

Opinnäytetyö (AMK)
Bioanalytikkokoulutus
2017

Bebe Wong

GRAMVÄRJÄYS TUTUKSI

– Oppimateriaali uusille bioanalytikko-
opiskelijoille

Bebe Wong

GRAMVÄRJÄYS TUTUKSI

- Oppimateriaali uusille bioanalytikko-opiskelijoille

Gramvärjäys on yksi tärkeimmistä bakteriologian tunnistusmenetelmistä, koska se havaitsee ja erottaa monenlaisia taudinaiheuttajia, ja jonka suoritus ja tulkinta pitää hallita bioanalytikon ammatissa. Parhaimmillaan gramvärjäys voi toimia pikadiagnostisena menetelmänä ohjaamaan potilaan hoitoa. Monet infektiiviset tekijät eivät kasva tai kasvavat hitaasti viljelyalustalla, jolloin värjäys saattaa olla ainoa tapa havaita nämä organismit kliinisissä näytteissä. Potilaiden hoito ja diagnosointi, pohjautuu suurimmalta osin laboratoriotutkimuksiin, jonka takia laadukkaat ja luotettavat tulokset ovat tärkeitä potilasturvallisuuden takaamiseksi.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on tehdä oppimateriaali Turun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian opintojaksolle. Oppimateriaali tehdään gramvärjättyjen bakteeripreparaattien muodossa ja ne ovat tarkoitettu uusille bioanalytikko-opiskelijoille. Opinnäytetyön tuotteena syntyvien värjäyslasien on tavoitteena tukea gramvärjättyjen preparaattien tulkinnan opettelua ja on tärkeänä osana bakteerimorfologian ymmärtämistä teoreettisesti, että visuaalisesti.

ASIASANAT:

Kliininen mikrobiologia, gramvärjäys, oppimateriaali, bakteeri

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Laboratory Science

2017 | 22 + 1

Bebe Wong

GRAM-STAINING

- Learning material for new biomedical laboratory scientist students

Gram staining is one of the most important methods of identifying bacteria as it detects and differentiates a wide range of pathogenic agents. The performance and interpretation of which must be known by a biomedical laboratory scientist professional. At best, gram-staining can act as a quick diagnostic method to guide the patient's treatment. Many infectious agents do not grow or grow slowly on cultures, where staining may be the only way to detect these organisms in clinical specimens. Patient care and diagnosis is largely based on laboratory testing, which means that high quality and reliable results are important to ensure patient safety.

The purpose of this thesis is to make a study material for the microbiology study program of the Biomedical Laboratory Science Degree Program in Turku University of Applied Sciences. The study material is made in the form of gram-stained bacterial glasses and is intended for new biomedical laboratory scientist students. The stained glasses produced as a product of this Bachelor's thesis aims to support the teaching and the interpretation of gram-stained bacteria and is an important part of the theoretical and visual understanding of bacterial morphology.

KEYWORDS:

Clinical microbiology, gram staining, learning material, bacteria

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	5
2 BAKTEERI	6
2.1 Bakterin morfologia	6
2.2 Bakterin genomi	8
3 GRAMVÄRJÄYS	10
3.1 Värjäyksen tarkoitus	10
3.2 Värjäyksen periaate	11
3.3 Värjäyslasin valmistus	12
4 VÄRJÄTYN PREPARAATIN TARKASTELU	13
4.1 Mikrobin muodot	13
4.2 Mikroskopia	14
4.3 Virhelähteitä	14
5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT	16
5.1 Metodologiset lähtökohdat	16
5.2 Eettiset lähtökohdat	16
6 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	18
7 POHDINTA	19
LÄHTEET	21
Liite 1. Gramvärjäyksen suoritus (Huckerin modifikaatio)	

1 JOHDANTO

Gramvärjäys on yksi tärkeimmistä bakteriologian tunnistusmenetelmistä, koska se havaitsee ja erottaa monenlaisia taudinaiheuttajia, ja jonka suoritus ja tulkinta pitää hallita bioanalyytikon ammatissa. Parhaimmillaan gramvärjäys voi toimia pikadiagnostisena menetelmänä ohjaamaan potilaan hoitoa. Monet infektiiviset tekijät eivät kasva tai kasvavat hitaasti viljelyalustalla, jolloin värjäys saattaa olla ainoa tapa havaita nämä organismit kliinisissä näytteissä. Potilaiden hoito ja diagnosointi, pohjautuu suurimmalta osin laboratoriotutkimuksiin, jonka takia laadukkaat ja luotettavat tulokset ovat tärkeitä potilasturvallisuuden takaamiseksi. (Liimatainen 2000; Madison 2009; Carlson & Koskela 2011).

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on tehdä oppimateriaali Turun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian opintojaksolle. Oppimateriaali tehdään gramvärjättyjen bakteeripreparaattien muodossa ja ne ovat tarkoitettu uusille bioanalytikko-opiskelijoille. Opinnäytetyön tuotteena syntyvien värjäyslasien on tavoitteena tukea gramvärjättyjen preparaattien tulkinnan opettelua ja on tärkeänä osana bakteerimorfologian ymmärtämistä teoreettisesti, että visuaalisesti.

Gramvärjäyksestä ei ole tällä hetkellä tarpeeksi kattavasti ajankohtaista tietoa suomalaisessa kirjallisuudessa. Vaikka menetelmä onkin pysynyt samana jo useamman vuosikymmenen, ei sen mahdollisia hyötyjä muualla kuin bakteriologisessa diagnostiikassa ole juurikaan tutkittu. Ulkomaisia lähdetietoja sen sijaan löytyy jopa tähän vuoteen asti.

2 BAKTEERI

Kaikki elävä maapallolla on saanut alkunsa kemiallisen säteilyn ja lämpöenergian kombinaatiosta, joka tuottaa sellaisia orgaanisia aineita, jotka kykenevät kerääntymään yhteen ja monistamaan rakenteitaan. Näitä järjestäytyneitä yksiköitä kutsutaan soluiksi, jotka muodostuvat solulimasta eli sytoplasmasta, solukalvosta eli sytoplasmisesta membraanista ja joissakin tapauksissa myös soluseinästä. Bakteerit kuuluvat prokaryoottiseen kehityslinjaan, joka jakaantuu edelleen eukaryootteihin ja arkkibakteereihin. Prokaryoottisissa soluissa ei ole tumaa, vaan perintöaines eli DNA on sytoplasmassa nukleoidina. Kaikkia prokaryootteja kutsutaan bakteereiksi. (Huovinen ym. 2003; Hedman ym. 2010).

2.1 Bakteerin morfologia

Bakteerit ovat yksisoluisia organismeja, jotka ovat kooltaan mikroskooppisia. Paljaalla silmällä voidaan havaita halkaisijaltaan noin 100 µm kokoinen partikkeli. Mikrobien koko määrää sen, kuinka nopeasti ravinteet pääsevät solun sisälle ja jätteet ulos solusta. Lähes kaikki bakteerit ovat kuitenkin tätä pienempiä, joten niiden tarkastelu vaatii mikroskoopin käyttöä. Suotuisissa olosuhteissa, eli kun bakteereilla on riittävästi ravintoa, lämpöä ja kosteutta, lisääntyvät ne eksponentiaalisesti muodostaen selvästi havaittavia pesäkkeitä. Kukin pesäke muodostuu useista sadoista miljoonista tai jopa tuhansista miljoonasta erillisestä bakteerisolusta. (Salkinoja-Salonen 2002; Huovinen ym. 2003; Heikkilä ym. 2005; Hedman ym. 2010).

Sytoplasma sijaitsee solukalvon sisäpuolella. Sytoplasminen väliaine eli matriksi koostuu kaikesta solukalvon sisäpuolella olevasta, paitsi DNA:sta. Prokaryooteilta puuttuvat toiminnaltaan erikoistuneet soluelimet, kuten esim. mitokondriot, kloroplastit, endoplasminen retikulum ja Golgin laite. Sytoplasma on näin ollen solun toiminnalle merkityksellinen, sillä lähes kaikki solun kasvu-, aineenvaihdunta- ja replikaatioreaktiot tapahtuvat sen muodostamassa ympäristössä. Bakteerien sytoplasma on hyytelömäinen ja se sisältää vettä, proteiinia, rasvaa ja hiilihydraatteja. Hyytelömäinen koostumus johtuu sen suuresta proteiinipitoisuudesta. Sytoplasmassa olevat ribosomit ovat välttämättömiä proteiinisynteesin kannalta. Bakteerit joilla on suuri lisääntymisnopeus, on paljon ribosomeja. (Huovinen ym. 2003; Ericson & Ericson 2009; Hedman ym. 2010).

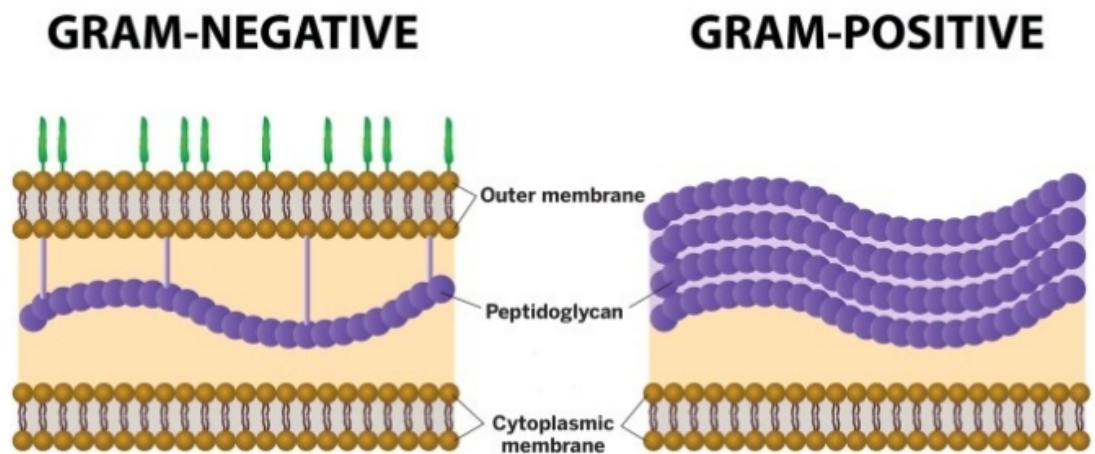
Bakteerien solukalvo muodostuu lähinnä fosfolipideistä ja proteiineista. Fosfolipidit muodostavat kaksoislipidikerroksen, joka erottaa soluliman ympäristöstään. Solukalvo on valikoivasti vuorovaikutuksessa solun ympäristön kanssa. Fosfolipidien muodostaman lipidikerroksen sisä- tai ulkokerroksen proteiinit asettuvat niin, että ne ovat näkyvissä vain solukalvon yhdeltä puolelta tai niin, että proteiini lävistää kalvon kokonaan. Proteiinien asettuminen perustuu niiden hydrofobisiin ominaisuuksiin. Solukalvon kestävyys puolestaan lipidikerroksen fosfolipidien välisiin hydrofobisiin vuorovaikutuksiin, sekä myös proteiinien ja fosfolipidien välisiin vetysidoksiin. Solukalvon rakenteen ansiosta osa proteiineista liikkuvat vapaana ja toiset proteiinit taas kiinnittyneet paikoilleen. Nämä ominaisuudet ovat keskeisiä solukalvon toiminnan kannalta. Prokaryoottien solukalvon rakenne poikkeaa eukaryooteista jonkin verran, esim. bakteerien kalvosta puuttuu eläinsolukalvoille tyypillinen kolesteroli. (Ericson & Ericson 2009; Hedman ym. 2010).

Miltei kaikilla bakteereilla on soluseinän ulkopuolella peptidoglykaanikerros eli mureiinikerros, joka määrää solun muodon ja koon. Peptidoglykaanimolekyylit itsessään muodostavat disakkariditrapeptidit, jotka edelleen muodostavat peptidisilloja. Nämä peptidisillat polymerisoituvat pitkiksi polysakkaridiketjuiksi, jotka ympäröivät bakteerisolua kolmiulotteisesti verkkopussin tavoin. Polysakkaridiketjut sisältävät kahta sokeria, N-asetyyli-glukosamiinia (GlcNAc) ja sen johdannasta N-asetyylimuraminaattia (MurNAc). (Hedman ym. 2010).

Grampositiivisilla bakteereilla on paksumpi peptidoglykaanikerros kuin gramnegatiivisilla, jonka johdosta ne ovat herkempiä tietyille antibiooteille. Teikkohapot ovat grampositiivisille bakteereille ominaisia, jotka puuttuvat gram-negatiivisilta. Ne muodostuvat glyserolifosfaatti- tai ribitolifosfaattirakenteisesta polymeeristä, johon on liittyneenä yleensä erilaisia sokereita tai D-aminohappoja. Teikkohapot säätelevät mm. solun mikroympäristön ionitasapainoa ja soluseinän peptidoglykaania pilkkovien entsyymien aktiviteettia. Gram-positiivisilla bakteereilla on ominaisten teikkohappojensa lisäksi polysakkaridirakenteisia polymeerejä. Niiden sijaintia ei ole varmasti pystytty määrittämään, mutta joissain tapauksissa niiden on osoitettu olevan kiinni peptidoglykaanissa. Eri bakteeriryhmien polysakkaridit ovat rakenteeltaan hieman erilaiset, mutta parhaiten tunnettu on C-polysakkaridi (C = carbohydrate), joka muodostuu polyramnoosista, jossa on GlcNAc-sivuhaaroja. Edellä mainittujen rakenteiden lisäksi joillakin gram-positiivisilla bakteereilla voi olla vielä proteiinikerros. Proteiineja on polysakkaridien tavoin erilaisia, josta parhaiten tunnetaan M-proteiini (M

= mucoid). Tämä proteiini muodostaa solun ulkopinnalla olevan säikeisen paksun kerroksen, joka on keskeinen komponentti fagosytoosin estämiseksi. (Hedman ym. 2010).

Gramnegatiivisilla bakteereilla on peptidoglykaanikerroksen ulkopuolella sille ominainen ulkomembraani, joka suojaa bakteerisolua. Tämän membraanin ansiosta gramnegatiiviset bakteerit ovat paljon vastustuskykyisempiä monille mikrobilääkkeille ja desinfiointiaineille (Kuva 1). Ulkomembraani muodostuu muiden biologisten kalvojen tavoin kaksoislipidikerroksesta, mutta poikkeuksellisesti noin puolet sen massasta koostuu ulkomembraanin ulkopinnassa esiintyvistä makromolekyylillä, lipopolysakkaridista. Gramnegatiivisten bakteerien aiheuttamaan yleisinfektioon liittyy usein endotoksiinisokki, joka johtuu lipopolysakkaridien toksisesta vaikutuksesta ihmisen elimistöön. (Gillespie & Bamford 2007; Hedman ym. 2010). Lähes kaikki kliinisesti merkittävät bakteerit voidaan löytää gram-värijäyksen avulla. Poikkeuksena ovat organismit, jotka elävät pääasiassa isäntäsolun sisällä, tai joilla ei ole soluseinää tai joita ei pystytä erottamaan valomikroskoopin avulla. (Forbes, Sahm & Weissfeld 2007).



Kuva 1. Gramnegatiivisen ja grampositiivisen bakteerisolun seinämäeröt (Geber Berg 2015).

2.2 Bakteerin genomi

Prokaryooteilta puuttuu varsinainen tuma, joten niiden genomi on hyvin yksinkertainen ja ne muodostuvat yhdestä tai useammasta pitkästä, yleensä rengasmaisesta DNA-molekyylillä. Tätä kutsutaan bakteerikromosomiksi, johon liittynyt useita erilaisia

emäksisiä histonin kaltaisia proteiineja. Niiden tehtävänä on esimerkiksi stabiloida kromosomin rakennetta. Bakterin yksinkertainen genomirakenne rajoittaa genomien kokoa, joka puolestaan rajoittaa solun kehitysmahdollisuuksia. (Huovinen 2003; Hedman ym. 2010).

Bakteerisolut ovat haploidisia, eli niissä on yleensä vain yksi kromosomi. Joillakin lajeilla genomi voi olla kahdessa tai useammassa osassa. Bakteereilla ei ole järjestäytyneitä mitoosia, jolloin nopean kasvun aikana bakteerisolussa voi olla useampia identtisiä kromosomeja. Tällöin solun jakautuminen on jäänyt jälkeen DNA:n kahdentumisesta. Replikaatio saa alkunsa oriC-lokuksesta, josta replikaatiohaarukat etenevät molempiin suuntiin. Vaikka bakteerigenomi on itsessään yksinkertainen rakenteeltaan, on sen replikaatio monimutkainen prosessi, joka vaatii paria kymmentä erilaista proteiinia. (Huovinen ym. 2003; Hedman ym. 2010).

3 GRAMVÄRJÄYS

Gramvärjäys on ollut jo yli vuosisadan ajan tärkein bakteerien alustavaan tunnistukseen käytetty menetelmä. Värjäys sai alkunsa tanskalaisesta Hans Christian Joachim Gramista vuonna 1883 hänen työskennellessään Berliinissä Karl Friedländerin laboratorioissa. Käsitellessään kristallivioletilla värjäämiään bakteereita jodiliuoksella, Gram havaitsi, että käsittelyn jälkeen osalla bakteereista väri ei ollut enää pestävissä pois alkoholilla, kun taas osalla oli. Gram julkaisi värjäysmenetelmänsä *Fortschritte der Medizin* -lehdessä maalikuussa 1884. Värjäysmenetelmän suosio oli niin suuri, että jo vuonna 1886 kuvattiin se jo oppi- ja käsikirjoissa. Menetelmää kehitti muutamaa vuotta myöhemmin saksalainen patologi Carl Weigert, lisäämällä vastavärjäyksen safraniinilla, jolloin pesussa värinsä menettäneet bakteerit värjäytyivät punaisiksi ja olivat näin helpommin tunnistettavissa. (Meurman 2014).

Bakteriologisia laboratoriotutkimuksia tarvitaan, kun halutaan selvittää, onko kyseessä infektio tauti ja onko sen aiheuttanut bakteeri. Bakterivärjäyksellä voidaan näytteestä saada alustava tieto, jota muut diagnostiset tutkimukset tarkentavat. Mikrobiologisten tutkimusten käyttöarvo perustuu merkittävästi siihen, miten nopeasti tulokset saadaan ja miten niitä voidaan tilastollisesti hyödyntää. (Carlson & Koskela 2003).

Gramvärjäykset suoritetaan nykyisin pääasiassa värjäysautomaattien avulla, joka vähentää työkuormitusta lasien värjäytymisen ajaksi. Nykyajan tekniikka ei kuitenkaan ole pettämätöntä, joten automaatin ollessa huollossa tai epäkunnossa, on bioanalyytikon osattava suorittaa värjäykset manuaalisesti. Myös yksittäiset ja kiireelliset preparaattit värjätään usein käsin. On kuitenkin muistettava, että epäonnistunutta värjäystä ei ole aina mahdollista uusua, esim. huomattavan vähäisen näytemäärän vuoksi. Koska värjäämiseen kuluu vain muutamia minutteja, gramvärjäystä voidaan käyttää myös kiireellisenä päivystysdiagnostisena menetelmänä. (Lappalainen & Vuento 2007; Meurman 2010; Pynninen 2013).

3.1 Värjäyksen tarkoitus

Gramvärjäyksen tarkoituksena on jakaa bakteerit kahteen suureen pääryhmään, grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin. Penisilliinin ja muiden mikrobilääkkeiden keksimisen myötä havaittiin, että grampositiivisuus tai -negatiivisuus voi osin ennustaa

bakteerin herkkyyttä tai resistenssiä tietyille antibiooteille. Bakteerin gramvärjäytyvyyden ja solumorfologian perusteella on mahdollista tunnistaa bakteereita alustavasti sellaiselle tarkkuudelle, joka antaa keskeistä tietoa hoitaville lääkäreille. Gramvärjäyksellä on keskeinen rooli bakteereiden tunnistusprosessissa huolimatta nykyisten nopeiden ja modernien tunnistusmenetelmien lisääntymisestä laboratorioissa. Vakavissa infektioissa värjäyksen avulla voidaan tuottaa nopeasti tietoa, jolla on kliinistä merkitystä. Tämä ensitieto vaikuttaa välittömästi mikrobilääkkeen valintaan. (Meurman 2010; Rissanen 2016).

3.2 Värjäyksen periaate

Gramvärjäyksen teoreettinen tausta ei ole täysin selvillä, mutta Beveridgen mukaan jodi ja kristallivioletti yhdistyneenä muodostavat liukenemattomia komplekseja. Vesipitoisissa liuksissa kristallivioletti hajoaa CV+ (kristallivioletti) ja Cl- (kloridi) – ioneiksi jotka tunkeutuvat sekä grampositiivisen, että gramnegatiivisen bakteerin soluseinän ja membraanin läpi. CV+ toimii vuorovaikutuksessa negatiivisesti varautuneiden bakteerikomponenttien kanssa, jolloin solut värjäytyvät violetiksi. Kun lisätään jodia, muodostaa se yhdessä kristallivioletin kanssa CVI-kompleksin sytoplasman sisällä ja solun ulommissa kerroksissa. Väriä poistettaessa käytetään alkoholia, yleensä etanolia tai etanolin ja asetonin yhdistelmää. Alkoholin vaikutuksesta gramnegatiivisen bakteerin ulkomembraani vaurioituu, jättäen peptidoglykaanikerroksen alttiiksi, jolloin värikompleksit pääsevät solusta ulos. Grampositiivisilla bakteereilla peptidoglykaanikerros puolestaan on niin paksu, ettei alkoholi vaurioita sitä riittävästi värikompleksien vapauttamiseksi. Väriinpoiston jälkeen grampositiiviset bakteerit pysyvät violettina, kun taas gramnegatiiviset bakteerit menettävät violetin värinsä. Gramnegatiiviset bakteerit saadaan havaittavaksi vastavärjäyksen avulla lisäämällä safraniinia. (Hussey & Smith 2005).

Jotkut bakteerit voivat värjäyksen jälkeen muodostaa kuvion joka tunnetaan nimellä gram-muuttuja. Tämä kuvio muodostuu vaaleanpunaisista ja violeteista soluista. Tämä epäsäännöllinen värjäytyminen johtuu joidenkin bakteerien soluseinistä, jotka ovat herkkiä rikkoutumiselle solun jakaantumisen aikana. Näitä bakteereita ovat esimerkiksi Actinomyces, Arthrobacter, korynebakteerit, mykobakteerit ja proprionibakteerit. Myös näytteen ikä ja tekniset tekijät voivat vaikuttaa värjäystuloksiin. (Madani 2003; Hussey & Smith 2005).

3.3 Värjäyslasin valmistus

Ennen värjäystä on varmistettava, että preparaattilasit ovat puhtaita ja kuivia. Näyte levitetään lasille ohuena kerroksena, jolloin näytteen värjäytyminen ja katsominen olisi selkeämpää. Bakteeripesäkkeestä tehty värjäys voidaan suorittaa levittämällä bakteerimassaa suoraan lasille esimerkiksi puutikun avulla tai sekoittamalla pesäke keittosuolaliuokseen. Jälkimmäisellä keinolla saadaan usein parempi tulos, mutta se hidastaa värjäysprosessia, sillä kuivuminen kestää pidempään. Mikäli näyte kiinnitetään liekillä, pitää kiinnitys tehdä varoen eikä näytettä saa polttaa pilalle. Liekillä kiinnitettäessä, lasia käytetään pari kertaa bunsenlampun liekin yläpuolella (Cappucino & Sherman 2008). Lasin on myös annettava jäähtyä kunnolla ennen värjäysprosessin aloittamista. Jos näytettä on niukka määrä, on kuivalle lasille tehtävä preparaatti parempi vaihtoehto. Värjäystä tehtäessä on huolehdittava myös siitä, että alkuperäinen potilasnäyte ei saa kontaminoitua, jotta myöhemmin mahdollisesti tehtävien diagnostisten tutkimusten laatu tai luotettavuus ei vaarantuisi. (Liimatainen 2000).

Gramvärjäyksen suorittamisesta on olemassa useita toisistaan hieman poikkeavia ohjeita, mutta menetelmäperiaate on sama kaikissa. Nykyisin yleisimmin käytössä oleva menetelmä on Huckerin keksimä modifikaatio vuodelta 1921 (Garcia 2007). (Kuva 2).



Kuva 2. Gramvärjäyksen kulku (Meurman 2010).

4 VÄRJÄTYN PREPARAATIN TARKASTELU

Bakteerien havaitseminen paljain silmin ei ole mahdollista niiden pienen koon vuoksi, jonka takia valomikroskoopi onkin tärkein apuväline bakteerien tarkastelussa. Sillä voidaan saavuttaa jopa noin 1000-1200 –kertainen suurennos. Bakteerit eivät yleensä erotu mikroskoopissa taustastaan värjäämättömänä, mikäli ei käytetä optisia erikoismenetelmiä. (Carlson & Koskela 2003).

Mikrobiologisten tutkimusten tavoitteena on ohjata hoitavaa lääkäriä infekti- ja immuunisairauksien diagnosoimisessa ja potilaan hoidon seurannassa (Katila & Laatikainen 2004). Laadukkaat ja luotettavat tulokset ovat tärkeitä potilasturvallisuuden takaamiseksi. Tämä tulee esille esimerkiksi Randin ja Tillanin (2006) tekemässä tutkimuksessa, jossa 23:n kuukauden aikana jopa 8253:n potilaan tulokset tulkittiin virheellisesti. Useimmat näistä liittyivät grampositiivisten kokkien tulkintaan. Neljässä tapauksessa potilaan hoito viivästyi 14:sta tunnista jopa kolmeen päivään.

4.1 Mikrobien muodot

Tavallisimpia kliinisiä infektioita aiheuttavat pyöreät eli kokkimaiset ja basillit eli sauvabakteerit. Kokkibakteerit voivat esiintyä joko yksittäin, diplokokkeina eli pareittain, ryhminä tai eripituisina ketjuina. Kierteisiä bakteereita kutsutaan spirokeetoiksi. Ketjumaiset tai rypälemäiset muodostelmat johtuvat tavallisesta bakteerilajeille tyypillisestä tavasta lisääntyä jakautumalla. Esim. stafylokokit ovat usein epämääräisissä kasoissa, kun taas streptokokit ovat yleensä järjestäytyneessä ketjussa. (Ericson & Ericson 2009).

Sauvoja voi olla lyhyitä tai pitkiä ja myös erikokoisia, ja ne voi valomikroskoopissa helposti erehdyttää soikeiksi kokeiksi. Bakteerin ryhmitystä, eli pesäkemuotoa ei tule sekoittaa sen perusmuotoon. Bakteeripesäke voidaan havaita paljain silmin, mutta yksittäistä bakteeria ei. Pesäke koostuu miljoonista bakteereista, jonka halkaisija voi olla millimetrejä. Bakteerien ryhmityksessä on myös vaihtelua, jota voidaan käyttää apuna tunnistamisessa. Ryhmittäminen aiheutuu solun jakaantumissuunnasta ja ajasta jonka solut pysyvät yhdessä. (Heikkilä ym. 2005; Sojakka & Välimäki 2011).

4.2 Mikroskopia

Bakteeridiagnostiikassa mikroskopointi tehdään yleensä värjäyksen jälkeen. Tämä helpottaa bakteerien jaottelua värjäytyvyyden perusteella sinisiin grampositiivisiin ja punaisiin gramnegatiivisiin sekä muotonsa perusteella vielä kokkeihin tai sauvoihin. Myös valkosoluja voidaan havaita. Jo tämä karkea jako neljään pääryhmään voi antaa monessa tapauksessa keskeistä tietoa todennäköisestä patogeenistä ja auttaa mahdollisen hoidon aloittamisessa. Samalla voidaan arvioida näytteen laatua ja tulehdusvasteen esiintymistä. Mikroskopiamenetelmät ja niiden tulkintakriteerit vaativat jatkuvaa ylläpidettävää kokemusta. (Katila 2004; Lehman 2003).

Gramvärjäyksen tulkinta vaatii ammattitaitoa ja kokemusta. Tarkastelu tulisi aloittaa pienellä suurennoksella edustavan kohdan löytämiseksi ja yleiskuvan saamiseksi näytteen laadusta. Lähempi tarkastelu tehdään usein öljyimmersio-objektiivilla, jossa on isompi suurennos. Öljyä käytetään valon kulkemisen edesauttamiseksi. Kun öljyn taitekerroin vastaa lasin taitekerrointa, valo ei taitu rajapinnassa ja näin objektiivin numeerinen apertuuri saadaan suuremmaksi. Mikroskopiinnissa edetään suoralinjaisesti joko sivelyn pituus- tai poikkiakselin suunnassa. (Hellstén 2005).

Koska värjäyksessä ei voida erottaa rakenteeltaan samankaltaisia bakteerisukuja tai lajeja toisistaan, normaaliflooraa sisältävien näytteiden tutkimukseen soveltuu se huonosti. Gramvärjäystä käytettäessä on se käyttökelpoisin normaalisti steriileihin näytteisiin, kuten likvoriin ja nivelnesteeseen. (Liimatainen 2000).

4.3 Virhelähteitä

Gramvärjäykseen liittyy monia virhelähteitä, joista osa ovat teknisiä ja osa potilaaseen liittyviä, kuten esimerkiksi antibioottihoito. Kriittinen vaihe tapahtuu jo näytteenotossa. Huonosti otetusta näytteestä saadaan yhtä heikko vastaus laboratoriossa. Siksi on tärkeää, että näytteenottaja on tietoinen oikeasta näytteenottotavasta ja näytteen säilytyskriteereistä. Tekniset virheet voidaan usein välttää huolellisella laboratorio-työskentelyllä. Bakteerit ovat yleensä säännöllisiä, ääriivoiltaan tasaisia ja usein keskenään samankokoisia. Jakautuneet bakteerit jäävät kiinni toisiinsa ja sen seurauksena bakteerit ovat näytteessä yleensä samassa tasossa toisin kuin artefaktat. Antibioottihoitoa saaneen potilaan näytteessä osa bakteereista voi olla jo niin kärsineitä,

että ne muistuttavat artefaktoja. Mikäli bakteerit näyttävät haamumaisilta, ovat ne saattaneet olla lasilla jo ennen haluttua näytettä, jolloin löydöksen merkitsevyyttä tulisi kyseenalaistaa. Kontaminaatiota tulisi epäillä, mikäli bakteereita ei näy useammassa näkökentässä. (Melhus 2010; Meurman 2010).

Gramvärjäys tulisi suorittaa 18 – 24 tunnin ikäisistä viljelmistä. Yli 48:n tunnin, joskus jopa 24 tunnin vanhan viljelmän bakteerit voivat värjäytyä sekalaisesti, sillä ikääntyessään bakteerien soluseinä muuttuu. (Harley 2005; Black 2008). Barenfangerin ym. (2008) tutkimuksessa on todettu värjäysajan merkitystä gramvärjäyksestä saatuihin raportteihin. On todettu, että mitä nopeammin sopiva hoito aloitetaan, sitä paremmat tulokset voidaan saavuttaa. Tutkimuksessa verrattiin välittömästi käsiteltyjä (<1h), viljelmiin joita ei oltu käsitelty viipymättä (≥1h). 99:ssä parinäytteessä keskimääräinen aikaero positiivisten veriviljelmien havaitsemiseksi oli alle 0.1 tuntia. Näytteet jotka oltiin käsitelty vasta yli tunnin kuluessa, tulokset saatiin noin 3.3 tunnin päästä. Tuloksena siis saatiin, että viiveetön värjäysaika toi merkittävää parannusta gramvärjäyksestä saatuihin raportteihin.

Mahdollisia selityksiä virheelliselle gramvärjäykselle (mukaillen Meurman 2010):

Grampositiivinen värjäytyy gramnegatiiviseksi

- Liian ohut valmiste
- Bakteeri on kiinteässä kasvuvaiheessa
- Bakteeri on vaurioitunut (antibioottihoito, näyte hangattu lasille)
- Liika kuumennus kiinnityksessä
- Liian pitkät vesipesut
- Vanhentunut jodiliuos
- Vettä värinpoistoliuoksessa

Grampositiivinen värjäytyy gramnegatiiviseksi

- Liian paksu valmiste
- Liian kuiva lasi ennen värinpoistoa
- Kristalliviolettiä värinpoistoliuoksessa
- Jodia värinpoistoliuoksessa
- Puhdistusainetta näytteessä

5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on tehdä oppimateriaali Turun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian opintojaksolle. Oppimateriaali tehdään gramvärjättyjen bakteeripreparaattien muodossa ja ne ovat tarkoitettu uusille bioanalyttikko-opiskelijoille. Oppiminen ajatellaan prosessiksi, jossa käyttäytyminen kokemusten tuloksena muuttuu (Ruohotie 2005). Oppimisessa ei ole tarkoitus vain olemassa olevien tosiasioiden tallentamisesta mieleen, vaan olennaisena tekijä on oppijan oma aktiivinen rooli merkityksellisten kokonaisuuksien rakentajana (Koli & Silander 2002). Opinnäytetyön tuotteena syntyvien värjäyslasien on tavoitteena tukea gramvärjättyjen preparaattien tulkinnan opettelua ja on tärkeänä osana bakteerimorfologian ymmärtämistä teoreettisesti, että visuaalisesti.

5.1 Metodologiset lähtökohdat

Tämä työ on toiminnallinen opinnäytetyö, koska sen tuotoksena syntyy uutta oppimateriaalia mikrobiologian opintojaksolle. Toiminnallisen opinnäytetyön tarkoituksena on tuottaa jotakin uutta, esimerkiksi jokin ohje, menetelmä tai palvelu, joka kootaan useista eri tietolähteistä toimien perustana uudelle tuotettavalle asialle (Turun ammattikorkeakoulu 2017). Opinnäytetyön tulisi olla tutkimuksellisella asenteella toteutettu ja riittävällä tasolla alan tietojen ja taitojen hallintaa osoittava. Työn tulee kuvastaa lukijalle tekijän ammatillisesta osaamisesta ja toimia sekä ammatillisen että persoonallisen kasvun välineenä. (Vilkkä & Airaksinen 2003). Tämän toiminnallisen opinnäytetyön tuotoksena tehdään gramvärjättyt bakteeripreparaatit, jotka toimivat oppimateriaalina uusille bioanalyttikko-opiskelijoille.

5.2 Eettiset lähtökohdat

Työn kirjallista osuutta kirjoitettaessa pyrin hakemaan mahdollisimman tuoretta, monipuolista ja ajankohtaista tietoa hyväksikäyttäen sekä kirjallisuutta että verkkolähteitä. Myös ulkomaisia lähteitä, sekä englannin- että ruotsinkielisiä pyrin käyttämään melko runsaasti. Vanhoja lähteitä käytettäessä tarkistettiin tiedon

muuttumattomuus. Kiinnitettiin myös huomiota tiedon alkuperään, lähteen uskottavuuteen ja julkaisijan arvovaltaan (Hirsjärvi ym. 2010).

Tästä työstä ei juurikaan esiinny eettisiä ongelmia, sillä tarkoituksena on tehdä oppimateriaali, joten työ ei aiheuta kenellekään haittaa tai vahinkoa. Opinnäytetyön teossa noudatetaan kuitenkin hyviä eettisiä ja tieteellisiä periaatteita, kuten huolellinen laboratoriotyöskentely ja aseptiset toimintatavat. Työstä ei synny kvantitatiivisia tuloksia eikä työssä käsitellä lainkaan potilasnäytteitä. Bakteerit saadaan olemassa olevista ATCC-kontrollikannoista.

6 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Toimeksianto opinnäytetyöhön saatiin Turun ammattikorkeakoululta toukokuussa 2017. Opinnäytetyö on osana Työelämäyhteistyön ja opetusmenetelmien kehittäminen – tutkimusta, jolle on saatu lupapäätös Turku CRC:ltä kesäkuussa 2017.

Bakteeripreparaattien suunnittelussa otin huomioon yleisimmät kliiniset bakteerit. Bakteerit saatiin Tyks-Sapa-liikelaitoksen toimipisteestä, Turun kaupunginsairaalan mikrobiologian osastolta 938. Bakteerit ympättiin natriumkloridissa pienessä koeputkessa olemassa olevista ATCC-kontrollikannoista. Tämän jälkeen jokaiselle lasille tiputettiin kahta eri bakteeria Pasteur-pipetillä. Lasit kuivatettiin lämpölevyllä prosessin nopeuttamiseksi. Lasien kuivuttua ne pistettiin värjäysautomaattiin, jossa kone hoiti värjäyksen. Preparaattien montteeraus tehtiin Tyks-Sapa-liikelaitoksen patologian osastolla 937. Montteerauksessa käytettiin värjäysautomaatti Leica ST5020 multistaineria.

Opinnäytetyön kirjallista raporttia varten aineistoa kerättiin kesällä 2017. Kesän ja alkusyksyn aika kirjoitettiin myös opinnäytetyön teoreettinen osuus. Teoreettinen osuus lähtee käsittelemällä bakteerin rakennetta, jotta lukija ymmärtää bakteerin soluseinän rakenteen merkityksen gramvärjäyksessä. Toisessa kappaleessa on purettu gramvärjäyksen tarkoitusta ja periaatetta, sekä miten värjäyslasi valmistetaan. Kolmannessa osuudessa on kerrottu mikrobien muodoista ja hieman mikroskopiasta. Myös mahdollisista virhelähteistä on kerrottu.

7 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tehdä oppimateriaali Turun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian opintojaksolle. Oppimateriaali tehtiin gramvärjättyjen bakteeripreparaattien muodossa, jonka tavoitteena on tukea gramvärjättyjen preparaattien tulkinnan opettelua ja on tärkeänä osana bakteerimorfologian ymmärtämistä teoreettisesti, että visuaalisesti.

Oppimateriaaliin haluttiin mahdollisimman monipuolisesti bakteereja, ottaen huomioon myös niiden gramvärjäytyvyys ja muoto. Laseihin valittiin seitsemän gramnegatiivista sauvaa, seitsemän grampositiivista kokkia, neljä grampositiivista sauvaa ja kaksi hiivaa. Tiettyjä alun perin haluttuja bakteereita ei ollut valmiissa kontrollikannoissa, joten osa bakteereista jouduttiin vaihtamaan saman gramvärjäytyyden ja muodon omaavien bakteerien kanssa. Erilaisia lasipareja tuli kymmenen kappaletta, ja jokaisesta tehtiin neljä kopioparia, joten laseja tehtiin yhteensä siis 50.

Itse lasien teko sujui melko mukavasti. Sillä bakteereja oli yhden ihmisen työskentelyyn melko sopiva määrä, ei huolellisen työskentelyn ansiosta virheitä sattunut. Muutama lasi meni hukkaan, lähinnä esteettisyyden vuoksi. Katsottiin että värjättävät bakteeripat olivat suurin piirtein samankokoisia ja samassa kohtaa lasia. Värjäysautomaatti lopetti toimintansa kesken värjäyksen, joten osa laseista jouduttiin värjäämään manuaalisesti koneen altaissa. Ensimmäisten lasien valmistuessa huomattiin myös ylimääräisiä värjäytymiä objektilasilla. Loput lasit huuhtelin vedellä värjäyksen lopussa ylimääräisten värjäytymien poistamiseksi.

Montteeraus tehtiin patologian värjäysautomaatin avulla. Sillä automaatti ei ole tarkoitettu mikrobiologisille näytteille, piti automaatista poistaa ksyleeni. Montteerausaine ei myöskään peittänyt koko objektilasia, joten manuaalisesti päälylystäminen olisi saattanut olla parempi vaihtoehto.

Teoreettisen osuuden kirjoittamisessa ajankohtaisia suomenkielisiä oli gramvärjäyksestä vaikea löytää, jopa 2000-luvun lähteitä oli melko rajallisesti. Englanninkielisiä lähteitä sen sijaan oli runsaasti, jopa tähän vuoteen asti. Englanninkielisiä aineistoja oli kuitenkin välillä vaikea lukea ja kääntää. Luotettavuuden ja ajankohtaisuuden takaamiseksi opinnäytetyöhön käytettiin vain 2000-luvun lähteitä.

Suomenkielisiä lähteitä käytin lähinnä opinnäytetyön perusteorian rakenteen kirjoittamiseen. Tutkimuksellisia lähteitä hyödynsin suurimmaksi osaksi englanniksi.

Laseja voisi tulevaisuudessa olla myös hieman enemmän, mikäli bakteereja saataisiin, esimerkiksi gramnegatiivisia kokkeja ei ollut laseissa lainkaan mukana. Jatkotutkimusaiheina voisivat olla samankaltaiset oppimateriaalit esimerkiksi hematologian opintojaksolle.

LÄHTEET

- Barenfanger, J., Graham, D., Kolluri, L., Sangwan, G., Lawhorn, J., Drake, C., Verhulst, S., Peterson, R., Moja, L., Ertmoed, M. Moja, A., Shevlin, D., Vautrain, R. & Callahan, C. 2008. Decreased Mortality Associated With Prompt Gram Staining of Blood Cultures. *American Journal of Clinical Pathology*. Volume 130 (6).
- Beveridge, T.J. 2001. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*. Volume 27 (3). Viitattu 30.6.2017. <http://dx.doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>.
- Black, J. G. 2008. *Microbiology*. 7. painos. Hoboken NJ: John Wiley & Sons Inc.
- Cappuccino, J. G & Sherman, N. 2008. *Microbiology. A laboratory manual*. San Fransisco CA: Pearson Benjamin Cummings.
- Carlson, P. & Koskela, M. 2011. *Bakteriologinen diagnostiikka. Mikrobiologia ja infektiosairaudet – Kirja II*. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Ericson, E. & Ericson, T. 2009. *Klinisk mikrobiologi – infektioner, immunologi, vårdhygien*. Tukholma: Liber AB.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F. & Weissfeld, A. S. 2007. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12. Painos. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Garcia, L. S. 2007. *Clinical microbiology procedures handbook*. 3. painos. Washington D.C.: ASM Press.
- Gebel Berg, E. 2015. A New Spin On The Old Gram Stain. *American Chemical Society*. Viitattu 30.6.2017. <http://cen.acs.org/articles/93/web/2015/04/New-Spin-Old-Gram-Stain.html>.
- Gillespie, S. & Bamford, K. 2007. *Medical Microbiology & Infection at a Glance*. 3. painos. Yhdysvallat: Blackwell Publishing.
- Harley, J.P. 2005. *Laboratory Exercises in Microbiology*. 6. painos. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. 2010. (toim.) *Teoksessa Mikrobiologia – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Hellstén, S. 2005. *Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa*. 2. uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2010. *Turki ja kirjoita*. 15. – 16. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Hussey, M. & Smith, A. 2005. *Gram Stain Protocols*. *American Society for Microbiology*. Viitattu 30.6.2017. <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.2886>.
- Katila, M-L. & Laatikainen, A. 2004. *Kliininen mikrobiologia. Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Porvoo: WS Bookwell Oy.
- Koli, H. & Silander, P. 2002. *Verkko-oppiminen. Oppimisprosessin suunnittelu ja ohjaus*. Hämeenlinna: Hämeenlinnan ammattikorkeakoulu.
- Lappalainen, M. & Vuento, R. 2007. *Mikrobiologinen diagnostiikka. Terapia Fennica 9*. Laitos. Kandidaattikustannus Oy & Lääketieteenkandidaattiseura ry. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

- Lehman, D. 2003. Rapid diagnostic testing in microbiology. Medical Laboratory Observer. Viitattu 30.6.2017. <https://www.mlo-online.com/rapid-diagnostic-testing-in-microbiology.php>.
- Liimatainen, O. 2000 Gram-värjäys. Moodi 4-5.
- Madani, K. 2003. Dr. Hans Christian Joachim Gram. Inventor of the Gram stain. Primary Care Update Ob/Gyns. 2003 (10).
- Madison, BM. 2009. Application of stains in clinical microbiology. Biotechnic & Histochemistry. Volume 76 (3). Viitattu 8.9.2017. <http://dx.doi.org/10.1080/bih.76.3.119.125>.
- Melhus, Å. 2010. Klinisk mikrobiologi för sjuksjötorskor. Riika: Livonia Print.
- Meurman, O. 2010. Gramvärjäykset. Moodi 2010 (1). Helsinki: Labquality Oy.
- Meurman, O. 2014. Miehiä bakteerinimien takana 15 Christian Gram – Gramella echinicola. Suomen Sairaalahygienialehti 2014 (2). Viitattu 30.6.2017. ssh.fi/data/documents/lehdet/14_2.pdf.
- Niku, M. 2001. Valomikroskopian alkeet. Histologisten tekniikoiden alkeet. Viitattu 17.11.2017. <http://slideplayer.fi/slide/2685913/>.
- Pynninen, L. 2013. Gram ja Ziehl-Neelsen-värjäykset – bakteerien jäljillä. Moodi 2013 (7). Helsinki: Labquality Oy.
- Rand, KH. & Tillan, M. 2006. Errors in interpretation of Gram stains from positive blood cultures. American Journal of Clinical Pathology. Volume 126 (5).
- Rissanen, A-M. 2016. Gramvärjäytymisen salaisuus kietoutuu bakteerin seinärakenteeseen. Suomen Sairaalahygienialehti 2016 (1). Viitattu 30.6.2017. http://ssh.fi/data/documents/lehdet/16_1.pdf.
- Ruohotie, P. 2005. Oppiminen ja ammatillinen kasvu. 1. – 3. Painos. Helsinki: WSOY.
- Salkinoja-Salonen, M. 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Sojakka, K. & Välimäki, M-L. 2011. Ammatillinen mikrobiologia. Tampere: Juvenes Print.
- Turun ammattikorkeakoulu. 2017. Viitattu 8.9.2017. <http://www.messi.turkuamk.fi>.
- Vilka, H. & Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Gramvärjäyksen suoritus (Huckerin modifikaatio)

VAIHEET	SUORITUS	AIKA
1.	Kiinnitä valmiste 95-prosenttisessa metanolissa	2 min
2.	Lisää kuivalle, jäähtyneelle lasille kristallivioletti	1 min
3.	Huuhtelee väri pois vedellä	
4.	Lisää lasille Gramin jodiliuos	1 min
5.	Huuhtelee jodi pois vedellä	
6.	Lisää etanoli-asetoni	30 sek
7.	Huuhtelee vedellä	5 sek
8.	Lisää lasille safraniini	30 sek
9.	Huuhtelee väri pois vedellä	
10	Kuivaa lasi kevyesti imupaperilla	