Previ®Color gram staining device and on different maintenance procedures.

These results and information of this report can be used in similar validation processes and staining device introductions.

Keywords: gram staining, gram-positive, gram-negative, validation

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	BAKTEERIT	7
2.1	Bakteerien rakenne ja luokittelu	8
2.2	Ihminen ja mikrobit	9
3	GRAMVÄRJÄYS.....	10
3.1	Värjäyksen perusteet.....	10
3.1.1	Kiinnitys.....	10
3.1.2	Värjäys.....	11
3.1.3	Gramvärjäyksen mekanismi.....	12
3.2	Gramvärjäyksen käyttö kliinisessä mikrobiologiassa	13
3.3	Gramvärjäyksen tulkinta	13
3.4	Virhelähteet ja laadun arviointi	14
4	MENETELMÄN VALIDOINTI	15
4.1	Mikrobiologisten menetelmien validointi ja niihin liittyvä epävarmuus.....	15
4.2	Validoinnin vaiheet	17
4.2.1	Validointisuunnitelma	17
4.2.2	Validointiin liittyvä dokumentointi	18
5	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS.....	19
5.1	Toimintaympäristö ja tutkimuksen suunnittelu	19
5.2	Gramvärjäysautomaatti	20
5.3	Värjäysautomaatin parametrien optimointi esitestauksessa	21
5.4	Validoinnin suorittaminen	23
6	TULOKSET.....	25
6.1	Esitestauksen tulosten analysointi.....	25
6.2	Validoinnin tulosten analysointi	25
6.2.1	Tunnetut vakiokannat.....	26
6.2.2	Veriviljelynäytteet.....	27
6.2.3	Kudos- ja märkänäytteet	32
7	POHDINTA.....	37
	LÄHTEET.....	39
	LIITTEET	40

1 JOHDANTO

Gramvärjäys on ollut jo pitkään yksi käytetyimmistä mikrobien tunnistustavoista kliinisessä mikrobiologiassa. Varsin yksinkertaisella toimenpiteellä ja nopeasti saadaan näytteestä määritettyä, ovatko infektion aiheuttajat grampositiivisia vai – negatiivisia, kokkeja vai sauvoja. Tällä on merkitystä muun muassa infektion torjunnassa ja oikean lääkityksen määrittämisessä. Gramvärjäystä käytetään yleisesti veriviljely-, märkä-, kudokset- ja vierasesinänäytteiden mikrobien tunnistuksessa.

Bioanalytiikan työssä käsityön määrä vähenee ja automatisoidut prosessit valtaavat alaa. Myös gramvärjäykseen on kehitetty laite, joka tekee värjäyksen eri vaiheet automatisoidusti. Tämä helpottaa työtä, vähentää tekijästä riippuvaa vaihtelua värjäyksessä ja säästää aikaa itse mikrobien tunnistustyöhön. Automaattisissa värjäyslaitteissa värjäyksen vaiheet ja reagenssit mukailevat käsivärjäystä. Värjäysprosessi tulee optimoida näytetyypeille sopivaksi muun muassa reagenssimäärien ja reaktioaikojen osalta.

Aina uutta laitetta käyttöönotettaessa, on huolehdittava sen toiminnan oikeellisuudesta. Validoinnin avulla voidaan varmistua, että käyttöönotettava laite antaa luotettavia tuloksia ja laboratorio hallitsee käyttöönotettavan menetelmän. Validointiprosessi kuvataan selkeästi ja se voidaan jakaa erillisiin vaiheisiin. Kaikki tulokset kirjataan niin, että niiden perusteella voidaan päätellä menetelmän soveltuvuus. Mikrobiologisten menetelmien validointi on aina kemiallisten menetelmien validointia hankalampaa, koska täsmällistä tulosta on hankala määrittää ja tulkintaeroja syntyy. (Elintarvikevirasto 1998, 1 – 2.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli testata ja validoida PREVI® Color gramvärjäysautomaatin käyttö klinisen bakteriologian potilasnäytetutkimuksiin, joihin kuuluu bakteerin gramvärjäys, Nord-Labin Kemian aluelaboratorion mikrobiologian laboratorioissa. Samalla haluttiin selvittää, värjäkö PREVI® Color gramvärjäysautomaatti potilasnäytteet yhtä hyvin kuin puhtasviljellyt ATCC-vakio-kannat. Tavoitteena oli saada laitteen värjäyslaatu sellaiselle tasolle, ettei manuaalisesti tehtäviä gramvärjäyksiä tarvittaisi.

2 BAKTEERIT

Bakteerit ovat kooltaan mikroskooppisia ja suhteellisen yksinkertaisia yksisoluisia organismeja (Vaara, Skurnik & Sarvas 2010, 14). Bakteerien alkeistumainen solutyyppe (prokaryootti) on saanut nimensä siitä, että niillä ei ole selvästi näkyvää ja solulimasta erillistä tumaa niin kuin aitotumallisilla, esimerkiksi ihmisen soluilla (Mäkelä 1994, 13). Useimpien bakteerien koko on noin 1-2 µm. Tämän kokoisia bakteereja ovat, esimerkiksi *Escherichia coli* (*E. coli*), stafylokokit ja neisseriat. Liian pieniä bakteereja mikroskoopilla tarkasteltaviksi ovat ne bakteerit, joiden soluseinä on rakenteeltaan vajavainen, kuten mykoplasmat, tai jotka lisääntyvät vain isäntäsolun sisällä, kuten riketsiat ja klamydiat. Selvästi *E. coli*ä mittavampia ovat monet rihmamaiset bakteerit, esimerkiksi spirokeetat ja syanobakteerit. Valomikroskoopin erottelukyky ei riitä bakteerisolun hienorakenteen tarkasteluun. (Vaara, Sarvas & Mäkelä 1997, 314.)

Prokaryooteilla ei ole varsinaista tumaa, vaan niiden DNA on kiinni solukalvossa. Niiltä puuttuvat myös mitokondriot, kloroplastit, ER ja Golgin laite. Soluseinänsä rakenteen pohjalta bakteerit jaetaan grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin. Bakteerit ovat erittäin nopeita lisääntymään, esimerkiksi tutkituin *E. coli* voi suotuisissa oloissa jakaantua joka 20. minuutti. Nopean jakautumiskykynsä ansiosta bakteerit ovat erittäin nopeita sopeutumaan muuttuneisiin elinoloihin. Vaikka bakteerien rakenne on yksinkertainen, niiden aineenvaihdunta saattaa olla erittäin kehittynyt ja erikoistunut. Siten bakteerit voivat käyttää hyväkseen lähes mitä tahansa orgaanista rakennetta. (Solunetti 2006, viitattu 3.6.2015.)

Yleisimmät bakteerisolun muodot ovat pallomainen kokki (coccus) ja sauvamainen basilli (bacillus). Pitkänomaiset solut voivat olla kaarevia (vibriot), tai kasvaa yhteen muodostaen rihmastoja (mycelium). Spiraalinmuotoiset solut ovat joko spirillejä (jäykät) tai spirokeettoja (joustavat). Muodoltaan vaihtelevat bakteerit ovat pleomorfisia. (Prescott, Harley & Klein 2002, 42-44.)

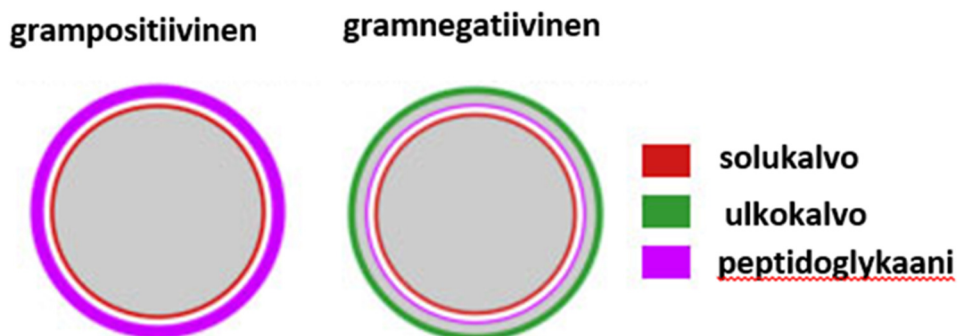
Myös bakteerien ryhmityksessä, eli siinä miten peräkkäisten solunjakaantumisten jakaantumis-suunnat suhtautuvat toisiinsa, ja kuinka kauan jakaantuneet solut pysyvät yhdessä, on vaihtelua, jota käytetään apuna tunnistamisessa. Kokit voivat olla esim. pareittain (diplokokit), neljän solun neliömäisenä ryhmänä, kahdeksan solun kuutiomaisena ryhmänä (*Sarcina*), ketjuina (streptokokit) tai rykelminä (stafylokokit). Bakteerit näkyvät yleensä mikroskoopissa niille luonteenomaisissa ryhmissä. (Vaara ym. 1997, 315; Prescott ym. 2002, 43; Niemi 2003, 8.)

2.1 Bakterien rakenne ja luokittelu

Useimmilla bakteereilla on eläinsoluista poiketen plasmamembraanin ulkopuolella niin sanottu soluseinä. Sytoplasman osmoottinen paine on korkea (5-25 atm) ja kohdistuu sytoplasmiseen membraaniin; soluseinä estää solujen osmoottisen hajoamisen. Soluseinä antaa myös bakteerisoluille niille ominaisen pallomaisen, sauvamaisen, nauhamaisen tai korkkiruuvimaisen muodon. (Prescott ym. 2002, 55.)

Soluseinän rakenne on bakteereille varsin ominainen, ja tämä onkin monien antibioottien toimintamekanismin perustana. Bakteereille on ominaista, että solukalvon ulkopuolella on luja soluseinä, joka määrää bakteerin muodon, ja lujittaa sitä. Soluseinättömiä ovat ainoastaan mykoplasmat ja eräät arkit. (Vaara ym. 2010, 21.)

Bakterien soluseinän keskeisin materiaali on verkkomainen peptidoglykaanipolymeeri, jota kutsutaan mureiiniksi. Bakteerit jakaantuvat soluseinän rakenteen perusteella kahteen pääluokkaan, grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin bakteereihin (kuvio 1). Tämä ero tulee esiin bakteerien gramvärjäyksessä. Grampositiiviset bakteerit ovat tumman sinivioletteja ja gramnegatiiviset vaaleanpunaisia. Grampositiivisella bakteerilla peptidoglykaanista muodostunut soluseinä on paljon paksumpi kuin gramnegatiivisella bakteerilla. Gramnegatiivisella bakteerilla on soluseinässään ylimääräinen niin sanottu ulkomembraani. Solu- ja peptidoglykaanikalvon väliin jää suhteellisen suuri tila, jota kutsutaan periplasmiseksi tilaksi. (Prescott ym. 2002, 55; Niemi 2003, 11; Vaara ym. 2010, 21.)



KUVIO 1. Grampositiivisen ja gramnegatiivisen bakteerin soluseinän rakenne (mukaiillen Solunetti 2006, viitattu 3.6.2015)

2.2 Ihminen ja mikrobit

Jo ensimmäisten syntymää seuraavien tuntien aikana vastasyntyneen iholle, limakalvoille ja suolistoon alkaa syntyä harmittomien mikrobien muodostamia elinyhteisöjä. Lopulta näille alueille kehittyy tyypillinen suhteellisen vakaa mikrobisto niin sanottu normaalifloora. Normaaliflooran laatuun vaikuttavat monet tekijät kuten ravinnon laatu, ihmisen ikä ja hormonitoiminta sekä elintavat. Suoliston normaalifloora sisältää yleensä hyvin paljon hapettomissa olosuhteissa eläviä, eli anaerobisia bakteereja, sekä seuraavaksi suurimpana ryhmänä myös niin sanottuja enterobakteereja. Nielun normaalifloora puolestaan sisältää anaerobisten bakteerien lisäksi runsaasti muun muassa viridans-ryhmän streptokokkeja. Melko tyypillinen flooransa on myös iholla, ulkokorvalla, ja virtsaputkella. Sen sijaan elimistön syvemmät osat kuten esimerkiksi verenkierto, kudokset, keuhkot, munuaiset ja ruumiinontelo ovat terveillä henkilöillä aina mikrobittomia eli steriilejä. (Vaara ym. 1997, 259; Prescott ym. 2002, 699.)

Normaaliflooralla on tärkeä merkitys elimistön immuunivastetta stimuloivana tekijänä. Antibiootit horjuttavat normaaliflooraa ja seurauksena saattaa olla esimerkiksi tiettyjen haitallisten mikrobien rikastuminen. Myös ne henkilöt, joilla on synnynnäinen, hankittu tai hoidon aikaansaama immuunivajavuus, omaavat lisääntyneen infektioriskin (Vaara ym. 1997, 259-262; Karhumäki, Jonsson & Saros 2010, 39).

Mikrobinäyte otetaan tavallisimmin infektiotalueelta, esimerkiksi nielun bakteeritulehdusta epäiltäessä nielusta ja haavatulehduksessa haavasta. Tulosten tulkintaa voi vaikeuttaa normaaliflooran läsnäolo. Elimistön normaalisti steriililtä alueelta löydetty mikrobi on aina tärkeä löydös, ellei se ole päässyt näytteeseen näytteenoton yhteydessä esimerkiksi iholta. (Vaara ym. 1997, 265.)

Veriviljely on usein hyödyllinen; moniin tartuntatauteihin liittyy tilapäinen bakteremia, vaikka varsinainen tulehdus olisikin kudoksissa. Veriviljely on hyödyllinen myös silloin kun näytettä ei saada tutkittavaksi esimerkiksi syvällä elimistössä olevasta infektiokokkeesta. Näyte on viljeltävä mahdollisimman pian, koska muuten mikrobien määräsuhteet voivat muuttua ja herkäät taudinaiheuttajat kuolla. (Vaara ym. 1997, 265.) Liitteissä 1 ja 2 on luetteloituna yleisimpiä ihmiselle infektiota aiheuttavia bakteereita gramvärjätyvyyden mukaan.

3 GRAMVÄRJÄYS

Ennen bakteerinäytteen mikroskopointia siitä tehdään tavallisesti kiinnitetty ja värjätty preparaatti. Differentiaalisen värjäyksen tarkoituksena on erotella mikrobit, useimmiten bakteerit, sen perusteella, miten ne värjäytyvät tietyllä käsittelyllä. Tunnetuin differentiaalinen värjäysmenetelmä on gramvärjäys (Christian Gram, 1884), jonka merkitys on siinä, että se erottelee bakteerit kahteen luokkaan – grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin. (Prescott ym. 2002, 28; Niemi 2003, 6; Charma 2007, 29.)

Kiinnittämättömissä ja värjäämättömissä niin sanotuissa natiivivalmisteissa bakteerit näkyvät varsin heikosti varjomaisina muodostelmina, ellei käytetä optisia erikoismenetelmiä, kuten faasikонтрасти- tai pimeäkenttämikroskooppia, jotka lisäävät taustan ja bakteerien välistä kontrastia (Vaara ym. 1997, 315). Näytteiden säilyvyys ja mikrobien rakenteiden tunnistaminen paranevat, kun näyte kiinnitetään ja värjätään (Prescott ym. 2002, 27).

3.1 Värjäyksen perusteet

3.1.1 Kiinnitys

Tutkittavat solut on kiinnitettävä, jotta niiden rakenne ei hajoa ja näytteestä saadaan kestävä. Mikroskoopilla katsottavien solujen tulisi olla ulkonäöltään mahdollisimman lähellä eläviä soluja. Kiinnityksellä säilytetään solujen ulkoiset ja sisäiset rakenteet sekä saadaan mikro-organismit säilymään ja pitämään paikkansa. Samalla kiinnitys inaktivoi entsyymejä, jotka vaikuttavat solun morfologiaan, ja vahvistaa solun rakenteita, jotta ne kestävät värjäyksen ja mikroskopoinnin. (Prescott ym. 2002, 27.)

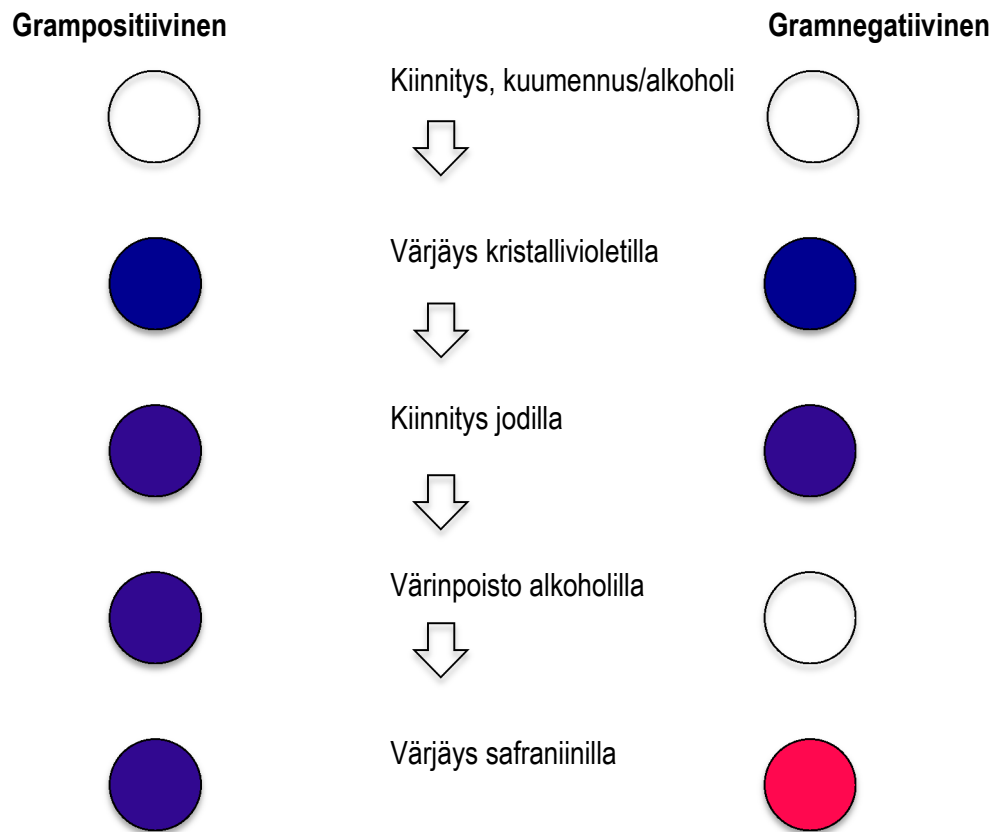
Bakteereille perinteinen tapa on kiinnittää solut kuumentamalla; lasilevyille kuivatut bakteerit vietään lyhyesti Bunsen-liekin läpi. Tällöin solujen ulkoinen rakenne säilyy, mutta sisäiset rakenteet eivät. Soluille käytetään kemiallista kiinnitystä, jolloin proteiinit denaturoidaan rakenteita hajottamatta. Tavallisia kemiallisia kiinnitysaineita ovat etanoli, etikkahappo, elohopeakloridi, formaldehydi ja glutaraldehydi. (Prescott ym. 2002, 27; Niemi 2003, 5; Charma 2007, 28.)

3.1.2 Värjäys

Mikrobien värjäykseen käytetyissä väriaineissa tarvitaan 1) kromofori, värillinen osa, joka antaa molekyylille värin ja 2) ryhmä tai ryhmiä, jolla molekyyli sitoutuu sopivaan mikrobin rakenteeseen. Sitoutuminen voi perustua ionisiin, kovalentteihin tai hydrofobisiin sidoksiin. Emäksiset väriaineet sitoutuvat negatiivisesti varattuihin molekyyleihin (nukleiinihapot ja eräät proteiinit). Koska bakteerien ulkopinnat ovat negatiivisesti varattuja, emäksiset värit soveltuvat hyvin bakteerien värjäykseen. Tyypillisiä emäksisiä väriaineita ovat metyleenisininen, emäksinen fuksiini, kristallivioletti, safraniini ja malakiittivihreä. Happamat väriaineet sitoutuvat positiivisesti varattuihin rakenteisiin, kuten esimerkiksi karboksyyliiryhmiin (-COOH) sekä fenolihydroksyyliiryhmiin (-OH). Tyypillisiä happamia väriaineita ovat eosiini, rose bengal ja hapan fuksiini. pH vaikuttaa värjäyksen tehokkuuteen, koska solujen varaus muuttuu pH:n funktiona. Niinpä anioniset värit värjäävät parhaiten happamissa olosuhteissa, kun proteiinit ja monet muut molekyylit ovat positiivisesti varautuneita. (Prescott ym. 2002, 27.)

Gramvärjäys käyttää hyväkseen kahta emäksistä väriainetta – kristalliviolettia ja safraniinia. Grampositiivisista organismeista jodilla kiinnitetty kristallivioletti ei lähde pois kun taas gramnegatiivisista väri irtoaa, jonka jälkeen ne värjätään safraniinilla. (Prescott ym. 2002, 28; Niemi 2003, 6; Charma 2007, 29.)

Gramvärjäyksessä käytetään ensin emäksistä kristalliviolettia, joka tunkeutuu kaikkien bakteerien soluseinän läpi ja värjää ne kaikki samalla tavoin. Seuraavaksi väri kiinnitetään kalium-jodidiliuksella. Jodi muodostaa kristallivioletin kanssa liukenemattomia komplekseja, jotka vapautuvat bakteerisolusta, jos soluseinä vaurioituu. Tämän jälkeen preparaattia huuhdellaan joko asetonilla tai alkoholilla tai näiden sekoituksella. Alkoholikäsitteily tekee helpommin reikiä gramnegatiivisten bakteerien seinämään, jossa peptidoglykaanikerros on ohut kuin grampositiivisten bakteerien seinämään. (Meurman 2010b, 4.) Grampositiiviset bakteerit säilyttävät violetin värin ja gramnegatiivisista se huuhtoutuu pois. Lopuksi preparaatti jälkivärjätään vastavärillä, joka on yleensä safraniini, ja gramnegatiiviset bakteerit saadaan näkyviin punaisina. Tavallisessa gramvärjäyksessä itiöt eivät yleensä värjäy, mutta erottuvat hyvin värjäytyntä solua vasten. (Vaara ym. 1997, 314.) Kuviassa 2 on esitettyä värin muodostuminen grampositiivisilla ja – negatiivisilla bakteereilla.



KUVIO 2. Värin muodostuminen grampositiivisilla ja – negatiivisilla bakteereilla (Meurman 2010b, 2)

3.1.3 Gramvärjäyksen mekanismi

Prescottin mukaan gramvärjäyksessä bakteerien eri värjäytyvyys johtuu soluseinän fyysisestä rakenteesta. Jos soluseinä poistetaan grampositiivisesta solusta, tulee siitä gramnegatiivinen. Peptidoglykaani itsessään ei värjäydy. Sen sijaan se toimii ”puomina”, joka estää kristallivioletin poistumisen solusta. Värjäysprosessin aikana jodikäsittely edistää värin rentoittumista soluseinän läpi. Tämän jälkeisen alkoholikäsittelyn ajatellaan pienentävän grampositiivisen bakteerin paksun peptidoglykaaniseinämän huokosia. Siksi väri-iodine kompleksi säilyy ja bakteerin väri jää sinivioletiksi. Gramnegatiivisten bakteerien peptidoglykaanikerros on ohut, niukemmin ristiinsitoutunut ja huokokset ovat suurempia. Värjäyksen alkoholikäsittely irrottaa rasvoja gramnegatiivisen bakteerin seinämästä ja siten kasvattaa sen huokoisuutta edelleen. Tämän vuoksi alkoholi helposti huuhtelee kristallivioletin värin gramnegatiivisesta bakteerista. (Prescott ym. 2002, 60.)

3.2 Gramvärjäyksen käyttö kliinisessä mikrobiologiassa

Gramvärjäys on vanha hyvä menetelmä, jota käytetään edelleen jokapäiväisessä diagnostiikassa. Veri- tai aivo-selkäydinnesteviljelyä varten otetuista näytteistä tehdään yleensä gramvärjäys heti näytteenoton jälkeen (aivo-selkäydinneste) tai viimeistään siinä vaiheessa, kun näytteissä on havaittu bakteerikasvua. (Kauma & Virolainen-Julkunen 2010, 117.) Taulukossa 1 on esitettyinä gramvärjäysten lähtömateriaalien erityispiirteitä.

TAULUKKO 1. Gramvärjäysten lähtömateriaalien erityispiirteitä (Meurman 2010b, 10)

	Gramvärjäyksen lähtömateriaali		
	Veriviljely	Pesäke	Potilasnäyte
Mikrobien löytyminen	Lähes varma	Varma	Epävarma
Mikrobimäärä	Vaihteleva *	Suuri	Vaihteleva, usein vähäinen
Mikrobien ryhmittäminen	Normaali	Poikkeava	Vaihteleva
Mikrobien lajimäärä	Yleensä yksi	Yksi	Vaihteleva
Häiritsevä tausta	Yleensä vähäinen	Ei ole	Usein runsas

*positiivisessa näytteessä suuri määrä

3.3 Gramvärjäyksen tulkinta

Kliinisestä näytteestä tehdyn preparaatin tulkinna voidaan katsoa sisältävän seuraavat vaiheet:

1. onko näyte edustava ja kelvollinen
2. löytyykö mikrobeja
3. ovatko mikrobit grampositiivisia vai gramnegatiivisia
4. ovatko mikrobit kokkeja vai sauvoja (Meurman 2010b, 31).

Normaalisti valomikroskoopissa on kolme objektiivia, 10x, 40x ja 100x objektiivit. 10x okulaarin avulla preparaatin todellinen suurennos on 100x, 400x ja 1000x. Edustavuus ja kelvollisuus todetaan yleensä pienemmällä mikroskoopin suurennoksella. Preparaatteja tarkastellaan 100x objektiivilla, jolloin bakteereista saadaan 1000-kertainen suurennos. Yleensä 100x objektiivit ovat öljymersio objektiiveja. Immersioöljy on tarpeellinen preparaatin ja objektiivin välissä valon taitekertoimen vuoksi. (Meurman 2010a, 55.)

3.4 Virhelähteet ja laadun arviointi

Virheellistä värjäytymistä tapahtuu ajoittain ja alla on lueteltu muutamia virhelähteitä väärin värjäytymiseen.

Grampositiivinen värjäytyy gramnegatiiviseksi:

- ohut valmiste
- bakteerin stationaarinen kasvuvaihe
- antibioottihoito
- näyte hangattu lasille
- liika kuumennus kiinnityksessä
- liian pitkät vesipesut
- vanhentunut jodiliuos
- vettä värinpoistoliuoksessa

Gramnegatiivinen värjäytyy grampositiiviseksi:

- paksu valmiste
- liian kuiva lasi ennen värinpoistoa
- kristalliviolettiä värinpoistoliuoksessa
- jodia värinpoistoliuoksessa
- detergenttiä näytteessä (Meurman 2010b, 26).

4 MENETELMÄN VALIDOINTI

Ihmisiin kohdistuvaa laboratoriotointia säädellään Suomessa lailla. 1.5.2011 voimaan tullut terveydenhuoltolaki velvoittaa, että sairaanhoitopiirin kuntayhtymän on vastattava kunnallisen terveydenhuollon tuottamien laboratoriopalvelujen kehittämisen ohjauksesta ja laadun valvonnasta. (Terveydenhuoltolaki 2010.) Validointi on tärkeä toimenpide menetelmän antamien tulosten luotettavuuden kannalta, sillä ei riitä, että toiminnan sanotaan olevan laadukasta, se tulee myös voida osoittaa. Validointi on menetelmän kelpoisuuden osoittamista. (Ehder 2005, 25.)

Validoinnille asetettavat vaatimukset vaihtelevat muun muassa menetelmän ja sen käyttötarkoituksen mukaan. Uuden menetelmän kehittäjä (esimerkiksi standardisoiomisjärjestö) suorittaa yleensä täydellisen validoinnin, joka edellyttää laajoja laboratorioden välisiä tutkimuksia. Laboratorioissa validointi liittyy useimmiten standardimenetelmien ja muiden yleisesti käytössä olevien menetelmien käyttöönottoon. Siksi validointi voidaan laboratoriossa suorittaa suppeahkona, dokumentoituna menettelyinä, jonka tarkoituksena on osoittaa, että menetelmä toimii myös tässä laboratoriossa. (Elintarvikevirasto 1998, 1.)

4.1 Mikrobiologisten menetelmien validointi ja niihin liittyvä epävarmuus

Validoinnin tarkoituksena on tuottaa vertailuarvoja suureille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Mikrobiologiassa tällaisia suureita ovat oikeellisuus eli täsmällisesti oikean tuloksen määrittäminen, toistettavuus, uusittavuus, toteamisraja, spesifisyys, lineaarisuus ja herkkyys. (Elintarvikevirasto 1998, 1.) Tässä työssä käytetään edellä mainituista suureista toistettavuutta ja uusittavuutta. Toistettavuus on peräkkäisten toistojen antamien tulosten paikkansapitävyys kun analyysi suoritetaan samoissa mittausolosuhteissa samojen henkilöiden toimesta lyhyellä aikavälillä. Toistettavuus määritetään tekemällä useita rinnakkaismäärytyksiä erityyppisistä näytteistä eri pitoisuuksilla. Uusittavuus kuvaa tulosten yhtäpitävyyttä eri olosuhteissa (esimerkiksi laboratorioden välinen uusittavuus) tai pidemmällä aikavälillä (laboratorion sisäinen uusittavuus). Laboratorion sisäistä uusittavuutta voidaan tutkia tekemällä samasta näytteestä useita määrytyksiä pidemmän ajan kuluessa. (NordVal / NMKL 2009, 2; Saari 2010.)

Kemialliset ja mikrobiologiset analyysit poikkeavat toisistaan perusajatuksellisesti. Kemiallisessa analyysissä pyritään liuottamalla, uuttamalla, saostamalla, fraktioimalla tai muulla vastaavalla menettelyllä erottamaan analyytti näytteestä. Mikäli analyyttiä joudutaan laimentamaan, se tehdään näiden vaiheiden jälkeen. Laimennetunkin analyysin (atomit, molekyylit) hiukkaspitoisuus on yleensä suuri, joten satunnainen hajonta vaikuttaa kemiallisissa analyysissä hyvin vähän tuloksiin. (Elintarvikevirasto 1998, 2.)

Mikrobiologiassa näyte analysoidaan mikrobeineen, materiaaleineen ja häiritsevine taustoineen. Analyysin erottelu tapahtuu vasta kasvatusalustalla. Mikrobiologiassa menetelmän spesifisyyteen vaikuttaa kasvatusalustan koostumus ja kasvatusolosuhteet kuten myös tutkittavien mikrobikantojen ominaisuuksien vaihtelu. Näyte joudutaan laimentamaan kvantitatiivista määrittystä varten sellaiselle pitoisuustasolle, että on mahdollista laskea yksittäisten solujen muodostamat pesäkkeet. Jotta laskeminen olisi mahdollista, solumäärän tulee olla enintään muutamia satoja tutkittavassa näytteessä. Tällöin rinnakkaisanalyysien pesäkemäärät voivat vaihdella suuresti ilman virhettä. (Elintarvikevirasto 1998, 2.)

Oikeellisuuden eli täsmällisesti oikean tuloksen määrittäminen on mikrobiologiassa vaikeaa. Mikrobit ovat elävää materiaalia, joten niistä ei pystytä tekemään valmisteita, joiden todellinen pitoisuus olisi selvillä ja pysyisi muuttumattomana. Mikrobiologiassa oikeana tuloksena pidetään useiden toistojen keskiarvotulosta ja referenssimateriaaleilla saadun hyväksytytyn arvon lähekkäisyyttä. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 3.)

Mikrobiologiassa merkittävin epävarmuustekijä on homogeenointi, jonka yhteydessä saattaa tuhoutua mikrobeja eikä niitä välttämättä saada täydellisesti irtaantumaan tutkittavasta materiaalista. Muita analyysitulokseen vaikuttavia epävarmuustekijöitä ovat työntekijäkohtaiset työskentelyerot, kuten pesäkkeiden tulkintaerot, jotka liittyvät näytteen ja mikrobien ominaisuuksiin. Lisäksi ongelmia saattavat aiheuttaa näytteen ominaisuudet, taustamikrobiston luonne ja muut vaikeasti määriteltävät tekijät. Näiden syiden takia rinnakkaisanalyysissä voi esiintyä huomattavan paljon hajontaa. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 3.)

4.2 Validoinnin vaiheet

Menetelmän validointi koostuu validointisuunnitelmasta, validointimittauksista, tulosten käsittelystä sekä raportoinnista. Kaikki validointiin liittyvät tulokset kirjataan niin, että niiden perusteella voidaan sanoa, soveltuuko menetelmä käyttötarkoitukseensa vai ei. (Hiltunen ym. 2011, 24-25.) Mikrobiologisten menetelmien validoinnissa pitää muistaa ottaa huomioon mikrobiologisten menetelmien erityispiirteet. Näytteissä olevat mikrobit ovat elävää materiaalia, joten näytteiden käsittelyyn tulee kiinnittää erityistä huomiota. Infektorisikin minimoimiseksi näytteiden käsittely tapahtuu laminaari-kaapeissa käyttäen tarvittavia suojavälineitä, kuten suojakäsineitä. Näytteiden todellinen mikrobipitoisuus ei ole tiedossa eikä se pysy vakiona. Valitut mikrobikannat valitaan tapauskohtaisesti siten, että mukana on kasvuvaatimuksiltaan ja muilta ominaisuuksiltaan sopivia kantoja. Mikrobikannat käsitellään siten, että saadaan kuhunkin tarkoitukseen sopiva mikrobipitoisuus. Pesäkeviljelyn jälkeen näytteistä tehdään yleensä sopivat laimennossarjat. Rinnakkaisten laimennosten välillä saattaa esiintyä suurtakin vaihtelua ilman, että kyseessä on virhe. (Elintarvikevirasto 1998, 2-3; Ehder 2006, 9.)

4.2.1 Validointisuunnitelma

Ennen varsinaista validointimenettelyä on laadittava validointisuunnitelma. Validointisuunnitelmassa kerrotaan soveltuvin osin validoinnin tarkoitus ja soveltamisala, menetelmälle asetettavat vaatimukset, periaatteet ja suoritustapa sekä määritelmät. Lisäksi siinä kerrotaan näytteenottoa, -käsittelyä ja kuljetusta koskevista menettelyistä. Suunnitelmaan kirjataan käytettävät testimateriaalit, käytetyt referenssit, reagenssit ja laitteet. Saatuja tuloksia vertaillaan muilla menetelmillä saatuihin tuloksiin, kuvataan tulosten käsittelyn periaatteet, työn suorittaja ja aikataulut sekä kirjoitetun suunnitelman laatija ja hyväksyjä. (ISO 17025, 2005, 36.)

Tässä työssä PREVI® Color gramvärjäysautomaatin validoinnissa päätettiin käyttää vakiokantoina grampositiivista *Staphylococcus aureus* -bakteeria ja gramnegatiivista *E. coli* -bakteeria, joiden todettiin olevan kasvuolosuhteiltaan ja gramvärjäytyvyyksiltään tutkimukseen sopivat. Vertailumenetelmäksi sovittiin manuaalinen gramvärjäys. Toistettavuuden toteamiseksi sovittiin, että rinnakkaismääryksiä tehdään 10 kertaa. Uusittavuuden kontrolloimiseksi jokaiseen ajoon otetaan mukaan vakiokannoista valmistetut levityspreparaatit.

4.2.2 Validointiin liittyvä dokumentointi

Laboratorion laadunvarmistukseen kuuluu kaikkien tehtyjen analyysien ja mittausten raportointi sekä niiden arkistointi. Myös validointiin liittyvistä mittauksista laaditaan validointiraportti, josta selviää työn tavoite, toteutus sekä mittauksiin käytetty laitteisto, välineistö ja materiaalit. Raportointi ja sen laajuus riippuvat validoinnin sisällöstä. Validointiraporttiin kirjataan validointisuunnitelman mukaiset toimenpiteet ja niiden tulokset. Validointiraportissa esitetään myös menetelmän käyttöönottoaikataulu sekä tarvitaanko menetelmän käyttöönottamiseksi lisätoimenpiteitä. Raportti sekä validoinnissa syntyvä alkuperäinen tulosaineisto arkistoidaan. Validointiraportin yhteenvedossa todetaan, soveltuuko menetelmä aiottuun käyttötarkoitukseen ja täyttyykö sille asetetut vaatimukset. Validointi on uusittava, mikäli laadunvarmistustulosten perusteella huomataan systemaattisia muutoksia. (Ehder 2005, 38.)

5 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Opinnäytetyössä tutkittiin ja validoitiin PREVI® Color gramvärjäysautomaatin käyttö klinisen bakteriologian potilasnäytetutkimuksiin, joihin kuuluu bakteerin gramvärjäys. PREVI® Color gramvärjäysautomaatin soveltuvuutta testattiin tekemällä riittävä määrä ajo-ohjelmia eri näytetyypeille. Lisäksi haluttiin selvittää värjäkö PREVI® Color gramvärjäysautomaatti potilasnäytteet yhtä hyvin kuin puhdasviljellyt ATCC-vakiokannat. Tutkimus toteutettiin vertaamalla värjäysautomaatilla värjättyjä näytteitä manuaalisesti tehtyihin gramvärjäyksiin. Työn tavoitteena oli saada laitteen värjäyslaatu sellaiselle tasolle, ettei manuaalisesti tehtäviä gramvärjäyksiä tarvittaisi.

5.1 Toimintaympäristö ja tutkimuksen suunnittelu

Toiminnallinen opinnäytetyö toteutettiin Pohjois-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä NordLabin Kemin aluelaboratorion mikrobiologian laboratoriossa Länsi-Pohjan keskussairaalassa. Mikrobiologian laboratorioon on hankittu bioMérieux SA:n valmistama PREVI® Color gramvärjäysautomaatti, jonka koestusta haluttiin tarkentaa, koska laitteen perusohjelmalla suoritettujen värjäykset eivät ole olleet laadultaan riittävän hyviä.

NordLabin Kemin klinisen mikrobiologian aluelaboratoriossa tehdään erilaisia mikrobiologisia tutkimuksia. Veriviljelynäytteitä tulee laboratorion veriviljelyautomaattiin vuodessa noin 6500, joista positiivisia löydöksiä on murto-osa. Veriviljelyautomaatin positiivisiksi ilmoittamista pulloista tehdään akridiinioranssi- ja gramvärjäys. Eristetty bakteeri(t) tunnistetaan ja sille määritetään mikrobiolääkeherkkyys. Kudon- ja märkänäytteitä laboratorion tehtäväksi tulee vuodessa noin 3000. Näytteet voivat olla mm. pinta-, makuu- tai syvähaavoista, palovammasta, dreeneritteitä tai kudospaloja.

Ennen varsinaista koestusta bioMérieux SA:n edustaja antoi koulutuksen laitteen käyttöön Kemin klinisen mikrobiologian laboratoriossa. Yhdessä NordLabin Kemin aluelaboratorion työnohjaajien kanssa laadittiin validointisuunnitelma, jossa kerrottiin validoinnin kohde, validoinnin syy ja tavoitteet, validointiin sisältyvät tutkimukset, käytettävät raaka-aineet ja materiaalit, vertailumenetelmä, toistettavuus ja uusittavuus; lisäksi kerrottiin validoinnin vastuuhenkilöt. Validointisuunnitelma hyväksyttiin NordLabin vastuuhenkilöllä, minkä jälkeen varsinainen kokeellinen osuus käynnistyi.

5.2 Gramvärjäysautomaatti

PREVI® Color gramvärjäysautomaatti on bioMérieux SA:n kehittämä laite, joka on suunniteltu gramvärjäämään objektilasilla olevia sivelynäytteitä. PREVI® Color gramvärjäysautomaattia markkinoidaan nopeana, standardoituja tuloksia antavana ja mikrobiologisten prosessien tehokkuutta lisäävänä automaattina. Lisäksi se on helppokäyttöinen ja vähentää sekä reagenssien että jätteen määrää samalla kun se parantaa gramvärjäyksen laatua ja yhtenäisyyttä. (BioMérieux Inc 2014.)

PREVI® Color gramvärjäysautomaatissa käytettävät reagenssit ovat päävärinä toimiva kristalliviolettiliuos (Crystal violet C solution), peittausaineena toimiva jodiliuos (Iodine B solution), värinpoistajana sekä vastavärinä toimiva asetoni-safraniiniliuos (Acetone Safranin A solution), tislattu vesi sekä etanoli. Vastavärinä voidaan käyttää myös pelkkää safraniinia tai fuksiinia asetonilla tai ilman. Tislattun veden tilalla voidaan käyttää myös deionisoitua vettä. Etanolin tilalla puolestaan voidaan vaihtoehtoisesti käyttää metanolia. Käytettävän alkoholin etanolipitoisuuden pitää olla yli 90 %. Gramvärjäyksen kemiallinen mekanismi perustuu siihen, miten kristallivioletti-jodi-yhdistelmä läpäisee soluseinän. Gramvärjäys tuottaa näytteitä, joissa grampositiiviset bakteerit ovat väriltään violetteja tai mustia ja gramnegatiiviset bakteerit ovat väriltään pinkkejä tai punaisia. (BioMérieux S.A 2013, 2-3 – 2-4.)

PREVI® Color gramvärjäysautomaatti soveltuu seuraaville solususpensioille:

- veri
- bronkoalveolaarinen huuhtelunäyte (BAL)
- selkäydinneste (CSF)
- uloste
- yskös
- vaginanäyte
- virtsa
- haavaerite
- puhtaat eristetyt kannat (grampositiivinen, gramnegatiivinen, hiiva). (BioMérieux S.A 2013, 2-2.)

PREVI® Color gramvärjäysautomaattia on saatavilla 12- tai 30-paikkaisella näytekarusellilla. Ajossa voidaan kristallivioletille sekä jodille määrittää kolme asetusta: matala (low), keskitaso (medium) ja korkea (high). Värinpoistolle voidaan asettaa yhdeksän tasoa. Laittevalmistaja suosittelee, että laitteessa käytettäisiin värinpoistossa tasoa 2 tai 3. Fiksaatiolle eli kiinnittämiseksi on valittavissa kolme tasoa: pois (off), normaali (normal) tai korkea (high). Laitteeseen voidaan tallentaa erilaisia värjäysasetuksia erilaisille näytetyypeille. Näytelasit asetetaan karuselliin näytepuoli myötapäivään. Reagenssit tulevat ajon aikana laselle sumutussuuttimien läpi karusellin pyöriessä automaattissa. (BioMérieux S.A 2013, 2-4.)

NordLabin Kemin aluelaboratorion mikrobiologian laboratoriossa on käytössä PREVI® Color gramvärjäysautomaatti, jossa on 12 paikkainen näytekaruselli. Koestuksessa käytettiin päävärinä kristalliviolettiliuosta (Crystal violet C solution 29524), peittausaineena toimi jodiliuos (Iodine B solution 29523) ja värinpoistajana sekä vastavärinä toimi asetoni-safraniiniliuos (Acetone Safranin A solution 29519). Muita reagensseja olivat deionisoitu vesi ja alkoholi, jonka etanolipitoisuus oli 99,5 %:a.

5.3 Värjäysautomaatin parametrien optimointi esitestauksessa

Värjäysautomaatin parametrit optimoitiin valmistamalla laboratorion omista tunnetuista ATCC-bakteerikannoista (American Type Culture Collection) 54 levityspreparaattia per bakteerikanta. ATCC-bakteerikannoista valittiin grampositiivinen *Staphylococcus aureus* ATCC29213 ja gramnegatiivinen *E. coli* ATCC25922. Puhdasviljelyistä valmistettiin bakteerisuspensiot steriiliin veteen. Suspensioiden vahvuus oli 2,0 McFarlandia. Objektilasille pipetoitiin 50 µl bakteerisuspensiota ja lasien annettiin kuivua huoneilmassa. Puolet valmistetuista grampositiivisista ja gramnegatiivisista näyteobjektileiseista kiinnitettiin kuumentamalla. Tämän jälkeen tehtiin värjäyksiä värjäysautomaatin eri asetuksilla, tavoitteena löytää parhaan tuloksen antava asetukset edellä mainituille bakteerikannoille.

Laitteen värjäyksen laatua testattiin myös normaaleilla potilasnäytteillä kuten veriviljelyillä sekä kudos- ja märkänäytteillä, joiden bakteeriviljelytulos tunnettiin. Potilastietoja ei käytetty, sillä näytteet ovat numeroituina juoksevasti. Vain potilasnäytteen tulosta käytettiin värjäytuloksen oikeellisuuden arvioimisessa. Ainoastaan mikrobiologian laboratorion henkilökunnalla on pääsy tietojärjestelmään, jossa potilastiedot ovat. Ajoissa oli aina mukana myös standardikantojen näytelasit. Liitteessä 3 on esitetty ajoissa käytetyt värjäysasetukset ja preparaattinumerot.

Kaiken kaikkiaan esitestausvaiheessa värjättiin 149 näyteobjekttilasia PREVI® Color gramvärjäysautomaatilla, jotka kaikki myös mikroskoipoitiin. Lisäksi tehtiin gramvärjäykset kaksi kertaa manuaalisesti ATCC-bakteerikannoista valmistetuille puhdasviljelyille. Manuaalisessa gramvärjäyksessä käytettiin seuraavia FF-Chemicals in värejä: Haggerin kristalliviolettiliuos FF064 (2 % kristallivioletti), Lugolin liuos laimea FF089 (0,333 % jodi) sekä Safraniiniliuos FF203 (0,25 w/v-% safraniini).

Esitestaus suoritettiin 10. – 29.4.2015 välisenä aikana Kemin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa. Esitestaukseen kului paljon aikaa laboratoriossa. Värjäysten lisäksi PREVI® Color gramvärjäysautomaattia piti huoltaa päivittäin, viikoittain sekä kuukausittain. Lisäksi näytteiden mikroskoipointi vaati oman aikansa. Värjätyt näyteobjekttilasit mikroskoipoitiin valomikroskoopilla 100-kertaisella öljyimmissiosuurenoksella. Näyteobjekttilaseilta tarkasteltiin yleisesti näytteen värjäytyvyyttä, taustan värjäytyvyyttä ja bakteerien värjäytyvyyttä. Tuloksia verrattiin manuaaliseen gramvärjäykseen. Laseilta tehdyt havainnot kirjattiin ylös. Mikroskopiinnissa oli tiedossa mitä näytteitä tarkasteltiin ja miten kyseisen bakteerin pitäisi värjäytyä. Myös tätä tietoa hyödynnettiin vertailussa. Esitestauksessa kävi ilmi, että näyteobjekttilasit, joihin näyte oli kiinnitetty kuumentamalla, antoivat parempia värjäystuloksia. Näin ollen päätettiin, että kaikki näytteet kiinnitetään jatkossa kuumentamalla ennen värjäystä. Esitestauksen tuloksena valikoitui kaksi ajo-ohjelmaa, joiden välillä saavutettiin mielestämme parhaat värjäystulokset. Nämä ovat esitettyinä taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Esitestauksessa parhaat värjäystulokset antavat ajo-ohjelmat

Ajo-ohjelma	Decolorizer	Crystal violet	Iodine	Fixation
	1-9	<i>low /med/ high</i>	low /med/ high	off /normal /high
V (=D)	7	med	med	normal
X	7	low	med	normal

Laboratorioasiantuntijaa hyödynnettiin mahdollisimman optimaalisen värjäystuloksen antavan ajo-ohjelman valinnassa. Laboratorioasiantuntijaa pyydettiin mikroskoipoimaan näytteitä, jotka olivat värjätty taulukossa 2 esitetyillä ajoparametreilla. Yhdessä laboratorioasiantuntijan kanssa päätettiin, että validoinnissa käytetään ajo-ohjelmaa X eli taulukossa 2 alimpana olevaa ajo-ohjelmaa.

5.4 Validoinnin suorittaminen

Varsinainen validointi suoritettiin 4. – 14.5.2015 sekä 4. – 5.6.2015 Kemin klinisen mikrobiologian laboratoriossa. Validointia varten valmistettiin ATCC-bakteerikannoista uudet puhdasviljelyt. Grampositiivisesta *Staphylococcus aureus* ATCC29213:sta valmistettiin 20 levityspreparaattia, samoin gramnegatiivisesta *E. coli* ATCC25922:sta. Puhdasviljelyistä valmistettiin bakteerisuspensiot steriiliin veteen. Suspensioiden vahvuus oli 2,0 McFarlandia. Objektilasille pipetoitiin 50 µl bakteerisuspensiota ja lasien annettiin kuivua huoneilmassa, jonka jälkeen ne kiinnitettiin kuumentamalla. Tunnettujen vakiokantojen lisäksi valmistettiin levityspreparaatteja tuoreista veriviljely- ja märkänäytteistä, joiden bakteeriviljelytulos tunnettiin. Potilastietoja ei käytetty, sillä näytteet ovat numeroituina juoksevasti. Vain potilasnäytteen tulosta käytettiin värjäystuloksen oikeellisuuden arvioimisessa. Kustakin näytteestä valmistettiin 12 levityspreparaattia värjäyksiä varten. Objektilasille tiputettiin steriilisti bakteerimassaa ja sekoitettiin viljelysauvalla. Näyteobjektilasit ilmakeivattiin veto-kaapissa, jonka jälkeen ne kiinnitettiin kuumentamalla. Taulukossa 3 on esitetty validoinnissa käytetyt näytteet.

TAULUKKO 3. Validoinnissa käytetyt näytteet. Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla.

Näyte	Bakteeri	Luokitus
B = veriviljely M = märkänäyte		
Standardikanta	<i>E. coli</i> ATCC25922	gramneg. sauva
Standardikanta	<i>Staph. aureus</i> ATCC29213	grampos. kokki
B2610/2611	<i>Bacteroides Fragilis</i>	gramneg. sauva
B2380	<i>Staph. epidermidis</i>	grampos. kokki
B2498	<i>Candida albicans</i>	hiiva
B2426	<i>Staph. epidermidis</i>	grampos. kokki
B2381	<i>E. coli</i>	gramneg. sauva
B2472	<i>Serratia marcescens</i>	gramneg. sauva
B2580	G-streptokokki	grampos. ketjukokki
M964	<i>Corynebacterium sp.</i>	grampos. sauva
M1059	<i>Enterococcus faecium</i>	grampos. kokki
M1060	<i>Enterococcus faecium</i>	grampos. kokki
M1061	<i>Enterococcus sp.</i>	grampos. kokki

M1064	<i>E. coli</i>	gramneg. sauva
M1263	<i>Serratia marcescens</i> ja <i>Enterococcus faecium</i>	gramneg. sauva ja grampos. kokki
M1264	<i>Serratia marcescens</i> ja <i>Enterococcus faecium</i>	gramneg. sauva ja grampos. kokki
M1265	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	grampos. kokki
M1266	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	grampos. kokki

Validoinnissa on tarkoitus toistuvilla värjäyksillä varmistaa värjäysautomaatin toimivuus. Validointisuunnitelman mukaan uusittavuus testataan tunnetuilla vakiokannoilla; grampositiivinen *Staphylococcus aureus* ATCC2921 ja gramnegatiivinen *E. coli* ATCC25922. Toistettavuus testataan värjäämällä samat vakiokannat ja samat potilasnäytteet 10 kertaa käyttämällä samaa ajo-ohjelmaa. Validoinnissa käytettiin jokaisessa ajossa seuraava ajo-ohjelmaa: vastavärin voimakkuus (decolorizer) 7, kristallivioletti (crystal violet) low, jodi (iodine) low ja fiksaatio (fixation) normal.

Koska värjäysautomaatin näytekaruselliin mahtuu 12 näyteobjekttilasia kerrallaan, värjäys suoritettiin kolmessa erässä. Jokaisessa ajossa käytettiin blokkilasia laitetoimittajan suosituksen mukaan. Koska karuselli on tasapainotettava, jokaisessa ajossa on ollut mukana myös tyhjä objekttilasi. Näin ollen varsinaisia näyteobjekttilaseja on karusellissa ollut enimmillään 10. Kaikki näytteet myös gramvärjättiin manuaalisesti, jotta saatiin vertailumenetelmä automaattilla värjäytyille laseille. Jokaisen ajon välissä laitteella tehtiin puhdistus (clean). Ensimmäisen erän seitsemännen ajon jälkeen tehtiin lisäksi tilavuusmittaus (volume test). Koska tilavuusmittauksen tulokset olivat hyväksytyissä rajoissa, jatkettiin ajoja.

Kaikkiaan validoinnissa värjättiin 196 näyteobjekttilasia PREVI® Color gramvärjäysautomaatilla ja 18 näyteobjekttilasia gramvärjättiin manuaalisesti. Kaikki värjätyt näytteet mikroskoipoitiin valomikroskoopilla 100-kertaisella öljyimmersiosuurennoksella. Näyteobjekttilaseilta tarkasteltiin yleisesti näytteen värjäytyvyyttä, taustan värjäytyvyyttä ja bakteerien värjäytyvyyttä, lisäksi tarkasteltiin toistettavuutta ja uusittavuutta. Laseilta tehdyt havainnot kirjattiin ylös.

6 TULOKSET

Koko projektin ajan pidettiin laboratoriopäiväkirjaa, johon kirjattiin ylös kaikki työskentelyn vaiheet ja tapahtumat. Esitestausvaiheessa optimoitiin ajo-ohjelma PREVI® Color gramvärjäysautomaatille. Validoinnissa varmistettiin värjäysautomaatin toimivuutta toistuvilla värjäyksillä käyttämällä esitestauksen tuloksena syntynyttä optimaalista ajo-ohjelmaa. Vertailumenetelmänä käytettiin manuaalista gramvärjäystä.

6.1 Esitestauksen tulosten analysointi

Ennen esitestauksen aloitusta BioMérieux SA:n edustaja antoi koulutuksen laitteen käyttöön, jonka myötä saatiin käsitys mistä ajoasetuksista kannatti lähteä liikkeelle. Useita eri ajoparametriasetuksia testattiin ja värjäystuloksiin saatiin eroja. Preparaateissa havaittiin pääasiassa eroja kiinnittymisessä ja gramnegatiivisten bakteerien värjäytymisessä.

Mikroskopointi etenkin esitestausvaiheessa oli haastavaa ja aikaa vievää, jotta bakteereita oppi katsomaan ja näytteitä tulkitsemaan oikein. Varsinkin näytteet, joissa esiintyi vain muutamia heikosti värjäytyneitä bakteereita, olivat vaativimpia mikroskopoitavia. Mikroskopoinnin laadukkuutta arvioi lisäksemme mikrobiologian laboratorion henkilöstö ja näin saimme varmuutta siihen millaisia tuloksia automaatin värjäyksissä haluamme saada aikaan.

Esitestaus oli työläs, mutta antoi paljon arvokasta tietoa laitteen käytöstä, näytteiden käsittelystä ja mikroskopoinnista. Esitestauksessa kävi ilmi, että näyteobjektilasit, jotka olivat kiinnitetty kuumentamalla, antoivat parempia värjäystuloksia. Näin ollen päätettiin, että kaikki näytteet kiinnitetään jatkossa kuumentamalla ennen värjäystä. Esitestauksen myötä valikoitui optimi ajo-ohjelma validointiin.

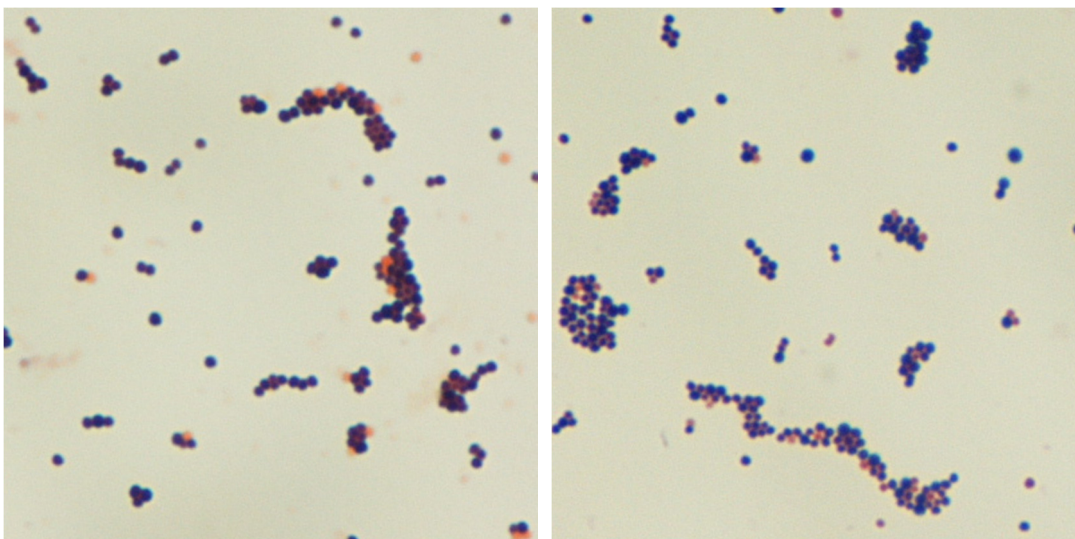
6.2 Validoinnin tulosten analysointi

Hyvän suunnittelun ja kattavan esitestauksen ansiosta varsinainen validointi sujui melko hyvin. Validoinnissa värjättiin samat vakiokannat ja samat potilasnäytteet 10 kertaa käyttämällä samaa ajo-

ohjelmaa. Värjäyksen arviointi mikroskopoimalla on kuitenkin hidasta ja perustuu aina subjektiiviseen kokemukseen. Tutkimuksen luotettavuuden lisäämiseksi konsultoiva mikrobiologian erikoislääkäri Markku Koskela mikroskopsi kahden ajon näytteet, sillä Koskelalla on vankka ammattitaito kliinisen mikrobiologian alalta.

6.2.1 Tunnetut vakiokannat

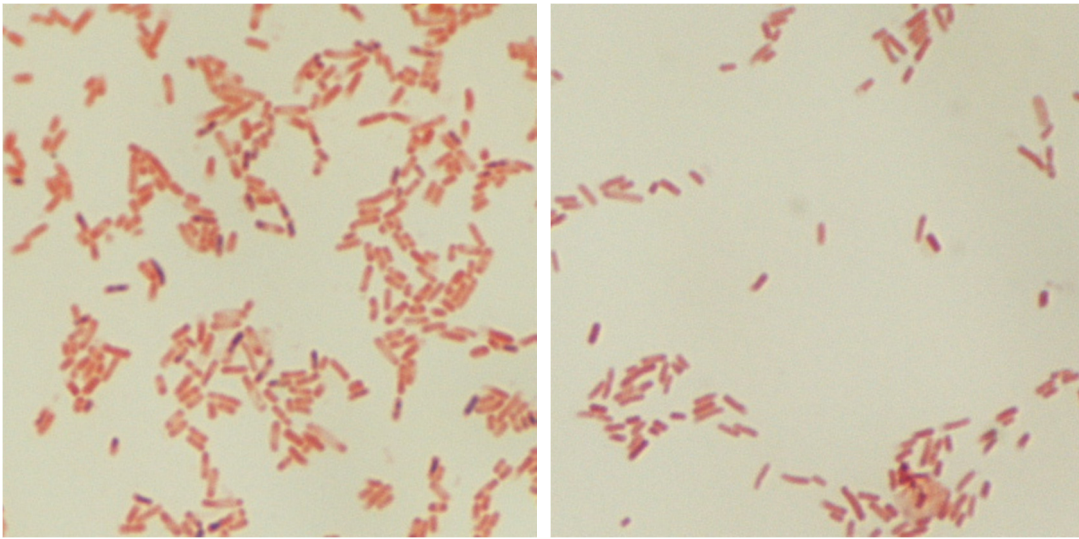
Validoinnissa uusittavuus testattiin tunnetuilla vakiokannoilla, jotka toimivat kontrollilaseina jokaisessa ajossa. Kuviossa 3 on esitetty vasemmalla grampositiivinen *Staphylococcus aureus*, joka on värjätty PREVI® Color gramvärjäysautomaatilla. Kuviossa oikealla on sama näyte värjätty manuaalisesti. Verrattaessa automaattilla värjättyä näytettä manuaaliseen värjäykseen, ei näytteiden välillä löytynyt laadullisia eroja. Myöskään toistettavuudessa ei havaittu eroavaisuuksia. Värjäysautomaatilla värjätty kaikki 10 näytettä olivat värjäytyneet samalla tavalla ja värjäystulosta pidettiin hyvänä.



KUVIO 3. Grampositiivinen *Staphylococcus aureus* värjättyinä koneella ja manuaalisesti (oikea)

Kuviossa 4 on esitetty vasemmalla gramnegatiivinen *E. coli*, joka on värjätty PREVI® Color gramvärjäysautomaatilla. Kuviossa oikealla on sama näyte värjätty manuaalisesti. Verrattaessa koneella värjättyä näytettä manuaaliseen värjäykseen, todettiin, että koneella saatiin kirkkaampi värjäystulos, mutta koneajoissa oli tapahtunut enemmän väärinvärjäytymistä, eli gramnegatiivinen *E. coli* oli värjäytynyt grampositiiviseksi. Kuitenkin jokaisesta automaattilla värjäystä näytteestä tunnisti, että

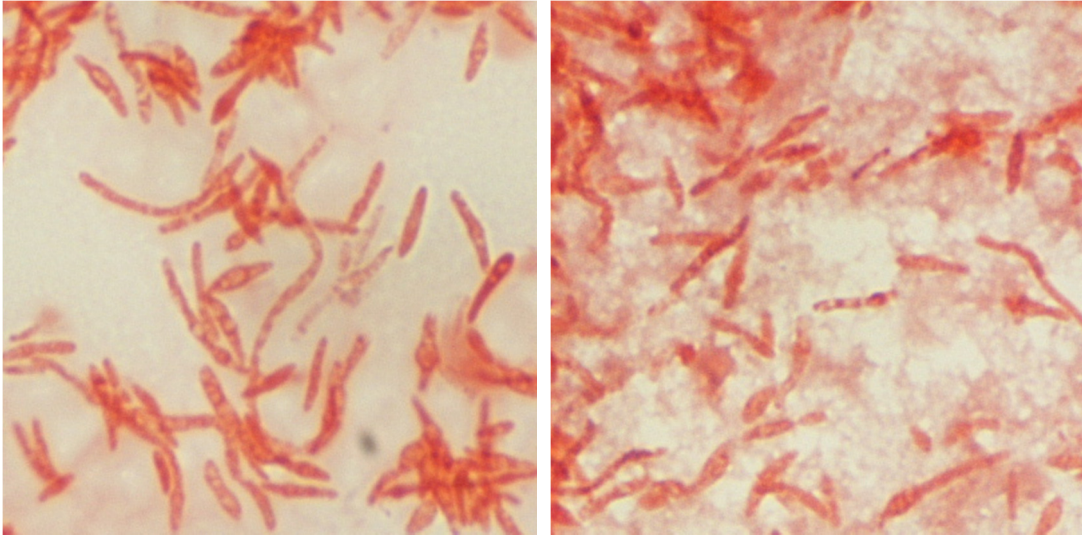
kyseessä on gramnegatiivinen bakteeri. Toisinaan solut saattavat värjäytyä liikaa sinisellä värillä eli grampositiivisen bakteerin tavoin johtuen vanhasta näytteestä tai liian paksusta näytteestä.



KUVIO 4. Gramnegatiivinen *E. coli* värjättyinä koneella (vasen) ja manuaalisesti

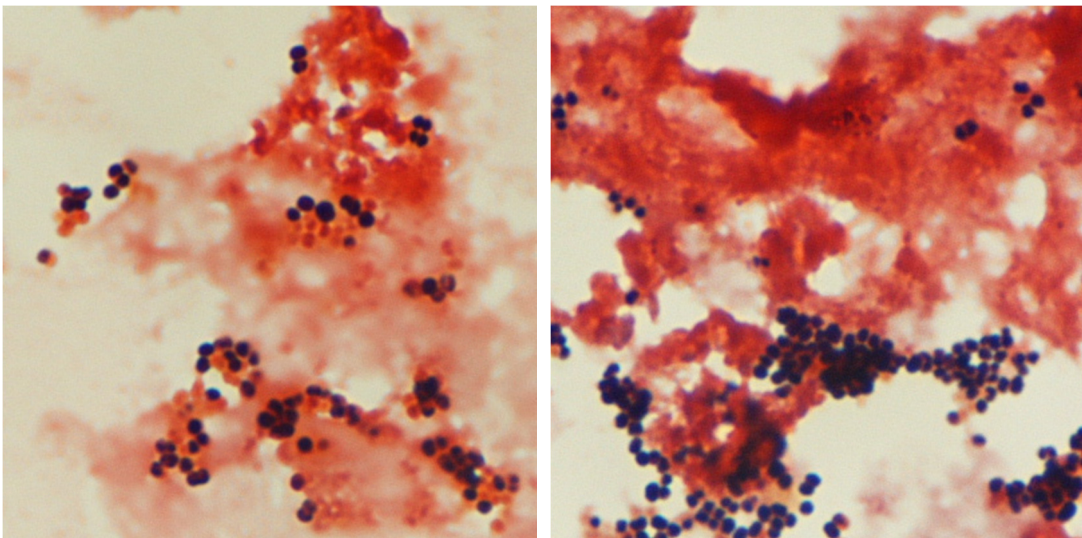
6.2.2 Veriviljelynäytteet

Validoinnissa oli mukana seitsemän veriviljelynäytettä, jotka kaikki värjättiin 10 kertaa käyttämällä samaa ajo-ohjelmaa. Kuviossa 5 on esitetty näytteen B2610 värjäystulos. Kyseessä on gramnegatiivinen sauva, *Bacteroides fragilis*. PREVI® Color gramvärjäysautomaatilla värjätty näyte on esitetty kuviossa vasemmalla ja oikealla on sama näyte värjätty manuaalisesti. Värjäystulos on hyvä sekä automaattilla että manuaalisesti tehtynä. Näytteiden värjäytyvyydessä sarjojen välillä ei havaittu eroja eli toistettavuus on hyvä.



KUVIO 5. Näytteen B2610 värjäystulos koneella (vasen) ja manuaalisesti

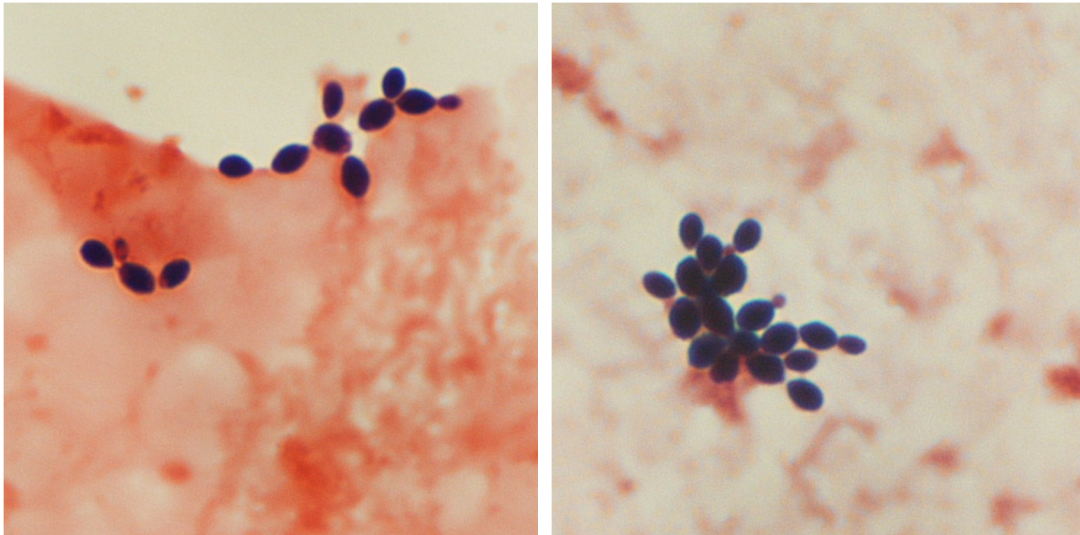
Kuviossa 6 on esitetty näytteen B2380 värjäystulos. Kyseessä on grampositiivinen kokki, *Staphylococcus epidermidis*. Värjäysautomaatilla värjätty näyte on esitetty kuviossa vasemmalla ja oikealla on sama näyte värjätty manuaalisesti. Värjäystulos on hyvä sekä automaatilla että manuaalisesti tehtynä eikä sarjojen välillä havaittu eroja värjäytyvydessä.



KUVIO 6. Näytteen B2380 värjäystulos koneella ja manuaalisesti (oikea)

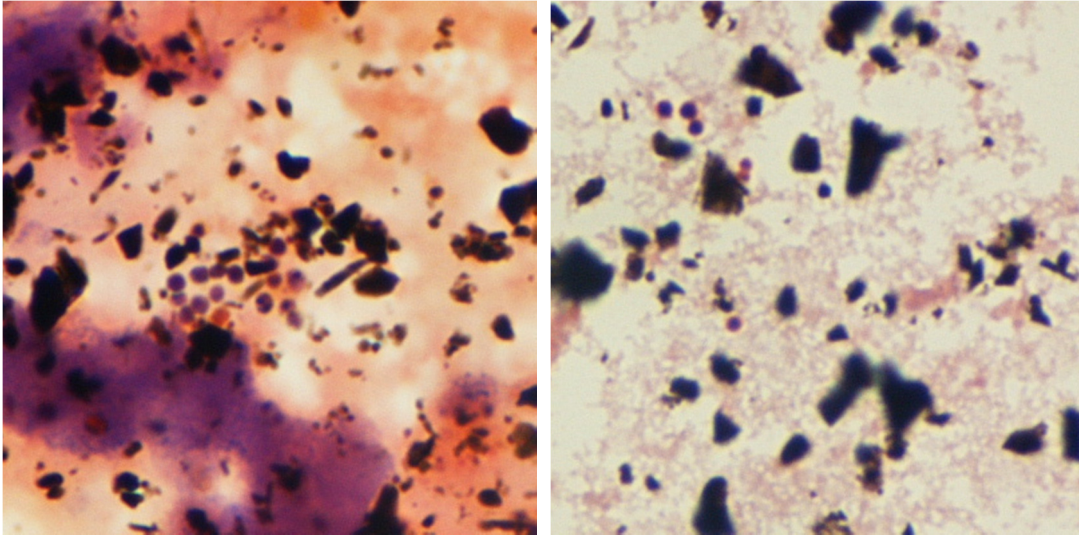
Kuviossa 7 on esitetty näytteen B2498 värjäystulos. Kyseessä on hiiva, *Candida albicans*, joka värjäytyy grampositiivisen bakteerin kaltaisesti. Gramvärjäysautomaatilla värjätty näyte on esitetty

kuviossa vasemmalla ja oikealla on sama näyte värjätty manuaalisesti. Verrattaessa koneella värjättyä näytettä manuaaliseen värjäykseen, todettiin, että manuaalisessa värjäyksessä tausta oli erilainen, mutta molemmissa tapauksissa värjäystulos oli hyvä. Automaatilla värjättyissä näytteissä ei sarjojen välillä löytynyt merkittäviä laadullisia eroja.



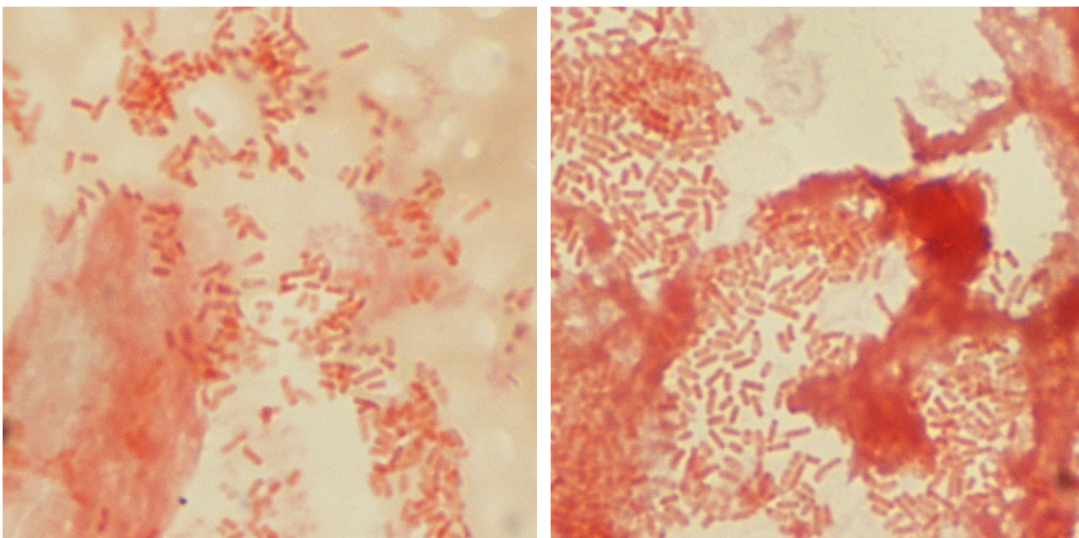
KUVIO 7. Näytteen B2498 värjäystulos gramvärjäysautomaatilla (vasen) ja manuaalisesti

Kuviossa 8 on esitetty näytteen B2426 värjäystulos. Kyseessä on grampositiivinen ryhmäkokki, *Staphylococcus epidermidis*. Gramvärjäysautomaatilla värjätty näyte on esitetty kuviossa vasemmalla ja oikealla on sama näyte värjätty manuaalisesti. Tässä, samoin kuin näytteessä B2380, on saatu hyvä värjäystulos sekä automaattilla että manuaalisesti. Myös toistettavuus on hyvä, koska sarjojen välillä ei laseissa ollut havaittavissa laadullisia eroja. Manuaalisessa värjäyksessä värit olivat haaleammat kuin konevärjäyksessä, mutta silti värjäystulos molemmissa tapauksissa oli hyvä. Veriviljelypulloissa oleva hiili tekee näytteestä sotkuisen näköisen ja hankaloittaa bakteerien löytymistä.



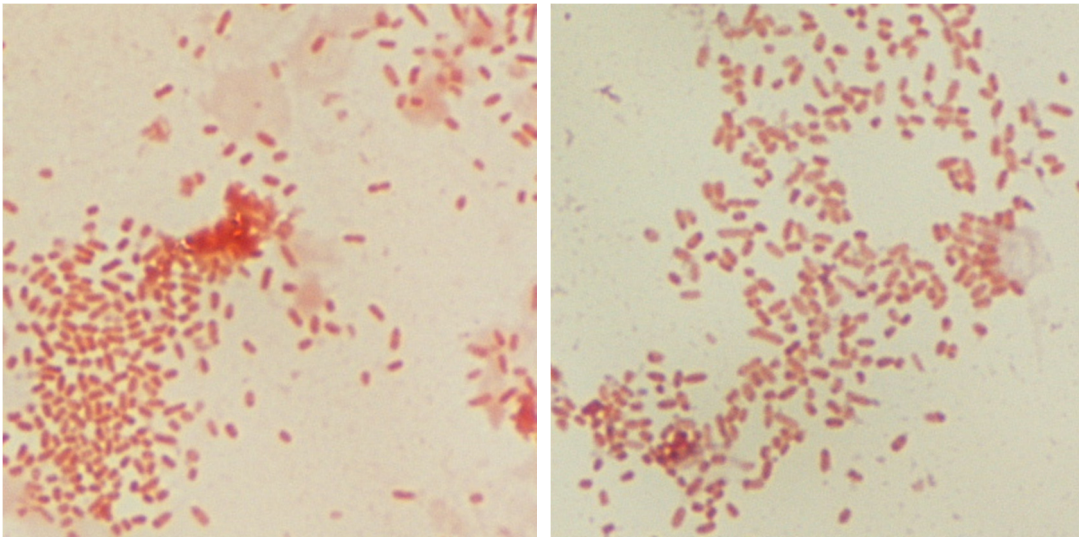
KUVIO 8. Näytteen B2426 värjäystulos gramvärjäysautomaatilla ja manuaalisesti (oikea)

Kuviossa 9 on esitetty näytteen B2381 värjäystulos. Vasemmalla kuviossa näkyy gramnegatiivinen sauvabakteeri *E. coli*, joka on värjätty gramvärjäysautomaatilla. Kuviossa oikealla sama näyte on värjätty manuaalisesti. Manuaalisella värjäyksellä on saatu selkeä gramnegatiivinen sauva, jossa on hyvä värjäystulos. Koneella värjätyissä näytteissä suurimmassa osassa sarjoista oli saatu hyvä värjäystulos. Kuitenkin osassa konevärjätystä näytteistä oli tapahtunut väärinvärjätymistä, eli gramnegatiivinen *E. coli* oli värjäytynyt osittain grampositiiviseksi. Tästä huolimatta jokaisesta koneella värjätystä näytteestä tunnisti että kyseessä on gramnegatiivinen bakteeri.



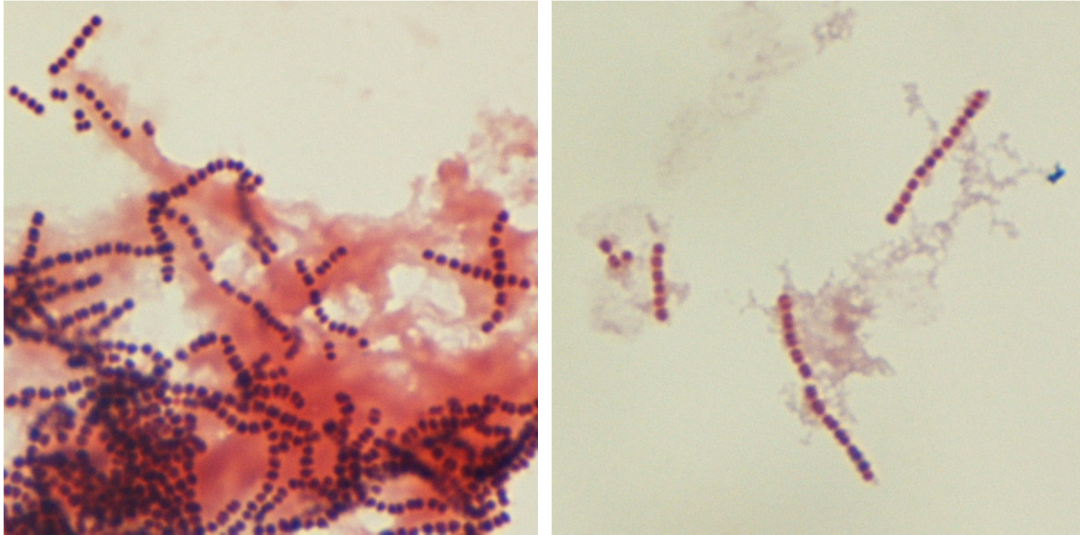
KUVIO 9. Näytteen B2381 värjäystulos gramvärjäysautomaatilla ja manuaalisesti (oikea)

Kuviossa 10 on esitetty näytteen B2472 värjäystulos. Kyseessä on gramnegatiivinen sauva *Serratia marcescens*. Gramvärjäysautomaatilla värjätty näyte on esitetty kuviossa vasemmalla ja oikealla on sama näyte värjätty manuaalisesti. Värjäystulos on hyvä sekä automaatilla että manuaalisesti värjättyinä eikä sarjojen välillä havaittu eroja värjäytyvydessä tai laadussa, eli myös toistettavuus on hyvä.



KUVIO 10. Näytteen B2472 värjäystulos gramvärjäysautomaatilla (vasen) ja manuaalisesti

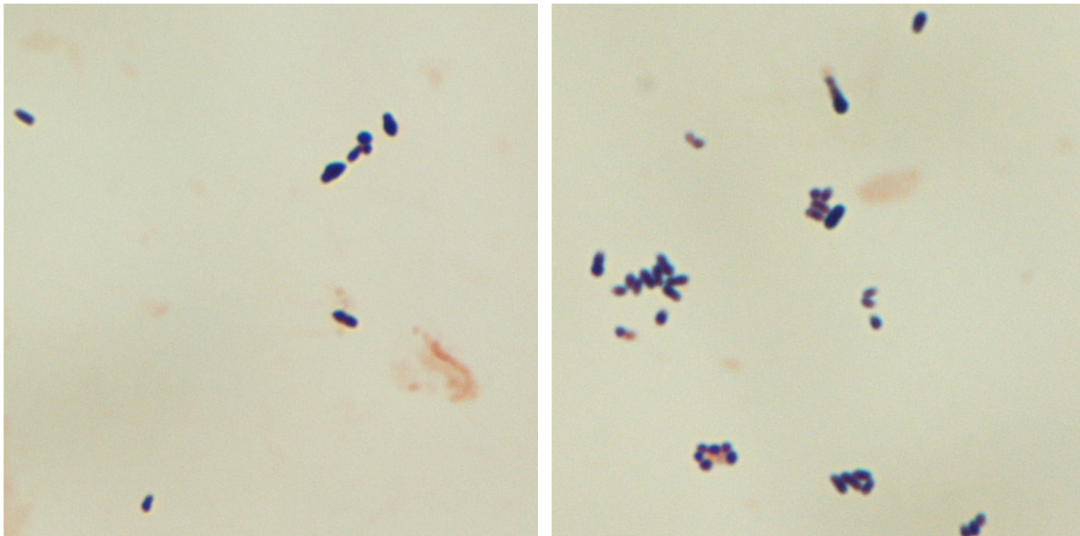
Kuviossa 11 on esitetty näytteen B2580 värjäystulos. Kyseessä on grampositiivinen ketjukokki, *G-streptokokki*. Vasemmalla kuviossa on esitetty automaatilla tehty värjäys ja oikealla on manuaalisesti tehty värjäys. Verrattaessa koneella värjättyä näytettä manuaaliseen värjäykseen, todettiin, että koneella saatiin laadultaan parempi värjäystulos. Myös toistettavuus oli hyvä, eli automaatilla värjätty rinnakkaisnäytteet eivät laadullisesti poikenneet toisistaan. Bakteerin haaleampi sininen väri voi johtua vanhasta näytteestä.



KUVIO 11. Näytteen B2580 värjäystulos koneella (vasen) ja manuaalisesti

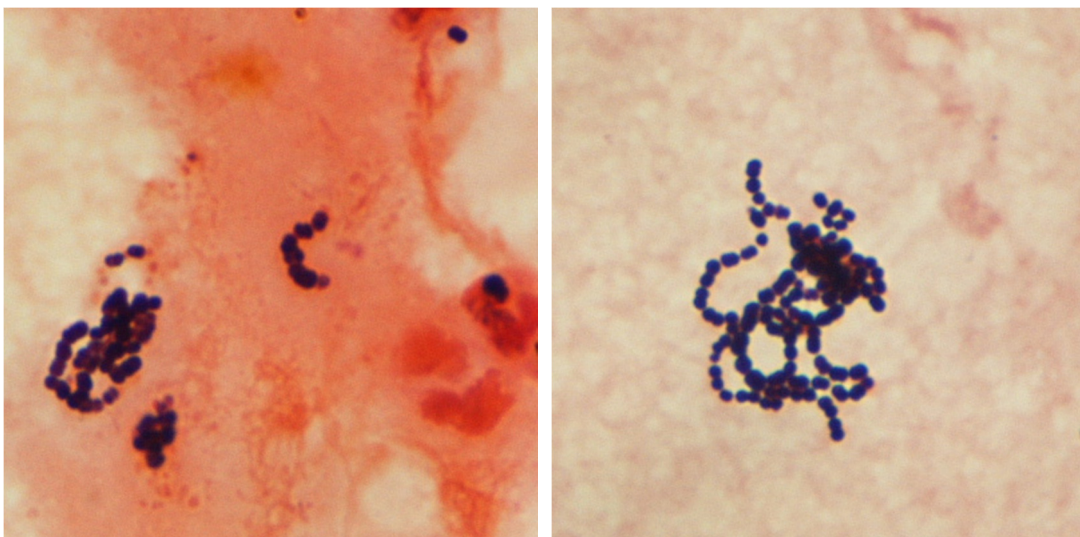
6.2.3 Kudos- ja märkänäytteet

Positiivisia kudos- tai märkänäytteitä oli validoinnissa mukana yhdeksän, jotka kaikki värjättiin 10 kertaa käyttämällä samaa ajo-ohjelmaa. Kuviossa 12 on esitetty näytteen M964 värjäystulos. Kyseessä on grampositiivinen sauva, *Corynebacterium sp.* PREVI® Color gramvärjäysautomaatilla värjätty näyte on esitetty kuviossa vasemmalla ja oikealla on sama näyte värjätty manuaalisesti. Mikroskopoitaessa todettiin, että näytettä on niukasti objektilaseilla. Värjäystuloksissa ei löytynyt eroa kun verrattiin automaattilla tehtyjä värjäyksiä manuaalisesti tehtyihin. Molemmilla tavoilla saatiin hyvä värjäystulos. Näytteiden värjäytyvyydessä sarjojen välillä ei havaittu eroja eli toistettavuus oli hyvä.



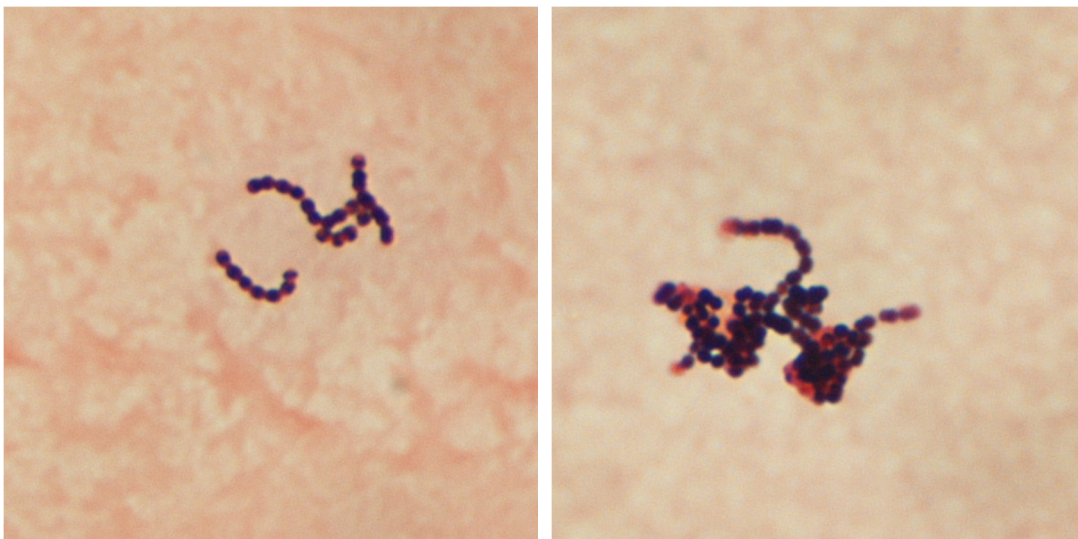
KUVIO12. Näytteen M964 värjäystulos värjäysautomaatilla (vasen) ja manuaalisesti

Kuviossa 13 on esitetty näytteen M1059 värjäystulos. Vasemmalla kuviossa näkyy grampositiivinen kokkibakteeri, *Enterococcus faecium*, joka on värjätty gramvärjäysautomaatilla. Kuviossa oikealla sama näyte on värjätty manuaalisesti. Manuaalisella värjäyksellä saatiin parempi värjäystulos kuin automaattilla. Toistettavuus oli tyydyttävä, sillä sarjojen välillä havaittiin laadullisia eroja. Osassa sarjoista oli tapahtunut väärinvärjäytymistä, eli grampositiivinen kokkibakteeri oli osin värjäytynyt gramnegatiiviseksi.



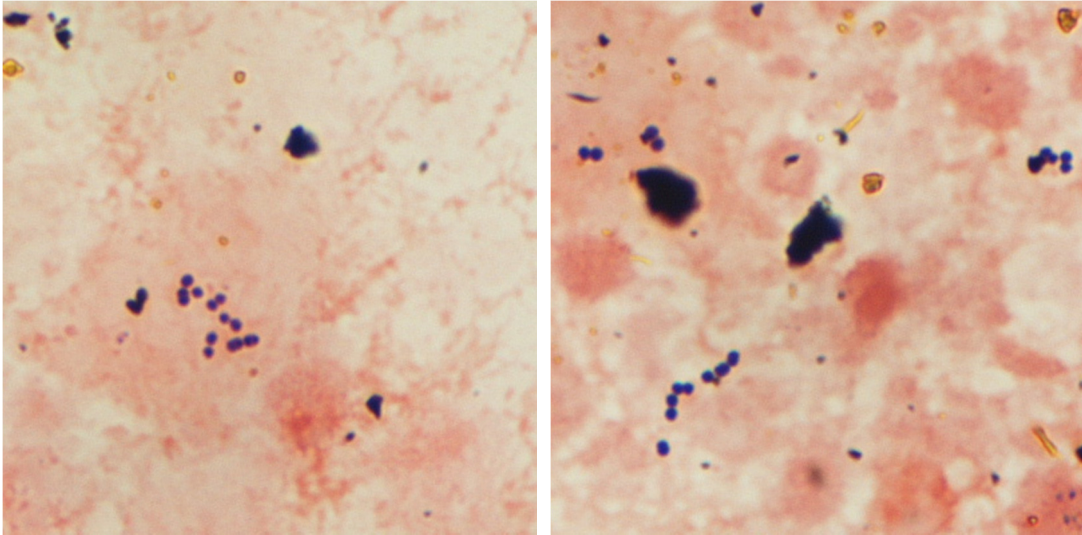
KUVIO 13. Näytteen M1059 värjäystulos gramvärjäysautomaatilla ja manuaalisesti (oikea)

Kuviossa 14 on esitetty näytteen M1060 värjäystulos. Kyseessä on grampositiivinen kokki, *Enterococcus faecium*. Värjäysautomaatilla värjätty näyte on esitetty kuviossa vasemmalla ja oikealla on sama näyte värjätty manuaalisesti. Mikroskopoidessa todettiin, että näytettä on niukasti objektiveilla ja näytteet oli raskas mikroskopoida. Näytteistä löytyi hyvin vähän bakteereita, mutta ne mitä löytyivät, olivat värjäytyneet hyvin sekä manuaalisella värjäyksellä että värjäysautomaatilla. Toistettavuus oli hyvä sillä värjäyslaadussa ei havaittu eroja sarjojen välillä, mutta bakteerien esiintyvyydessä kylläkin.



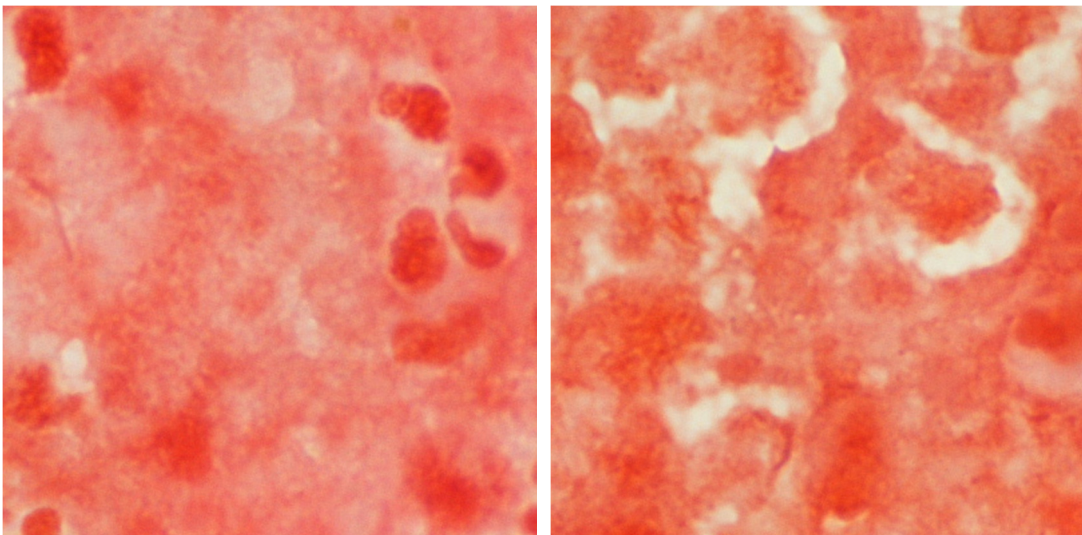
KUVIO 14. Näytteen M1060 värjäystulos koneella (vasen) ja manuaalisesti

Kuviossa 15 on esitetty näytteen M1061 värjäystulos. Kyseessä on grampositiivinen kokkibakteeri, *Enterococcus sp.* Gramvärjäysautomaatilla värjätty näyte on esitetty kuviossa vasemmalla ja oikealla on sama näyte värjätty manuaalisesti. Verrattaessa koneella värjättyä näytettä manuaaliseen värjäykseen, todettiin, että manuaalisessa värjäyksessä löytyi grampositiivinen ketjukokki ja värjäystulos oli hyvä. Konevärjäyksessä värjäystulos oli myös hyvä, mutta toistettavuus oli tyydyttävä, koska näytteiden välillä löytyi laadullisia eroja. Näytteen sotkuisuus häiritsi tulkintaa.



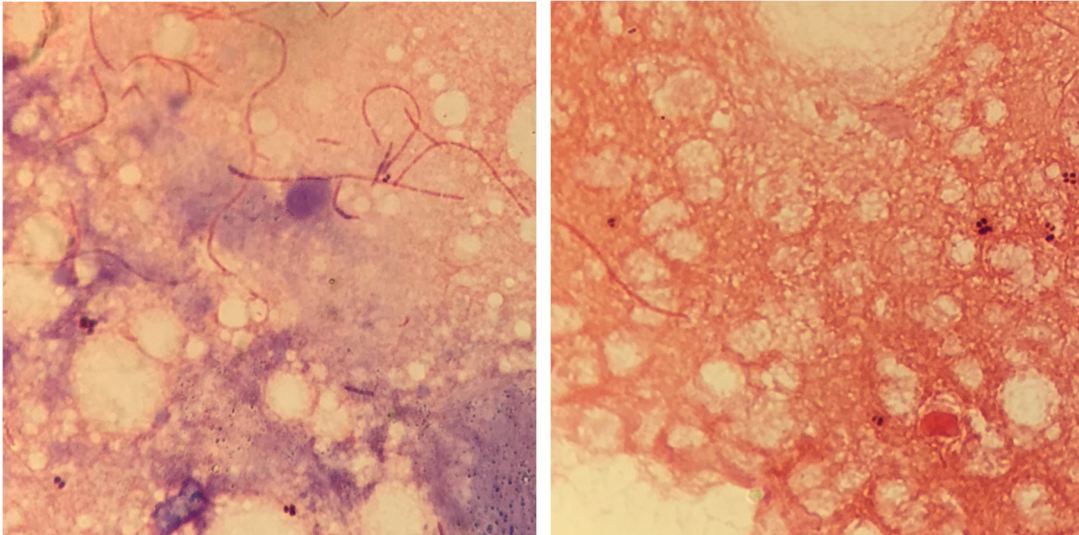
KUVIO 15. Näytteen M1061 värjäystulos gramvärjäysautomaatilla (vasen) ja manuaalisesti

Kuviossa 16 on esitetty näytteen M1064 värjäystulos. Kyseessä on gramnegatiivinen sauva, *E. coli*. Gramvärjäysautomaatilla värjätty näyte on esitetty kuviossa vasemmalla ja oikealla on manuaalisesti tehty värjäys. Mikroskopoitaessa todettiin, että näytteistä oli tullut hivenen liian paksuja ja bakteereita esiintyi niukasti preparaateissa. Kuitenkin sekä manuaalisissa että konevärjättyissä lauseissa löytyi gramnegatiivinen sauvabakteeri eikä värjäystuloksissa ollut eroja. Sarjojen välillä ei havaittu laadullisia eroja eli toistettavuus oli hyvä.



KUVIO 16. Näytteen M1064 värjäystulos gramvärjäysautomaatilla ja manuaalisesti (oikea)

Kuviossa 17 on esitetty näytteen M1263 värjäystulos. Näytteessä on gramnegatiivinen sauvabakteeri, *Serratia marcescens*, sekä grampositiivinen kokkibakteeri *Enterococcus faecium*. Gramvärjäysautomaatilla värjätty näyte on esitetty kuviossa vasemmalla ja oikealla on manuaalisesti tehty värjäys. Molemmissa värjäyksissä bakteerit erottuivat hyvin ja värjäytyivät oikein.



KUVIO 17. Näytteen M1263 värjäystulos gramvärjäysautomaatilla ja manuaalisesti (oikea)

Näytteessä M1264 on gramnegatiivinen sauvabakteeri, *Serratia marcescens*, sekä grampositiivinen kokkibakteeri *Enterococcus faecium*. Värjäystulos on vastaava kuin näytteellä M1263, eli sekä manuaalisessa että automaattisessa värjäyksessä bakteerit erottuivat hyvin ja toistettavuus oli hyvä.

Näytteet M1265 ja M1266 sisältävät molemmat grampositiivista kokkibakteeria nimeltään *Staphylococcus epidermidis*. Gramvärjäyksessä sekä automaatti- että käsivärjäys onnistuivat hyvin ja kokkibakteeri oli selvästi tunnistettavissa mikroskooppisessa tarkastelussa.

Näytteiden M1264-M1266 preparaateista ei ole saatavilla kuvia mikroskopiinnista.

7 POHDINTA

Opinnäytetyön päätavoitteena oli testata ja validoida PREVI® Color gramvärjäysautomaatin käyttö kliinisen bakteriologian potilasnäytetutkimuksiin, joihin kuuluu bakteerien gramvärjäys. Lisäksi tutkittiin, värjäkö automaatti potilasnäytteet yhtä hyvin kuin puhtasviljellyt ATCC-vakiokannat. Tavoitteena oli saada laitteen värjäyslaatu sellaiselle tasolle, ettei manuaalisesti tehtäviä gramvärjäyksiä tarvittaisi Kemin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa. Oppimistavoitteenamme oli perehtyä grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin bakteereihin ja niiden tunnistamiseen gramvärjäyksen perusteella sekä suunnitella ja toteuttaa tutkimusluontoinen projekti värjäysautomaatin validoinnista.

Yleisesti ottaen opinnäytetyö onnistui hyvin. Saimme hyvän perehdytyksen gramvärjäysautomaatin käyttöön ja yhteistyö mikrobiologian laboratorion ja koko Kemin kliinisen laboratorion henkilöstön kanssa oli sujuvaa. Itse kokeellinen työ sujui suunnitellusti aikataulujen mukaan, mutta opinnäytetyön kirjoitusvaihe viivästyi suunnitellusta työssäkäyntien vuoksi.

Haastavinta tutkimuksessa oli värjättyjen näyteobjektilasien mikroskopointi ja havainnointi. Mikroskopointi on aikaa vievää, etenkin vähän kokemusta omaavilla, ja värjäystuloksen arviointi mikroskopimalla perustuu aina subjektiiviseen kokemukseen. Värjätystä näytteestä tulkitaan huolella näytteen edustavuus ja kelvollisuus, mikrobien esiintyminen ja gramvärjäytyvyys sekä bakteerien morfologia. Etenkin näytteet, joissa esiintyi vain muutamia heikosti värjäytyneitä bakteereita, olivat vaativimpia mikroskopoitavia.

Tutkimusta tehtäessä huomioitiin eettiset näkökohdat ja noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkimukselle haettiin ja saatiin tutkimuslupa NordLabin organisaatiolta heidän käytäntöjensä mukaisesti. Tutkimus suunniteltiin, toteutettiin ja raportoitiin laadukkaasti hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen. Tutkimus lähti liikkeelle tutkimussuunnitelman laatimisesta, jonka jälkeen laadittiin validointisuunnitelma. Koko projektin ajan pidettiin laboratoriopäiväkirjaa, johon kirjattiin ylös huolellisesti kaikki työskentelyn vaiheet ja tapahtumat. Potilastietoja ei käytetty, sillä näytteet ovat numeroituina juoksevasti. Vain potilasnäytteen tulosta käytettiin värjäystuloksen oikeellisuuden arvioimisessa. Ainoastaan mikrobiologian laboratorion henkilökunnalla on pääsy tietojärjestelmään, jossa potilastiedot ovat.

Esitestaus oli työläs, mutta antoi paljon arvokasta tietoa laitteen käytöstä, näytteiden käsittelystä ja mikroskopoinnista. Tästä oli merkittävä hyöty itse validoinnissa. Esitestauksen myötä valikoitui optimi ajo-ohjelma validointiin.

Hyvän suunnittelun ja kattavan esitestauksen ansiosta varsinainen validointi sujui hyvin. Validoinnin standardikantojen värjäystulokset PREVI® Color gramvärjäysautomaatilla osoittivat, että uusittavuus oli hyvä, koska standardikantojen värjäystuloksissa ei esiintynyt eroja. Verrattaessa automaattilla värjättyjä näytteitä manuaaliseen värjäykseen, ei näytteiden välillä löytynyt merkittäviä laadullisia eroja ja värjäysautomaatin värjäystulosta pidettiin hyvänä. Myös toistettavuus oli hyvä eli automaattilla värjätty rinnakkaisnäytteet eivät laadullisesti poikenneet toisistaan. Värjäystulokset potilasnäytteillä tukivat tätä tulosta.

Tehtyjen värjäysten perusteella PREVI® Color gramvärjäysautomaatti värjää sekä standardikannat että potilasnäytteet yhtä hyvin ja luotettavasti kuin manuaalinen värjäys. Validoinnin tuloksena löytyi ajo-ohjelma, jolla potilasnäytteet voidaan jatkossa värjätä. Itse laite toimi luotettavasti ja oli helpokäyttöinen.

Laitteelle oli laitevalmistajan tekemän ohjeen lisäksi tehty NordLabin Rovaniemen laboratoriossa lyhyt käyttöohje (liite 4). Tämä ohje tarkastettiin ja todettiin hyväksi. Ohje otetaan käyttöön myös Kemin aluelaboratoriossa. Tämän vuoksi emme näe tarpeelliseksi laatia uutta työohjetta laitteen värjäysparametrien käyttöön.

Koemme saavuttaneemme sekä omat henkilökohtaiset että opinnäytetyön tavoitteet ja oppineemme prosessin aikana paljon. Ammatillisesti opimme gramvärjäystekniikasta ja värjäystulosten tulkinnasta sekä tulkinnan ongelmista. Laboratoriolaitteiden validointiprosessi tuntui aluksi isolta kokonaisuudelta ja hankalalta hallita, mutta laboratorion vakiintuneiden käytäntöjen mukainen menettely tuki hyvin työn toteutusta.

LÄHTEET

BioMérieux, Inc. 2014. PREVI® Color Gram Brochure. Viitattu 7.6.2015, http://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/doc/previ-color-gram-brochure-2014.pdf.

BioMérieux, SA. 2013. PREVI-Color Gram and Cytocentrifuge Rotor User Manual. Ranska: Lyon.

Charma, P. 2007. Microbiology. New Delhi; Rastogi publications.

Elintarvikevirasto. 1998. Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Elintarvikeviraston Valvonta-sarja 13/1997.

Ehder, T (toim.). 2005. Kemian metrologian opas. MIKES Julkaisu J6/2005.

Ehder, T (toim). 2006. Mikrobiologian laboratorion elatusaineiden sisäinen laadunvarmistus. MIKES Julkaisu J6/2006. Viitattu 20.11.2015, http://www.mikes.fi/mikes/Oppaat/j6_2006_ehder.pdf.

Hiltunen, E, Linko, L, Hemminki, S, Hägg, M, Järvenpää, E, Saarinen, P, Simonen, S & Kärhä, P (toimittaneet). 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. MIKES Julkaisu J4/2011.

Kauma, H. & Virolainen-Julkunen, A. 2010. Pneumokokki. 1. painos. Helsinki: Duodecim. Teoksessa K. Hedman, T. Heikkinen, P. Huovinen, A. Järvinen, S. Meri & M. Vaara (toim.). Mikrobiologia. 112-121.

Karhumäki, E., Jonsson, A. & Saros, M. 2010. Mikrobit hoitotyön haasteena. 2.-3. Uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

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

Meurman, O. 2010b. Gram-värjäykset. Viitattu 1.6.2015, <http://www.labquality.fi/@Bin/2306734/Meurman+Gram+nettiin.pdf>.

Mäkelä, P. & Mäkelä, J. 1994. Mikrobit ja tautien torjunta. 3. painos. Porvoo: WSOY.

Niemi, J. Mikrobiologian perusteet. Viitattu 3.6.2015, users.utu.fi/jarnie/Mikrobiologian_perusteet.doc.

NordVal / NMKL. 2009. Protocol for the validation of alternative microbiological methods. Viitattu 19.11.2015, <http://www.nmkl.org/dokumenter/nordval/NordValProtocol.pdf>

Oulun ammattikorkeakoulu. 2014. Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyön ohje. Viitattu 2.6.2014, <https://oiva.oamk.fi/utills/opendoc.php?aWRfZG9rdW1lbnR0aT0xNDMwNzY0Njky>.

Prescott, L., Harley, J. & Klein, D. 2002. Microbiology. 5.painos. New York: McGraw-Hill.

Saari, L. 2010. Kemiallisten menetelmien validointi ja mittausepävarmuus. Eviran tietoaieisto. Viitattu 20.11.2015, http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely_toiminta_valvonta/laboratoritoiminta/koulutus/leena_saari_13.10.10.pdf.

Solunetti 2006. Bakteerit (prokaryootti). Viitattu 3.6.2015, <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerit/2/>.

Solunetti 2006. Bakteerien soluseinä. Viitattu 3.6.2015, http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerien_soluseina/2/.

Terveystieteellinen tutkimuskeskus 30.12.2010/1326.

Vaara, M., Sarvas, M. & Mäkelä, P. 1997. Diagnostisen bakteriologian menetelmiä. 8. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Teoksessa A. Tiilikainen, M. Vaara & A. Vaheri (toim.) Lääketieteellinen mikrobiologia. 314-320.

Vaara, M., Sarvas, M. & Mäkelä, P. 1997. Infektiotauti. 8. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Teoksessa A. Tiilikainen, M. Vaara & A. Vaheri (toim.) Lääketieteellinen mikrobiologia. 259-291.

Vaara, M., Skurnik, M. & Sarvas, M. 2010. Bakterisolun rakenne ja toiminta. 1. painos. Helsinki: Duodecim. Teoksessa K. Hedman, T. Heikkinen, P. Huovinen, A. Järvinen, S. Meri & M. Vaara (toim.). Mikrobiologia. 14-33.

YLEISIMPIÄ IHMISELLE INFEKTIOITA AIHEUTTAVIA GRAMPOSITIIVISIA
BAKTEEREITA

LIITE 1

Grampositiiviset bakteerit		
Nimi	Muoto	Kliiniset taudinkuvat
<i>Staphylococcus aureus</i>	kokki/ryhmäkokki	<ul style="list-style-type: none"> • märkäiset iho- ja pehmytkudosinfektiot • leikkaushaava-, luu- ja nivelinfektiot • sepsis • endokardiitti
Koagulaasinegatiiviset stafylokokit: <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> * <i>Staphylococcus haemolyticus</i> jne.	kokki/ryhmäkokki	<ul style="list-style-type: none"> • vierasesineinfektiot esim. verisuonikatetrit • virtsatieinfektiot *
A-ryhmän streptokokki: <i>Streptococcus pyogenes</i>	kokki/ketjukokki	<ul style="list-style-type: none"> • tonsilliitti • iho- ja pehmytkudosinfektiot • sepsis
B-ryhmän streptokokki: <i>Streptococcus agalactiae</i>	kokki/ketjukokki	<ul style="list-style-type: none"> • vastasyntyneiden infektiot: sepsis, pneumonia, meningiitti • virtsatieinfektiot • sepsis • niveltulehduskeuhkokuume • aivokalvontulehdus

		<ul style="list-style-type: none"> • iho- ja pehmytkudosinfektiot
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	diplokokki	<ul style="list-style-type: none"> • välikorvan ja nenän sivuonteloiden infektiot • sepsis • meningiitti • pneumonia
Beetahemolyttiset streptokokit C ja G: <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>	kokki/ketjukokki	<ul style="list-style-type: none"> • nielutulehdus • ihotulehdus • selluliitti • yleinen löydös veriviljelyssä
Viridans-streptokokit: <i>S. mutans</i>	kokki/ketjukokki	<p>Normaalisti avirulentteja, mutta päästessään huonokuntoisilta limakalvoilta verenkiertoon voivat aiheuttaa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • sydämen sisäkalvon tulehdus, endokardiitti • sepsis • karies
Enterokokit: <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. casseliflavus</i>	kokki	<p>Immuniiteetin heikettyä:</p> <ul style="list-style-type: none"> • virtsatietulehdus • vatsaontelon ja lantion infektiot • leikkaus-, palo- ja krooniset haavaumat
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	sauva	<ul style="list-style-type: none"> • kurkkumätä, difteria
<i>Listeria monocytogenes</i>	sauva	<ul style="list-style-type: none"> • listerioosi <i>L. Monocytogenes</i>-bakteeria sisältävän elintarvikkeen välityksellä

Gramnegatiiviset bakteerit		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	diplokokki	<ul style="list-style-type: none"> • tippuri
<i>Neisseria meningitidis</i>	kokki/diplokokki	<ul style="list-style-type: none"> • bakteerimeningiitti • bakteremia, keuhko- kuume, vaginiitti, silmä- tulehdus, niveltulehdus, ylähengitystieinfektio
<i>Haemophilus influenzae</i>	sauva	<ul style="list-style-type: none"> • aivokalvontulehdus • kurkunkansitulehdus • keuhkokuume • septikemia • välikorvan tulehdus
<i>Bordetella pertussis</i>	sauva	<ul style="list-style-type: none"> • hinkuyskä
<i>E. coli</i>	sauva	<ul style="list-style-type: none"> • virtsatieinfektio • umpilisäkkeen tulehdus • sappirakon tulehdus
<i>Salmonella enterica</i> <i>Salmonella bongori</i>	sauva	<ul style="list-style-type: none"> • bakteremiset yleisinfek- tiot: lavantauti, pikkula- vantauti • suolenseinämän enterii- tit
<i>Klebsiella</i> -lajit	sauva	<ul style="list-style-type: none"> • sairaalainfektio • lohkokeuhkokuume • virtsatieinfektio • keuhkokuume • bakteremia
<i>Enterobacter</i> -lajit: <i>E. cloacae</i> <i>E. aerogenes</i>	sauva	<ul style="list-style-type: none"> • sairaalainfektio • keuhkokuume • virtsatieinfektio

		<ul style="list-style-type: none"> • infektoiduneet sääri-, palo- ja kirurgiset haavat
Proteukset: <i>P. mirabilis</i> <i>P. vulgaris</i>	sauva	<ul style="list-style-type: none"> • virtsatietulehdus • haavainfektiot
Pseudomonakset: <i>P. aeruginosa</i>	sauva	<ul style="list-style-type: none"> • ulkokorvantulehdus • virtsatieinfektiot • normaalisti ei aiheuta infektioita perusterveelle ihmiselle
<i>Moraxella catarrhalis</i>	kokkimainen sauva	<ul style="list-style-type: none"> • hengitystieinfektiot • välikorvatulehdukset
Capnocytophagat: <i>C. canimorsus</i> <i>C. cynodegmi</i>	pitkiä ja ohuita sauvoja	<ul style="list-style-type: none"> • hampaiston sairaudet • koiran ja kissan puremiin liittyvät infektiot
<i>Francisella tularensis</i>	sauva	<ul style="list-style-type: none"> • jänisrutto

ESITESTAUKSEN VÄRJÄYSASETUKSET JA PREPARAATTINUMEROT

LIITE 3

Ajo- ohjelma	Decolorizer 1-9	Crystal violet <i>low /med/ high</i>	Iodine low /med/ high	Fixation off/normal /high	Preparaattinumerot
A	4	low	low	normal	1, 38, 55, 82
B	4	med	med	normal	2, 39, 56, 83
C	7	low	low	normal	3, 57, 84, 33
D	7	med	med	normal	4, 58, 85, 34
E	7	med	med	off	5, 59
F	7	med	high	normal	40, 102, 74, 14, M496
G	7	med	high	high	37, 104, 70, 12, M496
H	7	high	high	high	54, 108, 80, 26, M496
I	7	high	high	normal	107, 53, 81, 27, M496
J	7	high	med	normal	86, 35, 11, 71, M496
K	7	high	med	high	36, 92, 6, 65, M496
L	7	med	med	high	42, 105, 66, 15, M496
M (=E)	7	med	med	off	41, 103, 69, 13, M496
N (=D)	7	med	med	normal	60,16,B2159, B2129, M495,M574,B577,B960
O (=F)	7	med	high	normal	17,61,B2159,B2129,M49 5,M574,B577,B960
P (=G)	7	med	high	high	B2159, B2129, M495, M574, B577, B960
Q (=D)	7	med	med	normal	B2159, B2129, M495, M574, B577, B960
R (=F)	7	med	high	normal	7, 73, M495, M574, B2159, B2129,
S (=F)	7	med	high	normal	
T (=D)	7	med	med	normal	
U	7	low	med	high	77, 24, M495, B336, B334, M203,
V (=D)	7	med	med	normal	
X	7	low	med	normal	

Ohjeen luokka	Työohje
Versio/pvm	1.1/3.8.2015
Laattijat	J Peltola, E Marjoniemi
Vastuhenkilö	
Hyväksyjä	J Kaupola
Jakelu	Nordlab Kajaani; Nordlab Kemi; Nordlab Rovaniemi
Kansio	

Previcolor värjäysautomaatin käyttöohje

Yleistä

Laite on tarkoitettu automaattiseen gram värjäyksen tekemiseen.

Laitteet

Previcolor (bioMerieux)

Periaate

Bakteerisolut tai mikrobiologinen näyte kiinnitetään objektilasille kuumentamalla. Kiinnitys voidaan myös tehdä PreviColor –laitteella etanolia käyttäen. Preparaatti värjätään ensin kristallivioletilla, sitten käsitellään jodilla ja lopuksi vastavärjätään safraniinilla (liuos sisältää asetonia värinpoistoon).

Reagenssit, tarvikkeet

Kristallivioletti (Ref. 29524 bioMerieux)

Jodiliuos (Ref. 29523 bioMerieux)

Asetoni-safraniini A (Ref. 29519 bioMerieux)

Näyte

Mikrobikanta objektilasilla

Mikrobiologinen näyte objektilasilla

Laadunvarmistus

ATCC 49766 *Haemophilus influenzae*

ATCC 49619 *Streptococcus pneumoniae*

Kontrollikannat värjätään automaattilla viikko- ja kuukausihuollon jälkeen.

Suoritus

Värjäys

- Suorita näytteen kuumafiksaus liekillä (tai vaihtoehtoisesti lasi voidaan fiksata etanolilla PreviColor –laitteessa ks. alla).
- Aseta lasit karuselliin niin, että näytepuoli on myötöpäivään päin. Karusellin paikat on numeroitu, aloita näytepaikasta n:o 1. Jos laseja on pariton lukumäärä, tasapainotetaan karuselli tyhjällä lasilla.
- Sulje karusellin kansi asettamalla karusellin nupit ja kannen kolot kohdakkain, samalla painetaan kannen pienestä metallinupista. Lopuksi napsautetaan kansi kiinni painamalla uudelleen kannen nupista mutta ulkoreunalta (musta rengas).

Tiedosto: verkkopolku, johon ohje tallennettu (tämä voimassa siihen saakka, kunnes dokumenttienhallintajärjestelmä saadaan käyttöön)

4. Sulje laitteen kansi.
5. Tarkista päänäytössä, että fiksaus on OFF, jos on suoritettu kuumafiksaus. Jos lasi halutaan fiksata etanolilla, painetaan päänäytössä painiketta PROG, valitaan numeropainikkeilla 2 (FIXATION) ja valitaan fiksausvalikossa 1 (Alcohol fixation NORMAL). Jos etanolifiksausta ei haluta, valitaan numeropainikkeella 0 (Alcohol fixation OFF).
6. Valitse näytelasien lukumäärä päänäytössä numeropainikkeilla.
7. Aloita värjäysajo painalla painiketta RUN.

Asetusten muuttaminen

Laitteessa voidaan muuttaa värjäyksen ja vastavärin voimakkuusasteita.

1. Paina päänäytössä painiketta PROG ja valitse 1 (DECOLORIZER).
2. Valitse numeronäppäimillä vastavärin voimakkuusaste (yleensä 4).
3. Paina päänäytössä painiketta PROG ja valitse 3 (ADJUST STAIN).
4. Valitse numeronäppäimillä vastaväri (1 = CRYSTAL VIOLET tai 2 = IODINE).
5. Valitse numeronäppäimillä vastavärin voimakkuusaste (yleensä MED).

Laitteen käyttö on kuvattu myös bioMerieuxin suomenkielisessä pikakäyttöohjeessa.

Huoltotoimet ja puhdistus

Yksityiskohtaiset huolto- ja puhdistusohjeet on kuvattu bioMerieuxin suomenkielisessä kuvallisessa käyttöohjeessa.

Päivittäin tehtävät puhdistustoimenpiteet:

Clean -puhdistusajo tehdään aamulla ennen käytön aloitusta sekä päivän aikana silloin kun käyttötauko on ollut yli kolme tuntia. Puhdistusajon lopuksi tehdään prime -huuhtelu.

Päivän lopuksi laitteen sisäpinnat, suuttimet ja kansi suihkutetaan 70% etanoliliuoksella sekä pyyhkitään kuivaksi.

Viikoittain tehtävät huolto- ja puhdistustoimenpiteet:

Näytekarusellin puhdistus 70 % etanoliliuoksella

Jäteletkun huuhtelu 70 % etanoliliuoksella

Kuukausittain tehtävät huolto- ja puhdistustoimenpiteet:

Suuttimien puhdistus

Värjäyspullojen letkujen huuhtelu 70% etanoliliuoksella

Vesipullon puhdistus 10 % kloriitilla

Kuviotesti

Tilavuustesti

Tarvittaessa tehtävät huolto- ja puhdistustoimenpiteet:

Ilmakuilien poisto letkuista

Kuviotesti

GRAM VÄRJÄYSJÄTTEEN KÄSITTELY ROVANIEMI:

PreviColor –laite kerää gram värjäysjätteen jätekanisteriin. Kun kanisteri täyttyy, se suljetaan ja siihen liimataan EKOKEMin tarra, josta näkyy:

1. Kanisterin sisältö
2. Vaaraominaisuus
3. Päivämäärä
4. Jätteestä vastaava

Kanisteri viedään mikrobiologian käytävällä olevaan jätehuoneeseen, josta se viedään (talon jätteenkuljetus) talon varastoon 00-kerrokseen. Sieltä on säännöllinen kuljetus ongelmajätelaitokselle.

GRAM VÄRJÄYSJÄTTEEN KÄSITTELY KEMI:**GRAM VÄRJÄYSJÄTTEEN KÄSITTELY KAJAANI:****Virhelähteet**

Laitteen seisottaminen käyttämättömänä voi johtaa väriaineiden sakkautumiseen letkustoissa ja virheellisiin värjäystuloksiin.

Viitteet**Huomautukset**