



SAVONIA

OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

KLINIISEN MIKROBIOLOGIAN TYÖOHJEIDEN PÄIVITYS

Oppimateriaali bioanalyttikko-opiskelijoille

TEKIJÄT: Pinja Kyllönen
Elina Lagus
Samuel Niskanen

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma/Tutkinto-ohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t) Pinja Kyllönen, Elina Lagus, Samuel Niskanen	
Työn nimi Kliinisen mikrobiologian työhjeiden päivitys – Oppimateriaali bioanalyttikko-opiskelijoille	
Päiväys	20.11.2020
Sivumäärä/Liitteet	30/1
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Savonia-ammattikorkeakoulu	
<p>Tiivistelmä</p> <p>Opinnäytetyömme oli toiminnallinen kehittämistyö, jonka tuotoksena oli kliinisen mikrobiologian työhjevihko bioanalyttikko-opiskelijoiden käyttöön Savonia-ammattikorkeakoulun harjoitustunneille. Työhjevihkoon sisällytettiin käytännön ohjeita harjoitustunneille valmistautumisesta, teoriatietoa bakteeriviljelystä sekä ohjeet bakteerien tunnistuskokeisiin, antibioottilherkkyyismääryksiin ja niiden tulkintaan. Työhjevihko tehtiin pdf-muotoon ja se on opiskelijoiden saatavissa ja tulostettavissa kliinisen mikrobiologian opintojakson kurssimateriaaleissa Moodle-kurssialustalla. Työhjeet liitettiin myös virtuaaliseen ThingLink360°-oppimisympäristöön.</p> <p>Tekemämme työhjevihko on päivitetty versio edellisistä kliinisen mikrobiologian harjoitustunneilla käytetyistä työhjeistä. Päivityksen yhteydessä tuotoksesta poistettiin tarpeettomiksi jääneitä ohjeita ja siihen lisättiin tunnistuskaavio gramnegatiivisille sauvabakteereille. Työhjevihkon sisältöä suunniteltiin ja muokattiin niin, että se vastaa nykyhetkellä kliinisen mikrobiologian laboratorioden käytössä olevien bakteerien tunnistuskokeiden ja antibioottilherkkyyismääryksien ohjeita. Opinnäytetyön kirjallisen raportin teoriaosuudessa käytiin läpi kehittämistyön vaiheita ja hyvän oppimateriaalin tuottamisen kriteereitä. Kirjalliseen raporttiin kirjoitettiin myös teoriaa gramnegatiivisista sauvabakteereista yleisellä tasolla sekä uutena lisättyjen tunnistuskokeiden menetelmien periaatteita.</p> <p>Ajantasaisten työhjeiden kanssa työskentely harjoitustunneilla on selkeämpää ja edistää bioanalyttikko-opiskelijoiden oppimista. Opiskelijoiden on helpompaa siirtyä opiskelujen jälkeen työelämään, kun heillä on viimeisin kliinisen mikrobiologian tutkimuksiin liittyvä tieto ja osaaminen. Opinnäytetyön tuotoksena laaditut työhjeet otetaan käyttöön seuraavaksi toteutettavalla kliinisen mikrobiologian opintojakson harjoitustunneilla.</p>	
Avainsanat Kliininen mikrobiologia, työhje, gramnegatiiviset sauvabakteerit	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme in Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Pinja Kyllönen, Elina Lagus, Samuel Niskanen			
Title of Thesis Update of clinical microbiology laboratory manual – Study material for biomedical laboratory scientist students			
Date	20.11.2020	Pages/Appendices	30/1
Client Organisation /Partners Savonia University of Applied Sciences			
<p>Abstract</p> <p>Our thesis was a functional development study, which resulted in a clinical microbiology laboratory manual for students of biomedical laboratory science in Savonia University of Applied Sciences. Laboratory manual includes instructions how to prepare for practice classes, theory of microbiological culture, instructions for bacterial identification tests and how to execute and interpret antibiotic sensitivity tests. Laboratory manual is done in a pdf-form and it is available for students in the course material of clinical microbiology in Moodle course platform, where it also can be printed out. The laboratory manual was also linked in a virtual learning solution called ThingLink360°.</p> <p>The laboratory manual is an updated version of the previous laboratory manual which was used in clinical microbiology practice classes. During the update we removed unnecessary instructions from the already existing laboratory manual and added a visual chart for bacterial identification of gram-negative rods. The content of the laboratory manual was designed and edited that they correspond the current bacterial identification and antibiotic sensitivity test instructions which are used in clinical microbiology laboratories. Our thesis report is consisted of theory about good learning material and working phases of functional development project. Furthermore, our thesis discussed also about gram negative rod bacteria in general and the principles of the added bacterial identification tests.</p> <p>Working in practice with the updated laboratory manual is easier and it supports biomedical laboratory scientist students' learning. It is more convenient for students to start their career when they have the latest knowledge about analysis in clinical microbiology. The updated laboratory manual will be introduced when the next clinical microbiology course takes place.</p>			
<p>Keywords Clinical microbiology, work instructions, gram negative rods</p>			

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO.....	5
2	GRAMNEGATIIVISET SAUVABAKTEERIT	6
2.1	Bakteriologia	6
2.2	Gramnegatiiviset sauvabakteerit	6
2.3	<i>Escherichia coli</i>	7
2.4	Proteus-lajit.....	8
2.5	Pseudomonas-lajit	9
2.6	KECS-ryhmä	9
3	BAKTEERIEN TUNNISTUSKOKEET KLIINISEN MIKROBIOLOGIAN HARJOITUSTUNNEILLA	11
4	OPPIMATERIAALIN TUOTTAMINEN	15
4.1	Oppiminen	15
4.2	Ohjeen laatiminen	16
5	KEHITTÄMISTYÖN TARKOITUS JA TAVOITE.....	17
6	TOIMINNALLISEN KEHITTÄMISTYÖN VAIHEET.....	18
6.1	Toiminnallinen opinnäytetyö.....	18
6.2	Suunnittelu ja toteutus	18
7	POHDINTA	21
7.1	Itsearviointi ja ammatillinen kehittyminen.....	21
7.2	Eettisyys ja luotettavuus.....	22
	LÄHTEET JA TUOTETUT AINEISTOT	24
	LIITE 1: KLIINISEN MIKROBIOLOGIAN TYÖOHJE.....	31

1 JOHDANTO

Ihminen on pohjimmiltaan utelias ja selviytyäkseen hän tarvitsee tietoa ympäristöstään ja omasta suhteestaan siihen. Syntymästämme saakka keräämme ja tulkitsemme ympärillämme olevaa uutta informaatiota. Näin muodostamme kuvaa siitä fyysisestä ja sosiaalisesta maailmasta, jossa elämme, sekä itsestämme osana sitä. Tästä prosessista käytetään nimitystä oppiminen. Oppimista on monenlaista ja yhteistä oppimisen eri muodoille on se, että ne ovat kytkeytyneet toimintaan ja palvelevat sitä. (Soini, Rauste-von Wright ja von Wright 2003, 50–51.)

Opinnäytetyön aiheeksi valitsimme kliinisen mikrobiologian työohjeiden päivityksen, koska kliinisen mikrobiologian harjoitustunneilla käyttämämme työohjevihko oli jo puutteellinen ja osittain vanhentunut. Opinnäytetyömme toimeksiantajana toimii Savonia-ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyömme on toiminnallinen kehittämistyö, jonka tuotoksena on pdf-muodossa oleva työohjevihko.

Aiheen valintaan vaikuttaa suuresti opinnäytetyön merkitys omalle alalle. Ammattikorkeakoulun opinnäytetyössä opiskelijan tulee kyetä kehittämään omia taitojaan sekä kehittämään jollain tavalla omaa ammattialaa. (Kananen 2015b, 35–36.) Opinnäytetyöksemme valikoitui kehittämistyö, joka oli juuri sillä hetkellä ajankohtainen ja tarpeellinen. Opinnäytetyömme tuotos hyödyttää tulevaisuudessa seuraavia vuosikurssin opiskelijoita, jotka ovat tulevaisuudessa oman alamme ammattilaisia ja asiantuntijoita.

Opinnäytetyömme tarkoitus oli päivittää kliinisen mikrobiologian harjoitustuntien työohjeet bioanalyttikko-opiskelijoille. Päivityksen avulla saamme työohjeet ajan tasalle niin, ettei niissä olisi puutteita tai mitään tarpeetonta. Pyrimme tekemään työohjeista selkeät, helposti ymmärrettävät ja joiden kanssa olisi helppo työskennellä itsenäisesti. Selkeiden työohjeiden kanssa työskentely on tehokasta, kun ei tarvitse esittää jatkuvasti tarkentavia kysymyksiä esimerkiksi opettajalta. Aikaa säästyy myös siinä, kun vältetään turhia virheitä puutteellisten ohjeiden takia

Opinnäytetyön tavoite on, että uusien työohjeiden kanssa työskentely on sujuvampaa, joka näin olen edistänyt bioanalyttikko-opiskelijoiden oppimista. On tärkeää, että bioanalytiikkaa ja kliinistä mikrobiologiaa opiskelevien opiskelijoiden oppimateriaali olisi selkeää ja ajan tasalla, jotta heillä olisi ammattiin valmistuessa kliinisen mikrobiologian menetelmiin liittyvä viimeisin tieto ja osaaminen.

2 GRAMNEGATIIVISET SAUVABAKTEERIT

2.1 Bakteriologia

Bakteriologia on tieteenala, joka on keskittynyt bakteereihin (Terveyskirjasto 2018). Ravintoalustalla kasvaessaan ne muodostavat silmällä havaittavia pesäkkeitä, joita voidaan tutkia erilaisin menetelmin klinisen mikrobiologian laboratoriossa (Sarvas, Skurnik ja Vaara 2010, 14).

Bakteereita luokitellaan bakteeritaksonomian tieteenalalla eli alalla, joka määrittelee bakteereille luokat erilaisten ominaisuuksien perusteella (Eerola ja Lindholm 2010, 63). Tällaisia ominaisuuksia voivat olla esimerkiksi mikroskooppinen ja makroskooppinen näkyvyys, bakteereille luonteenomainen kasvu, aineenvaihdunnalliset ja biokemialliset ominaisuudet, antigeenisuus tai genotyyppi (Murray, Pfaller, Rosenthal 2016, 106). Yksi tärkeimmistä bakteerien jaottelutavoista on bakteerien koko, muoto ja ryhmittäminen, joita voidaan tutkia mikroskoopissa. Bakteerit voivat olla esimerkiksi kokkeja eli pieniä ja pyöreitä tai sauvoja eli sylinterinmuotoisia. (Murray ym. 2016, 106.)

Gramvärjäys on bakteerien värjäysmenetelmä, jonka avulla bakteerit voidaan jakaa kahteen ryhmään, positiivisiin ja negatiivisiin. Grampositiiviset bakteerit värjäytyvät sinisiksi kristallivioletti värillä, kun taas gramnegatiiviset punaisiksi safraniinilla. Värien jakautuminen näiden kahden ryhmän välillä perustuu bakteerien solukalvon rakenteeseen. Grampositiiviset bakteerit omaavat paksun peptidoglykaaniseinän, kun taas gramnegatiivisten bakteerien seinä on paljon ohuempi ja rasvaliukoisempi. Tämä tarkoittaa sitä, että gramvärjäyksen alkoholikäsitelyssä gramnegatiiviset bakteerit päästävät kristalliviolettivärin ulos solusta, joten se täytyy vastavärjätä safraniinilla, jotta ne näkyisivät. Bakteerien värjäystä voi katsoa mikroskoopilla ja siten tunnistaa, onko kyseessä gramnegatiivinen vai positiivinen bakteeri. (Cappuccino ja Welsh 2018, 83–84.)

Paneudumme opinnäytetyössämme gramnegatiivisiin sauvabakteereihin. Näitä bakteereja ei ole käsitelty aiemmassa työohjeessa niin tarkasti. Halusimme myös kirjoittaa niistä sen takia, koska liäsämme tuottamaamme oppimateriaaliin gramnegatiivisten bakteereiden tunnistuskokeita ja teimme niistä helposti seurattavan visuaalisen kaavion liitteeksi.

2.2 Gramnegatiiviset sauvabakteerit

Gramnegatiivisiin sauvabakteereihin kuuluu muun muassa *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvat *Escherichia coli*, Proteus- ja Pseudomonas-lajit. Ryhmään kuuluu myös KECS-ryhmän muodostavat Klebsiella-, Enterobacter-, Citrobacter- ja Serratia-lajit. (Siitonen ja Vaara 2010, 177; Anttila ja Tissari 2010b, 200; Anttila ja Tissari 2010a, 196.)

Gramnegatiiviset bakteerit aiheuttavat infektioita, esimerkiksi keuhkokuumetta, tavallisten haavojen ja leikkaushaavojen tulehduksia sekä aivokalvontulehduksia. Gramnegatiiviset bakteerit voivat olla resistenttejä monille lääkkeille ja antibiooteille, kuten kefalosporiini *E.colilla* tai trimetopriimi *Klebsiella pneumoniaella*. (Centers for Disease Control and Prevention 2019; Jalava 2018.) Gramnegatiivisten bakteerien ulkomembraani on rakentunut niin, että se voi estää suurimolekyylisten vesiliukoisten aineiden pääsyn solun sisään, joten siksi ne ovatkin osin resistenttejä (Sarvas ym. 2010, 27). Gramnegatiiviset bakteerit omaavat myös sisäänrakennetun kyvyn muuntua resistenteiksi ja

voivat myös siirtää geneettistä materiaalia muihin bakteereihin, joka tekee myös näistä bakteereista resistenttejä tietyille lääkkeille ja antibiooteille (Centers for Disease Control and Prevention 2019). Gramnegatiivisten bakteerien tunnistuskokeisiin kuuluvat muun muassa seuraavat tunnistus kokeet: gram-värijäys, laktoosikoe, oksidaasikoe, API 10 ja API 20E sekä Pseudomonaksille API NE 20 ja kromogeeninen viljelymalja.

2.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli-bakteerit (*E.coli*) kuuluvat ihmisten ja eläinten suoliston normaaliflooraan. Yleensä ne ovat hyödyllisiä estäen muita mikrobeita tarttumasta isännän suolistoon tai lisääntymästä siellä. (Ruokavirasto 2019.) Kuitenkin osa *E.coli*-bakteerikannoista ovat muuntuneet siten, että ne kykenevät aiheuttamaan ihmiselle ripulina ilmeneviä suolistotulehduksia, virtsatietulehduksia ja aivokalvon tulehduksia (Ruokavirasto 2019 ja Terveyskirjasto 2019a). Eräs tällainen bakteeri on Enterohemorraaginen *Escherichia coli* eli EHEC-bakteeri. Merkittävin EHEC-bakteerin kantaja on nautakarja sekä muut märehitjät. Tartunnan ihminen voi saada saastuneiden elintarvikkeiden kautta tai juoma- tai uimavedestä. (Ruokavirasto 2019.)

EHEC-bakteeri kykenee tuottamaan verotoksiini-nimistä myrkyä (Shiga-toksiini), joka on haitallista suoliston toiminnan kannalta (Ruokavirasto 2019). Infektioon riittää jo hyvin pieni altistus ja itämisaika on yleensä 3–8 päivää. Oireet alkavat useimmiten akuutilla gastroenteriitillä, johon liittyy usein lievä kuume, verinen ripuli ja toisinaan voi ilmaantua oksentelua. (ECDC 2017.) Infektio todetaan EHEC-viljelyllä tuoreesta ulosteesta. Tutkimuksessa osoitetaan PCR-tekniikalla EHEC:ille ominaiset shiga like-toksiinit sekä näytteen positiivisuus viljelyllä. (HUSLAB 2020.) Hoitona EHEC- bakteerin infektioon käytetään nestetasapainon ylläpitoa eikä antibiootteja suositella. Noin 0–15 prosentille EHEC-tartunnan saaneista kehittyy vakava hemolyyttis-ureeminen oireyhtymä eli HUS. EHEC-tartunta pitää ilmoittaa aina tartuntatautirekisteriin. (Korhonen ja Nuutinen 2019.)

E.colin aiheuttamassa virtsatietulehduksessa välilihan ja peräaukon alueella normaalisti esiintyvänä bakteerina se on päässyt nousemaan virtsaputkea pitkin virtsarakkoon. Tyypilliset oireet virtsatietulehduksessa ovat tihentynyt virtsaamisen tarve, virtsaamispakko ja kirvely virtsatessa. *E.coli* on kliinisesti merkittävin patogeeni naisten virtsatietulehduksissa. Jopa 75-95 prosenttia naisten virtsatietulehduksista on *E.colin* aiheuttamaa. Nuorilla ja keski-ikäisillä miehillä virtsatietulehdus on harvinaisen. Hoitona *E.colin* aiheuttamaan virtsatietulehdukseen käytetään antibiootteja. *E.coli* tunnistetaan virtsatietulehduksen aiheuttajaksi tekemällä virtsan bakteeriviljely kasvatusmaljalle. (Virtsatietulehdus (virtsarakkotulehdus ja munuaistason tulehdus): käypä hoito -suositus 2019.) *E.coli* muodostaa eri maljoille tunnistettavat bakteerille tunnusomaiset pesäkkeet. Esimerkiksi Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient Agar eli CLED-maljalle *E.coli* muodostaa laktoosi-positiivisia keltaisia läpikuultamattomia pesäkkeitä ja CHROMagar™Orientation-maljalle tumman pinkkejä pesäkkeitä. (CHROMagar 2020; Thermoscientific 2020.)

E.colin mikrobilääkeresistenssi kasvaa nopeasti vaikeuttaen sopivan lääkkeen valintaan infektioiden hoidossa (Choe, Lee ja Lee 2018). Bakteerien lääkkeiden vastustuskyvystä eli lääkeresistenssistä

puhuttaessa resistentti tarkoittaa, että bakteeri on vastustuskykyinen kyseiselle lääkkeelle. Herkkä tarkoittaa, että bakteeri on herkkä kyseiselle lääkkeelle. (EUCAST 2020; Terveyskirjasto 2020.) Yleisesti herkkyys virtsatietulehduksia aiheuttaneilla *E.coli*-bakteereilla on trimetopriimi-sulfametoksatsolille alle 80 prosenttia, fluorokinoloneille noin 80 prosenttia, amoksisilliinille ja klavulanaatille noin 80 prosenttia, ja nitrofurantoniinille sekä fosfomysiinille yli 90 prosenttia. (Choe, Lee ja Lee 2018). Vastaavasti resistenssi on vahvaa erityisesti ampicilliinille. Saudi Arabiassa suoritetun tutkimuksen mukaan virtsatietulehduksen aiheuttaneen *E.colin* resistenssi ampicilliinille oli potilasryhmästä riippuen noin 64-83 prosenttia. Myös trimetopriimi-sulfametoksatsolin resistenssi saatiin noin 42–59 prosenttia. (Alanazi, Aleanizy ja Alqahtani 2018.) Herkkyksiä katsottaessa on muistettava, että alueelliset erot voivat olla suuriakin (Choe, Lee ja Lee 2018).

Vakavan uhan aiheuttaa *E.colin* laajakirjoisia beetalaktamaaseja (extended spectrum beta-lactamases, ESBL) tuottavien kantojen yleistyminen (Jalava 2018). ESBL on bakteerin hankkima ominaisuus, joka tekee sen vastustuskykyiseksi tavallisimmille hoidossa käytetyille antibiooteille tuottamalla antibiootteja pilkkovia entsyymejä (Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos 2019a). Pariisissa 2015 suoritetun tutkimuksen mukaan virtsatietulehduksia aiheuttaneiden *E.colin* ESBL-kantojen resistenssi amoksisilliinille, fluorokinoloneille, nitrofurantoiinille ja fosfomysiinille ovat 100 prosenttia, 80 prosenttia, alle viisi prosenttia ja alle 10 prosenttia (Chervet ym. 2017). Resistenssi kolmannen polven kefalosporiineita on myös yleistynyt 2000-luvulla ESBL-kantojen yleistymisen takia. Erityisesti kolmannen A-luokan eli CTX-M-ryhmän beetalaktamaasit ovat levinneet laajalle. Näille on ominaista, että ne kykenevät hydrolysoimaan kolmannen polven kefalosporiineja. (Jalava 2018; Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos 2019b.) ESBL-kantoja oli Euroopan tasolla keskimäärin 11-prosenttia vatsan sisäisistä osista kerätyistä näytteistä, joita saatiin etenkin leikkauksien yhteydessä. Esiintyvyys kuitenkin vaihteli suuresti Viron 1,4 prosentista Turkin 35 prosenttiin. (Badal ym. 2012.)

2.4 Proteus-lajit

Proteusten tunnetuin laji on *Proteus mirabilis*. Proteukset ovat suoliston normaaliflooraa ja niitä tutkitaan laboratoriossa usein (Carrol, Joergensen ja Pfaller 2015). Proteukset ovat taudinaiheuttajana opportunisteja eli ne eivät normaalisti aiheuta tulehdusta terveelle ihmiselle, mutta kun elimistön puolustuskyky heikkenee, ne voivat muuttua taudinaiheuttajiksi (Terveyskirjasto 2019b; Anttila ja Tissari 2010a). Proteuksilla on kyky tuottaa rikkivetyä ja niillä tavataan usein vahvasti positiivinen ureaasi. Urean hajottamiskyky selittää osin Proteusten taipumusta aiheuttaa virtsatieinfektioita, sillä ureaasi tuhoaa munuaisten tubuluksia, kun virtsa muuttuu alkaliseksi. Tästä syystä virtsatieinfektio voi kroonistua. Proteuksia tavataan myös haavainfektioissa. (Anttila ja Tissari 2010a, 198.)

Proteuksilla voi olla hyvinkin resistenttejä kantoja. *P.mirabilis* on kuitenkin herkkä lähes kaikille antibiooteille, joita käytetään gramnegatiivisten bakteerien aiheuttamien bakteeritulehdusten hoitoon. *Proteus vulgaris* on puolestaan resistentimpi. (Anttila ja Tissari 2010a, 198.) *Proteus mirabilis*-kannoista saattaa löytyä myös moniresistenttejä ESBL-kantoja (Tuhkalainen 2018).

2.5 Pseudomonas-lajit

Pseudomonas-lajeista tunnetuin on *Pseudomonas aeruginosa*, jota esiintyy laajalti eri paikoissa vaatimattomien kasvuolosuhteidensa vuoksi. Se pystyy hyödyntämään useita orgaanisia yhdisteitä kasvaakseen ja näin ollen selviytymään monissa eri ympäristöissä, kuten maaperässä ja vedessä. Muut Pseudomonas-suvun jäsenet viihtyvät myös maaperässä ja vedessä, mutta niitä ei tavata terveydenhuollossa niin usein. Aika ajoin ne kuitenkin kolonisoivat pitkäaikaissairaita. (Anttila ja Tissari 2010b, 200-202; Centers for Disease Control and Prevention 2019.)

P.aeruginosa on infektion aiheuttajana opportunisti. Se infektoi monisairaita ja sairaalahoidossa olevia potilaita. (Anttila ja Tissari 2010b.) Infektion voi saada esimerkiksi kontaminoituneesta vedestä tai se voi levitä ihmisten välillä kontaminoituneista pinnoista, käsistä tai välineistä. Patogeeninä *P.aeruginosa* esiintyy esimerkiksi keuhkoissa ja haavoissa sekä katetreissa. (Carrol, Joergensen ja Pfaller 2015.) Yleisimmät infektiotilat ovat kuitenkin väliliha, kainalot ja korvat (Anttila ja Tissari 2010b). *P. aeruginosa* aiheuttaa monimuotoisia infektioita, kuten korva-, haava- ja nielutulehduksia sekä keuhkokuumetta (Carrol ym. 2015).

P.aeruginosa on luonnostaan hyvin resistentti sen erityisen ulkomembraaninsa takia, joka toimii tehokkaana läpäisyesteenä. *P.aeruginosan* soluseinässä on myös erityisiä pumppuja, jotka pumppaavat antibiootteja ulos solusta. (Anttila ja Tissari 2010b.) *P.aeruginosa* on kuitenkin herkkä siihen tehoaville antibiooteille. Esimerkiksi siprofloksasiiniresistenttien kantojen osuus vuonna 2018 oli korkeimmillaan 12,9 prosenttia virtsakannoista ja meropeneemiherkkydeltään alentuneiden kantojen osuus oli noin 7 prosenttia. Tämä on hyvin vähän verrattuna moniin muihin Pohjoismaihin, joissa meropeneemiresistenttien kantojen määrä näytteissä on suuri, jopa yli 50 prosenttia vuonna 2017. Moniresistentit *P.aeruginosa*-kannat ovat myös erittäin vähäisiä. Vuonna 2018 vain 0,1 prosenttia eristetyistä kannoista oli resistenttejä meropeneemille, keftatsidiimille, tobramysiinille, siprofloksasiinille ja peperasilliini-tatsobaktaamille samanaikaisesti. (Jalava 2018.) Jari Jalavan (2018) mukaan WHO eli World Health Organization luokittelee karbapeneemeille resistentit *P.aeruginosa*-kannat kriittisiksi bakteereiksi uusien antibioottien kehityksen kannalta. Näitä moniresistenttejä kantoja voi potilaiden mukana siirtyä suomalaisiin sairaaloihin, joten hygieenisiin toimiin on kiinnitettävä erityistä huomiota. (Jalava 2018; World Health Organization 2017.)

2.6 KECS-ryhmä

Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter ja Serratia on joukko *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereja, jotka muodostavat KECS-ryhmän (Thermofisher 2014). Nämä bakteerit ovat ihmisen suoliston normaalia flooraa, jonka vuoksi ne eivät yleensä aiheuta terveelle ihmiselle infektioita. KECS-ryhmän bakteerit ovat merkittäviä sairaalainfektioiden aiheuttajia. Yleisimmät niistä aiheutuvat infektiot ovat virtsatieinfektio, keuhkokuume ja verenmyrkytys. Näitä bakteereita tavataan myös sekainfektioissa esimerkiksi haavoissa. (Anttila ja Tissari 2010a, 196.) KECS-ryhmästä tarkastelemme lähemmin Klebsiella-lajeja, sillä ne ovat yleisempiä taudinaiheuttajia tässä ryhmässä.

Klebsiella-lajit

Klebsiellat ovat liikkumattomia gramnegatiivisia sauvabakteereja, joilla on erityinen kyky muodostaa polysakkaridikapselia ympärilleen. Ne näkyvät elatusainemaljoilla isoina limaisina pesäkkeinä. (Anttila ja Tissari 2010a, 196.) Klebsiellat ovat tuottamansa beetalaktamaasin takia luonnostaan resistenttejä ampisilliinille, mutta yleensä herkkiä monille muille antibiooteille. Klebsiella-lajien kohdalla laajakirjoiset plasmidien koodittamat beetalaktamaasia tuottavat ESBL-kannat ovat vielä suhteellisen harvinaisia. (Anttila ja Tissari 2010a, 196–197.) Klebsiella-lajeista yleisimmät ovat *Klebsiella pneumoniae* ja *Klebsiella oxytca* (Murray ym. 2016, 262).

Karbapeneemille resistentti *K. Pneumoniae* on laajimmalle levinnyt sairaalahygieenisesti merkittävä gramnegatiivinen sauvabakteeri (Terveyden ja hyvinvoinninlaitos 2020b). CPE eli Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae on joukko bakteereja, jotka tuottavat karbapeneemiryhmän antibiootteja hajottavia entsyymejä. Ne ovat seuraava askel ESBL-ominaisuuden jatkokehityksessä, joten niiden aiheuttamien infektioiden hoitoon löytyy enää vain harvoja tehokkaita antibiootteja. CPE:tä esiintyy samoilla bakteereilla kuin ESBL:ääkin, muun muassa *E. coli*, Klebsiellat ja Enterobacter-lajit. (Anttila 2020.) Viime aikoina karbapenemaaseja tuottavien *Klebsiella pneumoniae* kantojen aiheuttamat infektiot ovat lisääntyneet Suomessa ja ulkomailla. Ensimmäinen tällainen kanta havaittiin Suomessa vuonna 2009. (Anttila ja Tissari 2010a, 197.) Vuodesta 2010 vuoteen 2018 neljässä Euroopan maassa tilanne on kehittynyt korkeimpaan luokkaan viisi, jossa CPE:tä tavataan lähes kaikissa sairaaloissa ja tapauksia tulee tasaiseen tahtiin lisää. Suomessa tässä ajassa olemme siirtyneet tasolta yksi tasolle kolme eli yksittäisistä tapauksista useampiin tapauksiin eri yksiköissä ja eri sairaanhoitopiirien alueella. (Albiger ym. 2019.) Suomessa CPE kantoja vuonna 2019 löydettiin 103 ja niistä *K. Pneumoniae*:n aiheuttamia oli 32. Vuonna 2018 löydetyistä seitsemästäkymmenestäkolmesta kannasta kaksikymmentäneljä oli *K. Pneumoniae*. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2020a.)

3 BAKTEERIEN TUNNISTUSKOKEET KLIINISEN MIKROBIOLOGIAN HARJOITUSTUNNEILLA

Tässä luvussa kerromme niiden tunnistuskokeiden periaatteita, joita olemme aiemmasta työohjevihkosta muokanneet tai jotka ovat lisätty uusina ohjeina työohjevihkoon. Edellisestä työohjevihkosta puuttui bakteerien tunnistuksena apuna olevan kromogeenisen CHROMagar™Orientation -maljan toimintaperiaatteen esittely, joten lisäsimme sen uutena työohjevihkoon. Lisäsimme työohjeisiin API® 20 E -testin jo aiemmissa ohjeissa olleen API® 10 S:n rinnalle. Uutena testinä harjoitustunneille on tullut myös Prolex™ Staph Latex Kit-testi, joka on agglutinaatiotesti stafylokokeille. Aiemmin harjoitustunneilla käytössä ollut stafylokokeille selektiivinen Bio-Rad:n SaSelect-malja on tällä hetkellä korvattu Biorieux:n SAIDE chromID™ S.aureus Elite -maljalla. Näissä maljoissa on hie- man erilainen toimintaperiaate ja tulosten tulkintaohje, joten ohje tuli uusia.

Työohjeisiin tuli lisätä kaksi uutta antibioottiherkkyksillä määritettävää tunnistuskoetta: telluriinikoe ja C-390-koe, joissa herkkyysmääritykset tehdään kiekkomenetelmällä. Myös β -laktamaasikokeen ohje ja periaate kirjoitettiin uusiksi työohjevihkoon, koska antibioottiekon valmistaja oli vaihtunut. β -laktamaasikoe on entsyymimääritys (Huovinen ja Vaara 2011).

CHROMagar™Orientation-malja

CHROMagar™Orientation-malja (kuva 1.) on tarkoitettu helpottamaan erityisesti virtsateiden pato- geenisten bakteereiden tunnistusta visuaalisesti. Sitä voidaan kuitenkin käyttää myös muiden näyte- laatuksen bakteeriviljelyissä. (CHROMagar 2020.) Tässä kasvatusalustassa käytetty kromogeeni saa bakteerit kasvamaan niille ominaisen värisinä pesäkkeinä. Kromogeeni on molekyyli, joka on kiinni- tetty tiettyyn spesifisen entsyymiaktiivisuuden reagoivaan substraattiin. Kun maljalle viljelty bakteeri alkaa kasvaa ja tuottaa entsyymiä kromogeeni irtoaa substraattista ja alkaa tuottaa bakteerille tyypil- listä väriä. Kromogeeninen malja on erittäin spesifinen menetelmä, joka tunnistaa esimerkiksi *E.coli* 99,3 prosentin herkkyydellä. Voimakkaat kromogeeniset värit tulevat esille kasvualustalla 18–24 tun- nin inkuboinnin jälkeen. (CHROMagar 2013.) CHROMagar™Orientation-maljaa tarkastellessa värilli- sien bakteeripesäkkeiden ansiosta on helpompaa erottaa, jos maljalla kasvaa useampi kuin yksi bak- teerilaji. (CHROMagar 2017.) Oheisessa taulukossa (Taulukko 1.) on esitelty CHROMagar™Orienta- tion-maljalla kasvavien pesäkkeiden värejä.

TAULUKKO 1. Bakteerien kasvu CHROMagar™Orientation-maljalla (CHROMagar 2020.)

<i>E.coli</i>	tumma pinkki
<i>Enterococcus</i>	pienet turkoosit pesäkkeet, "kuiva"
<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i>	metallin sininen, "limainen"
<i>P.aeruginosa</i>	läpikuultava, hohtava
<i>S.aureus</i>	pienet vaalean keltaiset pesäkkeet
<i>Proteus</i>	ruskea halo
<i>Citrobacter</i>	metallin sininen, punertava halo
<i>S.saprophyticus</i>	pienet vaalean pinkit pesäkkeet
<i>Candida albicans</i>	vaalea, väritön



KUVA 1. *E. coli*:n kasvu CHROMagar™Orientation-maljalla (Korhonen 2019.)

API® 20 E -testi

Gramnegatiiviset sauvat ja enterobakteerit voidaan luokitella ja nimetä tutkimalla niiden biokemiallisia ominaisuuksia API® 20 E -testiliuskojen avulla. API® 20 E – liuska sisältää 20 mikrotaskua, joissa on kuivattuja substraatteja. Mikrotaskuihin lisätään tutkittavasta bakteerista ja fysiologisesta keittosuolaliuoksesta valmistettua suspensiota. Testiliuskoja inkuboidaan lämpökaapissa 18–24 tuntia, joka jälkeen tulokset tulkitaan. Bakteerin aineenvaihdunta aiheuttaa inkuboinnin aikana mikrotaskuissa värimuutoksen, joka tulkitaan testin mukana tulevan taulukon avulla tai APIWeb-ohjelmalla. (Biomérieux 2002.)

Prolex™ Staph Latex Kit-testi

Prolex™ Staph Latex Kit-testiä käytetään erottamaan *Staphylococcus aureus* muista stafylokokeista. Testin suorittamiseen tarvitaan 18–24 tuntia inkuboituja bakteeripesäkkeitä ja bakteeripesäkkeet suositellaan poimittaviksi epäselektiiviseltä maljalta. Prolex™ Staph Latex Kitin reagenssi sisältää sinisiä lateksipartikkeleita, jotka ovat herkistettyjä fibrinogeenillä ja IgG:lla. Kun hyytymistekijää ja/tai proteiini A:ta sisältävää *S.aureus*ta ja kitin reagenssia sekoittaa keskenään, syntyy nopeasti voimakas agglutinaatio, joka näkyy sakkautumisena. (Pro-lab Diagnostics 2017.)

Tulos tulkitaan agglutinaation muodostumisen perusteella. Jos testikortilla muodostuu silmin havaittava agglutinaatio, voidaan testi tulkita positiiviseksi. Positiivinen tulos tarkoittaa tutkittavan bakteerin olevan *S.aureus*. (Pro-lab Diagnostics 2017.)

SAIDE chromID™ S.aureus Elite -selektiivinen malja

SAIDE chromID™-malja on suunniteltu *Staphylococcus aureuksen* tunnistamisen avuksi. *S.aureus* voidaan havaita tältä kromogeeniseltä ja selektiiviseltä vaaleanpunaisina pesäkkeinä. Maljan ravinteikkaan pohjan sisältämät eri peptonit ja kromogeeninen substraatti mahdollistavat *S.aureuksen* kasvun ja suoran tunnistamisen. Tutkittavaa bakteeria viljellään SAIDE chromID™-maljalle suoraan pesäkkeestä tai valmistetusta bakteerisuspensiosta. Maljaa inkuboidaan lämpökaapissa 18–24 tuntia. Maljan valikoiva seos estää useimpien hiivojen ja muiden kuin *S.aureus*-lajiin kuuluvien bakteerien kasvun. (Biomérieux 2016.)

Tulos tulkitaan tarkastelemalla maljalla esiintyvän bakteerikasvuston väriä silmämääräisesti. Vaaleanpunaisen kasvuston tulkitaan olevan *S.aureus*. Tulkinnassa on otettava huomioon myös mahdolliset virhelähteet. Bakteeri määrän ollessa hyvin runsas, viljelykohta näyttää värikkäämmältä kuin itse pesäkkeet. Pesäkkeiden väri saattaa jäädä kehittymättä ilman hyvää hajotusta viljelyssä. Lisäksi on otettava huomioon tietyt koagulaasipositiiviset Stafylokokki-lajit, muut kuin *S.Aureus*, jotka voivat myös kasvaa vaaleanpunaisina maljalla. Jotkin muut lajit kuten, Bacillus- ja Klebsiella-lajit saattavat tuottaa vaaleanpunaisia pesäkkeitä. On myös mahdollista, että joillakin *S.aureus* -kannoilla on jokin erityinen kasvuvaatimus, jonka seurauksena ne eivät kasva tai muodosta vaaleanpunaisia pesäkkeitä. (Biomérieux 2016.)

Bakteerien tunnistus antibioottilherkkyysmäärytyksien avulla

Kliinisen mikrobiologian laboratorio määrittää usein näytteistä eristetyille patogeeneille antibioottilherkkyysmäärytykset, jotta lääkehoito osataan suunnitella oikein. Herkkyysmäärytyksiä voidaan kuitenkin käyttää apuna myös bakteerien tunnistuksessa. Bakteerien luontainen herkkyys ja vastustuskyky eli resistenssi vaihtelevat lajikohtaisesti. (Carlson ja Koskela 2011.) Herkkyysluokat on jaettu kansainvälisesti käytössä olevan SIR-järjestelmän mukaan kolmeen luokkaan, jotka ovat:

- S (=susceptible), bakteeri on herkkä kyseiselle lääkkeelle ja lääkettä voidaan käyttää infektion hoidossa normaaliannoksina.
- I (=intermediate), bakteerin herkkyys on alentunut tai ei voida pitää täysin herkkänä kyseiselle lääkkeelle. Lääkehoidon onnistuminen on todennäköistä, kun annostusta tai pitoisuutta infektiokohdassa lisätään.
- R (resistant), bakteeri on vastustuskykyinen kyseiselle lääkkeelle. Lääke ei todennäköisesti tehoa infektiin suurinakaan annoksina. (Eucast 2020.)

Bakteerien herkkyden ja antibiootin tehon mittana käytetään antibiootin pienintä bakteerin kasvun estävää pitoisuutta eli MIC-arvoa (Minimal inhibitory concentration). MIC- arvo voidaan mitata useilla eri menetelmillä, kuten laimennosmenetelmällä, kiekkommenetelmällä, entsyymimäärytyksellä ja geeni-menetelmällä. (Carlson ja Koskela 2011.)

β-laktamaasikoe

β-laktamaasikokeella voidaan osoittaa tuottaako tutkittava bakteeri betalaktaameja pilkkovaa β-laktamaasi-entsyymiä. Koe soveltuu haemophiluksille, stafylokokkeille ja *neisseria gonorrhoeae*lle. Testi perustuu kiekossa esiintyvän substraatin (G-penisilliinin) β-laktaamirenkaan pilkkomiseen. Bakteerissa mahdollisesti esiintyvä β-laktamaasi hydrolysoi β-laktaamirenkaan amidisidoksen ja kiekon indikaattorin (bromikresolivioletti) väri muuttuu violetista keltaiseksi tai rusehtavaksi. (Rosco 2009.)

Tutkittavasta bakteerista ja fysiologisesta keittosuolaliuoksesta tehdään koeputkeen vahva noin 4,0 McFarlandin vahvuinen suspensio. Suspension vahvuuden voi mitata DensiCHEK-laitteella. Koeputkeen lisätään diagnostinen kiekko, jonka jälkeen putkea inkuboidaan lämpökaapissa noin 20 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen tarkastellaan, onko suspension väri muuttunut. Jos väri on pysynyt violetina, tulos on negatiivinen. Jos suspension väri on muuttunut keltaiseksi tai rusehtavaksi, voidaan tulos tulkita positiiviseksi. (Rosco 2009.)

Telluriinikoe

Telluriinikoetta käytetään *Enterococcus faecalis*en erottamiseen streptokokista ja muista enterokoikeista. Telluriinikoe perustuu siihen, että *E. faecalis* kasvaa herkkyysmaljalla normaalisti lähelle telluriiniekkoa mustilla tai harmailla pesäkkeillä, kun taas muut enterokokit ja streptokokki kasvavat kauempana kiekosta muodostaen estorenkään. *E. faecalis* on siis telluriinille resistentti bakteeri. (Rosco 2009; Facklam 1972.)

Tutkittavasta bakteerista ja fysiologisesta keittosuolaliuoksesta valmistettua suspensiota viljellään Müller-Hinton-maljalle dreijaamalla. Maljalle asetetaan telluriiniekko ja maljaa inkuboidaan lämpökaapissa yön yli, jonka jälkeen tulos on valmiina tulkittavaksi. Jos pesäkkeitä kasvaa mustina tai harmaina kiekon lähetyvillä (halkaisija alle 10 millimetriä) voidaan tuloksesta päätellä bakteerin olevan telluriinille resistentti, eli kyseessä olisi näin ollen *E. faecalis*. Kyseessä on streptokokki tai muu enterokokki, jos bakteeri on herkkä telluriinille ja estorenkään halkaisija on suurempi kuin 12 millimetriä. (Rosco 2009.)

C-390-Koe

C390-koetta käytetään erottamaan gramnegatiivinen sauvabakteeri *Pseudomonas aeruginosa* muista *Pseudomonas*-lajeista. Testi perustuu siihen, että *Pseudomonas aeruginosa*lla on spesifinen resistenssi 9-chloro-9-(4-diethylaminophenyl)-10-phenylacridan-antimikrobilääkkeelle (C-390). Tutkittavasta bakteerista valmistettua 0,5 McFarlandin vahvuista bakteerisuspensiota dreijataan Müller-Hinton-maljalle, johon lisätään myös C-390-kiekko. 18–24 tunnin lämpökaapissa inkuboinnin jälkeen estorengas mitataan maljalta ja tulos tulkitaan. Jos estorengas jää halkaisijaltaan alle 12 mm, tutkittava bakteeri voidaan tulkita resistenssiksi kyseiselle antimikrobilääkkeelle. Resistenssi C-390:lle tarkoittaa, että kyseessä on *Pseudomonas aeruginosa*. (Rosco 2009.)

4 OPPIMATERIAALIN TUOTTAMINEN

4.1 Oppiminen

Oppiminen on aivojen muovautumista erilaisia uusia tietoja ja taitoja omaksuessa. Se on vuorovai-
kutteinen prosessi, jossa omia kokemuksia muuttamalla saadaan aikaan pysyviä muutoksia tie-
doissa, taidoissa ja asenteissa. (Itä-Suomen yliopisto s. a.; Huotilainen 2016.) Tavoitteellisen ja elin-
ikäisen oppimisen edellytyksenä on oppijan kyky tiedostaa omat oppimisen taidot ja kehittää niitä.
Tietoisuus omasta oppimisprosessista saa vastuullisen oppijan toimimaan entistä itseohjautuvam-
min. (Opetushallitus 2014.)

Oppimistyyliillä tarkoitetaan jokaisen yksilön tapaa, jolla hän oppii ja omaksuu tietoa parhaiten
(Bjork, McDaniel, Pashler ja Rohrer 2009). Oppimistyyliä on luokiteltu paljon ja yhden käytetyim-
män, VARK-jaottelun mukaan, oppiminen jaetaan neljään osaan: visuaaliseen, audiitiiviseen, kirjalli-
seen ja kinesteettiseen oppiseen. Visuaalinen oppija omaksuu tietoa näköaistin avulla ja audiitiivinen
kuuloaistin avulla. Kirjallisen oppijan vahvuudet ovat lukeminen ja kirjoittaminen. Kinesteettinen op-
pija käyttää kehoaan oppimistilanteessa ja tekee mielellään itse eri asioita. (Chick s. a.)

Opetuksen räätälöiminen vastamaan oppijan oppimistyyliä ei kuitenkaan ole tutkimusten mukaan
kannattavaa. On havaittu, että oppimistulokset ovat olleet tällöin jopa huonompia materiaalin ollessa
räätälöityä vastaamaan oppijan oppimistyyliä. (Bjork ym. 2009; Tangen 2017.) Myöskään oppijan
oppimistyyliillä ei ole havaittu olevan merkittävää yhteyttä akateemiseen menestykseen (An-
dayeshgar ym. 2020). Rogowskyn, Calhoun ja Tallalin suorittamassa tutkimuksessa ei havaittu mer-
kittävää tilastollista korrelaatiota siinä, että audiitiivisena oppijana itseään pitävät olisivat parempia
kuulunymmärtämisessä. Ohjeiden esittäminenkin siinä muodossa, mikä vastasi yksilön ensisijaista
oppimistapaa, ei korreloinut merkittävästi paremman oppimisen tai tiedon säilyttämisen kanssa.
(Calhoun, Rogowsky ja Tallal 2014.)

Oppimistyylien sijaan huomio tulisi kiinnittää kasvatustieteen professori Markku Niemivirran mukaan
oppijan tiedollisiin valmiuksiin, temperamenttiin ja motivaatioon (Nygren 2018). Myös erityispedago-
giikan apulaisprofessori Riikka Mononen painottaa näitä kolmea asiaa oppimisen peruspilareina. Hy-
vät pohjatiedot edistävät oppimista, sillä uudet kokonaisuudet rakentuvat aikaisemmin opittujen tie-
tojen varaan. Motivaatio on olennainen osa oppimisprosessia, sillä oppijan ollessa motivoitu, työ-
kentelee hän todennäköisesti aktiivisemmin päästäkseen tavoitteeseen. Temperamentti puolestaan
kuvaa Monosen mukaan esimerkiksi oppijan aktiivisuutta, sensitiivisyyttä, sosiaalisuutta tai sinnik-
kyyttä. Laadittaessa opetusta huomioon tulisikin ottaa oppijoiden erilaiset temperamentit, sillä osa
meistä on ujompia kuin toiset. (Tutorhouse 2018.) Ensisijaisesti oppimisessa on kuitenkin kyse Nie-
mivirran mukaan sisällöistä (Nygren 2015).

4.2 Ohjeen laatiminen

Ohjeen tärkeimpiin tavoitteisiin kuuluu saada lukija lukemaan ohje kokonaan, sillä monilla ihmisillä on taipumus luottaa omiin tietoihin sekä taitoihin ja ryhtyä heti toimeen. Siksi olisi tärkeää kiinnittää huomiota pelkän toiminnallisen puolen lisäksi myös lukijan motivointiin. (Kauppinen, Nummi ja Savola 2010, 134.) Hyvän ensivaikutelman luominen on tällöin tärkeää (Hodgson 2007). Hyvällä ulkoasulla tuotoksesta tulee miellyttävämmän näköinen ja se voi lisätä luotettavuutta ja täten edistää oppimista (Ranta ja Kortetjärvi-Nurmi 2018, 78). Hyvää ulkoasua voidaan luoda esimerkiksi runsaalla kuvituksella. Oikein käytettyinä hyvin laaditut piirroksiset ja kuvat ovat tehokkaampia kuin sanat, ja etenkin niiden henkilöiden kohdalla, jotka osaavat puutteellisesti ohjeen kieltä, kuvitus on erityisen tärkeää. (Kauppinen ym. 2010, 135.)

Ohjeet tulee laatia huomioiden lukijoiden erilaiset luku- ja käyttötavat, sillä lukija voi käyttää ohjetta eri järjestyksessä ja eri tavoin mitä on suunniteltu (Kauppinen ym. 2010, 135). Tässä auttaa ohjeiden esittäminen tarkoituksen mukaisessa järjestyksessä. Tarkoituksenmukaisin järjestys on aikajärjestys, kun annetaan ohjeita siitä, miten pitäisi suorittaa vaadittu tehtävä. Voi olla myös tarpeen kirjoittaa johdanto ohjeen alkuun, jossa kerrotaan ohjeen tarkoitus, mihin tulokseen pitäisi päästä, mitä välineitä tai muita tarpeita tarvitaan ja pitääkö jotain muuta ottaa huomioon. (Kankaanpää ja Piehl 2011, 296.) Myös Kauppinen ym. (2010, 137) painottavat johdannon merkitystä, sillä ohjeen käyttökelpoisuus riippuu siitä.

Ohjeen kielen pitää olla ymmärrettävää ja sävyllään asiallista. Termejä, joita lukija ei varmuudella tunne, tulee välttää tai ainakin selittää, jos niiden käyttö on pakollista. Lukijaa voidaan puhutella suoraan tai käyttää epäsuoraa ilmaustapaa. Konkreettisisissa toimintaa vaativissa ohjeissa tavallisinta on sinutella lukijaa ja käyttää käskymuotoa. (Kankaanpää ja Piehl 2011, 299.) Käyttämällä aktiivista passiivin sijaan saadaan virkkeistä selkeämpiä ja lause tekee selväksi henkilön, jonka tulee suorittaa toimenpide (Online-learning s.a.). Toistoa voidaan käyttää aina, kun siihen on tarvetta ja samoista asioista tulee käyttää aina samaa nimitystä (Kauppinen ym. 2010, 136).

Ohjeen tekijällä on velvollisuus estää ohjeen suorittajaa tekemästä mitään mistä aiheutuisi vaaratilanne itselle tai ympäristölle. Ohjeisiin tulee laatia helposti ymmärrettäviä varoituksia johdantoon, jos varoitus koskee koko ohjetta tai toiminnallisen ohjeen yhteyteen, jos se koskee jotain erityistoimintoa tai -vaihetta. Varoitukset on syytä visualisoida, jotta ne huomattaisiin paremmin. Käytettäessä vaaraa ilmaisevia kuvia, tulee käyttää vakiintuneita symboleita. Varoituksen on oltava oikeassa paikassa, jotta lukija huomaa varoituksen ennen kuin tekee jotain väärin. Lukijaa tulee myös opastaa suojautumaan vaaratilanteen sattuessa sekä välttämään vaaraa. (Kauppinen ym. 2010, 137–138.)

Hyvä työohje säästää lukijalta aikaa ja turhaa vaivannäköä. Ohjeita kirjoitettaessa on otettava huomioon samat asiat kuin muidenkin tekstien laatimisessa. Pitää osata esittää tarpeelliset asiat ja karsia turhat pois. Ilmaisutavan tulee olla lukijalle sopiva ja asiat tulee esittää sellaisessa järjestyksessä, mikä palvelee tarkoitusta parhaiten. Työohjeen tekijän tulee arvioida, mitä vaaditaan, että ohjeet auttavat lukijaa suorittamaan sen, mikä on tavoitteena. (Kankaanpää ja Piehl 2011, 295.)

5 KEHITTÄMISTYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Kehittämistyömme tarkoitus oli päivittää kliinisen mikrobiologian harjoitustuntien työohjeet bioanalyttikko-opiskelijoille. Päivityksen avulla saimme työohjeet ajan tasalle niin, ettei niissä olisi puutteita tai mitään tarpeetonta. Pyrimme tekemään työohjeista selkeät, helposti ymmärrettävät ja joiden kanssa olisi helppo työskennellä itsenäisesti. Selkeiden työohjeiden kanssa työskentely on tehokasta, kun ei tarvitse esittää jatkuvasti tarkentavia kysymyksiä esimerkiksi opettajalta. Aikaa säästyy myös siinä, kun vältetään turhia virheitä puutteellisten ohjeiden takia.

Kehittämistyömme tavoite oli, että uusien työohjeiden kanssa työskentely on sujuvampaa, joka näin ollen edistää bioanalyttikko-opiskelijoiden oppimista. On tärkeää, että bioanalytiikkaa ja kliinistä mikrobiologiaa opiskelevien opiskelijoiden oppimateriaali olisi selkeää ja ajan tasalla. Ammattiin valmistuessa heillä olisi hallussaan kliinisen mikrobiologian menetelmiin liittyvä viimeisin tieto ja osaaminen.

6 TOIMINNALLISEN KEHITTÄMISTYÖN VAIHEET

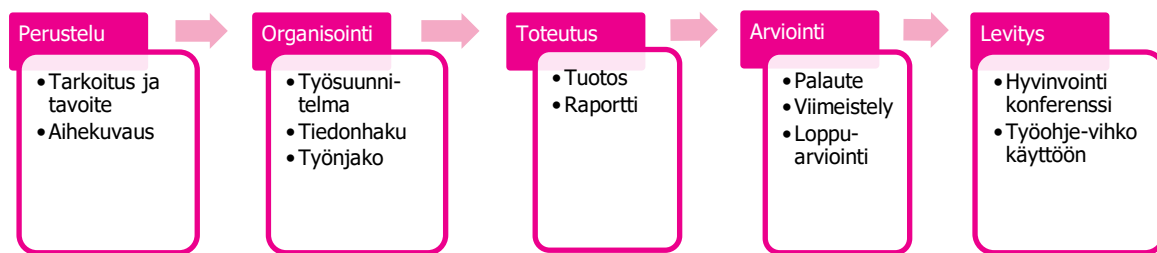
6.1 Toiminnallinen opinnäytetyö

Opinnäytetyömme oli toiminnallinen kehittäminen. Toiminnallisessa opinnäytetyössä lopullisena tuotteena on aina jokin konkreettinen tuotos, eli produkti. Se voi olla esimerkiksi ohje, opas tai portfolio. Tuotos, joka sisältää tekstiä, on suunniteltava niin, että se palvelee sille suunnattua käyttäjäkuntaa. Hyviä kriteerejä tuotokselle ovat mm. informatiivisuus, selkeys, johdonmukaisuus ja asiasällön sopivuus kohderyhmälle. Ohjeistuksen tai oppaan teossa on syytä tarkastella kriittisesti sitä varten kerättyä tietoa ja lähteitä. On varmistettava, että käytetyt lähteet ovat luotettavia ja ajanmukaista. (Vilka ja Airaksinen 2004, 51–53.) Kehittämissä pyritään ratkaisemaan työelämässä tai opiskelussa esiin nousseita käytännön ongelmia tai uudistamaan käytäntöjä sekä tuomalla uutta tietoa työelämän käytännöistä (Ojasalo, Moilanen ja Ritalahti 2014, 18–19). Kehittämistoiminnan tavoitteena on muutos, joka tähtää aiempaa parempiin tai tehokkaampiin toimintatapoihin tai -rakenneisiin. Kehittäminen voi kohdistua myös ammatilliseen osaamiseen. Työelämälähtöiset kehittämissä tehtävät antavat tärkeää osaamista tulevaisuuden työntekijöille. (Toikko ja Rantanen 2009, 16; Ojasalo ym. 2014, 15.) Toiminnallisen kehittämistyön tunnusomaisia piirteitä ovat myös siitä syntyvän tuotoksen uutuusarvo, hyöty, ainutkertaisuus ja käytettävyys. Opinnäytetyöraportissa tuotos voidaan sijoittaa työn loppuun tai siitä voidaan tehdä myös erillinen liite. On tärkeää erotella, että raporttiosio on kirjallinen esitys kehittämistyöstä, jonka tuloksena on muodostunut erillinen ja itsenäinen tuotos. (Salonen 2013, 13, 25; Vilka ja Airaksinen 2004, 65.)

Tärkeitä opittavia taitoja kehittämistyössä ovat vuorovaikutus-, ongelmanratkaisu- ja yhteistyötaidot. Usein kehittämistyö tehdään ryhmässä, mutta siinä korostuu myös itsenäinen työskentely. Kehittämistyön tekijä tekee itsenäistä tiedonhakuja, johtaa itse työskentelyään ja työskentelytavan tulisi olla tavoitteellista ja arvioivaa. (Ojasalo ym. 2014, 15.) Kehittämistoimintaan liittyy olennaisesti tutkimuksellinen lähestymistapa, koska tutkimustietoa sovelletaan käytäntöön. Tällöin voidaan puhua tutkimuksellisesta kehittämistoiminnasta, jossa yhdistyy konkreettinen kehittäminen ja uuden tiedon tuottaminen. (Toikko ja Rantanen 2009, 19.)

6.2 Suunnittelu ja toteutus

Toikko ja Rantanen (2009) hahmottavat kehittämistyölle viisi vaiheisen mallin, joka kuvaa opinnäytetyötämme hyvin. Kehittämistyön etenemisen malli on esitelty mukaillen kuviossa 1. Ensimmäisenä vaiheena on kehittämistyön perustelu, jossa määritellään työn lähtökohdat: miksi jotakin pitää kehittää juuri nyt? Lähtökohtina ovat nykytilanteen ongelma ja tulevaisuuden visio. Toisessa vaiheessa työn etenemistä ja käytännön asioita pitää suunnitella ja organisoida. Työnjaon tulee olla kaikille selvillä. Kolmas vaihe on toteutus, jossa lähdetään etenemään tavoitetta kohti. Konkreettisen tekemisen eli kirjoittamisen ja uusien työohjeiden luomisen ohella kehittämistoiminnassa tulee olla pohtiva ja analysoiva ote. Neljännessä vaiheessa työtä arvioidaan ja yksinkertaisimmillaan analysoidaan sitä, onko työn tavoitteet saavutettu. Viimeisessä vaiheessa kehittämistyön tulokset tai tuotos laitetaan levitykseen. (Toikko ja Rantanen 2009, 56–63.)



KUVIO 1. Opinnäytetyöprosessi vaiheittain (mukaillen Toikko ja Rantanen 2009, 56–63).

Sopivan aiheen valinta luo hyvät edellytykset onnistuneelle opinnäytetyölle. Hyvän aiheen kriteereinä voidaan pitää muun muassa omaa kiinnostusta aiheeseen ja että se on sopiva omalle tieteenalalle. On tärkeää, että aihe opettaa tekijälle jotakin ja että aiheesta on saatavilla tarpeeksi tietoa. (Hirsjärvi, Remes ja Sajavaara 2009, 77–78.) Myös Metsämuuronen (2009, 38) toteaa, että aiheen ja aihepiiriin valinnassa on kannattavaa valita aihe omien mielenkiinnon kohteiden joukosta. Aiheen on syytä olla myös sellainen, josta opiskelijalla on suoritettuna opintojaksoja. Aiemmin opittu teoria-pohja helpottaa opinnäytetyön tekemistä. (Kananen 2017, 24.)

Valitsimme aiheen opinnäytetyölle alkuvuodesta 2019. Keskustelimme aiheesta ja sen tarkoituksesta ja tavoitteesta ohjaavan opettajan kanssa. Teimme opinnäytetyön aihekuvausten ja työsuunnitelman kevään 2019 aikana. Opinnäytetyön etenemisen hahmottelun jälkeen teimme SWOT-analyysin. SWOT-analyysi muodostuu kartoittamalla sisäisten tekijöiden, eli henkilöiden tai organisaation, vahvuuksia (strengths) ja heikkouksia (weaknesses) sekä ulkoisista tekijöistä riippuvia mahdollisuuksia (opportunities) ja uhkia (threats). Analyysi on hyvä tehdä ennen varsinaisen työn tai projektin aloittamista, jotta riskit voidaan tunnistaa etukäteen. Työn etenemistä hankaloittavia tekijöitä voidaan näin välttää ja ennaltaehkäistä. (Finnish National Board of Education 2010, 23–24.)

Opinnäytetyön organisointi jatkui syksyn 2019 aikana. Olimme työharjoittelussa jokainen eri paikkakunnilla, mutta pidimme yhteyttä saadaksemme kerättyä opinnäytetyön teoriaosuuteen hyviä tietolähteitä. Tammikuussa 2020 aloitimme työstämään opinnäytetyön teoriaa ja varsinaista tuotosta eli työohjeita. Ennen tuotoksen ja raportin kirjoittamisen aloitusta mietimme vielä yhdessä työnjakoa, jotta kaikille olisi selvä mistä aloittaa. Työohjeisiin laadimme useita uusia työohjeita, joissa meidän tuli pohtia ohjeiden selkeyttä ja oikeellisuutta. Laatimamme työohjeet kävivät välillä tarkistuksessa ohjaavalla opettajalla ja tarvittaessa muokkasimme työohjeita palautteen mukaan. Työohjevihkon laadinnassa meidän tuli pohtia työohjeiden toimivuutta käytännössä, jotta opinnäytetyömme tarkoitus ja tavoite täyttyivät.

Opinnäytetyön tuotoksena teimme klinisen mikrobiologian työohjeet Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalyttikko-opiskelijoille. Työohjevihko jaetaan opiskelijoille sähköisessä muodossa, pdf-tiedostona, jolloin jokainen voi tulostaa itselleen työohjeet paperille harjoitustunteja varten. Työohjeet lisätään myös ThingLink 360° -virtuaalioppimisympäristöön, jossa opiskelijat voivat tutustua työohjeisiin ennen harjoitustuntien alkua. Opinnäytetyöprosessin aikana meidän tuli perehtyä opinnäytetyön teoriaosuudessa siihen, millainen on hyvä työohje ja miten se tukee opiskelijoiden oppimista. Lisäksi

teoriaosuudessa kerroimme yleisesti gramnegatiivisista sauvabakteereista, niiden jaottelusta ja ominaisuuksista patogeeneinä.

Työohjeet tuli laatia niin, että niiden seuraaminen on helppoa ja vaivatonta. Jokaisen työohjeen alussa on kerrottu tunnustuskokeen menetelmän periaatteita teoriassa, jotta työohjeen lukija saa käsityksen siitä, mitä erilaisia reaktioita kokeen aikana todella tapahtuu. Työohjeen seuraavassa vaiheessa kerrotaan mitä reagensseja ja välineitä kokeen suorittamiseen tarvitaan. Kun välineet ja reagenssit ovat esillä, lukija voi siirtyä seuraavaan kohtaan, jossa kerrotaan ohjeet kokeen suorittamiseen. Jokaisen työohjeen lopussa on ohje kokeen lopputuloksen tulkitsemiseen. Työohjevihkon loppuun lisättiin myös oma tekemämme kaavion gramnegatiivisten sauvabakteereiden tunnistamisen avuksi. Aiempi työohje piti jo sisällään tunnistuskaavion grampositiivisille kokkibakteereille, joten tekemämme tunnistuskaavio oli hyvä lisä tunnistamiskokeiden kulun havainnollistamiseksi. Aikaisemmassa ohjeessa oli myös hyvin havainnollistavia kuvia, jotka päätimme jättää sellaisinaan uuteen työohjeeseen. Lisäsimme työohjevihkoon myös uudet bakteeriviljelyille tarkoitetut viljelykuviot oppimisen tueksi. Kun saimme työohjevihkon melkein valmiiksi, aloimme työstämään opinnäytetyön raporttiosuutta. Aloimme etsiä vielä lisää tietolähteitä ja paneuduimme tieteelliseen kirjoittamiseen. Pyysimme välillä palautetta opinnäytetyömme ohjaajalta ja jatkoimme työstämistä läpi kevään. Raporttiosio vaati paljon arviointeja, lisäyksiä ja viimeistelyä ennen kuin se saatiin valmiiksi.

Huhtikuussa osallistuimme Savonia-ammattikorkeakoulun hyvinvointikonferenssiin. Hyvinvointikonferenssi siirtyi kevään 2020 poikkeusolojen vuoksi kokonaan verkossa toteutettavaksi ja perinteiset luokkatiloissa järjestettävät seminaarit peruttiin. Seminaarit korvattiin videosityksillä, jotka olivat katsottavissa hyvinvointikonferenssin verkkosivuilla. Teimme opinnäytetyöstämme informatiivisen e-posterin ja muutaman minuutin mittaisen videosittelyn. E-posterissa ja videosittelyssä kerroimme opinnäytetyön taustasta, tarkoituksesta ja tavoitteesta, menetelmästä, sekä tuotoksesta.

Opinnäytetyöprosessi aiheen valinnasta valmiiksi työksi kesti lähes kaksi vuotta. Tähän ajanjaksoon sisältyi kuukausia, jolloin työskentelimme aktiivisesti, etsimme luotettavia tietolähteitä, kävimme läpi kirjallista materiaalia ja kirjoitimme. Välillä oli kuukausia, jolloin olimme kesätöissä tai työssäoppimassa. Syksyllä 2019 olimme liki neljä kuukautta kestävässä keskussairaalaharjoittelussa, jolloin opinnäytetyön työstäminen jäi todella vähäiseksi. Keskussairaalaharjoittelun jälkeen pääsimme aloittamaan työohjeiden päivitystä ja se onnistui mielestämme melko sujuvasti.

7 POHDINTA

Opinnäytetyömme teoriapainotteisessa raporttiosiossa kerroimme, miten ja miksi olemme tätä opinnäytetyötä tehneet. Lisäksi kuvailimme, millainen työprosessi on ollut ja millaisiin johtopäätöksiin olemme tulleet työn tekemisen aikana. Opinnäytetyön loppuvaiheessa ja pohdinnassa arvioimme opinnäytetyöprosessin aikana kertynyttä oppimista ja osaamista.

Ammattikorkeakoulussa pyritään ammatilliseen korkeakoulututkintoon ja siellä korostuu voimakkaasti yhteys työelämään. Tavoitteena on tukea opiskelijan ammatillista kasvua ja pääsyä ammatillisiin asiantuntijatehtäviin. Ammattikorkeakoulut tukevat sellaisia tutkimus- ja kehittämistöitä, jotka palvelevat niin korkeakouluopetusta kuin työelämääkin. (Vilkkä 2015.) Ammattikorkeakoululain mukaan opinnäytetyön tavoitteena on syventää opiskelijan osaamistaan tutkinto-ohjelmaan ja työelämään liittyvillä aihealueilla. Opinnäytetyö osoittaa, että opiskelijalla on valmius soveltaa opittuja tietoja ja taitoja työelämän asiantuntijatehtävissä. (Kananen 2017, 22.)

Koimme kehittämistyön aiheen meille sopivaksi. Työohjeiden laatiminen tuntui selkeältä, koska olimme kaikki tehneet suurimman osan työohjeisiin tulevista uusista kokeista oman vuosikurssimme kliinisen mikrobiologian harjoitustunneilla ja olimme havainneet puutteet aikaisemmissa työohjeissa. Edelliset työohjeet oli jo valmiiksi tehty selkeästi loogisessa järjestyksessä etenevään muotoon, joten päätimme kirjoittaa uudet työohjeet saman kaavan mukaisesti. Koemme päässeemme opinnäytetyön tavoitteeseen, koska tekemämme työohjevihko on nyt päivitetty ajan tasalle niin, että sieltä löytyvät kaikki harjoitustunneilla tehtävät bakteerien tunnistuskokeet ja antibioottiherkkysmääritykset. Arvioisimme tuotoksen onnistuneen hyvin. Lisäämämme viljelykuviot helpottavat visuaalisesti hahmottamaan bakteeriviljelyiden suorittamista. Lisäksi työohjeissa on käytetty kuvia, taulukoita ja kaavioita helpottamaan ohjeiden hahmottamista ja tutkimusten etenemisestä. Turhiksi koetut näytteenotto-ohjeet päätettiin poistaa, koska näytteenottoon liittyvät asiat on käsitelty näytteenotto-opintojaksolla ennen kliinisen mikrobiologian opintojakson alkua. Uusia työohjeita laatiessa tuli perehtyä tarkasti reagenssi- ja testikittivalmistajien englanninkielisiin käyttöohjeisiin ja tuoteselosteisiin. Sieltä ohjeet tuli laatia suoraviivaisesti työohjeen muotoon, eikä ohjeisiin saanut jättää tulkinnan varaa. Työohjevihkon ulkoasu on selkeä ja ohjeet etenevät loogisessa järjestyksessä. Emme kokeneet tarvetta vaihtaa ohjeiden perinteistä paperista vihkomallia esimerkiksi digitaaliseen muotoon, koska ohjevideoiden ja digitaalisten kuvien katseleminen työn teon aikana voisi olla hankalaa ja digilaitteita ei tulisi muutenkaan käyttää samanaikaisesti bakteereiden kanssa työskennellessä. Toki ohjevideoihin voi tutustua ennen harjoitustunteja mutta harjoitustuntien aikana on helpompi lukea ja kerrata ohjeita paperilta.

7.1 Itsearviointi ja ammatillinen kehittyminen

Välillä ryhmässä työskentely tuotti haasteita, koska ryhmän jäsenten aikataulut eivät aina olleet helppoa sovittaa yhteen. Kaikilla ryhmäläisillä oli opinnäytetyön kirjoittamisen lisäksi paljon muitakin koulutehtäviä ja meneillään olevia kursseja sekä omia henkilökohtaisia menoja. Lisäksi keväällä 2020 poikkeusolot estivät meitä kokoontumasta koulun tiloihin työskentelemään, ja muitakin ei-pakollisia

kokoontumisia tuli välttää koko kevään ajan. Pidimme kuitenkin yhteyttä puhelimitse ja välillä pidimme palavereita Zoom-yhteydellä. Ryhmässä työskentelyssä oli kuitenkin myös etunsa. Jos jollakin ryhmän jäsenistä tuntui olevan vaikeuksia saada omaa kirjallista osuuttansa etenemään, pystyimme silloin tällöin tukeutumaan muiden ryhmän jäsenten apuun ja keksimään keinoja edetä omassa kirjoittamistyössä. Opinnäytetyötä ohjaavan opettajan antama palaute ja ohjeet tietyin väliajoin helpottivat opinnäytetyöprosessin etenemistä. Myös useamman silmäparin lukiessa kirjallista raporttia tai laadittuja työohjeita, virheet ja puutteet saatiin havaittua nopeammin. Lisäksi erilaisia näkökantoja opinnäytetyöhön liittyviin asioihin saatiin yhdessä keskustelemalla ja pohtimalla.

Opinnäytetyön tekeminen syvensi omaa osaamistamme ja tietämystämme bakteerien tunnistusmenetelmistä kliinisessä mikrobiologiassa. Opimme myös tarkastelemaan ja arvioimaan työohjeiden toimivuutta sekä uusien työohjeiden laatimista kliinisen laboratorion työympäristössä. Opinnäytetyötä kirjoittaessa kehitimme taitojamme luotettavan tiedon hankinnassa, analysoinnissa ja soveltamisessa. Savonia-ammattikorkeakoulun kuvaamiin bioanalyytikon yleisiin sekä ammatillisiin kompetensseihin peilattaessa, voimme todeta, että olemme kehittyneet useilla osa-alueilla. Yleisissä kompetensseissa mainitaan esimerkiksi työyhteisötaidot, jota voi periaatteessa soveltaa myös ryhmätyöskentelyyn opinnäytetyön yhteydessä. On osattava toimia ryhmän jäsenenä kantaen oma vastuu tekemisistään ja työskennellä välillä itsenäisesti samalla kuitenkin ottaen huomioon muut ryhmän jäsenet. Ammatilliset kompetenssit koostuvat muun muassa laboratoriotutkimusprosessin eri vaiheista. Opinnäytetyötä tehdessämme syvensimme osaamistamme erityisesti kliinisen mikrobiologian laboratorioprosessin analyttisessä ja postanalyttisessä osaamisessa. Meidän tuli tietää tarkasti ohjeita laatiessa, kuinka bakteerien tunnistuskokeet ja herkkyysmääritykset tehdään ja tulkitaan, jotta pystyimme laatimaan niistä toimivat työohjeet. Opinnäytetyöprosessin aikana saimme kokemusta myös ammatillisissa kompetensseissa mainitusta tutkimus- ja kehittämistoiminnasta kliinisessä laboratoriotyössä. (Savonia-ammattikorkeakoulu 2017.)

7.2 Eettisyys ja luotettavuus

Opinnäytetyön kohdalla tutkimuseetiikalla voidaan tarkoittaa yleisesti sovittujen pelisääntöjen noudattamista. Siinä otetaan huomioon tutkimuksessa mukana olevat henkilöt ja toimijat, toimeksiantaja, rahoittaja, tutkimuskohde ja yleisö. (Vilka 2015, 41.) Meidän tapauksessamme voimme ajatella huomioonotettavien toimijoiden olevan opinnäytetyötätekevä ryhmämme jäsenet, toimeksiantajana Savonia-ammattikorkeakoulua ja yleisönä kohderyhmästä eli bioanalytikko-opiskelijoista, jotka käyttävät tuotostamme opiskeluissaan.

Hyvä tieteellinen käytäntö (HTK) tarkoittaa, että tutkijat käyttävät tiedeyhteisön hyväksymiä tiedonhankinta- ja tutkimusmenetelmiä. Tiedonhankinnassa on nojaututtava tieteelliseen kirjallisuuteen ja asianmukaisiin tietolähteisiin, kuten ammattikirjallisuuteen. Tutkimustyön tekeminen ja tulosten esittäminen hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti edellyttää tekijältä rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta. Rehellinen ja vilpiton toiminta tarkoittaa, että tutkija tai kirjoittaja kunnioittaa toisten tuottamia tutkimustuloksia tai kirjallisuutta mainitsemalla heidät tarkoin lähdeviitteissä ja esittämällä heidän aikaansaannoksensa oikeassa valossa. Vilpillisellä toiminnalla tarkoitetaan, että toisten tuo-

toksia vääristellään tai plagioidaan. Hyvänä muistisääntönä voi pitää sitä, että mitä paremmin lähdeviittaukset on merkattu, sitä paremmin tutkimus on noudattanut hyvin tieteellisen käytännön periaatteita. Piittaamattomuudesta johtuvat virheet johtuvat yleensä tutkijan tai kirjoittamisen puutteellisista tiedoista ja taidoista – ei tiedetä kuinka tulisi oikeasti toimia. (Vilkkä 2015, 41–43, 45.)

Hyvän tieteellisen käytännön noudattaminen lisää tutkimuksen luotettavuutta (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012, 6). Opinnäytetyömme luotettavuutta pyrimme varmistamaan koko opinnäytetyöprosessin ajan. Raporttiosiota kirjoittaessa kaikkeen tausta-aineistoon nojautuvaan tekstiin on merkittävä tiedon alkuperä ja tekijä hyvän tutkimustavan mukaisesti (Lempinen ja Raivo 2020). Kehittämistyön luotettavuuden mittaaminen on haasteellisempaa kuin määrällisessä tai laadullisessa tutkimuksessa. Kehittämistyössä ei saada lopputulokseksi tutkimustuloksia vaan lopputuloksena pyritään saamaan aikaan muutos. Luotettavuutta voidaan arvioida tarkastelemalla kehittämistyöprosessin eri vaiheita, onko kaikki tehty oikein ja suunnitelman mukaisesti. (Kananen 2015a, 111–112). Pyrimme lisäämään opinnäytetyömme luotettavuutta käyttämällä useita ajantasaisia lähteitä. Etenkin verkkolähteiden kohdalla on syytä olla erityisen kriittinen. Lähteiden etsimisessä käytimme kirjallisten lisäksi luotettavista tietokannoista, kuten PubMedista ja Cinahlista löytyviä erilaisia tutkimusartikkeleita.

Poikkeusolojen vallitessa keväällä 2020, tiedon hakeminen kirjallaisista lähteistä vaikeutui huomattavasti, koska kaikki kirjastot olivat kiinni käytännössä koko kevään ajan. Tietoa oli tuolloin pyrittävä hyödyntämään internet-lähteistä ja sähköisessä muodossa olevista e-kirjoista. Opinnäytetyön tuotosta eli työohjevihkon sisältöä voimme pitää luotettavana, koska lähdeaineistona on käytetty ajantasaisia reagenssi- ja testikittivalmistajien käyttö- ja turvaohjeita sekä esitteitä. Tuotoksen luotettavuutta olisimme halunneet lisätä myös testaamalla tuotosta jo ennen varsinaista käyttöönottoa. Olisimme halunneet, että edes pieni opiskelijaryhmä olisi suorittanut työohjevihkossa olevat kokeet ja antanut meille palautetta työohjevihkon toimivuudesta, sisällöstä ja ulkoasusta. Tähän emme kuitenkaan saaneet mahdollisuutta risteävistä aikatauluista johtuen. Aloimme työstää työohjeita juuri kun meitä vuotta myöhemmän vuosikurssin opiskelijat olivat lopettaneet kliinisen mikrobiologian opintojakson. Työn tulokset ja työohjeiden toimivuus tulevat selville vasta kun bioanalyttikko-opiskelijat ottavat ne käyttöönsä. Seuraavaksi järjestettävä opintojakso järjestetään loppuvuodesta 2020, kun olimme saaneet opinnäytetyömme jo valmiiksi.

LÄHTEET JA TUOTETUT AINEISTOT

ALANAZI, Menyfah Q., ALEANIZY, Fadilah S. ja ALQAHTANI, Fulwah Y. 2018. An evaluation of *E.coli* in urinary tract infection in emergency department at KAMC in Riyadh, Saudi Arabia: retrospective study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 17 (3). [Viitattu 2020-05-25.] Saatavissa:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5806437/>

ALBIGER, Barbara, BROLUND, Alma, BYFORS, Sara, KOHLENBEER, Anke, LAGERQVIST, Nina, MONNET, Dominique, STRUELENS, Marc 2019. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Europe's journal on infectious disease surveillance, epidemiology, prevention and control* 24 (9), 28. [Viitattu 2020-10-25]

Saatavissa: https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1900123#html_fulltext

ANDAYESHGAR, Bahare, GHANDINEJAD, Fatameh, JANATOLMAKAN, Maryam, KHATONY, Alireza, MOZZAFARI ja Hamid Reza, SHARIFI, Roohollah 2020. The Relationship Between the VARK Learning Styles and Academic Achievement in Dental Students. *Advances in Medical Education and Practice* 11,15-19. [Viitattu 2020-05-22.] Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6955605/>

ANTTILA, Veli-Jukka 2020. ESBL- ja CPE-bakteerit. [verkkojulkaisu]. *Duodecim*. [Viitattu 2020-10-25.] Saatavissa: https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01205

ANTTILA, Veli-jukka ja TISSARI, Päivi 2010a. Muu Enterobacteriaceae-heimo. Julkaisussa: HEDMAN, Klaus, HEIKKINEN, Terho, HUOVINEN, Pentti, JÄRVINEN, Asko, MERI, Seppo ja VAARA, Matti (toim.) *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Kirja 1. Helsinki: Duodecim, 196–199.

ANTTILA, Veli-Jukka ja TISSARI, Päivi 2010b. Pseudomonakset, pseudomonaksen kaltaiset sauvat ja akinetobakteerit. Julkaisussa: HEDMAN, Klaus, HEIKKINEN, Terho, HUOVINEN, Pentti, JÄRVINEN, Asko, MERI, Seppo ja VAARA, Matti (toim.) *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Kirja 1. Helsinki: Duodecim, 200–205.

BADAL, R.E., BOUCHILLON, S.K., CANTON, R., HACKEL, M., HOBAN, D.J., ja LASCOLS, C. 2012. Susceptibility of European *Escherichia coli* clinical isolates from intra-abdominal infections, extended-spectrum beta-lactamase occurrence, resistance distribution, and molecular characterization of eropenem-resistant isolates (SMART 2008-2009). [verkkojulkaisu]. *Clinical microbiology and infection* 18 (3), 253-259. [Viitattu 2020-05-25.] Saatavissa: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61630-X/fulltext#%20](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61630-X/fulltext#%20)

BIOMERIEUX 2002. API® 20 E. Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods. Package Insert.

BIOMERIEUX 2016. ChromID™ S.aureus Elite agar (SAIDE). Chromogenic medium for the selective isolation and the direct identification of S.aureus. Package Insert.

BJORK, Robert, MCDANIEL, Mark, PASHLER, Harold ja ROHRER, Dough 2009. Learning styles: Concepts and Evidence. *Psychological Science in the Public Interest* 9 (3), 105-119. [Viitattu 2020-04-11.] Saatavissa: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1111/j.1539-6053.2009.01038.x>

CALHOUN, Barbara M., ROGOWSKY, Beth A. ja TALLAL, Paula 2014. Matching Learning Style to Instructional Method: Effects on Comprehension. [verkkodokumentti]. APA. [Viitattu 2020-06-01.] Saatavissa: <https://www.apa.org/pubs/journals/features/edu-a0037478.pdf>

CAPPUCCINO, James ja WELSH, Chad 2018. *Microbiology: a laboratory manual*. Harlow, England: Pearson

CARLSON, Petteri ja KOSKELA, Markku 2011. Bakteriologian perustekniikat. Julkaisussa: HEDMAN, Klaus (toim.), HEIKKINEN, Terho, HUOVINEN, Pentti, JÄRVINEN, Asko, MERI, Seppo ja VAARA, Martti. *Infektiosairaudet* [verkkokirja]. Duodecim. [Viitattu 2020-04-28.] Saatavissa: <https://www.oppiportti.fi/op/isa00302/do#s2>

CARROLL, Karen, JOERGENSEN, James ja PFALLER, Michael 2015. *Manual of Clinical Microbiology*. 11. painos. Kirja 1. Washington, USA: ASM Press

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTATION 2019. Diseases and Organisms. [verkkojulkaisu]. Centres for Disease Control and Prevention. [Viitattu 2020-04-18.] Saatavissa: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/organisms.html>

CHERVET, D., DUFOUGERAY, Alice, LORTHOLARY, Olivier, PARTOUCHE, Henri, PILMIS, B. ja ZAHAR, Jean-Ralph 2017. Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections in Paris in 2015 [verkkodokumentti]. *Daneshyari*. [Viitattu 2020-05-21.] Saatavissa: <https://daneshyari.com/article/view/8748887.pdf>

CHICK, Nancy s. a. Learning styles. [verkkojulkaisu]. Vanderbilt University. [Viitattu 2020-04-11.] Saatavissa: <https://cft.vanderbilt.edu/guides-sub-pages/learning-styles-preferences/>

CHOE, Hyun-Sop, LEE, Dong Sup, LEE, Seung-Ju 2018. Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance. *BioMed Research International* 2018. [Viitattu 2020-05-19.] Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6178185/>

CHROMAGAR 2013. Tuoteluettelo [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2020-04-28.] Saatavissa: http://www.chromagar.com/images_spaw/LF_EXT_029_FIN_V3.pdf?PHPSES-%20SID=f76c14ce09e1e44daf06b147fdaa6420

CHROMAGAR 2017. Product leaflet. CHROMagar™ Orientation [verkkodokumentti]. CHROMagar. [Viitattu 2020-04-28.] Saatavissa: http://www.chromagar.com/fichiers/1483453721LF_EXT_002_RT_V6.1_Siteweb.pdf

- CHROMAGAR 2019. Food&Water Q.C. CHROMagar™ E.coli. [verkkojulkaisu]. CHROMagar. [Viitattu 2020-06-01.] Saatavissa: <http://www.chromagar.com/food-water-chromagar-e-coli-focus-on-e-coli-38.html#.XtU1n2gzaMo>
- CHROMAGAR 2020. CHROMagar™ Orientation [verkkojulkaisu]. CHROMagar. [Viitattu 2020-10-11.] Saatavissa: <http://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-orientation-focus-on-urinary-tract-pathogens-25.html#.XqQdFMgzaUk>
- EEROLA, Erkki, LINDHOLM, Laura 2010. Bakteerien luokittelu ja tyypittäminen. Julkaisussa: HEDMAN, Klaus, HEIKKINEN, Terho, HUOVINEN, Pentti, JÄRVINEN, Asko, MERI, Seppo ja VAARA, Matti (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim, 56–67.
- EUCAST 2020. New definitions of S, I and R from 2019. [verkkojulkaisu]. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. [Viitattu 2020-10-11.] Saatavissa: <https://www.eucast.org/newsiandr/>
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTATION AND CONTROL 2017. Facts about Escherichia coli. [verkkojulkaisu]. ECDC. [Viitattu 2020-04-22.] Saatavissa: <https://www.ecdc.europa.eu/en/escherichia-coli-ecoli/facts>
- FACKLAM, Richard R. 1972. Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. [verkkodokumentti]. Center for Disease Control, 1131-1139. [Viitattu 2020-03-30.] Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.savonia.fi/pmc/articles/PMC380519/pdf/applmicro00047-0117.pdf>
- FINNISH NATIONAL BOARD OF EDUCATION 2010. WBL-TOI Manual - Manual for planning of work-based learning – transfer of innovations. [verkkodokumentti]. Finnish National Board of Education. [Viitattu 2019-04-29.] Saatavissa: https://www.oph.fi/download/130052_wb_toi_manual.pdf
- HIRSJÄRVI, Sirkka, REMES, Pirkko ja SAJAVAARA, Paula 2009. Tutki ja Kirjoita. 15. uudistettu painos. Helsinki: Tammi.
- HODGSON, Philip 2007. Tips for writing user manuals [verkkojulkaisu]. USERFOCUS. [Viitattu 2020-04-20.] Saatavissa: <https://www.userfocus.co.uk/articles/usermanuals.html>
- HUOTILAINEN, Minna 2016. Mitä oppiminen tekee aivoillemme? [verkkojulkaisu]. Helsingin seudun kesäyliopisto. [Viitattu 2020-04-14.] Saatavissa: <https://www.kesayliopistohki.fi/mita-oppiminen-tekee-aivoillemme/>
- HUOVINEN, Pentti ja VAARA, Martti 2011. Bakteerilääkehoidon perusteet. Julkaisussa: HEDMAN, Klaus (toim.), HEIKKINEN, Terho, HUOVINEN, Pentti, JÄRVINEN, Asko, MERI, Seppo ja VAARA, Martti. Infektiosairaudet [verkkokirja]. Duodecim. [Viitattu 2020-04-28.] Saatavissa: <https://www.oppiportti.fi/op/isa00801/do#s9>
- ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO s. a. Oppimisteoriat- ja strategiat [verkkojulkaisu]. UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND. [Viitattu 2020-04-14.] Saatavissa: <https://www.uef.fi/fi/web/educate/oppiminen1>

- JALAVA, Jari 2018. Moniresistentit gramnegatiiviset sauvat. Moodi 1/2018 [digilehti]. Labquality Oy. [Viitattu 2020-04-22.] Saatavissa: https://digiplus.fi/www/Moodi/2018_Moodi_01/page_1.html
- KANKAANPÄÄ, Salli ja PIEHL, Aino 2011. Tekstintekijän käsikirja: opas työssä kirjoittaville. Ajantasaistettu ja uudistettu laitos. Helsinki: Yrityskirjat 2011.
- KANANEN, Jorma 2015a. Kehittämistutkimuksen kirjoittamisen käytännön opas – Miten kirjoitan kehittämistutkimuksen vaihe vaiheelta. Sarjassa: Jyväskylän ammattikorkeakoulun julkaisuja 212. Tampereen Yliopistopaino Oy - Juvenes Print.
- KANANEN, Jorma 2015b. Opinnäytetyön kirjoittajan opas – Näin kirjoitan opinnäytetyön tai Pro Gradun Alusta loppuun. Sarjassa: Jyväskylän ammattikorkeakoulun julkaisuja 202. Jyväskylä: Suomen yliopistokirjapaino Oy – Juvenes Print.
- KANANEN, Jorma 2017. Kehittämistutkimus interventiotutkimuksen muotona – Opas opinnäytetyön ja Pro Gradun kirjoittajalle. Sarjassa: Jyväskylän ammattikorkeakoulun julkaisuja 232. Jyväskylä: Suomen yliopistokirjapaino Oy – Juvenes Print.
- KAUPPINEN, Anneli, NUMMI, Jyrki ja SAVOLA, Tea 2010. Tekniikan viestintä: kirjoittamisen ja puhumisen käsikirja. 10. uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima.
- KORHONEN, Linda ja NUUTINEN, Matti 2019. EHEC-infektiot ja lasten hemolyyttis-ureeminen oireyhtymä OYS:ssa 1995–2016. Lääkärilehti 22,1427-1432. [Viitattu 2020-04-22.] Saatavissa: <https://www.laakari-lehti.fi/tieteessa/alkuperaistutkimukset/ehec-infektiot-ja-lasten-hemolyyttis-ureeminen-oireyhtyma-oys-ssa-1995-ndash-2016/>
- KORHONEN, Ulla 2019. *E. coli*:n kasvu CHROMagar™Orientation-maljalla. Valokuva. Kuvauspäivä tuntematon. Kuopio; Savonia-ammattikorkeakoulu.
- KORTETJÄRVI-NURMI, Sirkka ja RANTA, Iris 2018. Näin teet oppikirjan. Tampere: Mediapinta 2018.
- LEMPINEN, Petri ja RAIVO, Petri 2020. Ammattikorkeakoulun opinnäytetöiden eettiset suositukset. [verkkodokumentti]. Ammattikorkeakoulujen rehtorineuvosto Arene ry. [Viitattu 2020-04-29.] Saatavissa: <http://www.arene.fi/wp-content/uploads/Raportit/2020/AMMATTIKORKEAKOULU-JEN%20OPINN%C3%84YTET%C3%96IDEN%20EETTISET%20SUOSITUKSET%202020.pdf?t=1578480382>
- METSÄMUURONEN, Jari 2009. Tutkimuksen tekemisen perusteet ihmistieteissä. 4. laitos. Helsinki: International Methelp Oy.
- MURRAY, Patrick, PFALLER, Michael ja ROSENTHAL, Ken 2016. Medical microbiology. 8. painos. Philadelphia: Elsevier.
- NYGREN, Jussi 2015. Prisma Studio. Väärinkäsitys: Jokaisella on oma oppimistyylinsä [verkkojulkaisu]. YLE. [Viitattu 2020-04-14.] Saatavissa: <https://yle.fi/aihe/artikkeli/2015/07/16/vaarinkasitys-jokaisella-oma-oppimistyylinsa>
- OJASALO, Katri, MOILANEN, Teemu, RITALAHTI, Jarmo 2014. Kehittämistyön menetelmät - uudenlaista osaamista liiketoimintaa. 3. uudistettu painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

- ONLINE-LEARNING 2020. Five Tips for Writing a User Manual [verkkojulkaisu]. Online-learning.com. [Viitattu 2020-04-20.] Saatavissa: <https://online-learning.com/five-tips-writing-user-manual/>
- OPETUSHALLITUS 2014. Perusopetuksen opetussuunnitelman perusteet 2014 [verkkodokumentti]. Opetushallitus. [Viitattu 2020-04-14.] Saatavissa: https://www.oph.fi/sites/default/files/documents/perusopetuksen_opetussuunnitelman_perusteet_2014.pdf
- PRO-LAB DIAGNOSTICS 2017. Prolex™ Staph Latex Kit. Instructions for use. [verkkodokumentti]. Pro-Lab Diagnostics. [Viitattu 2020-03-23.] Saatavissa: https://www.pro-lab.com/wp-content/uploads/2017/02/PL080B_081B_Prolex-Staph-Latex-Kit_English.pdf
- ROSCO 2009. DIATABS™ User's guide [verkkodokumentti]. ROSCO. [Viitattu 2020-03-25.] Saatavissa: [https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Users%20Guide\(2\).pdf](https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Users%20Guide(2).pdf)
- RUOKAVIRASTO 2019. Escherichia coli/EHEC (VTEC/STEC) ruokamyrkytysten aiheuttajana. [verkkojulkaisu]. Ruokavirasto. [Viitattu 2020-04-22.] Saatavissa: <https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/escherichia-coli/>
- SALONEN, Kari 2013. Näkökulmia tutkimukselliseen ja toiminnalliseen opinnäytetyöhön. Sarjassa: Puheenvuoroja 72. [verkkodokumentti]. Turun ammattikorkeakoulu. [Viitattu 2020-04-29.] Saatavissa: <http://julkaisut.turkuamk.fi/isbn9789522163738.pdf>
- SIITONEN, Anja ja VAARA, Martti 2010. Escherichia, Salmonella, Shigella ja Yersinia. Julkaisussa: HEDMAN, Klaus, HEIKKINEN, Terho, HUOVINEN, Pentti, JÄRVINEN, Asko, MERI, Seppo ja VAARA, Matti (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim, 177-195.
- SOINI, Tiina, RAUSTE-VON WRIGHT, Maijaliisa ja VON WRIGHT, Johan. 2003. Oppiminen ja koulutus. 9. uudistettu painos. Juva: WS Bookwell Oy.
- TANGEN, Jodi L. 2017. Learning styles and supervision: A critical review [verkkojulkaisu]. Taylor & Francis Online. [Viitattu 2020-04-15.] Saatavissa: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07325223.2017.1388897>
- TERVEYDEN JA HYVINVOINNINLAITOS 2020a. CPE-esiintyvyys Suomessa. [verkkojulkaisu]. THL. [Viitattu 2020-10-25] Saatavissa: <https://thl.fi/fi/web/infektiaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/cpe/cpe-esiintyvyys-suomessa>
- TERVEYDEN JA HYVINVOINNINLAITOS 2020b. Lisätietoa karbapeneemiresistensistä. [verkkojulkaisu]. THL. [Viitattu 2020-10-25] Saatavissa: <https://thl.fi/fi/web/infektiaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/cpe/lisatietoa-karbapeneemiresistensista>
- TERVEYDEN JA HYVINVOINNINLAITOS 2019a. ESBL. [verkkojulkaisu]. THL. [Viitattu 2020-04-22.] Saatavissa: <https://thl.fi/fi/web/infektiaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/esbl>

TERVEYDEN JA HYVINVOINNIN LAITOS 2019b. Lisätietoa laajakirjoisista beetalaktamaaseista. [verkkajulkaisu] [Viitattu 2020-11-13.] Saatavissa: <https://thl.fi/fi/web/infektiaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/esbl/lisatietoa-laajakirjoisista-beetalaktamaaseista>

TERVEYSKIRJASTO 2020. Lääketieteen sanasto. Resistenssi. [verkkajulkaisu]. Duodecim. [Viitattu 2020-11-14.] Saatavissa: https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt02916

TERVEYSKIRJASTO 2019a. Lääketieteen sanasto. Escherichia coli. [verkkajulkaisu]. Duodecim. [Viitattu 2020-04-22.] Saatavissa: https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt00760&p_hakusana=e.coli

TERVEYSKIRJASTO 2019b. Lääketieteen sanasto. Opportunistinen mikrobi. [verkkajulkaisu]. Duodecim. [Viitattu 2020-04-18.] Saatavissa: https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt02424

TERVEYSKIRJASTO 2018. Lääketieteen sanasto. Bakteriologia. [verkkajulkaisu]. Duodecim. [Viitattu: 2019-03-24.] Saatavissa: https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt00376

THERMOFISHER 2014. Quick and easy ESBL and CRE screening. [verkkajulkaisu]. Thermo SCIENTIFIC. [Viitattu 2020-04-21] Saatavissa: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Brilliance-CRE-ESBL-Biplate-Product-Overview.pdf>

THERMOSCIENTIFIC. 2020. Dehydrated Culture Media. [verkkajulkaisu]. Thermoscientific. [Viitattu 2020-06-01.] Saatavissa: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0301&org=145&c=UK&lang=EN

TOIKKO, Timo ja RANTANEN, Teemu 2009. Tutkimuksellinen kehittämistoiminta: Näkökulmia kehittämiss-prosessiin, osallistumiseen ja tiedontuotantoon. 1. Painos. Tampere: Tampereen Yliopistopaino Oy - Juvenes Print.

TUHKALAINEN, Terhi 2018. Moniresistentit mikrobit MRSA, ESBL, CPE ja VRE. [verkkajulkaisu]. ISLAB. [Viitattu 2020-04-18] Saatavissa: https://www.essote.fi/wp-content/uploads/sites/2/2018/10/mdr_mikrobit_tt.pdf

TUTKIMUSEETTINEN NEUVOTTELUKUNTA 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. [verkkajulkaisu]. Tutkimuseettinen neuvottelukunta. [Viitattu 2020-04-10.] Saatavissa: https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf

TUTORHOUSE 2018. Unohda oppimistyyli – nämä tekijät vaikuttavat lapsesi oppimiseen eniten [verkkajulkaisu]. Tutorhouse. [Viitattu 2020-04-14.] Saatavissa: <https://www.tutorhouse.fi/blogi/n%C3%A4m%C3%A4-tekij%C3%A4t-vaikuttavat-lapsesi-oppimiseen-eniten>

SARVAS, Martti, SKURNIK, Mikael ja VAARA Matti 2010. Bakterisolun rakenne ja toiminta. Julkaisussa: HEDMAN, Klaus, HEIKKINEN, Terho, HUOVINEN, Pentti, JÄRVINEN, Asko, MERI, Seppo ja VAARA, Matti (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim. 14–40.

SAVONIA-AMMATTIKORKEAKOULU 2017. Osaamistavoitteet, Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma. [verkojulkaisu]. Savonia-ammattikorkeakoulu. [Viitattu 2020-04-29.] Saatavissa: <https://portal.savonia.fi/amk/fi/opiskelijalle/opetusuunnitelmat?yks=KS&krtid=1094&tab=2>

VILKKA, Hanna ja AIRAKSINEN, Tiina 2004. Toiminnallinen opinnäytetyö. 1.–2. painos. Helsinki: Tammi.

VILKKA, Hanna 2015. Tutki ja kehitä. 4., uudistettu painos. Jyväskylä: PS-kustannus.

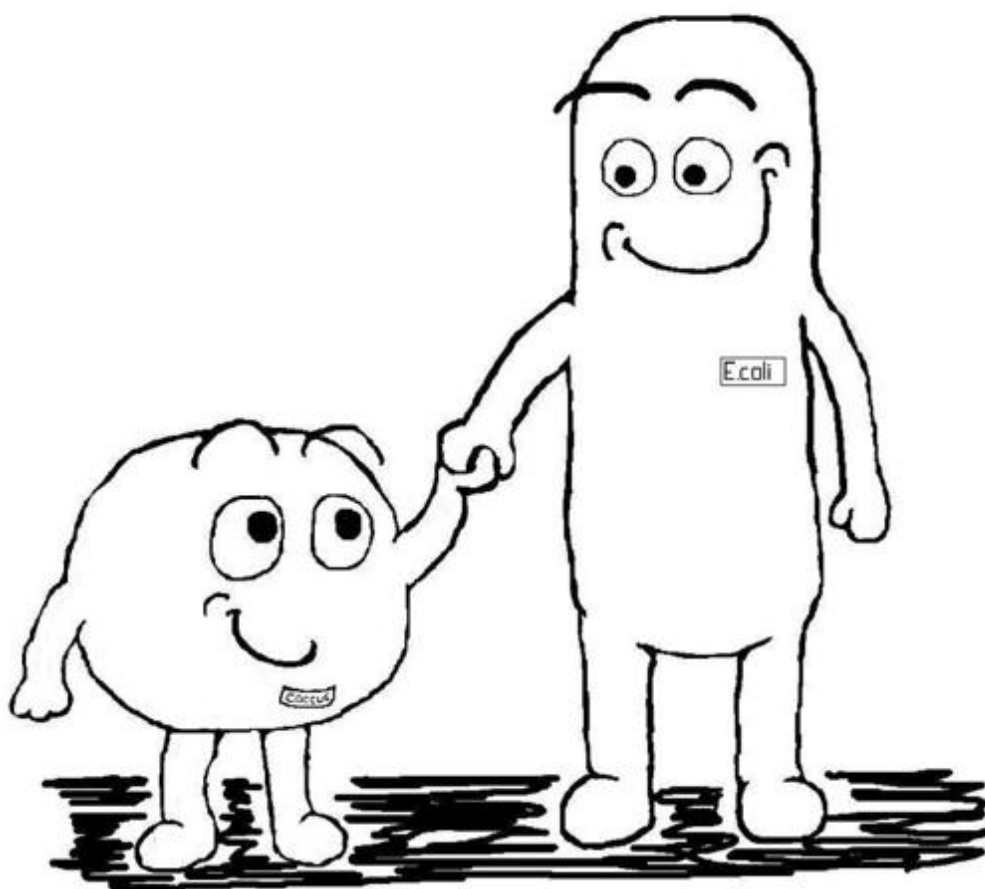
VIRTSATIETULEHDUS (VIRTSARAKKOTULEHDUS JA MUNUAISTASON TULEHDUS): KÄYPÄ HOITO -SUOSITUS 2019. ARIKOSKI, Pekka, MÄÄTTÄNEN, Petra, SIPILÄ, Raija, TARNANEN, Kirsi, VALTONEN, Kirsi ja WUORELA, Maarit. Helsinki. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. [Viitattu 2020-05-20.] Saatavissa: <https://www.kaypahoito.fi/khp00038>

VUENTO, Risto 2010. Muita gramnegatiivisia bakteereita. Julkaisussa: HEDMAN, Klaus, HEIKKINEN, Terho, HUOVINEN, Pentti, JÄRVINEN, Asko, MERI, Seppo ja VAARA, Matti (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim, 206–212.

VUENTO, Risto 2018. Pseudomonas aeruginosa. Julkaisussa: JALAVA, Jari ja RÄISÄNEN, Kati. Bakteerien mikrobilääkeresistenssi Suomessa [verkojulkaisu]. THL. [Viitattu 2020-04-18] Saatavissa: https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/138818/URN_ISBN_978-952-343-424-0.pdf?sequence=1&isAllowed=y

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. [verkojulkaisu]. World Health Organization - WHO. [Viitattu 2020-11-17.] Saatavissa: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Kliinisen mikrobiologian työohjeet



Pinja Kyllönen, Elina Lagus ja Samuel Niskanen TB171SP

Savonia-ammattikorkeakoulu

Sisällysluettelo

1 Johdanto	4
2 Yleistä toiminta- ja työskentelyohjeita.....	5
2.1 Mikrobiologian harjoitustuntien säännöt:	5
2.2 Aseptinen työskentely	6
2.3 Jätteiden oikea jaottelu	7
3 Bakteerinäytteet.....	8
4 Bakteerien kasvattaminen ja viljeleminen	9
5 Sauva- ja kokkibakteereille yhteisiä tunnistuskokeita	11
5.1 Bakteerien mikroskooppinen tarkastelu.....	11
5.2 Gram-värjäys.....	11
5.3 Kromogeeninen malja	13
5.4 Katalaasikoe.....	14
5.5 Oksidaasikoe.....	15
6 Gram-negatiivisten sauvojen tunnistuskokeita	16
6.1 Laktoosinkäyttö	16
6.2 API 10 S ja API 20 E.....	17
6.3 C-390-koe	22
6.4 Haemophilusten tunnistuskokeita	23
6.3.1 Satelliittikoe.....	23
6.3.2 Farktorikoe.....	24
7 Gram-positiivisten kokkien tunnistuskokeita	26
7.1 Gram-positiiviset ryhmäkokit	26
7.1.1 Koagulaasikoe.....	26
7.1.2 Staphylococcus aureuksen tunnistaminen Prolex™ Staph Latex Kit-testin avulla	27
7.1.3 Staphylococcus aureuksen tunnistaminen SAIDE chromID™ S. aureus Elite -maljalta (Biomerieux™).....	28
7.2 Gram-positiiviset ketjukokit.....	29
7.2.1 Hemolyysikoe.....	29
7.2.2 Optokiinikoe	30
7.2.3 Basitrasiinikoe	31
7.2.4 Streptokokkien antigeeninen eli Lancefieldin ryhmitys agglutinaatiokokeella	32
7.3 D-ryhmän streptokokit = enterokokit	34
7.3.1 Sappieskuliinikoe.....	34
7.3.2 Arabinoosikoe	35
7.3.3 Telluriinikoe.....	36
8 Herkkyysmääritykset	37
8.1 β-laktamaasikoe.....	39
9 Muita mikrobiologisia tunnistuskokeita	40
9.1 Seerumikoe eli itutesti.....	40

9.2 Nielun pikatesti.....	41
Lähteet.....	42
Liitteet.....	43

1 Johdanto

Tämä työohje on tarkoitettu Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman kliinisen mikrobiologian harjoitustunneille. Työohje sisältää harjoitustyötunneilla tehtävien tunnistus- ja herkkyyskokeiden ohjeet. Työohjeen alusta löydät myös yleisiä toiminta- ja työskentelyohjeita. Lisäksi työohjeessa on liitteenä yleisimpien bakteereiden tunnistamista helpottavia tunnistuskaavioita. Sinun tulisi kerrata nielu- ja veriviljelyn sekä virtsan bakteeriviljelynäytteen näytteenotto-ohjeet ennen harjoitustunteja.

Työohjeessa olevat ohjeet ovat kaikki tällä hetkellä kliinisen mikrobiologian laboratoriossa käytettyjä bakteereiden tunnistus- ja herkkyyskokeita. Työohjeeseen on hyvä tutustua huolellisesti jo ennen harjoitustunteja, jotta osaat toimia oikein ja turvallisesti.

Työohje on päivitetty 2020 opinnäytetyönä vanhan työohjeen pohjalta. Työohjeen käyttöoikeudet on luovutettu Savonia-ammattikorkeakoululle.

Toivotamme mielenkiintoisia ja mukavia hetkiä mikrobiologian kiehtovassa maailmassa!

2 Yleistä toiminta- ja työskentelyohjeita

Kliinisen mikrobiologian laboratoriossa tulee työskennellä huolellisesti ja tarkasti, koska työskentelet tauteja aiheuttavien bakteerien kanssa. Laboratoriossa tulee toimia sovittujen sääntöjen mukaisesti. Sääntöjä noudattamalla takaat oman sekä toisten turvallisuuden laboratoriossa ja sen ulkopuolella. Tutustu alla oleviin ohjeisiin ENNEN laboratorioon menoa!

2.1 Mikrobiologian harjoitustuntien säännöt:

- Pukeudu asianmukaisesti suojavaatteisiin (lyhythihainen jakku ja housut) ja työkenkiin ennen harjoitustunneille menoa
 - Huomioi suojavaatteiden alla olevat vaateet, jottet kuljeta bakteereita laboratorioluokan ulkopuolelle
 - Suojavaatteissa EI saa lähteä laboratorion ulkopuolelle
 - Laita suojavaatteet pesuun harjoitusviikon jälkeen
- Käytä tarvittaessa muita asiaankuuluvia suojarusteita
 - Suojakäsineet, suu-nenäsuojus ja suojalasit
- Ehjä iho on paras suoja. Tarkista kätesi ja peitä mahdollinen haava laastarilla sekä käytä suojakäsineitä
- Laboratorioluokassa EI saa syödä eikä juoda
- Älä laita sormia tai kyniä suuhun laboratoriossa
- Älä koskettele kasvojasi tai hiuksiasi
 - Pitkien hiusten on oltava kiinni
- Älä kaivele korviasi, nenääsi tai kynnenalusiasi
- Sormuksia, kelloja, suuria kaula- ja korvakoruja EI saa käyttää
- Pese ja desinfioi kädet huolellisesti ENNEN työskentelyn aloittamista sekä laboratorioluokasta poistumista
 - Puhelimen käyttö: Desinfioi kädet ennen puhelimen käyttöä sekä sen jälkeen
- Älä työskentele työohjeen päällä
- Ole huolellinen: tutustu kittien ja reagenssien turvalausekkeisiin, lue käyttöohjeet ja noudata niitä
- Pidä työpisteesi puhtaana
 - Puhdista työtasosi ennen töiden aloittamista sekä työpäivän päätteeksi
 - Puhdista työtasosi heti etanolilla, jos siihen roiskahtaa näytettä tai muuta näytettä sisältävää materiaalia
- Siivoa työpisteesi työpäivän loppuun ja järjestele tavarat oikeille paikoilleen yhdessä muiden kanssa
 - Hävitä jätteet ohjeen mukaisesti
 - Muista sammuttaa kaasut

2.2 Aseptinen työskentely

Aseptisellä työskentelyllä pyritään estämään ja ehkäisemään mikrobien leviämistä ympäristöön, itseensä tai muihin ihmisiin. Aseptiseen toimintaan vaikuttaa myös oma henkilökohtainen hygienia, terveys ja oma toiminta. Kellojen ja sormusten alle jää usein vettä, jolloin ne tarjoavat edulliset olosuhteet bakteerien kasvuille, ja niiden käyttöä tulee välttää laboratoriotyöskentelyssä. Lisäksi tulee välttää kynsilakan käyttöä sekä kiinnittää huomiota kynsien pituuteen. Rikkinäinen kynsilakan pinta ja pitkien kynsien alusta tarjoavat oivan kasvualustan bakteereille. Kaula- ja korvakorut taas saattavat kontaminoitua laboratorion bakteereista, jolloin viet bakteerit mukana laboratorion ulkopuolelle. Myös nenän ja suun alueiden tai ihon epäpuhtauksien ja näppyloiden koskettelua tulee välttää. On myös tärkeää hallita oikeanlaiset yskimis- ja niistämistavat, jotta et aiheuta näytteeseen kontaminaatiota. Edellä mainittuja kohtia noudattamalla voi ehkäistä kontaminaatioiden syntyä.

Suurimpana vaikuttajana aseptiseen toimintaan on oma aseptinen omatunto. Tällä tarkoitetaan aseptisiä toimintatapoja ja työjärjestystä, joita työntekijä noudattaa. Se tarkoittaa siis sitoutumista aseptisten sääntöjen noudattamiseen omassa työskentelyssään. Käsihygienia on yksi tärkeä vaikuttava tekijä aseptisuuteen mikrobiologian laboratoriossa. Käsien pesu tulee aina suorittaa ennen laboratorioon menoa ja ennen sieltä lähtöä. Käsien pesu tulee tehdä aina huolellisesti ohjeita noudattaen. Suojakäsineitä tulee käyttää tarvittaessa. Käytä käsineitä esimerkiksi silloin, kun käsien iho ei ole ehjä tai käsiteltäessä erityistä huomiota vaativia bakteereita

2.3 Jätteiden oikea jaottelu

Mikrobiologian harjoitustunneilla syntyy monenlaista jätettä, jotka tulee hävittää oikeaoppisesti.

Välineiden ja näytteiden hävitykseen on erittäin tärkeää kiinnittää huomiota ja syntynyt jäte tulee AINA laittaa sille tarkoitettuun jäteastiaan. Alla on lueteltu muutamia vinkkejä, siitä minne mikäkin jäte kuuluu:

Sekajäte:

- Työvälineet

Terveystieteiden erityisjäte

- Tartuntavaarallinen, biologinen jäte
 - Elatusainemaljat kannet teipattuna
 - Sauvat ym. muut bakteereita sisältävät työvälineet ensin suljettavaan pussiin
- Tapaturmavaarallinen jäte
 - Neulat

Ongelmajäte:

- Katso käyttöturvatiedotteet
- Värjäysaineet
 - Erilliseen merkittyyn astiaan: VÄRIJÄTE
- Etanoli-asetoni
 - Erilliseen merkittyyn astiaan: ONGELMAJÄTE
- Reagenssit

Tietosuojajäte:

- Jäte, joka sisältää henkilötietoja

Hyötyjäte

- Paperi, pakkaukset jne.
- Lasi

3 Bakteerinäytteet

Mikrobiologisia näytteitä otetaan esimerkiksi verestä, ulosteesta, virtsasta, haavoista sekä limakalvoilta. Hyvä mikrobiologinen näyte on otettu oikeasta paikasta, oikeaan aikaan sekä säilytetty asianmukaisesti ennen laboratorioon toimittamista. Mikrobiologisen näytteen laatu ja näytteenottotapa riippuvat epäiltävästä tulehduksesta sekä sitä aiheuttavasta mikrobista. Näyte vaatii aina lähetteen, josta tulee ainakin ilmetä henkilötiedot, näytteenottoaika, tarkka näytteenottoaika ja näytelaatu. Lähetteessä voi olla tietoa myös perussairauksista, käytössä olevasta antibiootista ja muista lääkkeistä.

Mikrobiologisia näytteitä ottavat lääkärit ja muu hoitohenkilökunta mutta myös bioanalyttikot ja potilaat itse. Bioanalyttikolla on iso rooli näytteenoton asiantuntijana ja etenkin potilasnäytteenotossa on tärkeää antaa oikeanlaiset ohjeet näytteenottoon tutkimuksen onnistumisen kannalta. Siksi on erittäin tärkeää ymmärtää mikrobiologisen näytteenoton peruseriaatteet. **Kertaa nielu- ja veriviljelyn sekä virtsan bakteeriviljelyn näytteenotto-ohjeet ennen harjoitustunteja.**

4 Bakteerien kasvattaminen ja viljeleminen

Bakteerien tunnistamista varten bakteerinäytteet viljellään keinotekoisille elatusaineille, jotka voivat olla joko kaupallisia tai itse laboratoriossa valmistettuja. Elatusaineet valitaan aina etsittävän bakteerin mukaan, sillä eri bakteereilla on erilaisia kasvuvaatimuksia. Elatusaineet sisältävät bakteerien kasvamiselle ja lisääntymiselle tarpeellisia ravintoaineita, kuten erilaisia orgaanisia ja epäorgaanisia kemiallisia yhdisteitä. Elatusaineissa on eläimistä tai kasveista peräisin olevia aineita kuten verta, seerumia ja lihauutetta. Maljoihin on joskus myös lisätty antibiootteja muiden bakteerien kasvun estämiseksi.

Viljelyissä käytetään eniten kiinteitä ravintoalustoja eli viljelymaljoja. Kiinteä pohja saadaan merilevähajaisesta agarista. Kiinteällä ravintoalustalla bakteerit kasvavat erillisinä pesäkkeinä, joten pesäkkeitä on helppo ottaa maljan pinnalta tunnistuskokeita varten. Bakteerien tunnistamisen apuna voidaan hyödyntää pesäkemorfologian tarkastelua.

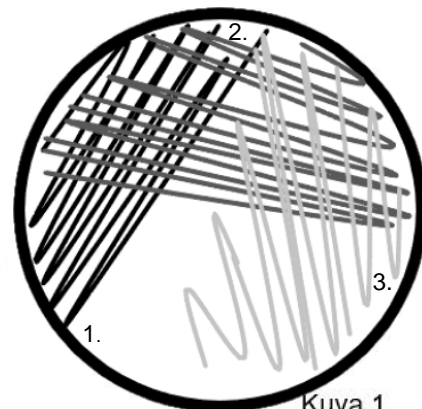
Puolikiinteät ravintoalustat sisältävät vähemmän agaria kuin kiinteät ravintoalustat. Puolikiinteitä ravintoalustoja hyödynnetään liikkuvien ja liikkumattomien bakteerien erottamiseksi toisistaan.

Nestemäisten ravintoliuoksien tavallisin elatusaine on lihaliemi. Nestemäisiä ravintoliuoksia hyödynnetään rikastusviljelyissä ja kasvattaessa suuria bakteerimääriä.

Viljelyjä tehtäessä tulee huomioida myös bakteerin kasvulle sopiva ympäristö. Kasvuun vaikuttavat muun muassa lämpötila, kosteus, pH, osmoottinen paine, hapen ja hiilidioksidin määrä. Happea vaativat bakteerit kasvatetaan normaalissa lämpökaapissa, mutta hiilidioksidia vaativat bakteerit kasvatetaan hiilidioksidikaapissa. Tilanteissa, joissa ei ole käytettävissä hiilidioksidikaappia, voidaan maljat laittaa eksikaattorissa lämpökaappiin +35–36 °C. Eksikaattorista poistetaan happi polttamalla sen hiilidioksidiksi palavan kynttilän avulla. Kynttilä sammuu itseksensä hapen loputtua, mutta valvo ja varmista kynttilän sammuminen.

Rikastusviljely

Tarkoitus on saada näytteessä oleva bakteeri kasvamaan runsaana nestemäisessä elatusaineessa. Esimerkiksi veriviljely on rikastusviljely.

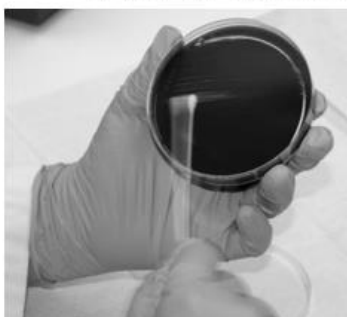


Kuva 1

Hajotusviljely

Tarkoitus on saada näytteessä oleva bakteeri kasvamaan erillisinä pesäkkeinä

1. Viljele näytteenottotikulla näytettä 1/3:lle maljaa (kuva 2)
2. Vaihda puhdas viljelysauva ja viljele kohtisuoraan edellisestä viljelystä (kuva 3)
3. Vaihda vielä toinen puhdas viljelysauva ja viljele malja loppuun. Tee maljaan tarvittavat merkinnät: näyttenumero, viljely pvm (kuva 4)



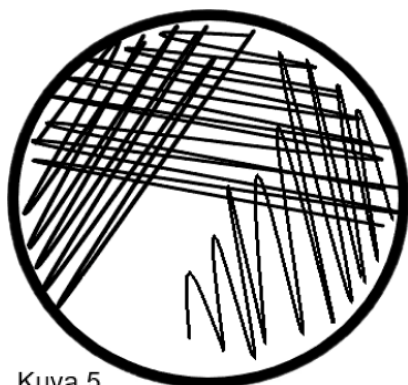
Kuva 2 Viljele 1/3 maljasta



Kuva 3 Viljele kohtisuoraan viljelystä



Kuva 4 Tee tarvittavat merkinnät



Kuva 5

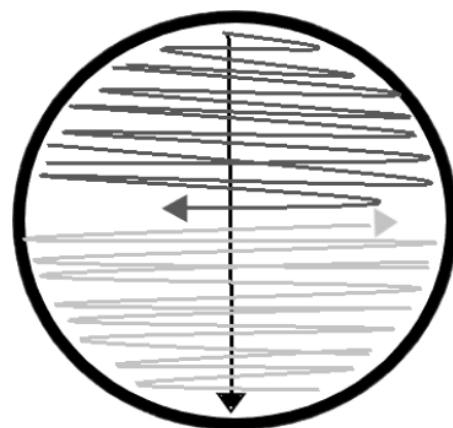
Puhdasviljely

Tarkoituksena on saada samaa bakteeria kasvamaan runsaasti jatkotutkimuksia varten.

1. Ota tutkittavaa bakteeria viljelysauvalla sen pesäkkeistä HUOM! Vältä kontaminaatiota pesäkkeitä poimiessasi
2. Tee viljely samalla tavalla kuin hajotus (koko viljelyn voi tehdä samalla sauvalla).

Virtsaviljely

1. Sekoita virtsanäyte huolellisesti ennen viljelyä.
2. Kasta 1 µl:n silmukka virtsaan työntämällä se n. 3 kertaa hieman näytteen pinnan alle.
3. Vedä silmukalla veto koko maljan poikki
4. Viljele malja siksak vedoin ylhäältä puoleen väliin, sitten käännä malja ja viljele taas ylhäältä puoleen väliin. Silmukka EI saa koskea maljan reunoja.



Kuva 6

5 Sauva- ja kokkibakteereille yhteisiä tunnistuskokeita

5.1 Bakteerien mikroskooppinen tarkastelu

Bakteereiden tunnistaminen mikroskopoimalla on yksi mikrobiologian perinteisimmistä bakteereiden tunnistusmenetelmistä. Ennen mikroskopointia näytteet yleensä värjätään. Yleisin mikrobiologian värjäysmenetelmistä on gramvärjäys. Käytössä on myös useita muita värjäysmenetelmiä esimerkiksi erilaiset happovärjykset. Työohjeesta löytyy ohje gramvärjäyksen suorittamiseen.

Etsi aluksi näkökenttä 10-kertaisella suurennuksella. Sen jälkeen tutki bakteereita 100-kertaisella suurennoksella immersioöljyn kanssa. Valmista preparaattia mikroskopoidessasi kiinnitä huomiota ainakin seuraaviin asioihin:

1. Värjäytyvyyteen (gram-negatiivinen/positiivinen)
2. Muotoon (kokki, sauva)
3. Bakteereiden ryhmittymiseen (ryhmä, ketju)

HUOM! Muista ottaa huomioon myös mahdolliset artefaktat, sillä bakteereiden morfologia voi muuttua esimerkiksi antibiootihoidon seurauksena.

5.2 Gram-värjäys

Periaate

Värjäyksen erot perustuvat gram-positiivisten ja gram-negatiivisten bakteerien soluseinämien rakenteeroihin. Gram-negatiivisten bakteerien soluseinäma sisältää etanoliliukoisia lipidejä, jonka vuoksi kristallivioletti-jodikompleksi pääsee poistumaan solusta alkoholikäsitteilyn yhteydessä. Gram-positiivisilla bakteereilla alkoholikäsitteily kutistaa paksun peptidoglykaaniseinämän, jolloin muodostuu tiheä polymeeriverkko, jonka läpi kristallivioletti-jodikompleksi ei mahdu poistumaan.

Alkoholikäsitteilyn yhteydessä gram-negatiivisista bakteereista tulee "värittömiä", siksi lopuksi suoritetaan vastavärjäys safrariinilla.

Välineet

Objektilasi, laboratoriotikku tai viljelysauva, imupaperi

Reagenssit: 0,9 % NaCl (tai steriili vesi) Kristallivioletti 2 %, Lugolin liuos, etanoliasetoni värinpoistoliuos (1:1) ja safraniini

Suoritus

Valmisteen teko

1. Tiputa pisara 0,9 % NaCl:a objektilasille
2. Ota viljelysauvalla tutkittavaa näytettä
3. Sekoita näyte objektilasilla olevaan pisaraan
4. Ilmakuivaa preparaatti, jonka jälkeen värjää se

Näyte voidaan ottaa suoraan potilaasta (esim. likvor- ja nivelneste), maljalta (hajotus- tai puhtasviljelmältä) tai ravintoliuoksesta (esim. veriviljelypullosta).

Värjäys

1. Kiinnitä preparaatti kuumentamalla.
2. Anna lasin jäähtyä ennen värin lisäämistä.
3. Peitä kiinnitetty näytealue kristallivioletilla, anna värin vaikuttaa 1 minuutti.
4. Poista väri huuhtelemalla Lugolin liuksella.
5. Peitä näytealue Lugolin liuksella, anna vaikuttaa 1 minuutti.
6. Huuhdo ylimääräinen Lugolin liuos pois juoksevalla vedellä.
7. Huuhdo preparaatti värinpoistoliuksella noin 30 sekuntia.
8. Huuhdo preparaatti nopeasti juoksevalla vedellä.
9. Peitä näytealue safraniinin liuksella ja anna vaikuttaa 30 sekuntia.
10. Huuhdo nopeasti juoksevalla vedellä.
11. Kuivaa lasi imupaperilla, anna kuivahtaa hetki ilmassa ja mikroskopoi.

Virhelähteet

Liian vanha pesäke voi aiheuttaa gram-positiivisen bakteerin virheellisen värjäytymisen gram-negatiiviseksi.

Tuloksen tulkinta

Gram-positiivinen → Sininen / Tummanvioletti

Gram-negatiivinen → Punainen

5.3 Kromogeeninen malja

CHROMagar™Orientation-malja on tarkoitettu helpottamaan erityisesti virtsateiden patogeenisten bakteereiden tunnistusta visuaalisesti. Sitä voidaan kuitenkin käyttää myös muiden näytelaatujen bakteeriviljelyissä.

Periaate

Tässä kasvatusalustassa käytetty kromogeeni saa bakteerit kasvamaan niille ominaisen värisinä pesäkkeinä. Kromogeeni on molekyyli, joka on kiinnitetty tiettyyn spesifisen entsyymiaktiivisuuden reagoivaan substraattiin. Kun maljalle viljelty bakteeri alkaa kasvaa ja tuottaa entsyymiä kromogeeni irtoaa substraatista ja alkaa tuottaa bakteerille tyypillistä väriä. Kromogeeninen malja on erittäin spesifinen menetelmä, joka tunnistaa esimerkiksi *E.colin* 99,3 prosentin herkkyydellä. Voimakkaat kromogeeniset värit tulevat esille kasvualustalla 18–24 tunnin inkuboinnin jälkeen.

CHROMagar™Orientation-maljaa tarkastellessa värillisten bakteeripesäkkeiden ansiosta on helpompaa erottaa, jos maljalla kasvaa useampi kuin yksi bakteerilaji.

Välineet

Kromogeeninen malja, viljelysauva tai -silmukka.

Suoritus

1. Viljele näytettä tai bakteerisuspensiota kromogeeniselle maljalle.
2. Inkuboi maljaa lämpökaapissa +35–36 °C:ssa yön yli.
3. Tarkastele bakteeripesäkkeiden väriä ja ulkonäköä.

Tulosten tulkinta

E.coli → tumma pinkki

Enterococcus → pienet turkoosit pesäkkeet, ”kuiva”

Klebsiella, *Enterobacter*, *Serratia* → metallin sininen, ”limainen”

P.aeruginosa → läpikuultava, hohtava

S.aureus → pienet vaalean keltaiset pesäkkeet

Proteus → ruskea halo

Citrobacter → metallin sininen, punertava halo

S.saprophyticus → pienet vaalean pinkit pesäkkeet

Candida albicans → vaalea, väritön

5.4 Katalaasikoe

Käytetään streptokokkien ja stafylokokkien erotusdiagnostiikassa.

Periaate

Stafylokokkien tuottama katalaasientsyymi hajottaa vetyperoksidin hapeksi ja vedeksi, mikä ilmenee kuplintana.

Välineet

Objektilasi/maljan kansi, viljelysilmukka/-sauva tai laboratoriotikku

Reagenssi: 3 % vetyperoksidi

Suoritus

1. Tiputa aluslasille 1–2 tippaa 3 % vetyperoksidiä.
2. Ota steriilillä silmukalla/sauvalla/puutikulla bakteerimassaa maljalta.
3. Suspensoi bakteerimassa vetyperoksidi pisaraan.
4. Tarkastele kuohuuko näyte.

Virhelähteet

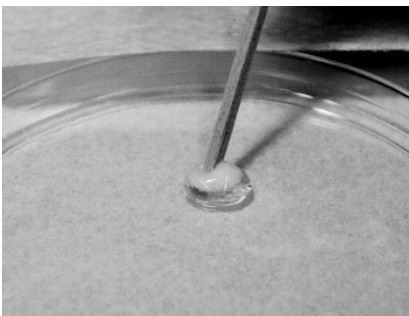
Testi suositellaan tehtäväksi verettömällä alustalla kasvaneista pesäkkeistä tai varovasti pelkkää bakteerimassaa poimien verialustalta. Punaiset verisolut saattavat aiheuttaa kuplintaa. Kuplinta on tosin heikompaa verrattuna positiiviseen tulokseen.

Platinasilmukkaa ei tulisi käyttää, koska se aiheuttaa kuplintaa ollessaan tekemisissä vetyperoksidin kanssa.

Tuloksen tulkinta

Katalaasi positiivinen (stafylokokki) → Vetyperoksidi kuohuu (kuva 7)

Katalaasi negatiivinen (streptokokki) → Vetyperoksidi ei kuohu



Kuva 7 Vetyperoksidi kuohuu (positiivinen tulos)

5.5 Oksidaasikoe

Käytetään gram-negatiivisten bakteereiden erotteluun. Oksidaasi-positiivisia bakteereja ovat esimerkiksi Aeromonakset, Plesiomonakset, Kampylobakteerit, Neisseriat sekä osa Pseudomonaksista ja Pasteurelloista.

Periaate

Oksidaasiposiitiivisen bakteerin sisältämä sytokromioksidaasi hapettaa oksidaasireagenssin (tetrametyyli-p-fenyleenidiamiini dihydrokloridi) indofenoliksi, mikä ilmenee sinertävänä tai violetin sävyisenä värinä.

Välineet

Imupaperi, laboratoriotikku/viljelysauva

Reagenssit: Oksidaasireagenssi (Biomerieux™)

Suoritus

Testi suositellaan tehtäväksi epäselektiiviseltä maljalta.

Kostuta pala imupaperia (tai muuta huokoista paperia) oksidaasireagenssilla. Ota tutkittavaa pesäkettä steriilillä puutikulla/viljelysauvalla ja hiero se kostutetulle imupaperille.

Tuloksen tulkinta

Oksidaasiposiitiivinen → Sininen / Violettiväri (10–30 sekunnin kuluessa!)

Oksidaasinegatiivinen → Ei värin muutosta

6 Gram-negatiivisten sauvojen tunnistuskokeita

6.1 Laktoosinkäyttö

Osa enterobakteereista on laktoosiposiitivisia ja osa laktoosinegatiivisia. Suolistopatogeenit, kuten Salmonella ja Shigella ovat laktoosinegatiivisia. Proteukset ja Pseudomonakset ovat myös negatiivisia. E.coli -kannoissa on molempia, mutta yleisimmin ne ovat laktoosiposiitivisia.

Periaate

Bakteeri käyttää kasvualustansa laktoosia, mikä ilmenee maljan värin muutoksena.

Välineet

Cled-malja, viljelyvälineet

Suoritus

1. Viljele tutkittavaa bakteeria Cled-maljalle.
2. Inkuboi maljaa lämpökaapissa +35–36 °C:ssa yön yli.
3. Tarkastele mahdollista värin muutosta maljalla.

Tuloksen tulkinta

Laktoosiposiitivinen → Keltainen

Laktoosinegatiivinen → Sininen / Vihreä

6.2 API 10 S ja API 20 E

Periaate

Gram-negatiiviset sauvat ja enterobakteerit voidaan luokitella ja nimetä tutkimalla niiden biokemiallisia ominaisuuksia. API 10 S – liuska sisältää 10 mikrotaskua, joissa on kuivattuja substraatteja. API 20 E-liuskalla näitä mikrotaskuja on 20. Bakterin aineenvaihdunta aiheuttaa värinmuutoksen, jota tulkitaan testin mukana tulevan taulukon avulla tai APIWeb-ohjelmalla.

Välineet

API-testiliuska ja -kotelo, steriiliä vettä, koeputki, Cled-malja, viljelysauva, Pasteur-pipetti, steriiliä parafiiniöljyä

Reagenssit: TDA-reagenssi (ferrikloridi), indolireagenssi (James), NIT1- ja NIT2-reagenssi, API 20 E testissä lisäksi VP1 ja VP2 reagenssit

Suoritus

API 10 S:

1. API-kotelon pohjalle kaadetaan hieman steriiliä tislattua vettä kosteuden ylläpitämiseksi. Tunnistetiedot kirjoitetaan kotelon pidennettyyn päähän. Liuska laitetaan koteloon.
2. Otetaan yksi pesäke tutkittavaa bakteeria ja suspensoidaan se 3 ml:aan steriiliä tislattua vettä koeputkessa.
3. Pasteur-pipetillä lisätään bakteerisuspensiota kaikkiin liuskan taskuihin liuskaa kallistaen, ilmakuplien syntymistä tulisi välttää. ICITI – taskussa täytetään myös kuplaosa bakteerisuspensiolla.
4. Bakteerisuspensiosta tehdään lisäksi häntämalja testin puhtauden ja bakteerin laktoosin käytön tarkastelemiseksi. Häntämalja tehdään viljelemällä bakteerisuspensiota Cled-maljalle. Vie malja inkuboitumaan lämpökaappiin +35–36 °C:een yön yli.
5. LDC-, ODC-, H₂S- ja URE- taskuissa täytetään kuplaosat öljyllä anaerobisen ilmaston luomiseksi. Varotaan kontaminoimasta pullossa olevaa öljyä bakteerisuspensiolla!
6. Sulje kotelo kannella ja inkuboi sitä lämpökaapissa +35–36 °C:ssa yön yli.
7. Seuraavana päivänä lisätään TDA-taskuun tippa TDA-reagenssia (ferrikloridia) ja IND-putkeen tippa indolireagenssia (James).
8. GLU-tuloksen lukemisen jälkeen taskuun lisätään yksi tippa NIT1-reagenssia, jonka jälkeen siihen lisätään myös yksi tippa NIT2-reagenssia. Tulos on positiivinen, jos väri muuttuu punaiseksi.
9. Tulokset luetaan värimuutosten perusteella reagenssivalmistajan ohjeen mukaan.

Tuloksen tulkinta

Tulkintataulukon avulla merkitään kunkin testin kohdalle + tai - tulosliuskaan. Siinä testit on eritelty kolmen ryhmiin ja pisteytetty 1, 2 ja 4. Jokaisessa ryhmässä lasketaan positiivisten tulosten pisteet yhteen ja näin saadaan nelinumeroinen profiili, jota verrataan testivalmistajan taulukkoon.

API 10 S:N TULKINTATAULUKKO

Testi	Negatiivinen tulos	Positiivinen tulos
ONPG	väritön	keltainen
GLU	sininen	keltainen / sinivihreä
ARA	sininen / sinivihreä	keltainen
<u>LDC</u>	keltainen	oranssi
<u>ODC</u>	keltainen	punainen / oranssi
<u>ICITI</u>	vaalean vihreä / keltainen	sinivihreä / sininen
<u>H₂S</u>	väritön / harmahtava	musta sakka / ohut viiva
<u>URE</u>	keltainen	punainen / oranssi
TDA *	keltainen	tumman ruskea
IND *	väritön / vaal.vihreä / keltainen	vaalean punainen
OX	väritön	violetti
NO ₃ -NO ₂	keltainen	punainen

*Värimuutos välittömästi reagenssilisäyksen jälkeen!

Lopuksi tarkastellaan häntämalja, josta nähdään bakteerin laktoosinkäyttö, kasvaminen maljalla ja kasvaako se puhtaana (kontaminaatioiden mahdollisuus tekovaiheessa).

Suoritus

API 20 E:

1. API-kotelon pohjalle kaadetaan noin 5ml steriiliä tislattua vettä kosteuden ylläpitämiseksi. Tunnistetiedot kirjoitetaan kotelon pidennettyyn päähän. Liuska laitetaan koteloon.
2. Otetaan yksi pesäke tutkittavaa bakteeria ja suspensoidaan se 5 ml:aan steriiliä tislattua vettä koeputkessa.
3. Pasteur-pipetillä lisätään bakteerisuspensiota kaikkiin liuskan taskuihin liuskaa kallistaen, ilmakuplien syntymistä tulisi välttää. ICITI -, IVPI- ja IGELI-taskussa täytetään myös kuplaosa bakteerisuspensiolla.
4. Bakteerisuspensiosta tehdään lisäksi häntämalja testin puhtauden ja bakteerin laktoosin käytön tarkastelemiseksi. Häntämalja tehdään viljelemällä bakteerisuspensiota Cled-maljalle. Vie malja inkuboitumaan lämpökaappiin +35–36 °C:een yön yli.
5. ADH-, LDC-, ODC-, H₂S- ja URE- taskuissa täytetään kuplaosat öljyllä anaerobisen ilmaston luomiseksi. Varotaan kontaminoimasta öljyruiskun neulaa bakteerisuspensiolla!
6. Sulje kotelo kannella ja inkuboi sitä lämpökaapissa +35–36 °C:ssa yön yli.
7. Seuraavana päivänä lisätään TDA-taskuun tippa TDA-reagenssia (ferrikloridia), IND-putkeen tippa indolireagenssia (James), VP-taskuun lisätään yksi tippa VP1-reagenssia, jonka jälkeen siihen laitetaan myös yksi tippa VP2-reagenssia.
8. Tulokset luetaan värimuutosten perusteella reagenssivalmistajan ohjeen mukaan.

Tuloksen tulkinta

Tulkintataulukon avulla merkitään kunkin testin kohdalle + tai - tulosliuskaan. Liuskan tulokset syötetään valmistajan internet-sivuilla olevaan API 20E tulostenlukijaan osoitteessa:

<https://apiweb.biomerieux.com>

API 20 E:N TULKINTATAULUKKO

Testi	Negatiivinen tulos	Positiivinen tulos
ONPG	väritön	keltainen
<u>ADH</u>	keltainen	punainen / oranssi
<u>LDC</u>	keltainen	punainen / oranssi
<u>ODC</u>	keltainen	punainen / oranssi
<u>ICITI</u>	vaalean vihreä / keltainen	sinivihreä / sininen
<u>H₂S</u>	väritön / harmahtava	musta sakka / ohut viiva
<u>URE</u>	keltainen	punainen / oranssi
TDA *	keltainen	punaruskea
IND *	väritön / vaalean vihreä / keltainen	vaaleanpunainen
<u>IVPI</u> **	väritön	vaalean punainen / punainen
<u>IGELI</u>	ei leviämistä	mustan pigmentin leviäminen
GLU	sininen / sinivihreä	keltainen / harmahtavan keltainen
MAN	sininen / sinivihreä	keltainen
INO	sininen / sinivihreä	keltainen
SOR	sininen / sinivihreä	keltainen
RHA	sininen / sinivihreä	keltainen
SAC	sininen / sinivihreä	keltainen
MEL	sininen / sinivihreä	keltainen
AMY	sininen / sinivihreä	keltainen
ARA	sininen / sinivihreä	keltainen

*Värimuutos välittömästi reagenssilisäyksen jälkeen!

** Odota mahdollista värin muutosta vähintään 10min

Lopuksi tarkastellaan häntämalja, josta nähdään bakteerin laktoosinkäyttö, kasvaminen maljalla ja kasvaako se puhtaana (kontaminaatioiden mahdollisuus tekovaiheessa).

6.3 C-390-koe

C390-koetta käytetään erottamaan *Pseudomonas aeruginosa* muista *Pseudomonas*-lajeista.

Periaate

*Pseudomonas aeruginosa*lla on spesifinen resistenssi 9-chloro-9-(4-diethylaminophenyl) -10-phenylacridan-antimikrobilääkkeelle (C-390).

Välineet

Viljelyvälineet, pumpulipuikko, Müller-Hinton-malja, dreijja, DensiCHEK

Reagenssit: C-390-kiekko, 0,9% NaCl

Suoritus

1. Tee tutkittavasta bakteerista 0,5 McFarlandin vahvuinen bakteerisuspensio keittosuolaliuokseen. Tarkista suspension vahvuus DensiCHEK:llä.
2. Dreijaa maljalle tutkittavaa bakteerisuspensiota.
3. Aseta C-390-kiekko viljelmän päälle.
4. Inkuboi maljaa yön yli 35–36 °C.
5. Mittaa estorengas suuruus.

Tulosten tulkinta

Pseudomonas aeruginosa → R, eli estorengas alle 12 mm

Muu *Pseudomonas*-laji → S, eli estorengas yli 12 mm

6.4 Haemophilusten tunnistuskokeita

Haemophilukset ovat pieniä gram negatiivisia sauvoja (joskus hyvin kokkimainen. Värjäyksessä voi myös näkyä pidempiä, ohuita sauvoja pienten sauvojen joukossa). Haemophilukset kolonisoivat nenänielua ja suun limakalvoja, joten sieltä ovat tavallisimmat infektiotkin lähtöisin: otiitti, sinuiitti ja konjunktiviitti. Ihmisellä yleisimpiä taudinaiheuttajia ovat *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae* ja *H. aphrophilus*.

Bakteerisuvun erikoisuus on *H. ducreyi*, joka aiheuttaa pehmeän sankkerin (sukupuolitauti).

Haemophilukset kasvavat suklaamaljalla pieninä harmaina pesäkkeinä. Verimaljalla ne eivät yleensä kasva puhtasviljelmänä (huom. satelliittikoe).

6.3.1 Satelliittikoe

Periaate

Haemophilukset tarvitsevat verimaljalla kasvaakseen lähelleen toisen bakteerin, joka hemolysoi punasoluja ja näin maljalta vapautuu haemophilusten tarvitsemia kasvutekijöitä.

Välineet

Verimalja, viljelyvälineet ja *Staphylococcus aureus*-kanta.

Suoritus

Tutkittava bakteeri viljellään verimaljalle siksak-viljelmänä, jonka yli vedetään viiva *Staphylococcus aureus*-kanta uudella steriilillä viljelysauvalla.

Inkuboi maljaa CO₂:ssa yön yli +35–36 °C.

Tuloksen tulkinta

Kaikki Haemophilukset ovat satelliitti-positiivisia (= *S. aureus* viiva kasvaa voimakkaasti ja sen läheisyydessä Haemophilus pieneä pesäkkeenä), paitsi *H. aphrophilus*, joka kasvaa verimaljalla CO₂:ssa.

6.3.2 Farktorikoe

Periaate

Eri haemofiluslajit tarvitsevat erilaisia kasvutekijöitä, joiden avulla ne voidaan erottaa toisistaan. X-kiekkko sisältää hemiiniä, V-kiekkko NAD:ia ja XV-kiekkko hemiiniä että

NAD:ia. Viljelyyn käytettävä Müller-Hinton-malja ei sisällä hemiiniä tai NAD:ia.

Välineet

Koeputki, Müller-Hinton-malja, dreijja, pumpulipuikko ja DensiCHEK

Reagenssit: X-, V- ja XV-kiekkot, 0,9 % NaCl



Kuva 8 Faktorikoe maljan merkinnät

Suoritus

1. Tee tutkittavasta bakteerista suspensio 0,9 % NaCl:iin (n.0,5 McFarland). Tarkista suspension vahvuus DensiCHEK:illä.
2. Dreijjaa (katso s. 37) suspensiota tasaisesti Müller-Hinton-maljalle
3. Merkitse faktorikiekkosten X, V ja XV paikat (kuva 8)
4. Aseta faktori kiekkot merkityille paikoille
5. Inkuboi maljaa CO₂:ssa yön yli +35–36 °C.
6. Tarkastele bakteerin kasvua maljalla.

HUOM! 0,5 McFarlandia tarkoittaa n. 10⁸ elävää bakteeria/ml.

Silmämääräisesti suspensio näyttää hiukan samealta.

Tuloksen tulkinta

Bakteerin kasvaessa vain XV-kiekon ympärillä, on kyseessä *Haemophilus influenzae*

Faktori eli kasvutekijävaatimukset:

Bakteeri	X	V
<i>H.influenzae</i>	+	+
<i>H.parainfluenzae</i>	-	+
<i>H.aphrophilus</i>	-	-

Haemophiluksille on oma herkkyysmalja ja – paneeli. Haemophiluksille tehdään lisäksi aina beeta-laktamaasitesti (katso s. 39).

7 Gram-positiivisten kokkien tunnistuskokeita

7.1 Gram-positiiviset ryhmäkokit

7.1.1 Koagulaasikoe

Käytetään erottamaan *Staphylococcus aureus* muista stafylokokkeista. Koagulaasikokeen rinnalla tehdään aina viljely *S.aureus*-selektiiviselle maljalle, tulosten on oltava yhtäläiset.

Periaate

Koagulaasi on termostabiili entsyymi, jota löytyy lähinnä *S.aureuksesta*. Se aiheuttaa ihmis- tai kaninplasman fibrinogeenin koaguloitumisen eli hyytymisen.

Koagulaasientsyymi on myös kahdella muulla stafylokokilla (*S. intermedius* ja *S. Hyiucus*), mutta niitä löydetään vain harvoin kliinisistä näytteistä.

Välineet

Koeputkia, viljelysauva

Reagenssit: Kaupallinen kaninplasma (HUOM! Testaukseen eivät sovi muut eläinplasmat), steriili vesi

Suoritus

Plasma liuotetaan valmistajan ohjeiden mukaan.

1. Suspensoi runsas ymppe tutkittavaa bakteeria n. 0,3 millilitraan plasmaa.
2. Inkuboi putkea +35 °C:ssa yön yli.
3. Tarkastele onko putkeen muodostunut hyytymää, putkea ei saa ravistaa! (kuva 10)



Kuva 10 Koagulaasikokeen tulosten tulkinta: ylemmässä putkessa hyytymä (positiivinen)

Tuloksen tulkinta

Staphylococcus aureus → Putkeen on muodostunut hyytymä.

Koagulaasi negatiivinen stafylokokki → Plasma liikkuu vapaasti, eikä ole havaittavissa olevaa hyytymää.

7.1.2 Staphylococcus aureuksen tunnistaminen Prolex™ Staph Latex Kit-testin avulla

Käytetään erottamaan *Stafylococcus aureus* muista stafylokokkeista.

Periaate

Prolex™ Staph Latex Kitin reagenssi sisältää sinisiä lateksipartikkeleita, jotka ovat herkistettyjä fibrinogeenillä ja IgG:lla. Kun hyytymistekijää ja/tai proteiini A:ta sisältävää *S.aureusta* ja kitin reagenssia sekoittaa keskenään, syntyy nopeasti voimakas agglutinaatio eli sakka. Testi suositellaan tehtäväksi epäselektiiviseltä maljalta.

Välineet

Prolex™ Staph Latex Kit- reagenssit ja -testikortit, viljelysauva, 18–24 tuntia inkuboituja tutkittavia bakteeripesäkkeitä.

Suoritus

1. Ota kitti huoneenlämpöön vähintään 10 minuuttia ennen testin tekoa, jotta reagenssit ovat huoneenlämpöisiä ennen testin aloittamista.
2. Sekoita reagenssipulloa huolellisesti kääntelemällä ylösalaisin useita kertoja.
3. Annostele yksi tippa reagenssia testikortin ympyrään.
4. Ota maljalta kaksi pesäkettä tutkittavaa bakteeria viljelysauvalla/sekoitustikulla ja sekoita ne reagenssin kanssa keskenään pyörivin liikkein testikortin ympyrän alueelle laitoja myöten.
5. Keinuttele testikorttia varovasti edestakaisin 20 sekuntia.
6. Tarkastele onko agglutinaatiota tapahtunut 20 sekunnin jälkeen.
7. Voit parantaa testin luotettavuutta kitin mukana tulevan negatiivisen kontrollin avulla.

Tuloksen tulkinta

Positiivinen tulos, eli agglutinaatio aiheuttaa sakan muodostumisen testiympyrässä.

Staphylococcus aureus → Agglutinaatio

Muu bakteeri → Ei agglutinaatiota

7.1.3 Staphylococcus aureuksen tunnistaminen SAIDE chromID™ S. aureus Elite -maljalta (Biomerieux™)

SAIDE chromID™-malja on suunniteltu *S.aureuksen* tunnistamiseen 18-24 tunnissa.

Periaate

Maljan ravinteikkaan pohjan sisältämät eri peptonit ja kromogeeninen substraatti mahdollistavat *S.aureuksen* kasvun ja suoran tunnistamisen. *S.aureus* voidaan havaita tällöin vaaleanpunaisina pesäkkeinä. Maljan valikoiva seos estää useimpien hiivojen ja muiden kuin *S.aureus*-lajiin kuuluvien bakteerien kasvun.

Välineet

SAIDE chromID™ -malja, viljelyvälineet

Suoritus

1. Viljele tutkittava kanta maljalle joko suoraan pesäkkeestä tai herkkyysuspensiosta. Viljely tehdään pienelle alueelle hajotusviljelynä (yhdelta maljalla voi viljellä useamman näytteen).
2. Inkuboi maljaa 18-24 tuntia +35–36 °C:ssa.
3. Tarkastele maljaa ja bakteeripesäkkeiden värejä.

HUOM! Jos inkubointi ylittää 24 tuntia, pinkit ja oranssit pesäkkeet on varmistettava koagulaasi tai agglutinaatiotestillä.

Virhelähteet

- Jos maljalle siirretty bakteerimäärä on hyvin runsas, viljelykohta näyttää värikkäämmältä kuin itse pesäkkeet.
- Jos maljalle viljellään näyte suoraan ilman hyvää hajotusta, pesäkkeiden väri saattaa jäädä kehittymättä.
- Tietyt koagulaasipostiiviset Stafylokokki-lajit, muu kuin *S.aureus*, voivat myös kasvaa vaaleanpunaisina maljalla
- Jotkin muut lajit esim. Bacillicus ja Klebsiella saattavat tuottaa vaaleanpunaisia pesäkkeitä
- On mahdollista, että jollakin *S.aureus* kannoilla on jokin erityinen kasvuvaatimus, jonka seurauksena ne eivät kasva tai muodosta vaaleanpunaisia pesäkkeitä

Tuloksen tulkinta

S. Aureus → Vaaleanpunainen

7.2 Gram-positiiviset ketjukokit

7.2.1 Hemolyysikoe

Käytetään streptokokkien tunnistamiseen.

Periaate

Streptokokkien erittämät eksotoksiinit hajottavat verimaljan tai streptokokkimaljan punasoluja. Kun punasolut hajoavat kokonaan, syntyy kirkas hemolyysi eli β -hemolyysi. Kun punasolut hajoavat vain osittain syntyy vihreä hemolyysi eli α -hemolyysi. Kun hemolyysia ei ole havaittavissa, puhutaan non-hemolyysistä.

Välineet

Viljelyvälineet, veri- tai streptokokkimalja

Suoritus

Tehdään hajotusviljely veri- tai streptokokkimaljalle. Inkuboi maljaa CO₂-ympäristössä lämpökaapissa +35–36 °C:ssa yön yli.

Virhelähteet

HUOM! myös esim. *E. coli*, muut gram-negatiiviset sauvat, *S. aureus* ja *Listeria monocytogenes* voivat aiheuttaa kirkkaan hemolyysin verimaljalla.

Tuloksen tulkinta

β -hemolyyttinen streptokokki → Kirkas hemolyysi

α -hemolyyttinen streptokokki → Vihreä hemolyysi

Non-hemolyyttinen streptokokki / muu bakteeri → Ei silmin nähtävää hemolyysiä
(Vaalea / Harmahtava kasvu)

7.2.2 Optokiinikoe

Periaate

Optokiini estää pneumokokin kasvua.

Välineet

Verimalja, viljelyvälineet

Reagenssit: Optokiinikiekko ROSCO DIATABS™

Suoritus

1. Viljele tutkittavaa bakteeria verimaljalle tiheäksi kasvustoksi.
2. Aseta optokiinikiekko viljelmän päälle.
3. Inkuboi maljaa CO₂-ympäristössä lämpökaapissa +35–36 °C:ssa yön yli.
4. Mittaa estorenkään halkaisija ja vertaa tulosta optokiinikiekon valmistajan rajoihin.

Tuloksen tulkinta

ROSCO DIATABS™ – optokiinikiekon tulkinta:

S → estorenkään halkaisija on yli 18 mm

R → estorenkään halkaisija on alle 18mm

Optokiinikiekkoja on saatavilla useilta eri valmistajalta, joten tarkista tulkintarajat aina valmistajalta!

7.2.3 Basitrasiinikoe

Periaate

Basitrasiini estää *Streptococcus pyogenes* kasvu.

Välineet

Veri- tai streptokokkimalja tai streptocult alusta

Reagenssit: Basitrasiinikiekko

Suoritus

1. Viljele tutkittavaa bakteeria maljalle tai streptocult alustalle.
2. Aseta basitrasiinikiekko viljelmän päälle.
3. Inkuboi maljaa lämpökaapissa +35–36 °C:ssa yön yli. Streptocult alustaa kasvatetaan +35 °C:ssa yli yön.
4. Mittaa estorenkään halkaisija.

Tuloksen tulkinta

Basitrasiini positiivinen eli *S. Pyogenes* → Estorenkään halkaisija yli tai yhtä suuri kuin 16 mm

Basitrasiini negatiivinen → Estorenkään halkaisija alle 16 mm

7.2.4 Streptokokkien antigeeninen eli Lancefieldin ryhmitys agglutinaatiokokeella

Periaate

Tyypitys Lancefieldin ryhmiin perustuu β -hemolyyttisten streptokokkien pinnalla olevien erilaisten hiilihydraattien rakenteisiin.

Välineet

Koeputkia, viljelysauvoja

Reagenssit: Kaupalliset kitit: Oxoid™ Streptococcal Grouping Kit ja PathoDextra™ Strep Grouping Reagent Set

(Reagenssit säilytetään jääkaapissa pystyasennossa ja otetaan huoneenlämpöön n. puoli tuntia ennen käyttöä!)

HUOM! Jos käytössä on joku muu kaupallinen kitti kuin yllä mainitut kitit, niin tutustu aina ensin valmistajan ohjeeseen!

Suoritus Oxoid™-entsyymiuuttomenetelmällä

1. Pipetoi 400 μ l liuotettua ekstraktioentsyymiä koeputkeen.
2. Lisää putkeen 2–5 tutkittavan kannan pesäkettä.
3. Inkuboi +37°C 5 min, jonka jälkeen ravista putkea 3 sekuntia ja jatka inkubaatiota vielä 5 min.
4. Anna bakteerisuspension jäähtyä huoneenlämpöiseksi ennen testiä.
5. Sekoita huoneenlämpöiset latex-reagenssit hyvin.
6. Annostele kuhunkin testiympyrään 1 tippa kutakin latex-reagenssia.
7. Lisää Pasteur-pipetillä 1 tippa bakteerisuspensiota kuhunkin testiympyrään.
8. Sekoita kunkin testiympyrän tipat keskenään käyttäen aina puhdasta sekoitustikkua siirryttäessä seuraavaan testiympyrään. Levitä suspensio koko ympyrän alueelle.
9. Keinuta testilevyä kevyesti edestakaisin enintään minuutti. Lue tulos levyltä.

Suoritus PathoDextra™-happouuttomenetelmällä

1. Lisää koeputkeen 1 tippa reagenssia 1.
2. Lisää putkeen 1–4 pesäkettä tutkittavaa bakteeria käyttäen viljelysauvaa tai silmukkaa (älä käytä vanutikkua). Sekoita hyvin. Sopiva määrä pesäkkeitä on sellainen, jolla tulee heikosti samea suspensio.
3. Lisää putkeen 1 tippa reagenssia 2 ja sekoita naputtelemalla putkea 5–10 sekuntia.
4. Lisää putkeen 5 tippaa reagenssia 3 ja sekoita naputtelemalla putkea 5–10 sekuntia.
5. Lisää Pasteur-pipetillä tippa testisuspensiota niin moneen testiympyrään, kuin testattavia ryhmiä on.
6. Annostele kuhunkin testiympyrään 1 tippa hyvin sekoitettua huoneenlämpöistä latex-reagenssia. A-latexia omaan ympyrään, B-latexia omaan jne.
7. Sekoita kunkin testiympyrän tipat keskenään käyttäen aina puhdasta sekoitustikkua siirryttäessä seuraavaan testiympyrään. Levitä suspensio koko ympyrän alueelle.
8. Keinuta testilevyä hellävaraisesti edestakaisin enintään minuutti. Lue tulos levyiltä.

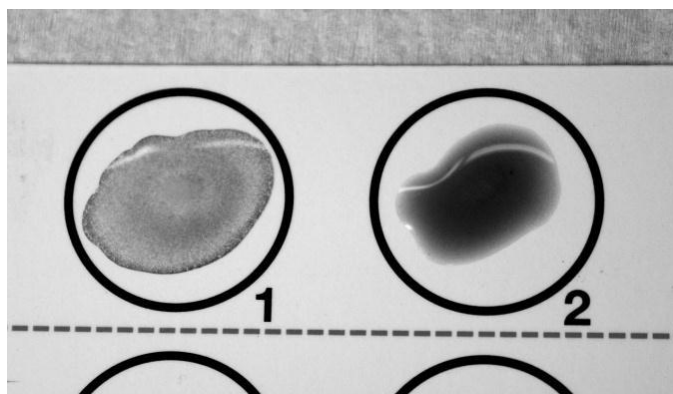
Virhelähteet:

Epäpuhtaiden bakteeripesäkkeiden käyttö tai kontaminaatio jossain työvaiheessa voi aiheuttaa sakan muodostumisen useampaan testiympyrään. Tee uusi testi.

Tuloksen tulkinta

β -hemolyttinen bakteeri → Sakka

Muu bakteeri kuin β -hemolyttinen streptokokki
→ Ei sakkaa



Kuva 11. Sakan muodostuminen vasemmalla

7.3 D-ryhmän streptokokit = enterokokit

Tämän ryhmän streptokokit kuuluvat elimistön eri alueiden, varsinkin genitaalialueen ja suoliston, normaaliflooraan. Tavallisimmat kliinisissä näytteissä esiintyvät enterokokit ovat *Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus faecium*.

Kasvuvaatimuksiltaan ne ovat vaatimattomia. Veri- ja streptokokkimaljalla ne kasvavat harmaina pieninä pesäkkeinä. Aerobikasvatuksessa ne ovat alfa- tai nonhemolyyttisiä, mutta anaerobissa usein beta-hemolyyttisiä.

7.3.1 Sappieskuliinikoe

Käytetään enterokokkien erottamiseksi muista streptokokeista.

Periaate

Enterokokit pystyvät lisääntymään maljalla, joka sisältää sappisuoloja, eskuliinia ja rautaa.

Enterokokkien hajottamasta eskuliinista muodostunut metaboliituote reagoi raudan kanssa, mikä ilmenee maljalla mustana värinä.

Välineet

Eskuliinimalja, viljelyvälineet

Suoritus

1. Vedä tutkittavasta bakteerista viiva sappieskuliinimaljalle.
2. Inkuboi maljaa lämpökaapissa +35–36 °C:ssa yön yli.
3. Tarkastele kasvaako maljalla mustia bakteeripesäkkeitä.

Tuloksen tulkinta

Enterokokki (*E. Faecium*, *E. Faecalis*) → Maljalla kasvaa mustia bakteeripesäkkeitä (sappieskuliini positiivinen)

Streptokokki → Väritön

7.3.2 Arabinoosikoe

Käytetään *Enterococcus faeciumin* ja *Enterococcus faecalis*en erottamiseen toisistaan.

Periaate

E. faecium fermentoi arabinoosia muuttaen maljan violetin värin keltaiseksi. *E. Faecalis* taas ei saa maljaa muuttamaan väriä.

Välineet

Viljelyvälineet, arabinoosimalja

Suoritus

1. Viljele tutkittavaa bakteeri arabinoosimaljalle. (Yhdelle maljalle voi viljellä useamman näytteen!)
2. Kasvata yön yli +35-36 °C:ssa.
3. Tarkastele maljaa seuraavana päivänä.

Tuloksen tulkinta

E. faecium → Keltainen

E. faecalis → Ei värimuutosta (violetti)

Bakteeri	Arabinoosi	Sappieskuliini
<i>E. faecium</i>	keltainen	positiivinen
<i>E. faecalis</i>	violetti	positiivinen

7.3.3 Telluriinikoe

Telluriinikiekkaja käytetään *Enterococcus faecalis* erottamiseen streptokokista ja muista enterokokeista.

Periaate

Enterococcus faecalis kasvaa normaalisti lähelle telluriinikiekkoa mustilla/harmailla pesäkkeillä, kun taas muut enterokokit ja streptokokki kasvavat kauempana kiekosta muodostaen estorenkkaan.

Välineet

Viljelyvälineet, pumpulipuikko, Müller-Hinton-malja, dreijja, DensiCHEK.

Reagenssit: Telluriinikiekko, 0,9% NaCl

Suoritus

1. Tee tutkittavasta bakteerista 0,5 McFarlandin vahvuinen bakteerisuspensio keittosuolaliuokseen. Tarkista suspension vahvuus DensiCHEK:llä.
2. Dreijjaa maljalle tutkittavaa bakteeriympästä.
3. Aseta telluriinikiekko viljelmän päälle.
4. Inkuboi maljaa yön yli 35–37 °C.
5. Mittaa estorenkkaan suuruus.

Tuloksen tulkinta

E. Faecalis → Estorengas pienempi kuin 10mm (R)

Streptokokki ja useat muut enterokokit → Estorengas suurempi kuin 12 mm (S)

8 Herkkyysmääritykset

Bakteerien herkkyden ja bakteerilääkkeen tehon mittana käytetään **MIC-arvoa** eli **Minimal Inhibitory Concentration**. Voidaan määrittää myös **MBC-arvo** eli **Minimal Bacterial Concentration**.

Lääkeherkkyys voidaan määrittää usealla eri menetelmällä, joita ovat agardiffuusimenetelmä (kiekkomenetelmä), laimennusmenetelmä (E-testi, katso video kurssimateriaaleista), entsyymimääritykset ja geenimenetelmät.

Herkkyysluokat kansainvälisesti käytetyn SIR-järjestelmän mukaan ovat:

S (susceptible) = Bakteri herkkä tutkitulle antibiootille normaalilla hoitoannoksella.

I (intermediate) = Tutkittu antibiootti käyttökelpoinen vain korkeilla annoksilla.

R (resistant) = Bakteri vastustuskykyinen tutkitulle antibiootille eli resistentti.

Periaate

Lääkekiekosta diffundoitua lääkeainetta estää bakteerin kasvun kiekon ympäriltä ja sitä suuremmalta alueelta mitä herkempi bakteri on kyseiselle lääkkeelle.

Välineet

Viljelysauva, Müller-Hinton-malja, pumpulitikku, dreija, DensiCHEK

Reagenssit: 0,9 % NaCl-putki, antibioottikiekot

Avaamattomat antibiootit ja antibioottiannostelijat säilytetään jääkaapissa ja ne tulisi nostaa huoneenlämpöön noin tuntia ennen annostelua. Avatut antibiootit säilyvät noin kuukauden.

Suoritus

1. Tee puhtaasta ja tuoreesta bakteerikasvustosta 0,5 McFarlandin ymppeä 1,0 ml:aan steriiliä 0,9 % NaCl:a. Tarkasta ympin vahvuus DensiCHEK:llä. Ymppeä tulee siirrostaa maljalle 15 minuutin kuluessa ympin valmistamisesta.
2. Kasta steriili pumpulitikku suspensioon ja kuivaa ylimääräinen neste putken sisäreunaan.
3. Vedä pumpulitikulla herkkyysmaljan pinnalle poikkiviiva. Levitä samalla tikulla suspensio koko maljalle dreijan avulla. HUOM! Älä paina tikkua liian kovasti!
Vältä myös koskettamasta maljan reunoja, jottei syntyisi aerosoleja.
4. Annostele antibioottikiekot maljalle käsin tai antibioottiannostelijalla.
5. Inkuboi maljoja kyseessä olevan bakteerin vaatimassa kasvuympäristössä yön yli.
6. Mittaa seuraavana päivänä lääkeaineiden aiheuttamien estorenkaiden halkaisijat (mm).



Kuva 12 Dreijaamisen aloittaminen Kuva 13 Dreijaamisen lopettaminen Kuva14 Antibioottikiekot maljalla

Tuloksen tulkinta

Tarkista aina lääkeainekohtaiset rajat. Asiakkaalle annetaan vastaus herkkyysluokkina S, I tai R.

8.1 β -laktamaasikoe

Monet kliinisesti tärkeät bakteerit tuottavat β -laktamaasientsyymiä, joka pystyy hajottamaan β -laktaamiantibiootteja. β -laktamaasientsyymiä tavataan staphylokokeilla, haemophiluksilla, *Branhamella catarrhaliksella*, *Neisseria gonorrhoea*lla, enterokokeilla ja anaerobibakteereilla.

Periaate

Testi perustuu kiekossa esiintyvän substraatin (G-penisilliinin) β -laktaamirenkaan pilkkomiseen. Bakteerissa mahdollisesti esiintyvä β -laktamaasi hydrolysoi β -laktaamirenkaan amidisidoksen ja kiekon indikaattorin (bromikresolivioletti) väri muuttuu violetista keltaiseksi tai rusehtavaksi.

Välineet

Koeputki, viljelysauva

Reagenssit: 0,9 % NaCl, β -laktamaasikiekko (ROSCO™)

Suoritus

1. Ota useita pesäkkeitä maljalta (yhden vuorokauden kasvustosta) ja suspensoi ne 0,25 ml 0,9% NaCl:a. Pyri tekemään vahva suspensio, noin 4,0 McFarlandia. Tarkista suspension vahvuus DensiCHEK:llä
2. Lisää putkeen yksi β -laktamaasikiekko ja sekoita.
3. Inkuboi putkea 15–20 min lämpökaapissa +35–36 °C.
4. Tarkastele muuttuuko liuoksen väri.

Tuloksen tulkinta

β -laktamaasi positiivinen → Väri muuttuu keltaiseksi (rusehtava)

β -laktamaasi negatiivinen → Violetti

HUOM!

- Testin reaktioaika voi vaihdella tutkittavan bakteerin lajista ja bakteeripesäkkeen iästä riippuen.

- β -laktamaasi positiivisilla kannoilla penisilliinin ja ampicilliinin herkkyudet tulkitaan R:ksi

9 Muita mikrobiologisia tunnistuskokeita

9.1 Seerumikoe eli itutesti

Harjoitustunneilla tehdään sienitutkimuksista ainoastaan seerumitesti, joka on tarkoitettu *Candida albicansin* erottamiseen muista hiivalajeista.

Periaate

Seerumikokeessa luodaan sellaiset olosuhteet *Candida albicansille*, jotta se kykenee muodostamaan ituputken. Ituputki(hyyfi) on paksuudeltaan noin puolet ja pituudeltaan noin nelinkertainen hiivasoluun verrattuna. Ituputken ja solun yhtymäkohdassa ei ole seinämää vaan se on avonainen.

Välineet

Seerumia sisältävä koeputki, viljelysauva, objektilasi, peitinlasi
Reagenssit: ihmisen tai naudan seerumia

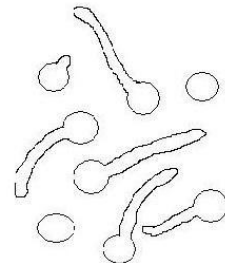
Suoritus

1. Suspensoi tutkittavaa hiivapesäkettä viljelysauvalla seerumia sisältävään koeputkeen.
2. Inkuboi putkea 2-3 tuntia +35–36 °C:ssa (tai yön yli)
3. Tiputa objektilasille tippa hyvin sekoitettua seerumiympppiä ja peitä tippa peitinlasilla.
4. Tarkastele tippaa mikroskoopilla 40x objektiivilla.

Tuloksen tulkinta

Jos on havaittavissa ituputkia (kuva 15), on kyseessä *Candida albicans*.

Joskus *Candida albicans* ei tee ituputkea seerumitestissä. Ituputki muodostuu kuitenkin jatkoviljelmässä, mutta neljän tunnin kasvatuksen jälkeen myös muut hiivalajit alkavat muodostaa ituputkia.



Kuva 15 Ituputkien muodostuminen

9.2 Nielun pikatesti

A-ryhmän β -hemolyyttinen streptokokki aiheuttaa nielutulehduksen, jonka hoidossa penisilliini on avainasemassa. Nykyään on saatavilla kaupallisia pikatestejä, joilla voidaan hyvinkin nopeasti osoittaa A-ryhmän streptokin antigeeni nielunäytteestä. Diagnostiikassa tämä ei yksin riitä, sillä niiden herkkyys on alle 95 %, ja lisäksi C- tai G ryhmän streptokokit jäävät näillä testeillä löytymättä. Siksi nielunäytteestä pikatestin lisäksi on syytä tehdä myös viljely.

Periaate

Perustuu streptokokin A-antigeenin osoitukseen.

HUOM! Näytteenoton oikea suorittaminen on ehdoton edellytys sille, että testillä saadaan oikea tulos

Välineet

Reagenssit: Quick-Vue Dipstick Strep A test

Suoritus

HUOM! Tutustu valmistajan ohjeeseen, jos käytössä on muu kuin Quick-Vue Dipstick Strep A test.

1. Avaa pakkaus ja aseta testiliuska telineeseen. Testiliuska tulee käyttää välittömästi foliopaketin avaamisen jälkeen. Testiliuskaan saa koskea vain siitä päästä, missä on teksti strep A.
2. Sekoita reagenssi A ja tiputa sitä koeputkeen 3 tippaa
3. Sekoita reagenssi B ja tiputa sitä koeputkeen 3 tippaa. Liuoksen pitäisi muuttua vihreäksi.
4. Laita näytteenottotikku koeputkeen.
5. Purista putken päätä, jotta tikusta saataisiin näyte mahdollisimman hyvin nesteeseen.
6. Pyöritä tikkua putkessa vähintään viisi kierrosta.
7. Anna tikun seistä nesteessä 1 minuutin ajan.
8. Minuutin kuluttua purista kaikki mahdollinen neste näytteenottotikusta samalla kun nostat tikun pois putkesta.
9. Upota testiliuska koeputkeen niin, että nuolet osoittavat alaspäin. Anna testiliuskan seistä putkessa viisi minuuttia, jonka jälkeen voit lukea tuloksen.

Tulokset

Streptokokki A-positiivinen → Kaksi viivaa: punainen testiviiva ja vaaleansininen kontrolliviiva. Viivojen värin voimakkuus voi vaihdella.

Streptokokki A-negatiivinen → Yksi viiva: vaaleansininen kontrolliviiva

Testi uusittava uudella näytteellä, kun sinistä kontrolliviivaa ei ilmesty viiden minuutin kuluessa.

Lähteet

BIOMERIEUX™ 2002. API® 20 E. Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods.

BIOMERIEUX™ 2016. ChromID™ S.aureus Elite agar (SAIDE). Chromogenic medium for the selective isolation and the direct identification of S.aureus.

BIOMERIEUX™ 2005. Oxidase Reagent. Instructions for use.

CHROMAGAR 2013. Tuoteluettelo [verkkodokumentti]. [Viitattu 2020-04-28.] Saatavissa: http://www.chromagar.com/images_spaw/LF_EXT_029_FIN_V3.pdf?PHPSESS-%20SID=f76c14ce09e1e44daf06b147fdaa6420

CHROMAGAR 2017. CHROMagar™ Orientation [verkkosivu]. [Viitattu 2020-04-28.] Saatavissa: <http://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-orientation-focus-on-urinary-tract-pathogens-25.html#.XqQdFMgzaUk>

CHROMAGAR 2017. Product leaflet. CHROMagar™ Orientation [verkkodokumentti]. [Viitattu 2020-04-28.] Saatavissa: http://www.chromagar.com/fichiers/1483453721LF_EXT_002_RT_V6.1_Siteweb.pdf

HELENIUS, Minna, KILPELÄINEN, Kati, TAPONEN, Elsa 2012. Mikrobiologiaa bioanalytikoille: Kliinisen mikrobiologian työhöjeiden päivittäminen. Savonia-ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö. [Viitattu 2020-02-22] Saatavissa: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-2012120317890>

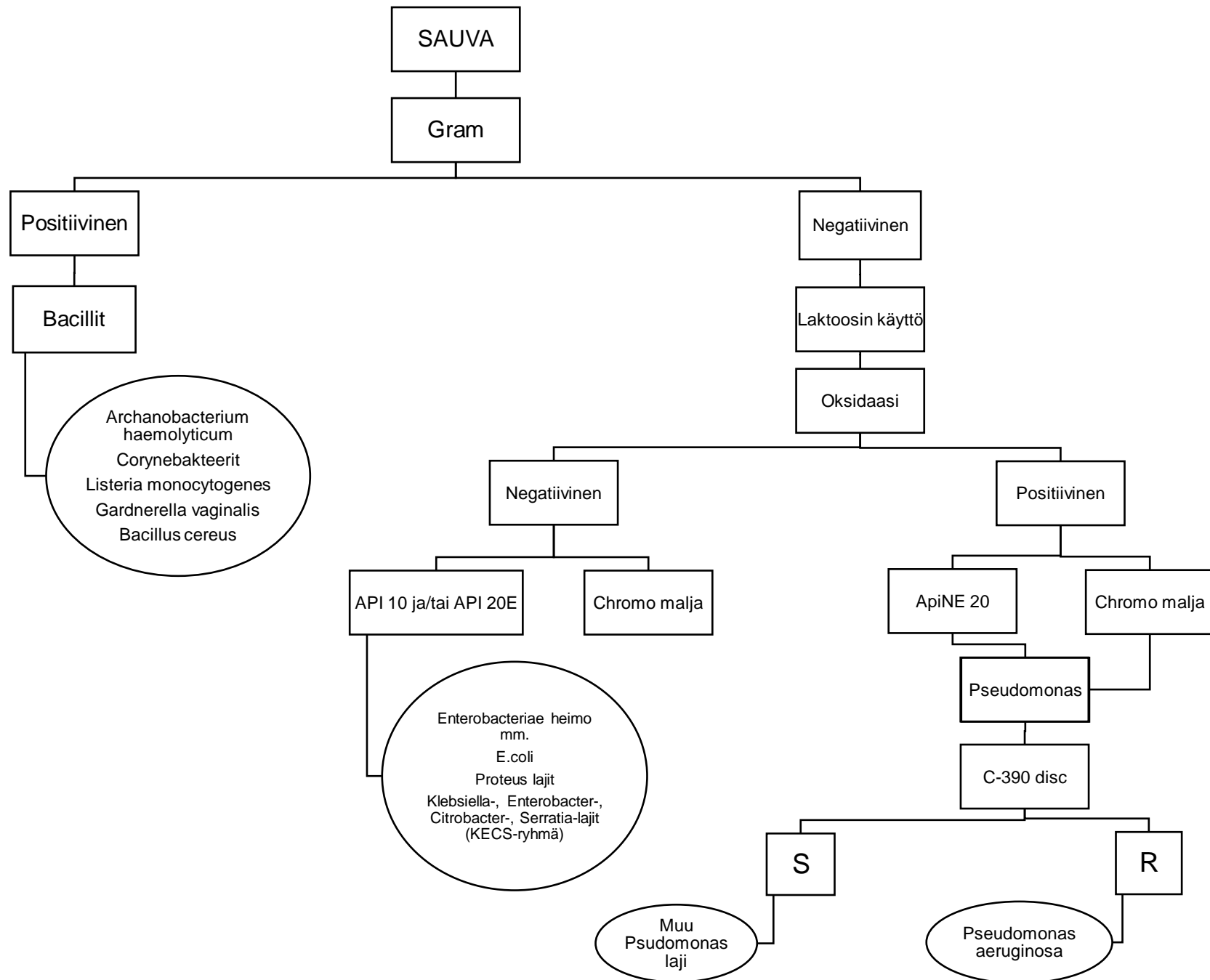
PRO-LAB DIAGNOSTICS 2017. Prolex™ Staph Latex Kit. Instructions for use. [verkkodokumentti]. Pro-Lab Diagnostics. [Viitattu 2020-03-23.] Saatavissa: https://www.pro-lab.com/wp-content/uploads/2017/02/PL080B_081B_Prolex-Staph-Latex-Kit_English.pdf

ROSCO s. a. DIATABS™ User's guide [verkkodokumentti]. ROSCO. [Viitattu 2020-03-25.] Saatavissa: [https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Users%20Guide\(2\).pdf](https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Users%20Guide(2).pdf)

THERMO FISHER 2016. Oxoid Streptococcal Grouping Kit. [Viitattu 2020-03-04.] Saatavissa: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/MBD/Instructions/X3981D.pdf>

THERMO FISHER 2015. PathoDextra Strep Grouping Reagent Set. [Viitattu 2020-03-04.] Saatavissa: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/Instructions/X7737B.pdf#page=2&zoom=70,-10,494>

Liitteet



Kokki

Gram

Positiivinen

Negatiivinen

Katalaasikoe

Oksidaasikoe

Positiivinen (ryhmäkokki)

Negatiivinen (ketjukokki)

Positiivinen

Koagulaasikoe + SAIDE chromID™, Stafylokokkien agglutinaatiotesti

Streptokokit

Moraxella catarrhalis

Neisseriat

Hemolysikoe

Positiivinen +/+

Negatiivinen -/-

α-hemolyyssi

Non-hemolyyssi

β-hemolyyssi

S.aureus

Koagulaasi negatiiviset Stafylokokit

Optokiini

Streptokokkien agglutinaatiotesti

Agglutinaatiotesti

A,B,C,F tai G ryhmän Streptokokki

S

R

Pneumokokki

Viridans streptokokit

Positiivinen (D-ryhmä)

Negatiivinen

Enterokokki

Sappieskuliini

Positiivinen (Musta pesäke)

Negatiivinen (Vaalea pesäke)

Arabiinooosi

Telluriini

Keltainen

Violetti

S

R

E.Faecium

E.Faecalis

Streptokokki tai muu enterokokki

E.Faecalis

Muu streptokokki