

S T a D I a

HELSINGIN AMMATTIKORKEAKOULU

Tioglykolaattiputki bakteerien tunnistuksen apuna

Bioanalytiikan koulutusohjelma,
bioanalytikko
Opinnäytetyö
13.11.2006

Hanna Ihala
Jonna Paavola



Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Hanna Ihala ja Jonna Paavola			
Työn nimi			
Tioglykolaattiputki bakteerien tunnistuksen apuna			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Syksy 2006	41	
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Teimme opinnäytetyömme HUSLABin Kliinisen mikrobiologian vastualueen bakteriologian osaston pyynnöstä. Osastolla toivottiin, että opinnäytetyömme auttaisi bakteriologian osaston työntekijöitä paremmin hyödyntämään päivittäin märkäviljelytyöpisteissä käytettävistä tioglykolaattiputkista saatavaa informaatiota. Opinnäytetyömme on jatkoa vuonna 2005 tehdyille opinnäytetyöille Oppimismateriaali gramvärjäyksestä, joka on myös tehty HUSLABin bakteriologian osastolle.</p> <p>Opinnäytetyössämme tutkimme, miten eri anaerobit ja aerobit bakteerilajit kasvavat tioglykolaattiputkessa, sekä miten tätä tietoa voitaisiin käyttää hyödyksi bakteerien alustavassa tunnistuksessa ja esimerkiksi jatkotunnistustestejä valittaessa. Tutkittavia bakteerilajeja oli 20 ja yksi sieni. Bakteerilajit valittiin niin, että jokaisesta ryhmästä tulisi ainakin yksi tyypillinen esimerkki. Valokuvasimme tulokset ja valmistimme kuvallisen materiaalin HUSLABin Kliinisen mikrobiologian vastualueen bakteriologian osastolle työntekijöiden ja opiskelijoiden käyttöön. Valmistamamme kuvamateriaalin pitäisi auttaa tioglykolaattiputkesta saatavan informaation parempaan hyödyntämiseen bakteriologian osaston märkäviljelytyöpisteessä.</p> <p>Aluksi etsimme kokeilemalla sopivan, potilasnäytteitä lähinnä olevan laimennoksen. Teimme 1/10 laimennossarjan muutamalle bakteerille. Sopivan bakteeripitoisuuden löydyttyä käytimme samaa pitoisuutta jatkossa kaikille viljellyille bakteereille. Kasvatimme tioglykolaattiputkia lämpökaapissa, kunnes bakteerien kasvu tuli näkyviin. Varmistimme, että tioglykolaattiputkissa kasvoivat tutkimamme bakteerit puhtaina tekemällä putkissa kasvavasta bakteerimassasta gramvärjäykset sekä puhtasviljelmät maljoille. Lopuksi valokuvasimme tulokset ja kokosimme niistä kuvallisen tulososion, jossa kuvaillaan myös sanallisesti bakteerien kasvua tioglykolaattiputkessa.</p> <p>Bakteerit kasvoivat putkissa niille ominaisella tavalla. Kokkibakteerit kasvoivat niille tyypillisenä raemaisena kasvuna ja sauvabakteerit enemmän harsomaisesti, kuten mikrobiologian kirjoissa on kuvattu. Obligatorisesti eli ehdottomasti anaerobit bakteerit kasvoivat tioglykolaattiputken alaosassa, koska ne eivät siedä happea. Obligatorisesti aerobien bakteerien kasvu sijoittui putken yläosaan, koska ne tarvitsevat ehdottomasti happea elääkseen. Fakultatiivisesti eli valinnaisesti anaerobit bakteerit kasvoivat kauttaaltaan koko tioglykolaattiputkessa, koska ne pystyvät kasvamaan yhtä hyvin sekä hapettomissa että hapellisissa oloissa. Mikroaerofiilit bakteerit kasvoivat koko tioglykolaattiputkessa suosien kuitenkin enemmän putken anaerobista osaa.</p>			
Avainsanat			
tioglykolaattiputki, bakteerien kasvuvaatimukset			



Degree Programme in Biomedical Laboratory Science		Degree Bachelor of Health Care and Social Services	
Author/Authors Ihala Hanna and Paavola Jonna			
Title Thioglycolate Broth Use in Bacteria Identification			
Type of Work Final Project	Date Autumn 2006	Pages 41	
<p>ABSTRACT</p> <p>We made our final project in the Department of Bacteriology at HUSLAB. Our study continues the final project titled “The Learning Material of the Gram Stain”, which was made in the autumn of 2005. The objective of this final project was to study how different anaerobes and aerobes bacteria grow in the enrichment broth made of thioglycolate and how this information can be used in bacteria identification in the Department of Bacteriology at HUSLAB.</p> <p>Our study contains 20 bacteria and a fungus. First we tried to find a diluent which was suitable for the bacteria we used. With the proper bacteria suspension we cultured thioglycolate broths and incubated them for an appropriate amount of time. We checked, how clean the bacterial growth was with gram stain and pure culture. We took photographs of the growth into thioglycolate broths and compiled the photos together in our study.</p> <p>Different growth requirement of the bacteria have an influence on how the bacteria place in thioglycolate broths. Obligate aerobes bacteria grew at the surface of thioglycolate broth, whereas obligate anaerobes bacteria grew in the bottom of the thioglycolate broth. Facultative anaerobes bacteria grew in the entire tube. Cocci bacteria grew puff balls effect and the rod bacteria became muddy in the thioglycolate broth.</p>			
<p>Keywords thioglycolate broth, enrichment broth, growth requirement of bacteria</p>			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 BAKTEERIEIN KASVUVAATIMUKSET	3
2.1 Ravinnevaatimukset	3
2.2 Ympäristövaatimukset	4
2.2.1 Lämpötila	4
2.2.2 pH- arvo	4
2.2.3 Happi	5
3 RIKASTEPUTKIEN KÄYTTÖ LABORATORIOISSA	5
3.1 Rikasteputki	5
3.2 Tioglykolaattiputki	6
3.2.1 Koostumus	7
3.2.2 Valmistus	7
3.2.3 Käyttö ja tulkinta	8
3.2.4 Tioglykolaattiputken käyttöön liittyviä tutkimuksia	9
4 BAKTEERIEIN TUNNISTUS	10
4.1 Gramvärjäys	10
4.2 Bakteeriviljely	10
5 TUTKIMUKSESSA KÄYTETTÄVÄT BAKTEERILAJIT JA SIENI	11
5.1 Grampositiiviset bakteerit	11
5.1.1 Kokkibakteerit	11
5.1.2 Sauvabakteerit	13
5.2 Gramnegatiiviset bakteerit	15
5.2.1 Kokkibakteerit	15
5.2.2 Sauvabakteerit	16
5.3 Sienet	18
6 TUTKIMUSONGELMAT	18
7 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN	19
7.1 Työtavat ja menetelmät	19
7.1.1 Laimennoksen testaaminen	20
7.1.2 Viljely maljoille ja tioglykolaattiputkeen	22
7.1.3 Tioglykolaattiputkien kuvaaminen	23
7.2 Ongelmatilanteet	24
8 TULOKSET JA TULKINTA	24
8.1 Fakultatiivisesti anaerobiset bakteerit	25
8.2 Obligatorisesti aerobit bakteerit	28
8.3 Obligatorisesti anaerobiset bakteerit	30
8.4 Mikroaerofiiliset bakteerit	32
8.5 Usean bakteerin tioglykolaattiputket	34
POHDINTA	37
LÄHTEET	40

1 JOHDANTO

Rikasteputket ovat bakteerien kasvuun tarvittavia ravintoaineita sisältäviä putkia. Niitä on erilaisia eri tilanteisiin käytettäviksi. Rikasteputkia käytetään, jotta saataisiin pienetkin bakteerimäärät esille erityisesti steriilien alueiden näytteistä. Tioglykolaattiputki on yksi monista rikasteputkista, ja sitä käytetään syvämärkänäytteiden rikasteputkena. Muita rikasteputkia ovat mm. lihaliemiputki ja seleniittiputki (Mahon - Manuselis 2000: 1135; Claros 1995: 2505). Tioglykolaattiputki on hyvä yleisrikasteputki, koska monet eri lajit kasvavat siinä. Putki suosii erityisesti anaerobeja bakteereita. Märkäviljelyssä tioglykolaattiputki viljellään aina ensimmäisenä, koska niukka bakteerikasvu voi näkyä vain rikasteputkessa eikä maljoilla ollenkaan, jolloin voidaan tehdä uusintaviljelyt tioglykolaattiputkesta. Putkessa olevan kasvun tulkinta perustuu näköhavaintoon. (Björklöf – Korhola- Salmela - Schauman 2000: 28; Bridson 1998: 2200.) Tioglykolaattiputkia käytetään lähes satoja päivittäin HUSLABin Kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolla märkäviljelytyöpisteissä. Kuitenkin putkesta saatavaa informaatiota hyödynnetään todella vähän varsinaisen bakteeritunnistuksen apuvälineenä.

Tavoitteenamme on selvittää opinnäytetyössämme, millä tavalla tutkimamme bakteerit kasvavat tioglykolaattiputkessa, sekä voidaanko tätä tietoa hyödyntää bakteerin alustavassa tunnistuksessa esimerkiksi jatkotunnistustestejä valittaessa. Opinnäytetyössämme tutkimme eri anaerobien ja aerobien, sekä grampositiivisten että -negatiivisten bakteerilajien kasvua tioglykolaattiputkessa. Tutkittavia bakteereita on 20 ja yksi sieni. Tutkittavat bakteerilajit ovat eri ryhmistä, niin että kaikista ryhmistä tulisi ainakin yksi tyypillinen esimerkki. Ainoastaan gramnegatiivisista anaerobeista kokkibakteereista ei ole esimerkkiä. Etsimme aluksi bakteereille sopivimman laimennoksen muutamalla bakteerilla ja käytämme sitten valittua laimennosta tutkittavien bakteerien viljelyyn tioglykolaattiputkiin. Tulokset voi nähdä yön yli lämpökaapissa kasvatuksen jälkeen. Valokuvamme tulokset, ja kokoamme niistä kuvamateriaalin tunnistuksen apuvälineeksi HUSLABin Kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolle, opiskelijoiden ja uusien työntekijöiden käyttöön. Ohjaajinamme toimivat sairaalamikrobiologi Eveliina Tarkka ja laboratoriohoitaja Anja Salesto, jotka valitsivat tutkittavat bakteerilajit. Opinnäytetyöhöemme ei liity eettisiä ongelmia, koska käytämme tutkimuksessamme laboratorion kontrollikantoja ja pakasteeseen taltioituja bakteerikantoja.

Työmme on jatkoa vuonna 2005 tehdylle opinnäytetyölle, joka on ”Oppimismateriaali gramvärjäyksestä”. Opinnäytetyön ovat tehneet Minna Tupasela, Heidi Vesterinen ja Jenni Villman. Käytämme työssämme samoja bakteerilajeja ja teemme myös gramvärjäyksen sekä maljalle viljelyn kaikista käyttämistämme bakteereista. Emme kuitenkaan valokuvaa gramvärjäyksiä ja maljaviljelmiä, koska kuvat näistä ovat jo tässä edellisessä oppimateriaalissa, joka on myös HUSLABin bakteriologian osaston käytössä. Saatujen tulosten perusteella kokoamme kuvamateriaalin, joka otetaan käyttöön HUSLABin bakteriologian osaston märkäviljelytyöpisteissä, joissa tioglykolaattiputkia käytetään päivittäin. Kuvamateriaalin olisi tarkoitus auttaa, varsinkin opiskelijoita ja uusia työntekijöitä, käyttämään tioglykolaattiputkesta saatavaa informaatiota apuna bakteerin alustavassa tunnistuksessa.

2 BAKTEERIEN KASVUVAATIMUKSET

2.1 Ravinnevaatimukset

Monet bakteerit ovat hyvin vaatimattomia ravintonsa suhteen. Ne pystyvät niukallakin ravinnolla lisääntymään erittäin nopeasti (Huovinen ym. 2005: 70). Bakteerien tärkeimmät ravinnon lähteet ovat hiili, typpi, vety ja happi (Mahon - Manuselis 2000: 13). Ne muodostavat 95 % kuivan solun painosta. Loppuosuus muodostuu mm. suoloista, magnesiumista, kalsiumista ja raudasta (Bauman 2004: 172). Bakteerit tarvitsevat typpeä proteiinien ja nukleotidien rakentamiseen. Tarvitsemansa typen bakteerit saavat aminohapoista. Typen puuttuessa bakteerin rakennusaineenvaihdunta, ja sen myötä kasvukin pysähtyy. Bakteerit tarvitsevat vetyä elektronikuljetukseen ja vetysidoksien muodostamiseen. Happea käyttävät bakteerit tuottavat suurimman osan ATP:stä eli energiasta hapen avulla. (Bauman 2004: 169- 172.)

Hiili toimii bakteerien energianlähteenä. Bakteerit voidaan jakaa heterotrofisiin ja autotrofisiin sen mukaan, mitä ne käyttävät hiilenlähteenä. Heterotrofiset bakteerit käyttävät orgaanisia yhdisteitä esim. erilaisia sokereita tai orgaanisia happoja. Heterotrofiset bakteerit hajottavat sokereita samalla tavalla kuin eläinsolut. Maaperästä ja vesistöistä löytyvät autotrofiset bakteerit käyttävät hiilenlähteenä epäorgaanisia yhdisteitä esim. aurinгон valoa. Jotkin autotrofit saavat energiansa hapettamalla esim. vetyä, rikkivetyä tai ammoniakkia. Näitä bakteereja kutsutaan kemoautotrofeiksi. (Huovinen ym. 2005: 70-71.)

Monet tauteja aiheuttavat bakteerit ja normaaliflooran bakteerit ovat vaativia ravinteiden suhteen (Huovinen ym. 2005: 73). Ne tarvitsevat ravinteita, joita ei saa isäntäelimestön ulkopuolelta, eivätkä bakteerit pysty niitä itse tuottamaan. Nämä ravintoaineet toimivat bakteerien energianlähteenä, ja niitä kutsutaan kasvutekijöiksi. Kasvutekijöihin kuuluvat mm. aminohapot, nukleotidit, vitamiinit, hemi ja kolesteroli. (Bauman 2004: 172.) Vaativiin bakteereihin kuuluvat esim. streptokokit, jotka tarvitsevat monia erilaisia kasvutekijöitä. Vielä vaativampia ovat mm. hemofilukset ja gonokokit, jotka tarvitsevat punasolujen sisältämiä kasvutekijöitä. Laboratorioissa käytettävät elatusaineet tulisikin suunnitella niin, että bakteerit saavat niistä kaikki kasvuun tarvitsemansa ravintoaineet. (Huovinen ym. 2005: 70- 73.)

2.2 Ympäristövaatimukset

Ravintovaatimusten lisäksi bakteereilla on myös fysikaalisia vaatimuksia kasvunsa ylläpitämiseksi. Tällaisiin fysikaalisiin ympäristövaatimukseen kuuluu lämpötila, pH-arvo ja ilmaston happipitoisuus. (Bauman 2004: 172.) Bakteerilajit ovat sopeutuneet hyvin erilaisiin ja todella vaativiinkin olosuhteisiin. Bakteereja voi elää melkein minkälaisessa ympäristössä tahansa. (Huovinen ym. 2005: 70.)

2.2.1 Lämpötila

Oikealla lämpötilalla on tärkeä merkitys bakteerin kolmiulotteisen rakenteen ylläpitämisessä. Liian matalassa lämpötilassa solukalvoista tulee haurasrakenteisia ja korkeassa lämpötilassa lipidirakenteet muuttuvat nesteeksi. Solukalvo ei siis pysty pitämään yllä solun rakennetta lämpötilassa, joka on liian kylmä tai kuuma bakteerille. Bakteerin kolmiulotteisen rakenteen ylläpidon lisäksi myös oikea lämpötila tukee bakteerin aineenvaihduntaa ja kasvua. (Bauman 2004: 173.)

Bakteerit voidaan jakaa optimaalisen lämpötilansa mukaan psykoofiilisiin, joiden ihanne lämpötila on 10- 20 °C, mesofiilisiin, joilla se on 20- 40 °C ja termofiilisiin, joilla se on 50- 60 °C (Mahon ym. 2000: 14). Suurin osa patogeenisistä bakteereista viihtyy parhaiten 35- 37 °C:n lämmössä, koska se on samaa luokkaa kuin ihmisen ruumiinlämpötila. Poikkeuksiakin ovat esim. *Pseudomonas*- lajin bakteerit, jotka viihtyvät parhaiten viileämmässä ympäristössä. (Huovinen ym. 2005: 71.)

2.2.2 pH- arvo

Luonnossa pH- arvon ääriarajat ovat 0,5 ja 10,5. Näissä ääriarajoissa ja niiden välisissä arvoissa bakteerikasvu on mahdollista. Vaikka bakteereilla on melko kapea optimaalinen pH- alue, ne kestävät kuitenkin aika hyvin kolmen pH- yksikön vaihteluja. (Huovinen ym. 2005: 73- 74.) Suurin osa bakteereista esim. patogeenit vaativat neutraaleja tai lievästi emäksisiä kasvuolosuhteita 6,5 ja 7,5 välillä. Samoihin arvoihin sijoittuu myös kudosten ja elinten pH. (Bauman 2004: 174.) Laktobasillit ja homeet viihtyvät happamissa kasvuolosuhteissa (Huovinen ym. 2005: 74).

2.2.3 Happi

Happi voi olla hyvin tärkeä energian lähde, mutta myös hyvin toksinen aine monelle bakteerille (Bauman 2004: 169). Hapentarpeen mukaan bakteerit on luokiteltu neljään ryhmään: obligatoriset aerobit ja anaerobit, fakultatiiviset anaerobit ja mikroaerofiilit. Obligatoriset eli ehdottomat aerobit tarvitsevat elääkseen happea esim. *pseudomonas*. Ne tarvitsevat happea orgaanisen tai epäorgaanisen energianlähteensä hapettumiseen. Obligatorisille eli ehdottomille anaerobeille happi on taas vahingollista, joten energiansa nämä bakteerit ottavat käymisestä esim. *Clostridium difficile*. Anaerobit bakteerit ovat yleisimpiä useissa bakteeriryhmissä. Suurin osa bakteereista on kuitenkin fakultatiivisesti eli valinnaisesti anaerobeja. Ne kasvavat yhtä hyvin hapen läsnä ollessa kuin ilman happeakin esim. *E. coli*. Hapen läsnäollessa ne hengittävät, kun taas hapen puutteessa ne käyttävät käymisreaktioita. Jotkin bakteerit sietävät happea vain rajoitetussa määrin, näitä kutsutaan mikroaerofiileiksi esim. laktobasillit. (Salkinoja-Salonen 2002: 196- 197; Huovinen ym. 2005: 72.)

3 RIKASTEPUTKIEN KÄYTTÖ LABORATORIOISSA

3.1 Rikasteputki

Rikastuksella tarkoitetaan prosessia, joka suosii sellaisten mikro-organismien kasvua sekaviljelmissä, joilla on tietyn tyyppisiä ominaisuuksia. Näin saadaan bakteerimassasta esille halutut bakteerilajit. Rikastuksella pyritään tuomaan esiin pienetkin bakteerimäärät näytteistä, joissa jo parin bakteerin löytö luokitellaan patogeeniseksi eikä normaali-flooraksi. Rikasteputkea voidaan pitää solujen elvyttäjänä, koska rikasteputkia käytetään myös vaurioituneiden solujen kasvatukseen. (Björklöf – Korhola- Salmela - Schauman 2000: 28.)

3.2 Tioglykolaattiputki

Tioglykolaattiputki sisältää nestemäisiä ravinneaineita, ja sitä käytetään aerobien ja anaerobien mikro-organismien rikastukseen (kuvio 1). Tioglykolaattiputki suosii anaerobien bakteerien rikastamista, koska putki sisältää happea sitovia aineita. Yleisesti tioglykolaattiputkea käytetään bakteriologian laboratorioissa steriilien bakteerinäytteiden diagnostiikassa esim. märkäviljelmissä. (Bridson 1998: 2200.)



KUVIO 1. Tioglykolaattiputki

Steriileissä näytteissä ei normaalisti ole bakteereja lainkaan, joten vähäinkin bakteerilöydös on merkittävä. Tioglykolaattiputken avulla pyritään lisäämään tutkittavan bakteerin määrää, jotta tunnistus- ja herkkyystestejä varten olisi tarpeeksi bakteerimassaa. Tioglykolaattiputkien avulla pyritään myös pitämään yllä kasvuolosuhteiltaan vaativien bakteerilajien kasvua. Jos bakteeri sattuu kuolemaan maljoilta, tioglykolaattiputkesta saadaan lisää bakteerimassaa uusia maljaviljelyitä varten. Tioglykolaattiputki toimii siis eräänlaisena varmennuskopiona bakteerinäytteiden diagnostiikassa. Tioglykolaattiputki antaa myös tietoa tutkittavan bakteerilajin hapenkäytöstä, joten putkea voidaan käyttää hyväksi alustavassa bakteerien tunnistuksessa. Eri lajeilla kun on niille ominainen suhde happeen ja sen tarpeellisuuteen. (Mahon ym. 2000: 1136- 1137.) Tioglykolaattiputkea voidaan käyttää myös bakteerien säilöntään. Putki ei kuitenkaan ole parhain mahdollinen bakteerien säilytysputki, varsinkaan pitkäaikaisessa säilytyksessä. (Claros – Citron – Coldstein 1995: 2505.)

3.2.1 Koostumus

Tioglykolaattiputki voi sisältää useita erilaisia ravintoaineita, jotka lisäävät bakteerien kasvua esim. hiivaa, glukoosia, kaseiinia (suurimolekyylinen proteiini), lihaliemiutetta tai vitamiineja (Forbes – Sham – Weissfeld 1998: 158). Putkeen on lisätty myös happipitoisuuksia vähentäviä aineita. Kysteiini ja tioglykolaatti ovat pelkistäviä aineita, jotka sitovat happea, tehden kasvuolot suotuisammiksi anaeroobeille bakteereille. (Salkinoja-Salonen 2002: 197.) Pieni määrä agaria taas estää hapen diffundoitumisen putkeen. Putkeen voidaan lisäksi lisätä monia muita ravintoaineita kasvun lisäämiseksi esim. hemiä ja K1-vitamiinia. Näin saadaan vaativimmatkin bakteerilajit kasvamaan putkessa. Se millaisia ravintoaineita putkeen laitetaan, määräytyy sen mukaan mihin tarkoitukseen putkea käytetään. (Mahon ym. 2000: 1136.)

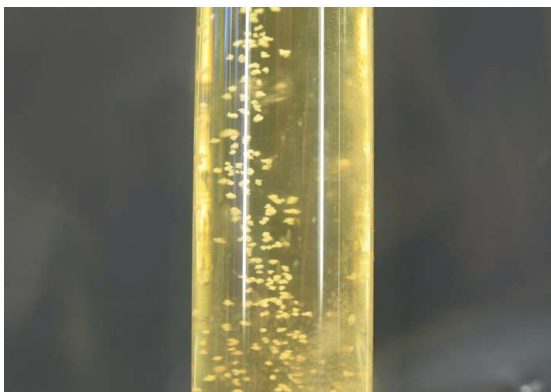
3.2.2 Valmistus

Elatusaineen valmistus aloitetaan happea sitovia aineita ja perusravintoaineita sisältävän pulverin liuotuksella steriiliin veteen keittämällä. Seuraavaksi putki jäädytetään n. 30 °C:sta – 40 °C:seen, jonka jälkeen putkiin lisätään hemi- ja K1-vitamiiniliuos. Putket steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuuttia. Valmiit putket säilyvät valolta suojattuna huoneenlämmössä kuukauden. Vanhentuneen putken tunnistaa putken yläosassa olevan tummemman alueen osuuden kasvusta. Jos taas putken yläosa muuttuu pinkin väriseksi, se on merkki putken hapettumisesta. Anaerobinen ympäristö voidaan kuitenkin vielä palauttaa keittämällä putkea kymmenen minuuttia. Tämän voi tehdä putkelle vain kerran. Mikäli yli kolmasosa putkesta on pinkin värinen, sitä ei voi enää käyttää. (Bridson 1998: 200.)

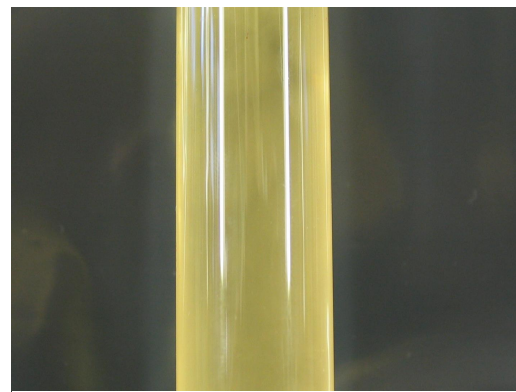
3.2.3 Käyttö ja tulkinta

Valmiita putkia säilytetään ennen käyttöä huoneenlämmössä. Bakterimassan lisäyksen jälkeen putket laitetaan kasvamaan yön yli lämpökaappiin +35 °C:een. Joillekin bakteerilajeille yön yli kasvatus ei ole riittävä. Ne vaativat pidemmän, jopa viikon kestävän kasvatusajan. Kasvatuksen jälkeen putkista tarkastetaan sameus ja sameuden sijainti. Sameus kertoo, että putkessa on bakteerikasvua ja sameuden sijoittuminen putkessa taas kertoo kyseisen bakteerilajin hapen käytöstä (Mahon ym. 2000: 1137). Jotkin glukosifermentaatiota käyttävät bakteerilajit voivat alentaa putken pH- arvoa kriittiselle tasolle, jolloin ne eivät välttämättä enää selviä putkessa. (Bridson 1998: 200.)

Tioglykolaattiputken pinnalla vallitsee aerobinen ja pohjassa anaerobinen tila. Tämän vuoksi anaerobit ja aerobit bakteerit kasvavat putken eri osissa. Gramnegatiiviset fakultatiiviset sauvabakteerit samentavat kasvullaan koko putken (kuvio 3). Fakultatiiviset grampositiiviset kokit kasvavat selkeinä rakeina kauttaaltaan koko putkessa (kuvio 2). Obligatoriset aerobit bakteerit kasvavat aivan putken pinnassa, kun taas obligatoriset anaerobit kasvavat putken alaosassa. Mitä herkempi bakteeri on hapelle, sitä suurempi alue putken yläosasta on kirkas eli bakteeriton. Tätä putken yläosassa olevaa kirkasta aluetta kutsutaan estovyöhykkeeksi, joka kuvastaa bakteerin happiherkkyyttä. Myös putken ikä vaikuttaa bakteerittoman alueen kokoon, koska putki hapettuu vanhetessaan. Mikroaerofiilisten bakteerien kasvu sijoittuu putken yläosaan, jättäen kuitenkin pienen bakteerittoman alueen putken pintaan. (Salkinoja- Salonen 2002: 196; Forbes ym. 1998: 158; Mahon ym. 2000: 322.)



KUVIO 2. Tioglykolaattiputkessa näkyy grampositiiviselle kokkibakteerille ominaista raemaista kasvua.



KUVIO 3. Gramnegatiivinen fakultatiivinen sauvabakteeri samentaa kasvullaan koko tioglykolaattiputken.

3.2.4 Tioglykolaattiputken käyttöön liittyviä tutkimuksia

Laboratoriolla on käytettävissä monia erilaisia rikasteputkia. Erilaisten rikasteputkien suuren tarjonnan vuoksi Toronton yliopistossa Kanadassa on tehty vuonna 1996 tutkimus, jossa vertailtiin kymmentä eri rikasteputkea ja niiden kykyä parantaa valittujen vaativien bakteerilajien kasvua. Tutkimuksessa mukana oli myös Oxoid firman valmistama tioglykolaattielatusaine, josta meidänkin tutkimuksessa käytetyt tioglykolaattiputket ovat valmistettu. Tutkimuksessa käytettiin kolmea eri bakteeripitoisuutta ja seurattiin niiden kasvua putkissa seitsemän päivän ajan. Oxoidin tioglykolaattielatusaineesta valmistettu rikasteputki pääsi kolmen parhaimman rikasteputken joukkoon. Parhaimmat putket pystyivät pitämään yllä valtaosan tutkimuksessa käytettyjen bakteerilajien kasvua, jopa pienissä bakteeripitoisuuksissa, seitsemän päivän ajan. Tutkimustulosten perusteella voidaan päätellä, että tioglykolaattirikasteputki sopii hyvin laboratorioissa tutkittavien patogeenisten bakteerilajien kasvatukseen steriileistä näytteistä. (Scythes – Louie – Simor 1996: 1804 -1807.)

Tioglykolaattiputkea voidaan käyttää myös bakteerien säilytykseen, jos tarvitsee tehdä myöhemmin tutkimuksia bakteereille. Tioglykolaattiputken sopivuutta tähän tarkoitukseen on tutkittu Kalifornian yliopistossa vuonna 1995. Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla tioglykolaattiputken ja lihaliemiputken kykyä pitää yllä anaerobien bakteerien kasvua kahdeksan viikon ajan. Putkia säilytettiin valolta suojattuna huoneenlämmössä. Tioglykolaattiputkessa bakteerikasvua oli 48 tunnin kuluttua enemmän kuin lihaliemiputkessa. Kuitenkin kahdeksan viikon säilytyksen jälkeen, suurin osa tioglykolaattiputkissa kasvatetuista bakteereista oli kuollut. Tutkijoiden mukaan tioglykolaattiputken sisältämä kysteini ja tioglykolaatti voivat hapettua ja muodostaa toksisia happiradikaaleja anaeroobeille bakteereille. Tutkimuksen mukaan tioglykolaattiputki ei ole siis parhain mahdollinen valinta bakteerien pitkäaikaiseen säilytykseen, koska putkessa ei ole bakteereille toksisia happiradikaaleja neutraloivia aineita. (Claros ym. 1994: 2505-2507.)

4 BAKTEERIEN TUNNISTUS

4.1 Gramvärjäys

Bakteerit voidaan jaotella gramvärjäyksen perusteella gramnegatiivisiin eli punaisiin ja grampositiivisiin eli sinisiin. Muotonsa perusteella bakteereista voidaan päätellä, onko kyseessä kokki- vai sauvabakteeri. Gramvärjäystä käytetään pikadiagnostisena testinä suoraan potilasnäytteestä, sekä muiden tunnistustestien apuna jo kasvaneesta bakteeripesäkkeestä. Näyte levitetään puhtaalle lasille ohueksi kerrokseksi. Aluksi tehdään kiinnitys liekittämällä ja annetaan lasin jäähtyä hetken. Tämän jälkeen bakteerit värjätään kristallivioletilla sinivioletiksi, jonka jälkeen ylimääräinen väri huuhdotaan pois vedellä ja alkoholilla. Grampositiivisissa bakteereissa sinivioletti väri säilyy, kun taas gramnegatiivisista bakteereista väri huuhtoutuu pois, bakteerien soluseinän rakenteen eroista johtuen. Grampositiivisilla bakteereilla on paksu peptidoglykaanista muodostuva soluseinä, johon kristalliviolettiväri sitoutuu tiukasti, eikä se irtoa alkoholi huuhtelussa. Gramnegatiivisilla bakteereilla on ohuen peptidoglykaanikerroksen lisäksi lipopolysakkaridia sisältävä ulkokalvo. Huuhteluvaiheessa kristalliviolettiväri huuhtoutuu pois, koska alkoholi pääsee lipopolysakkaridikalvon läpi. (Heino - Vuento 2002: 72; Tarkka 2006: 2.) Gramnegatiiviset bakteerit saadaan näkyviin vastavärillä eli safriniinilla. Värjäystulos katsotaan mikroskoopilla. Osa bakteerilajeista on varsin helppo tunnistaa, mutta bakteerin värjäytyvyyteen ja morfologiaan vaikuttaa potilaan ennen näytteenottoa käyttämät mikrobilääkkeet. (Liimatainen 2000: 126- 128.) Myös bakteeriviljelmän ikä vaikuttaa värjäytyvyyteen, vanhemmat bakteerit eivät välttämättä enää värjäydy niille tyypillisellä tavalla (Bauman 2004: 110). Jotkin grampositiiviset bakteerit taas värjäytyvät luonnostaan punaisiksi (Tarkka 2006: 2).

4.2 Bakteeriviljely

Bakteeriviljely on tavallisin tutkimus bakteriologian laboratoriossa. Viljelyn avulla bakteeri voidaan tunnistaa tarkemmin ja saadaan selville sen mikrobilääkeherkkyys (Huovinen ym. kirja II. 2005: 22.) Bakteereja viljellään sekä maljoilla että nestemäisessä elatusaineessa, kuten veriviljelypulloissa. Viljelyyn käytettävät maljat valitaan sen mukaan, mistä näyte on otettu. Yksi lisääntymään kykenevä bakteeri jakaantuu yön yli

kasvatuksessa miljooniksi uusiksi bakteereiksi, koska kiinteällä elatusaineella liikkuminen estyy ja ne muodostavat pesäkkeen. Eri bakteerit kasvavat maljoilla erinäköisinä pesäkkeinä, joten ne kyetään näin erottamaan toisistaan. Bakteeripesäkkeen tunnistamista bakteerille ominaisen muodon perusteella kutsutaan pesäkemorfologiaksi. Tautia aiheuttavan bakteerin tunnistusta vaikeuttaa, muilta kun steriililtä alueelta otetuissa näytteissä, potilaan normaalifloora. Silloin tehdään puhdasviljelmä, johon otetaan vain yksi pesäke, ja tällä tavoin yhtä tiettyä bakteeria voidaan monistaa jatkotunnistusta varten. (Héllsten 2005: 95.)

5 TUTKIMUKSESSA KÄYTETTÄVÄT BAKTEERILAJIT JA SIENI

5.1 Grampositiiviset bakteerit

Grampositiiviset bakteerit värjäytyvät sinisiksi gramvärjäyksessä. Värjäytyvyyteen vaikuttaa grampositiivisilla bakteereilla oleva paksu peptidoglykaanista muodostuva soluseinä, johon kristallivioletti väri sitoutuu tiukasti. Kristallivioletti väri ei irtoa edes alkoholilla huuhdettaessa. (Heino - Vuento 2002: 72; Tarkka 2006: 2.)

5.1.1 Kokkibakteerit

Grampositiivisista aerobeista kokeista tutkimme *Staphylococcus aureuksen*, *Streptococcus pyogeneksen*, *Streptococcus pneumoniaen* ja *Enterococcus faecaliksen* kasvua tioglykolaattiputkessa. Grampositiivisista aerobeista kokeista suurin osa kuuluu ihmisen normaaliflooraan. Ne pystyvät kuitenkin aiheuttamaan vakaviakin infektioita, niin perusterveelle kuin puolustuskyvyltään heikentyneellekin ihmiselle. (Mahon ym. 2000: 330.) Tutkimuksemme grampositiivista anaerobia kokkibakteeria edustaa *Micromonas micros*. Grampositiiviset anaerobit kokkibakteerit kuuluvat ihmisen normaaliflooraan. Ne ovat yleensä opportunisteja ja ovat usein mukana sekainfektioissa. (Murray – Baron – Jorgensen – Pfaller – Tenover – Tenover 2003: 857.)

Stafylokokit ovat grampositiivisiä fakultatiivisesti anaerobeja ryhmäkokkeja (Pönkä 1999: 21). *Staphylococcus aureus* eroaa muista stafylokokkiryhmän bakteereista siten, että

se on koagulaasipositiivinen eli se pystyy hyydyttämään plasman. Muut stafylokokit ovat koagulaasinegatiivisiä. *Staphylococcus aureus* voi aiheuttaa infektion sekä terveelle, että vastustuskyvyltään heikentyneelle ihmiselle. Ainakin 50 % ihmisistä kantaa *S. aureusta* normaalifloorassaan, joko jatkuvasti tai tilapäisesti. Bakteri leviää ihmisestä toiseen kosketuksen ja aerosolitartunnan välityksellä. Bakteerit tarvitsevat kuitenkin tartuntareitiksi vauriokohdan, koska terveen ihon tai limakalvon läpi ne eivät pääse. (Huovinen ym. 2005: 98- 106.) *S. aureuksen* aiheuttamia kliinisiä infektioita ovat ruokamyrkytykset, märkäiset iho- ja pehmytkudosinfektiot, kirurgiset haavainfektiot, luu- ja nivelinfektiot sekä vakavat yleisinfektiot (Pönkä 1999: 21).

Streptokokit ovat grampositiivisia ketjukokkeja ja suurin osa niistä on fakultatiivisesti anaerobeja. Ne voidaan jakaa pinta-antigeeniensä mukaan A-, B-, C- ja G-ryhmän sekä viridans-ryhmän streptokokkeihin. Streptokokit voidaan jakaa myös α -, β - tai γ -hemolyyttisiin, sen mukaan kuinka ne hajottavat punasoluja. (Mahon ym. 2000: 346-349.) *Streptococcus pyogenes* on β -hemolyyttinen A-ryhmän streptokokki. *S. pyogenes* tarttuu helposti pisara- ja kosketustartuntana, ja on yleisin leikki-ikäisillä lapsilla sekä nuorilla aikuisilla (Héllsten 2005: 36). *S. pyogenes* aiheuttaa yleisimmin nieluinfektiota eli tonsilliittia, mutta se voi aiheuttaa myös iho- ja pehmytkudosinfektioita sekä vakavia yleisinfektioita (Huovinen ym. 2005: 111- 117).

Streptococcus pneumoniae eli pneumokokki on grampositiivinen kapselillinen fakultatiivisesti anaerobinen diplokokki (Mahon ym. 2000: 366). Se kuuluu hengitysteiden normaaliflooraan (Héllsten 2005: 37). Pneumokokki on kasvuolosuhteiltaan hyvin vaativa, joten se kuolee helposti epäedullisissa olosuhteissa. Terveistä aikuisista 5- 10 % voi olla oireettomia kantajia, lapsista jopa 60 %. Pneumokokki leviää pisaratartuntana ja infektion aiheuttajana on yleensä omasta hengitystiefloorasta peräisin oleva pneumokokki. Pneumokokki on tavallisin keuhkokuumeen ja akuutin välikorvatulehduksen aiheuttaja. Se on myös toinen kahdesta yleisimmästä aivokalvontulehduksen aiheuttajasta. (Huovinen ym. 2005: 120- 123.)

Enterokokit eli D-ryhmän streptokokit ovat grampositiivisia ketjukokkeja. *E. coli* jälkeen, enterokokit ovat yleisimpiä fakultatiivisesti anaerobeja suolistobakteereja (Bioinformatics Support Portal 2003). Kliinisesti merkittävimpiin enterokokkeihin kuuluu *Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus faecium*. Enterokokit aiheuttavat infektioita pääasiassa vain silloin, kun ihmisen puolustuskyky on heikentynyt esim. vakavan perussai-

rauden tai kirurgisen toimenpiteen takia. Tavallisin *Enterococcus faecalis* aiheuttama infektio on virtsatieinfektio. Enterokokkia löydetään usein myös osana sekaflooraa selluliiteissa ja vatsan tai lantion seudun syvissä infektioissa. (Héllsten 2005: 40; Huovinen ym. 2005: 129- 131.)

Micromonas micros, entiseltä nimeltään *Peptostreptococcus micros*, on grampositiivinen obligatorisesti anaerobi kokkibakteeri. Se voi olla mukana kasvojen ja kaulan alueen infektioissa. *Micromonas micros* liittyy usein kurkkupaiseeseen, hammasperäisiin leukojen ja kaulan selluliitteihin sekä absesseihin. Pahimmillaan *Micromonas microksen* aiheuttama infektio voi johtaa aivoabsessiin. (Murray ym. 2003: 857- 859.)

5.1.2 Sauvabakteerit

Bacillus cereus, *Listeria monocytogenes* ja *Corynebacterium jeikeium* edustavat tutkimuksessamme grampositiivisia aerobisia sauvoja. *Bacillus cereusta* ja *Listeria monocytogenestä* löytyy runsaasti maaperästä, ja ne voivat aiheuttavat mm. ruokamyrkytyksen. *Corynebacterium jeikeium* kuuluu ihmisen normaaliflooraan, aiheuttaen infektioita vastustuskyvyn heikettyä. (Bauman 2004: 532- 533.) Tutkimukseemme valittiin grampositiivisista anaerobeista sauvoista *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus acidophilus* ja *Propionibacterium acnes*. Klostridit ovat itiöllisiä bakteereja, joita löytyy luonnosta ja ihmisen suoliston normaalifloorasta. Ne aiheuttavat infektioita tuottamiensa toksien välityksellä. Laktobasilli ja propionbakteeri kuuluvat ihmisen normaaliflooraan, aiheuttaen opportunistisia infektioita. (Mahon 2000: 594, 599.)

Itiöitä muodostava *Bacillus cereus* on grampositiivinen fakultatiivisesti anaerobinen sauvabakteeri. Se on hyvin yleinen löytö maaperässä, pölyssä ja luonnon vesissä. *Bacillus cereus* tunnetaan parhaiten ruokamyrkytysbakteerina. Se voi aiheuttaa kahden tyypistä ruokamyrkytystä toksiiniensa välityksellä. Lyhytaikaisemmassa hallitsee oksentelu ja pidempiaikaisemmassa taudinkuvaa hallitsee ripuli. (Pönkä 1999: 26.) Puolustuskyvyltään heikentyneille ihmisille *Bacillus cereus* voi aiheuttaa haavainfektion tai jopa sepsiksen (Huovinen ym. 2005: 152- 153).

Listeria- suvun lajeista vain *Listeria monocytogenes* on kliinisesti merkittävä ihmiselle. Muiden listerialajien ei ole osoitettu aiheuttavan infektioita ihmisille. *Listeria monocy-*

togenes on grampositiivinen fakultatiivisesti anaerobinen sauva. (Pönkä 1999: 63.) Se on yleinen löytö eläimissä, mutta sitä tavataan myös elintarvikkeissa ja ihmisen suolistossa. *Listeria monocytogenes* voidaan jakaa 13 serotyyppiin, joista 1/2a, 1/2b ja 4b aiheuttavat yli 90 % kaikista infektioista. Listeriainfektio saadaan yleensä bakteerin kontaminoiman ruoan kautta. Tavallisesti listerioosiin sairastuvat vastustuskyvyltään heikentyneet ihmiset. Tauti ilmenee sepsiksenä, meningiittinä tai meningoenkefaliittina. Terveille ihmisille listeriainfektio aiheuttaa ruokamyrkytyksen kaltaisia oireita. Listerioosi on luokiteltu ilmoitettavaksi tartuntataudiksi. (Huovinen ym. 2005: 137- 140.)

Corynebacterium jeikeium on difteroideihin eli koryneformeihin kuuluva grampositiivinen aerobinen sauva. Bakteeri vaatii sille tyypillisen kasvuympäristön. Difteroidit muistuttavat solumorfologialtaan *Corynebacterium diphtheriae*, joka on kurkkumädän aiheuttaja. (Huovinen ym. 2005: 153- 154.) Difteroidit kuuluvat ihmisen ihon ja limakalvojen normaaliflooraan. Ne aiheuttavat tauteja vain, jos ihmisellä on heikentynyt yleinen ja paikallinen vastustuskyky. *Corynebacterium jeikeium* on merkittävä hankalahoitosten sairaalainfektioiden aiheuttaja, jotka usein liittyvät verisuonikatetriin (Huovinen ym. 2005: 153- 154). Se voi aiheuttaa vakavaa perustautia sairastavalle potilaalle mm. sepsiksen, haavainfektion, aivokalvon tulehduksen tai tekoläppäendokardiitin. *Corynebacterium jeikeium* on resistentti lähes kaikille tavanomaisille bakteerilääkkeille. (Mahon ym. 2000: 380.)

Klostridit ovat suuria itiöllisiä, anaerobeja grampositiivisia sauvabakteereja. Ne ovat yleisiä maaperässä, eläinten ja ihmisten suoliston normaalifloorassa eläviä bakteereja. Klostridit voivat elää itiömuotoisina pitkään karuissakin olosuhteissa. Clostridiumlajien happiherkkyys vaihtelee suuresti. *Clostridium perfringens* on anaerobibakteeri, mutta se pystyy elämään hapekkaassakin ympäristössä. Se voi aiheuttaa vaarallisen kaasukuolion, kun energian tuotannon lopputuloksena syntyneet liukenematon typpi ja vety jäävät vaurioituneeseen kudokseen. *Clostridium perfringens* kykenee tuottamaan monenlaisia eksotoksiineja ja eri kudskomponentteja tuhoavia entsyymejä. *C. perfringensin* A-tyyppi erittää ruokaan toksiinia, joka aiheuttaa tavallisesti ruokamyrkytyksiä. *Clostridium difficile* on taas hyvin happiherkkä bakteeri eli se on obligatorisesti anaerobi. Se tuottaa ainakin kahta toksiinia, jotka aiheuttavat mikrobilääkehoitoon liittyvää pseudomembranoottista koliittia ja antibioottiripulia. (Héllsten 2005: 50; Mahon ym. 2000: 594- 599.)

Laktobasillit ovat sauvabakteereja, jotka eivät kykene muodostamaan itiöitä. Useimmat laktobasillit ovat mikroaerofiilisiä ja niiden aiheuttamat infektiot todella harvinaisia. Laktobasillit aiheuttavat infektiota pääasiassa immuunipuutteisille henkilöille. Ne toimivat pääasiassa tärkeinä normaaliflooran tasapainon säilyttäjinä, niin suolistossa kuin emättimen limakalvolla. (Koneman Allen – Janda – Schreckenberger – Winn Jr. 1997: 670.) Siksi laktobasillia voidaankin käyttää hyödyksi vaginosisin ja ripulin hoidossa (Murray ym. 2003: 869).

Propionibakteerit ovat ihon normaaliflooran sauvabakteereita. Ne kontaminoivat usein veriviljelypullot näytteenottohetkellä, ihon huonon puhdistamisen vuoksi. Propionibakteerit voivat aiheuttaa heikkokuntoiselle potilaalle myös todellisen infektion. *Propionibacterium acnes* on mikroaerofiilinen ihon syvempien osien normaaliflooran bakteeri, joka tuottaa lipaasia. Lipaasi hydrolysoi talirauhasten erittämiä rasvoja glyseroliksi ja rasvahapoiksi. Hormonien vaikutuksesta bakteerien määrä voi lisääntyä niin paljon, että se houkuttelee leukosyyttejä paikalle, josta seuraa tulehdusreaktio ja finnin muodostuminen. *Propionibacterium acnesilla* onkin suuri merkitys aknen synnyssä. (Huovinen ym. 2005: 238; Bauman 2004: 561- 562).

5.2 Gramnegatiiviset bakteerit

Gramnegatiiviset bakteerit värjäytyvät gramvärjäyksessä punaisiksi. Gramnegatiivisilla bakteereilla on ohuen peptidoglykaanikerroksen lisäksi lipopolysakkaridia sisältävä ulkokalvo, joka päästää kristallivioletin ulos solusta alkoholihuuhtelun aikana. Punainen väri tarttuu bakteerisoluihin värjättäessä safriniinilla, joka on kristallivioletin vastaväri. (Tarkka 2006: 2.)

5.2.1 Kokkibakteerit

Gramnegatiivisista aerobeista kokeista tutkimukseemme valittiin *Neisseria meningitidis* eli meningokokki. Se on kapselillinen obligatorisesti aerobinen diplokokki. Meningokkia voi esiintyä harmittomana nenänielun floorassa. Meningokit voidaan jakaa 13 serologiseen ryhmään erilaisten pintarakenteidensa mukaan. Yleisimmät taudinaiheuttajat ovat A-, B- tai C- ryhmät. Meningokokki on tunnetuin bakteerimeningiitin eli aivokalvontulehduksen aiheuttaja, ja se infektoi pääasiassa nuoria aikuisia ja lapsia (Héllsten

2005: 46). Meningokokki voi aiheuttaa myös hengenvaarallisen septisen sokin. Tapaavuus on 15- 80 %, ja hengissä selvinneillekin voi tulla vakavia jälkitauteja. (Huovinen ym. 2005: 160- 164.)

5.2.2 Sauvabakteerit

Escherichia coli, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Klebsiella pneumoniae* ovat tutkimuksessamme käytettävät gramnegatiiviset aerobiset sauvat. Nämä bakteerit kuuluvat ihmisen normaaliflooraan, aiheuttaen infektioita vain ihmisen puolustuskyvyn heikettyä. Gramnegatiivisia anaerobeja sauvoja edustaa tutkimuksessamme *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter jejuni* ja *Fusobacterium necrophorum*. *Bacteroides fragilis* ja *Fusobacterium necrophorum* ovat opportunistisia infektioita aiheuttavia bakteereja, kun taas *Campylobacter jejuni* esiintyy eläinten suolistossa, ja ihminen voi saada sen kontaminoituneesta eläimen lihasta. (Bauman 2004: 567.)

Escherichia coli eli kolibakteeri on enterobakteereihin kuuluva fakultatiivisesti anaerobinen gramnegatiivinen sauva. Se kuuluu ihmisen suoliston normaaliflooraan, muodostaen valtaosan suoliston aerobisesta bakteerifloorasta. Aerobisten bakteerien osuus suolistossa on kuitenkin vain yhden prosentin luokkaa, loppu koostuu anaerobeista. *E. coli* voi aiheuttaa opportunistisia infektioita, joista virtsatieinfektio on tavallisin (Héllsten 2005: 40). *E. coli* voi aiheuttaa kirurgisia infektioita tai sepsiksen, ja voi olla mukana myös suolistoalueen sekainfektioissa. Tiedyt *E. coli*- kannat voivat aiheuttaa myös suolistoinfektioita erityisten virulenssiominaisuuksien avulla esim. EHEC- eli enterohemorraginen kanta. (Huovinen ym. 2005: 177- 181.)

Haemophilus influenzae on pieni gramnegatiivinen fakultatiivisesti anaerobinen sauva (Mahon ym. 2000: 433). Hemofilukset kuuluvat ihmisen suun normaaliflooraan. *Haemophilus influenzae* on kapselillisia ja kapselittomia muotoja. Kummatkin muodot voivat infektoida, mutta kapselillinen on vaarallisempi. *Haemophilus influenzae B* on kapselillisista virulentein (Héllsten 2005: 38). Kapselillinen muoto voi aiheuttaa mm. aivokalvontulehduksen, kurkunkannentulehduksen tai keuhkokuumeen. Kapseliton muoto aiheuttaa välikorvatulehdusta ja kroonista keuhkoputkentulehdusta. (Huovinen ym. 2005: 166- 169.)

Pseudomonas aeruginosa on hoikka gramnegatiivinen obligatorisesti aerobinen sauva. Se kolonisoituu ihmisillä välilihan, kainaloiden ja korvien alueelle. (Huovinen ym. 2005: 195- 199.) *Pseudomonas aeruginosa* on opportunisti, joten se ei voi infektoida perustervettä ihmistä. Vastuskyvyltään heikentyneen ihmisen esim. sairaalahoidossa olevan potilaan pseudomonas voi infektoida. Tavallisin *Pseudomonas aeruginosan* aiheuttama tulehdus on ulkokorvatulehdus. Bakteri voi aiheuttaa myös mm. ihotulehduksen, ruoansulatuskanavan infektion tai keratiitin. (Koneman ym.1997: 265)

Klebsiellat ovat fakultatiivisesti anaerobeja suoliston normaaliflooraan kuuluvia bakteereja. Ne aiheuttavat harvoin infektioita perusterveelle väestölle, mutta kuuluvat kuitenkin tärkeimpiin sairaalainfektion aiheuttajiin. Klebsiellat ovat maljalla tavallisesti limaisia, koska kykenevät muodostamaan polysakkaridikapselin. Klebsiellat voidaan luokitella yli 70 K-antigeenityyppiin polysakkaridikapselinsa perusteella. (Mahon ym. 2000: 473- 474.) *Klebsiella pneumoniae* aiheuttaa jopa kuolemaan johtavan keuhkokuumeen, se voi olla aiheuttajana myös virtsatieinfektiossa sekä kirurgisissa haavainfektioissa. Klebsiellat ovat ampisilliinille resistenttejä, koska tuottavat beetalaktamaasia. (Huovinen ym. 2005: 192.)

Bacteroides-suku kuuluu kehon tyypillisimpiin opportunisteihin, jotka kykenevät yleensä aiheuttamaan taudin vasta isännän puolustuskyvyn heikennyttyä. *Bacteroides fragilis* on obligatorisesti anaerobinen, ja se aiheuttaa tavallisesti infektioita lantion ja suoliston alueelle. *Bacteroides fragilixen* polysakkaridikapseli toimii nähtävästi bakteerin virulenssitekijänä eli taudinaiheuttamiskyvyn tekijänä. (Huovinen ym. 2005: 241- 242)

Kampylobakteerit aiheuttavat tavallisimmin ihmisille suolitulehduksia ja *Campylobacter jejuni* on syynä 90- 95 %:iin infektioista. *Campylobacter jejuni* kasvaa parhaiten mikroaerofiilisessä atmosfäärissä + 42 °C:teen lämpötilassa (Mahon 2000: 530). Kampylobakteeri-infektio aiheuttaa tavallisesti vetistä, joskus veristäkin, ripulia ja kuumetta 3-5 vuorokaudeksi. Infektion syntyyn riittää hyvinkin pieni määrä bakteeria. Kampylobakteerit ovat usein resistenttejä monille mikrobilääkkeille, mutta tauti menee usein ohi ilman lääkitystä. Kampylobakteereja esiintyy eläinten suolistossa ja usein infektion lähteenä onkin eläin tai eläimistä valmistettu huonosti kypsennetty ruoka. (Huovinen ym. 2005: 215- 218.)

Fusobakteerit voivat aiheuttaa kaulan, keuhkojen ja suuontelon alueella infektoita. *Fusobacterium necrophorum* on melko harvinainen, mutta hyvin virulentti bakteeri. Se voi aiheuttaa vakavia, jopa sepsikseen johtavia infektoita lapsille ja nuorille aikuisille. (Murray ym. 2003: 883.)

5.3 Sienet

Candida albicans on tutkimuksemme ainoa sieni. Candida- suvun sienet kuuluvat hiiwasieniin. Hiivat ovat yksisoluisia sieniä, jotka ovat rakenteeltaan yksittäisiä pyöreitä, soikeita tai pitkänomaisia soluja. Ne lisääntyvät kuromalla emosolusta samanlaisen tytärsolun, jolloin muodostuu pitkiä ketjuja. Candida- suvun sienet kasvavat pyöreinä tai soikeina hiiwasoluina tai hiivarihmana. Niitä voidaan löytää suun ja ruoansulatuskanavan alueelta sekä genitaalialueelta. Candida- suvun sienet voivat aiheuttaa immuunivajeisille potilaille iho- ja limakalvoinfektioiden lisäksi, myös äkillisiä ja varsin pitkäaikaisiakin syviä sieni-infektioita. Tällainen yhteen elimeen tai laajemmalle levinnyt infektio voi johtaa kuolemaan. (Héllsten 2005: 74- 80.)

6 TUTKIMUSONGELMAT

Pääongelmanamme on selvittää, miten tioglykolaattiputkea voisi käyttää paremmin hyödyksi bakteerien tunnistuksessa bakteriologian osaston märkäviljelytyöpisteissä. Voidaanko mahdollisesti putkessa olevaa kasvua katsomalla päätellä alustavasti, mikä bakteerilaji on mahdollisesti kyseessä. Lähdemme hakemaan ratkaisua tähän ongelmaan selvittämällä, miten eri bakteerilajit kasvavat tioglykolaattiputkessa, ja miten bakteerien hapenkäyttö vaikuttaa kasvun sijoittumiseen putkessa. Ennen kuin voimme aloittaa tutkittavien bakteerien viljelyn tioglykolaattiputkiin, meidän tulee löytää sopiva bakteerisuspensio. Bakteeripitoisuus tulisi olla lähellä potilasnäytteiden bakteeripitoisuuksia tioglykolaattiputkessa.

1. Mikä on sopivin ja potilasnäytettä lähinnä oleva bakteerisuspensiolaimennos luotettavan tuloksen saamiseksi? Aluksi meidän on tehtävä muutama laimennossarja sekä kokkibakteereille että sauvabakteereille, jotta voimme valita parhaan laimennoksen, joka olisi lähellä tioglykolaattiputkiin viljeltyjen varsinaisten potilasnäytteiden si-

sältämää bakteerimäärää. Laimennoskokeilu pitää tehdä sekä kokeille että sauvoille, koska niiden kasvutavat tioglykolaattiputkessa ovat niin erilaiset, ja tavoitteenamme on löytää sellainen bakteerimäärä, jota voimme käyttää kaikille tutkittaville bakteereille.

2. Miten tioglykolaattiputkesta saatavaa informaatiota voidaan hyödyntää bakteerin varsinaisessa tunnistuksessa merkävilytelytyöpisteessä esimerkiksi jatkotunnistustestejä valittaessa? Jatkotunnistustestit valitaan sen mukaan onko tutkittava bakteeri grampositiivinen vai negatiivinen, sauva vai kokki, anerobi vai aerobi. Tioglykolaattiputkessa nähtävän kasvutavan ja kasvun sijoittumisen perusteella voitaisiin valita tehtävät jatkotunnistustestit, yhdessä muiden apuna käytettävien tunnistustestien kanssa (esim. gramvärjäys ja pesäkemorfologia).

3. Miten tioglykolaattiputkessa havaitun kasvun perusteella voidaan alustavasti päätellä, mikä bakteerilaji on kyseessä? Kokkibakteerit ja sauvabakteerit pitäisi voida erottaa tioglykolaattiputkessa erilaisen kasvutapansa vuoksi. Myös bakteerin liikkuvuus ja hapenkäyttö vaikuttavat bakteerin kasvuun tioglykolaattiputkessa.

4. Miten fakultaviivisesti anaerobien bakteerien kasvu sijoittuu tioglykolaattiputkessa? Miten obligatoriset anaerobit bakteerit kasvavat tioglykolaattiputkessa? Miten obligatorisesti aerobien bakteerien kasvu sijoittuu tioglykolaattiputkessa? Millä tavalla mikroaerofiilit kasvavat tioglykolaattiputkessa? Kasvun sijoittumisen perusteella pitäisi kyetä arvioimaan bakteerin hapenkäyttöä, ja sanomaan onko kyseessä mikroaerofiilinen bakteeri, obligatorisesti aerobi-, obligatorisesti anaerobi- vai fakultatiivisesti anaerobibakteeri. Tämä tieto voi osaltaan auttaa tutkittavan bakteerin tunnistuksessa.

7 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN

7.1 Työtavat ja menetelmät

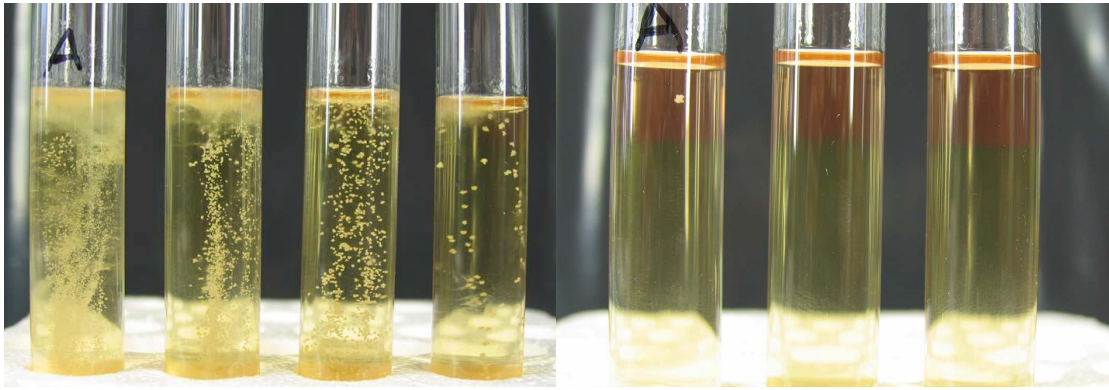
Aluksi etsimme sopivan laimennoksen, testaamalla muutamalla bakteerilajilla eri vahvuisia laimennoksia. Valitsimme potilasnäytteitä lähinnä olevan bakteeripitoisuuden, jota käytimme jatkossa kaikkiin tutkittaviin bakteereihin. Viljelimme tioglykolaattiput-

ket, ja kasvatimme niitä kunnes kasvu näkyi selkeästi. Valokuvasimme tulokset ja kuvailimme kasvua myös sanallisesti.

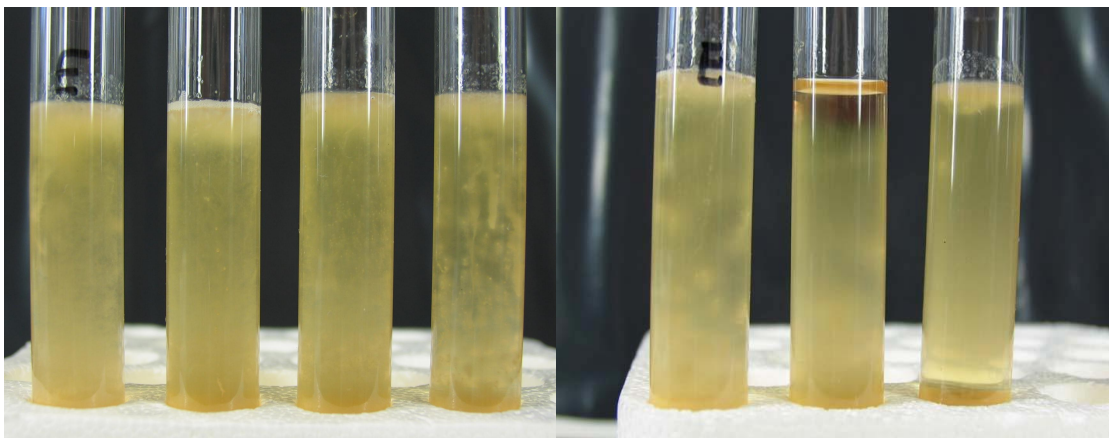
7.1.1 Laimennoksen testaaminen

Testasimme sopivaa laimennosta kolmella eri kontrollikannalla: *E. coli*, *S. aureus* ja *Ent. faecium*. Tavoitteenamme oli löytää sopiva, potilasnäytteitä lähinnä oleva laimennos. Valmistimme ensin 1,0 MacFarlandin suspension, joka vastaa bakteerimäärältään suunnilleen pitoisuutta 3×10^8 /ml. Bakteripitoisuuteen MacFarland 1,0 suspensiossa vaikuttaa bakteerin koko, ja esimerkiksi sienillä tämä luku tulisi jakaa 30:llä. (Murray - Baron – Pfaller – Tenover – Tenover – Tenover – Yolken 1999: 1669). Mittasimme bakteeritiheyden bioMérieux® Densimat-laitteella, jossa mitattavan putken läpi heijastetaan valonsäde, jolloin saadaan kaksi mittaustulosta: hajavallo S ja heijastunut valo T. Näiden suhde on suoraan verrannollinen bakteerisuspension tiheyteen. (bioMérieux 1997: 5.) Densimat-laitteen antamien tulosten luotettavuuden tarkastimme kaupallisilla kontrolleilla, jotka antoivat tulokset 1,5 ja 0,8. Kontrollien tulokset olivat viitearvojen rajoissa, joten myös mittaamamme tulokset olivat luotettavia. Oikean suspension löydyttyä valmistimme 1/10 laimennossarjan, pipetoimalla seitsemään putkeen 100 µl laimennosta aina edellisestä putkesta seuraavaan. Putkissa oli valmiiksi 900 µl NaCl:a. Sekoitimme putket fortextilla ja pipetoimme tämän jälkeen finnpipeteillä. Pipetinkärki vaihdettiin aina putkien välillä. Teimme laimennokset 1/10 – 1/10 000 000. Jokaisesta laimennoksesta teimme viljelyn pumpulitikulla tioglykolaattiputkeen vetokaapissa ja kasvatimme putkia yön yli lämpökaapissa. (Tarkka 2004: 2.)

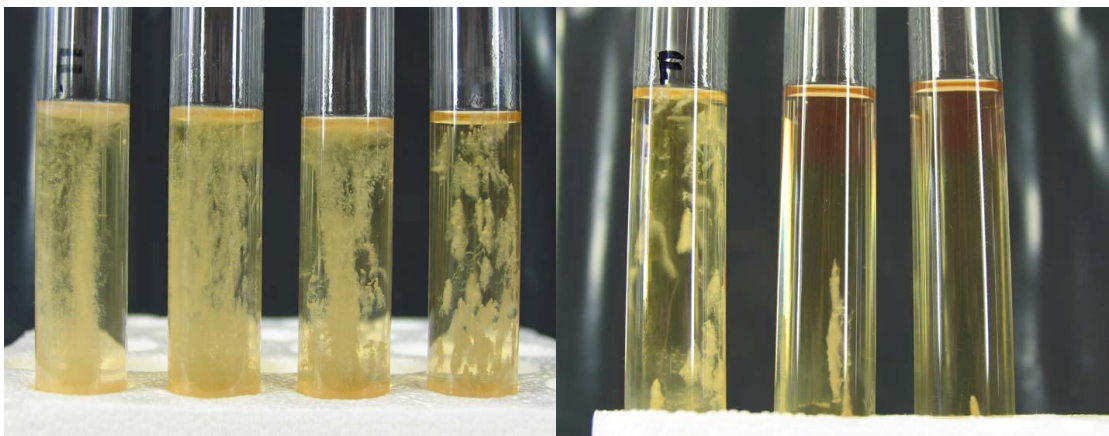
Yön yli kasvatuksen jälkeen valitsimme parhaan laimennoksen, jota käytimme myöhemmin kaikkiin tutkittaviin bakteerikantoihin. Parhaan kasvun tioglykolaattiputkessa antoi laimennokset 1/100 ja 1/1000. *S. aureuksen* ja *Ent. faeciumin* kasvu näkyi selkeimmin putkissa 2 ja 3 (kuvio 4 ja kuvio 6). *E. coli* samentaa tyypilliseen tapansa melko samalla tavalla kaikki putket, laimentamisesta huolimatta eli eroa bakteerimäärässä ei pystytä havaitsemaan (kuvio 5). Teimme siis jatkossa laimennossarjan tutkittavista bakteerilajeista vain 1/1000 asti. Valitsimme laimennokset 1/100 ja 1/1000, koska ne parhaiten edustivat potilasnäytteiden bakteeripitoisuutta. Valitsimme kaksi laimennosta tutkittavaksi, koska eri bakteerit kasvavat tioglykolaattiputkessa eri voimakkuudella.



KUVIO 4. *Staphylococcus aureuksen* laimennossarja 1/10 – 1/10 000 000 vasemmalta oikealle laimentuen.



KUVIO 5. *E. colin* laimennossarja 1/10 – 1/10 000 000 laimeten vasemmalta oikealle.



KUVIO 6. *Enterococcus faeciumin* laimennossarja 1/10 – 1/10 000 000 vasemmalta oikealle laimentuen.

7.1.2 Viljely maljoille ja tioglykolaattiputkeen

Viljelimme tutkittavista aerobibakteereista puhtasviljelmät maljoille. Käytimme laboratorion kontrollikantoja. Verimaljalle viljelimme *S. aureuksen*, *Str. pyogeneksen*, *Str. pneumoniaen*, *Ent. faecaliksen* ja *Listeria monocytogeneksen*. Suklaamaljalle viljelimme *Neisseria meningitidiksen*, *Bacillus cereuksen*, *Corynebacterium jeikeiumin* ja *Haemophilus influenzae B:n*. Cled-maljalle viljelimme *E. colin*, *Pseudomonas aeruginosan* ja *Klebsiella pneumoniaen*. *Candida albicansin* viljelimme sp-maljalle. Valitsimme yleismaljat, joilla nämä bakteerit kasvavat parhaiten. Kasvatimme *Str. pyogeneksen*, *Str. pneumoniaen* ja *Haemophilus influenzae B:n* yön yli hiilidioksidikaapissa ja muut lämpökaapissa.

Anaerobibakteereista teimme puhtasviljelmät laboratorion kontrollikannoista ja pakastetuista laaduntarkkailukannoista. Faa-maljalle viljelimme *Lactobacillus acidophiluksen*, *Probionibacterium acnesin*, *Bacteroides fragilliksen* ja *Fusobacterium necrophorumin*. *Micromonas micros*in viljelimme BR+K3+H- maljalle ja *Clostridium difficilen* viljelimme tioglykolaattiputkessa kasvavasta kontrollikannasta Faa- ja GGFA- maljoille. *Campylobacter jejunin* viljelimme verimaljalle ja kasvatimme sen mikroaerofiilisesä olosuhteissa + 42 °C:ssa. Muut maljat laitoimme kasvamaan lämpökaappiin anaerobiosuhteisiin.

Yön yli kasvatuksen jälkeen tarkistimme silmämääräisesti, että bakteerit kasvoivat maljoilla puhtaina. Tämän jälkeen teimme laimennossarjat tutkittavista aerobeista ja anaerobeista bakteerikannoista 1/1000:een asti. Viljelimme pumpulitikulla tioglykolaattiputkiin jokaiselta bakteerilta sekä laimennoksen 1/100 että 1/1000. Eli jokaisesta bakteerista tuli kaksi tioglykolaattiputkea. Laitoimme putket kasvamaan yön yli lämpökaappiin ja käyttämämme puhtasviljelmämaljat lisäkasvuun.

Viljelimme yksittäisten bakteerien lisäksi myös muutaman tioglykolaattiputken, jossa oli kahta tai kolmea eri bakteeria. Valitsimme sekaviljelmiin yhden anaerobin ja yhden aerobin kokkibakteerin, sekä kaksi aerobista sauvabakteeria. Käytimme sekaviljelmissä 1/100 laimennosta *Micromonas mikrokselle* ja 1/1000 laimennosta *Staphylococcus aureukselle*, *Pseudomonas aeroginosalle* sekä *E. colille*. Teimme useampaa bakteeria si-

sältäviä tioglykolaattiputkiviljelyitä, koska märkävilyllynäyteissä, joiden viljelyyn tioglykolaattiputkea käytetään, kasvaa usein enemmän kuin yhtä bakteeria.

Tarkistimme bakteerien tioglykolaattiputkiviljelmät yön yli kasvatuksen jälkeen, ja teimme tioglykolaattiviljelyistä puhtasviljelmät ja gramvärjäykset, ottamalla putkesta pisaran näytettä. Näin tarkastimme, että tioglykolaattiputkissa kasvoivat varmasti tutkimamme bakteerit puhtaina. Vertasimme myös gramvärjäyksiä ”Oppimismateriaali gramvärjäyksistä” opinnäytetyön mikroskooppikuviin. Tioglykolaattiputkista tehdyt puhtasviljelmät katsoimme yön yli kasvatuksen jälkeen ja havaitsimme bakteerien kasvavan maljoilla puhtaina. *Haemophilus influenzae B*:n kasvu tioglykolaattiputkessa ei ollut silmin havaittavissa, mutta gramvärjäyksen ja puhtasviljelmän avulla totesimme, että tioglykolaattiputkessa todella kasvoi *Haemophilus influenzae B*:tä. Tällainen kasvu tioglykolaattiputkessa on ominaista *Haemophilus influenzae*.

Anaerobeista bakteereista *Micromonas microsta*, *Lactobacillus acidophilusta* ja *Propionibacterium acnesta* jouduimme kasvattamaan useamman vuorokauden ajan, sekä maljoilla että tioglykolaattiputkissa, ennen kuin kasvu näkyi kunnolla. *Campylobacter jejuni* ja *Corynebacterium jeikeiumista* jouduimme tekemään vahvemmat 1,0 MacFarlandin laimennokset, jotka viljelimme tioglykolaattiputkiin. Näin saimme kasvun paremmin näkymään. *Fusobacterium necrophorum*in viljelimme lopulta suoraan maljalla kasvavista pesäkkeistä tioglykolaattiputkeen ilman laimentamista, koska muuten emme saaneet sitä kasvamaan putkessa. *Fusobacterium necrophorum* on niin happiherkkä bakteeri, että se luultavasti kuoli laimennettaessa.

7.1.3 Tioglykolaattiputkien kuvaaminen

Aluksi kuvasimme tioglykolaattiputkia laboratoriohoitaja Risto Hillan avustuksella. Hän opasti meitä Canon PowerShot Pro1 digikameran käytössä ja oikean kuvakulman valitsemisessa. Kuvasimme putket vetokaapissa mustaa taustaa vasten. Tällä taustalla putkien kasvu tuli parhaiten esille. Testasimme putkille eri pidikkeitä, jotta saimme putkesta parhaimman kuvan. Myös valaistusta, etäisyyttä ja kuvakulmaa muuttamalla yritimme löytää selkeimmän lopputuloksen.

Valitsimme aerobeista bakteereista kuvattaviksi 1/1000 laimennokset, *Candida albicansista* valitsimme 1/100 laimennoksen, koska näissä kasvu oli edustavinta. Anaerobeista kuvasimme osasta 1/100 ja osasta 1/1000 laimennoksen sen mukaan kummassa kasvu näkyi selvemmin. *Campylobacter jejuni* ja *Corynebacterium jeikeiumista* kuvasimme uudelleen tehdyt vahvemmat 1,0 MacFarlandin laimennokset ja *Fusobacterium necrophorumista* kuvasimme suoraan maljalta tioglykolaattiputkeen tehdyn viljelyn. Kuvasimme aerobibakteerien tioglykolaattiputket sekä yhden että kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen. Työhömmme valitsimme kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen otetut kuvat, koska niissä putkissa oleva kasvu näkyi selkeimmin ja kuvien laatu oli tarkempi. Anaerobibakteerien kasvuajat vaihtelivat suuresti, joten kuvasimme niitä sen mukaan kun kasvu alkoi näkyä selkeästi.

7.2 Ongelmatilanteet

Ongelmana oli pakasteesta otettujen bakteerikantojen hidas ja niukka kasvu. Jouduimme kasvattamaan niitä pitkään ja tekemään uusintaviljelyjä, ennen kuin saimme ne kasvamaan kunnolla. Teimme muutamista anaerobibakteereista uudet vahvemmat laimennokset, mutta silti ne eivät kasvaneet tioglykolaattiputkissa vaikka maljoilla kasvu oli runsasta. Syynä tähän saattoi olla bakteerien happiherkkyys, jonka seurauksena ne eivät kasvaneet putkissa. Aluksi myös kuvauksen kanssa oli ongelmia mm. oikean kuvakulman, kuvausalustan ja taustan löytäminen tuotti välillä vaikeuksia.

8 TULOKSET JA TULKINTA

Tulkitsimme saamamme tulokset katsomalla miten, ja missä kohtaa bakteeri kasvaa tioglykolaattiputkessa, sekä kuvasimme lopputuloksen. Sienestä, aerobeista ja anaerobeista bakteereista valitsimme kahden päivän kasvatuksen jälkeen otetut kuvat. Poikkeuksena on *Micromonas micros*, *Lactobacillus acidophilus* ja *Propionibacterium acnes*, koska ne vaativat pidemmän kasvatus ajan. Kuvailimme tulosta eli kasvua myös sanallisesti. Tulostusosiomme koostuu siis tioglykolaattiputken kuvasta ja kasvun sanallisesta selostuksesta.

Kokkibakteerit kasvoivat pääosin niille tyypillisenä raemaisena kasvuna ja sauvabakteerit vastaavasti harsomaisempana tai sameana kasvuna. Varsinkin anaerobit bakteerit vaativat pidemmän kuin yön yli kasvatuksen tioglykolaattiputkessa ennen kuin niille tyypillinen kasvu tuli esiin. Myös bakteerin liikkuvuus vaikutti siihen oliko kasvu selvärajaista vai levinnyttä. Osa bakteereista kasvoi niin runsaana, että tioglykolaattiputken yläosaan muodostui vaahtoa.

8.1 Fakultatiivisesti anaerobiset bakteerit

Fakultatiivisesti eli valinnaisesti anaerobit bakteerit kasvoivat kauttaaltaan koko tioglykolaattiputkessa, koska ne kasvavat yhtä hyvin sekä hapellisissa että hapettomissa oloissa. (Salkinoja-Salonen 2002: 196- 197: Huovinen ym. 2005: 72.) Fakultatiivisista anaeroobeista bakteereista *Haemophilus influenza*, ei aiheuttanut näkyvää kasvua putkessa (kuvio 15).



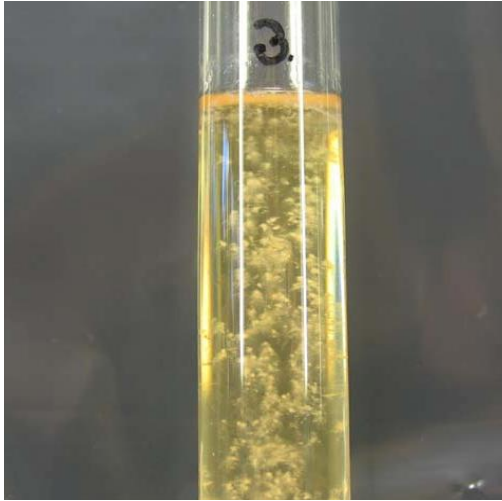
KUVIO 7. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus kasvoi tioglykolaattiputkessa kokeille tyypillisinä selkeinä rakeina (kuvio 7). Kasvua oli kauttaaltaan koko putkessa, koska *Staphylococcus aureus* on fakultatiivisesti anaerobi. Kokeille tyypillisesti *Staphylococcus aureus* ei liiku, joten kasvu ei näyttänyt putkessa suttuiselta.



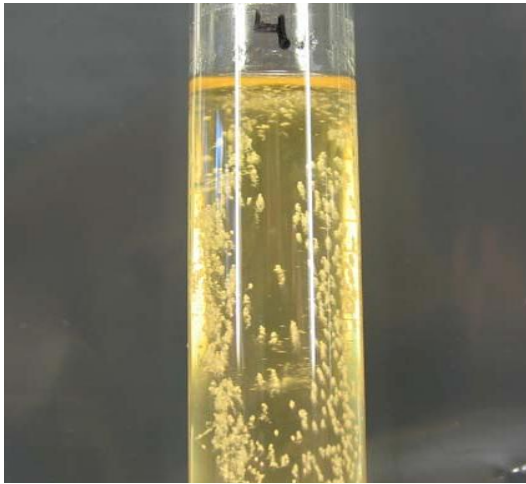
Streptococcus pyogenes kasvu tioglykolaattiputkessa oli raemaista, samoin kuin *Staphylococcus aureus* (kuvio 7 ja 8). *Streptococcus pyogenes* on fakultatiivisesti anaerobinen kokkibakteeri ja se kasvoi koko putkessa.

KUVIO 8. *Streptococcus pyogenes*



KUVIO 9. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae on fakultatiivisesti anaerobinen kokki. Se kasvoi koko tioglykolaattiputkessa pienenä harsona, ja rakeet eivät näyttäneet yhtä selvärajaisilta kuin kahdessa aiemmassa tioglykolaattiputkessa (kuvio 7, 8 ja 9).



KUVIO 10. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis on fakultatiivisesti anaerobinen kokki, joten se kasvoi kauttaaltaan koko putkessa. Kasvu näkyi tioglykolaattiputkessa selvinä yksittäisinä rakeina, jotka olivat hieman alaspäin venyneitä (kuvio 10).



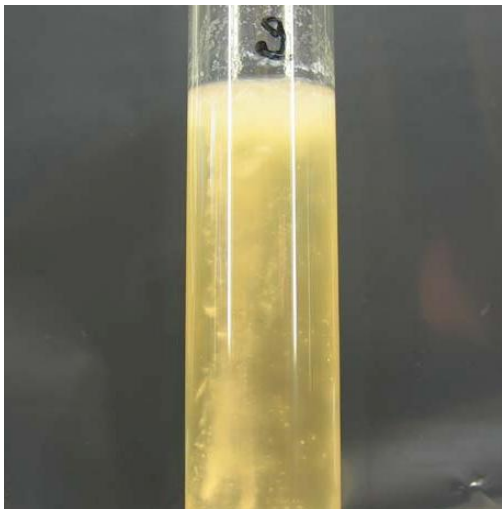
KUVIO 11. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus kasvoi sameana kasvuna tioglykolaattiputkessa. Se on fakultatiivisesti anaerobi sauvabakteeri, joten se kasvoi koko putkessa (kuvio 11). Neste pinta oli vaahtomainen, koska kasvu oli niin runsasta.



KUVIO 12. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes on sauvabakteeri, joka kasvoi fakultatiivisesti anaerobina koko tioglykolaattiputkessa (kuvio 12). Kasvu näkyi selkeinä harsoina ja putken pinnassa oli ohut samea kerros.



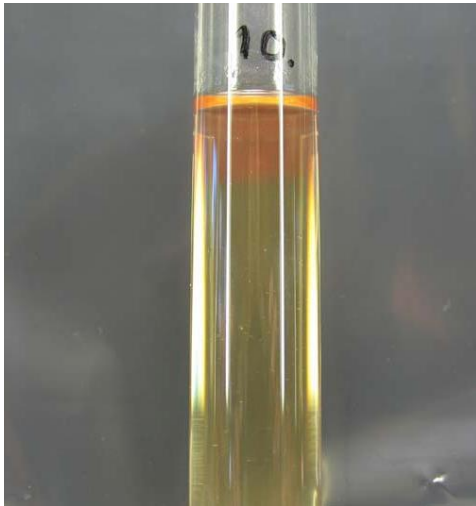
KUVIO 13. *Escherichia coli*

Escherichia coli samensi runsaalla kasvullaan tioglykolaattiputken kokonaan tyypilliseen tapaansa (kuvio 13). Se on fakultatiivisesti anaerobinen tavallisesti liikkuva sauvabakteeri, joka aiheutti runsaalla kasvullaan vaahtoa putken pinnalle.



KUVIO 14. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae on fakultatiivisesti anaerobinen sauva, joka kasvoi harsomaisena koko tioglykolaattiputkessa (kuvio 14). *Klebsiella* ei liiku, joten se ei samentanut kasvullaan koko putkea.

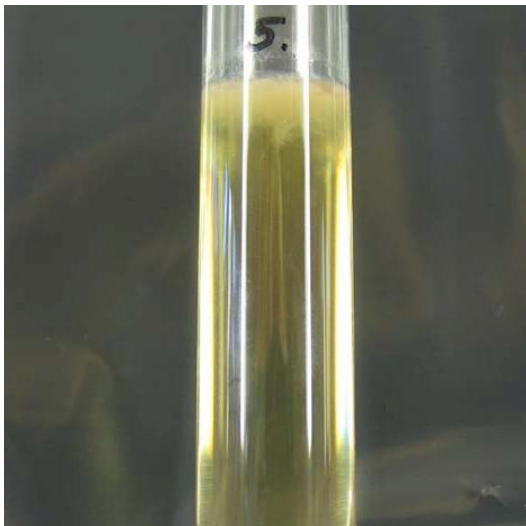


KUVIO 15. *Haemophilus influenzae B*

Haemophilus influenzae B: n kasvu tioglykolaattiputkessa ei ollut silmin nähtävää (kuvio 15). Mutta gramvärjäys ja puhtasviljelmä tioglykolaattiputkesta osoitti, että *Haemophilus influenzae B* kasvoi putkessa. Tämän tyyppinen kasvu tioglykolaattiputkessa on yleistä *Haemophilus influenzae* sauvabakteereille.

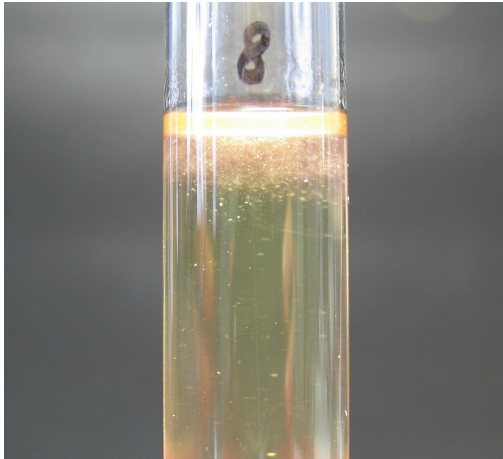
8.2 Obligatorisesti aerobit bakteerit

Obligatoriset eli ehdottomat aerobit tarvitsevat elääkseen happea ja kuolevat ilman sitä (Salkinoja-Salonen 2002: 196-197; Huovinen ym. 2005: 72). Obligatoriset aerobit kasvavat aivan tioglykolaattiputken yläosassa, koska putken yläosa on happipitoinen.



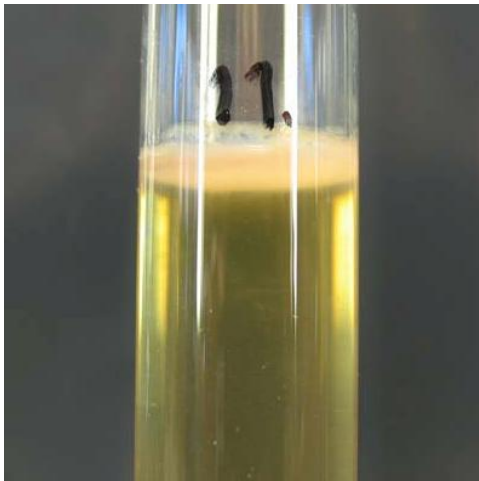
KUVIO 16. *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis on gramnegatiivinen obligatorisesti eli ehdottomasti aerobinen kokkibakteeri. Se kasvoi ohuena sameana kerroksena tioglykolaattiputken pinnassa (kuvio 16).



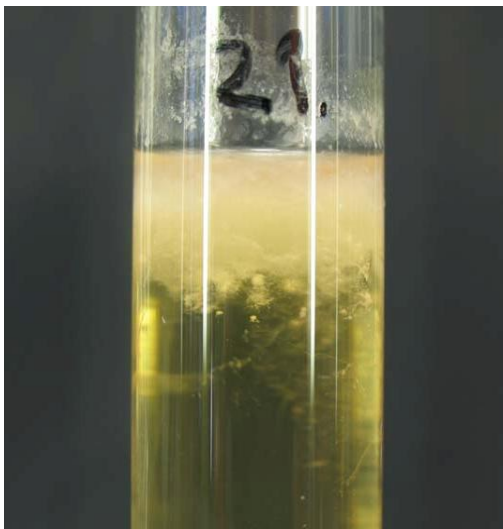
KUVIO 17 *Corynebacterium jeikeium*

Corynebacterium jeikeium on sauvabakteeri, jonka samea kasvu sijoittui aivan tioglykolaattiputken yläosaan (kuvio 17). *Corynebacterium jeikeium* kasvaa parhaiten omassa tyypillisessä kasvuympäristössään.



KUVIO 18. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa on obligatorisesti aerobinen sauvabakteeri ja siksi sen samea kasvu sijoittui aivan tioglykolaattiputken pintaan (kuvio 18).



KUVIO 19. *Candida albicans*

Candida albicans on hiivasieniin kuuluva sieni, joka kasvoi bakteereihin verrattuna hyvin paksuna massana tioglykolaattiputken pinnassa (kuvio 19). Kasvu sijoittui putken pintaan, koska *Candida albicans* on obligatorisesti aerobinen hiivasieni.

8.3 Obligatorisesti anaerobiset bakteerit

Obligatorisesti anaerobien bakteerien kasvulle happi on vahingollista. Siksi ne kasvavatkin tioglykolaattiputken alaosassa, anaerobisissa oloissa. Putken yläosaan muodostuva estovyöhyke eli bakteeriton alue kuvastaa bakteerin happiherkkyyttä, mitä suurempi estovyöhyke sitä happiherkempi bakteeri on. (Salkinoja-Salonen 2002: 196; Forbes ym. 1998: 158.)



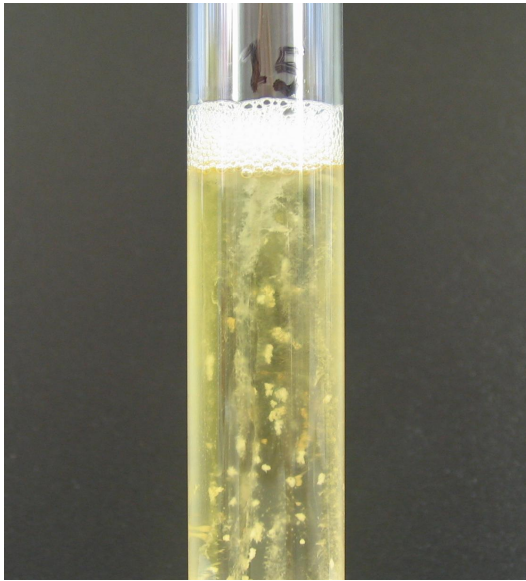
Micromonas micros on kokkibakteeri, joka kasvoi tioglykolaattiputkessa selkeinä pieninä rakeina (kuvio 20). Obligatorisena eli ehdottomana anaerobina bakteerina se jätti selkeän bakteerittoman alueen eli estovyöhykkeen putken yläosaan.

KUVIO 20. *Micromonas micros*



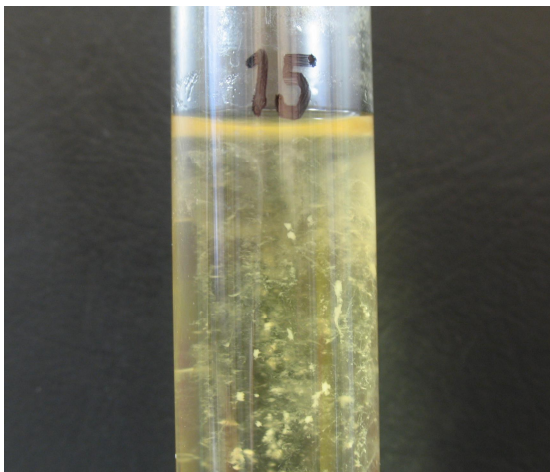
Clostridium difficile on obligatorisesti anaerobinen sauvabakteeri. Sen kasvu tioglykolaattiputkessa oli pitkänomaista harsoa (kuvio 21). Putken yläosassa oli pieni, mutta selkeä estovyöhyke, jossa bakteeri ei kasvanut.

KUVIO 21. *Clostridium difficile*



KUVIO 22. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens on anaerobinen sauvabakteeri, joka ei ole herkkä hapelle ja siksi kasvoikin koko putkessa (kuvio 22). Kasvu näkyi harsomaisena samentumana. *Clostridium perfringens* muodostaa kaasua ensimmäisen vuorokauden kasvatuksen jälkeen, mutta pidemmässä kasvatuksessa kaasunmuodostus lakkaa (kuvio 23). Kaasunmuodostus on tärkeää huomata, koska tämän perusteella *Clostridium perfringens* voidaan alustavasti nimetä ja aloittaa hoito.

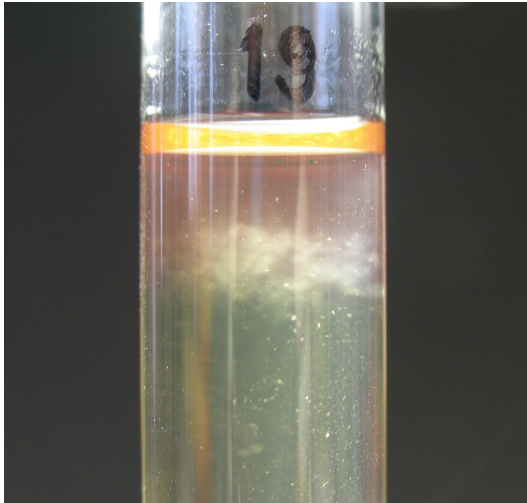


KUVIO 23. *Clostridium perfringens* ei muodosta enää kaasua tioglykolaattiputkessa viikon kasvatuksen jälkeen.



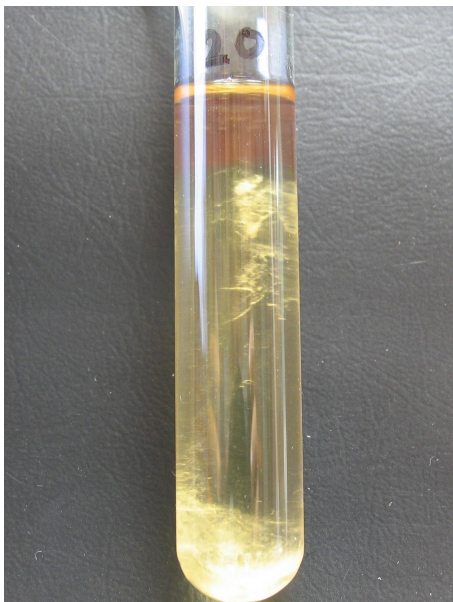
KUVIO 24. *Bacteroides fragilis*

Bacteroides fragilis on obligatorisesti anaerobi sauvabakteeri. Se samensi kasvullaan koko tioglykolaattiputken, mutta jätti kuitenkin selkeän bakteerittoman alueen putken yläosaan (kuvio 24).



KUVIO 25. *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni kasvu oli todella niukkaa tioglykolaattiputkessa (kuvio 25). Tämä sauvabakteeri näkyi putkessa hyvin hentona pilvimäisenä kasvuna, jättäen selkeän pienen estovyöhykkeen putken yläosaan. Heikko kasvu voi johtua siitä, ettei putkea kasvatettu kampylobakteerille optimaalisissa olosuhteissa.

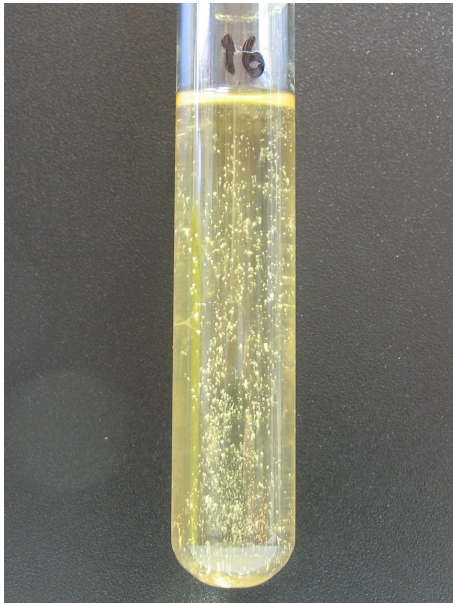


KUVIO 26. *Fusobacterium necrophorum*

Fusobacterium necrophorum on kasvuvaatimuksiltaan hyvin vaativa anaerobi sauvabakteeri. Tioglykolaattiputkeenkin on otettu bakteeripesäkettä suoraan maljalta, koska laimennettuna bakteeri ei kasvanut putkessa. Kasvu näkyi tioglykolaattiputkessa pitkänä ja harvana harsona (kuvio 26). Fusobakteeri kasvoi anaerobille tyypilliseen tapaan putken alaosassa. Kasvua oli myös putken yläosassa, mutta bakteeri jätti silti selkeän estovyöhykkeen putken pintaan.

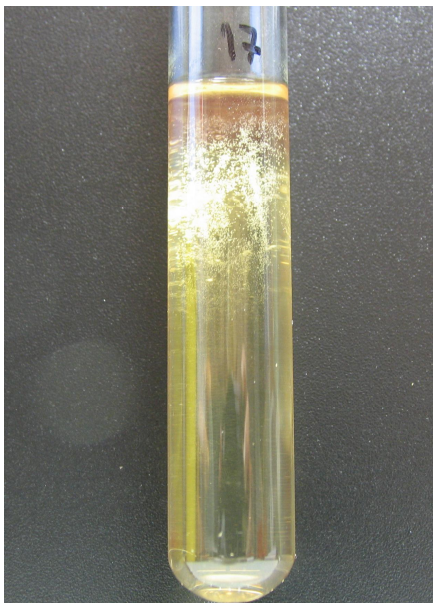
8.4 Mikroaerofiiliset bakteerit

Mikroaerofiilisille bakteereille happi ei ole täysin myrkyllistä, vaan ne sietävät sitä jonkin verran. Mikroaerofiilit bakteerit kasvavat kauttaaltaan koko tioglykolaattiputkessa, suosien kuitenkin enemmän anaerobista osaa putkesta. (Huovinen ym. 2005: 72.)



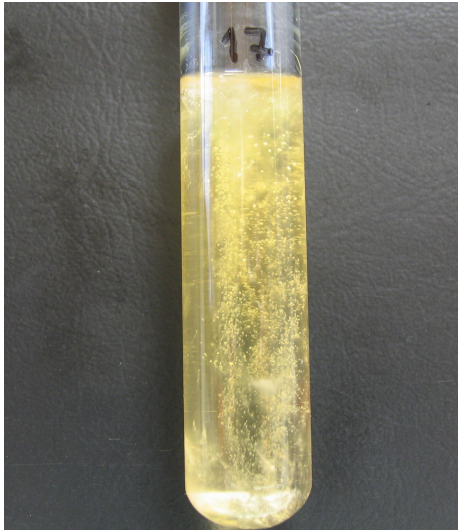
KUVIO 27. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus on mikroaerofiilinen sauvabakteeri, ja se viihtyy parhaiten anaerobioloissa. Sen kasvu tioglykolaattiputkessa näkyi selkeinä alaspäin leviävinä pieninä rakeina (kuvio 27). Rakeinen kasvutapa tioglykolaattiputkessa on epätyypillistä sauvoille.



KUVIO 28. *Propionibacterium acnes*

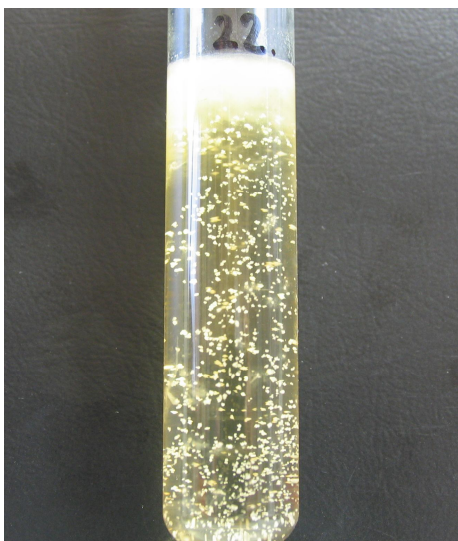
Propionibacterium acnes kasvoi tioglykolaattiputkessa kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen vain putken yläosassa, jättäen kuitenkin pienen estovyöhykkeen (kuvio 28). Lisäkasvatuksen jälkeen *Propionibacterium acnes* sai sille ominaisen muodon, kasvaen putken alaosaan asti sameana kasvuna (kuvio 29). *Propionibacterium acnes* on mikroaerofiilinen sauvabakteeri, joka viihtyy parhaiten anaerobioloissa.



KUVIO 29. *Propionibacterium acnesille* tyypillinen kasvu tulee esille vasta usean päivän kasvatuksen jälkeen.

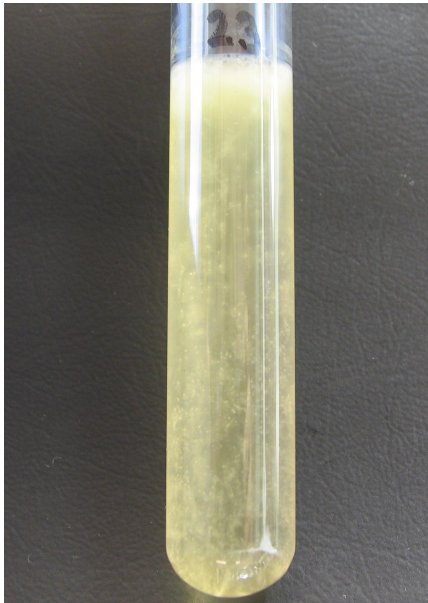
8.5 Usean bakteerin tioglykolaattiputket

Käytännössä märkäviljetyöpaisteissa tioglykolaattiputkiin viljellyissä potilasnäytteissä kasvaa harvoin vain yhtä bakteeria. Tästä syystä teimme myös useampaa bakteeria sisältäviä tioglykolaattiputkiviljelmiä. Kokki- ja sauvabakteerit erottaa toisistaan myös seka-tiljelmistä, mutta kahta kokkia tai kahta sauvaa on lähes mahdotonta erottaa samasta putkesta. Myös bakteerille ominainen hapenkäyttö on havaittavissa. *E. coli* peittää voimakkaalla kasvullaan muiden bakteerien kasvun alle.



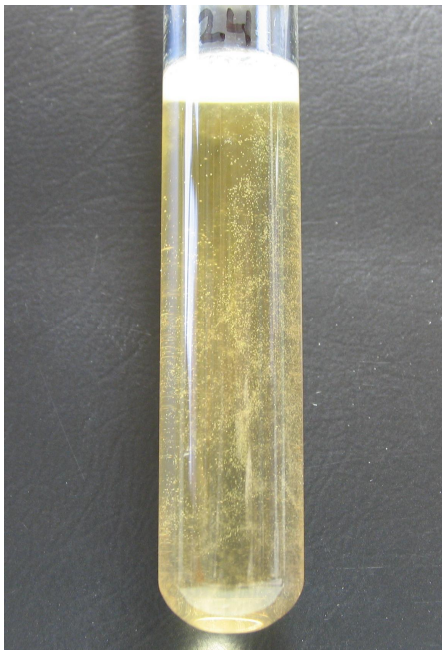
KUVIO 30. *Staphylococcus aureus* ja *Pseudomonas aeruginosa*.

Tässä tioglykolaattiputkessa kasvoi *Staphylococcus aureus* ja *Pseudomonas aeruginosa* (kuvio 30). *Pseudomonas aeruginosa* kasvoi aivan putken pinnalla ja *Staphylococcus aureus* koko putkessa, sille tyypillisesti selkeinä rakeina. Putkea katsomalla näki hyvin, että siinä kasvoi kahta eri bakteerilajia.



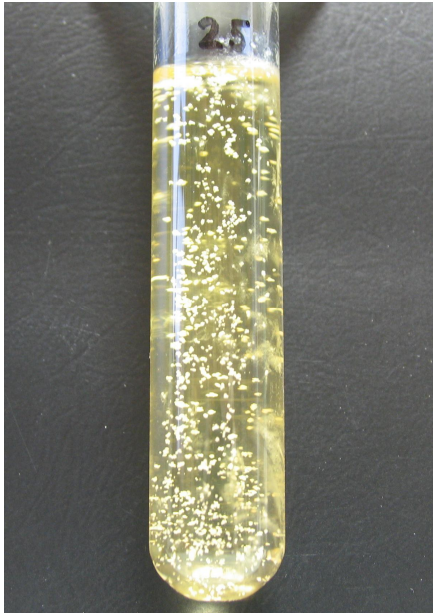
KUVIO 31. *Staphylococcus aureus* ja *Escherichia coli*.

Escherichia coli valtasi runsaalla kasvullaan koko tioglykolaattiputken ja peitti alleensa *Staphylococcus aureuksen* kasvun (kuvio 31). *Escherichia coli* runsaan kasvun vuoksi, putkesta ei voitu havaita muita mahdollisia bakteerilajeja.



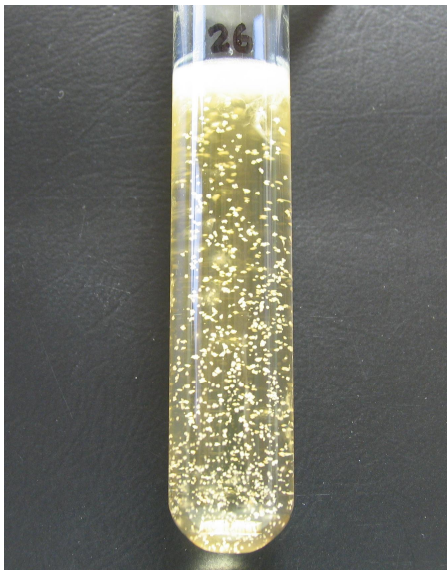
KUVIO 32. *Micromonas micros* ja *Pseudomonas aeruginosa*.

Micromonas micros kasvoi tioglykolaattiputkessa pieninä rakeina ja *Pseudomonas aeruginosa* sameana kasvuna putken pinnassa (kuvio 32). Koska *Pseudomonas aeruginosa* ja *Micromonas micros* kasvoivat eri osissa putkea, voitiin molempien kasvut nähdä.



KUVIO 33. *Staphylococcus aureus* ja *Micromonas micros*.

Staphylococcus aureus ja *Micromonas micros* kasvoivat molemmat tioglykolaattiputkessa raemaisena kasvuna, joten niiden kasvua oli lähes mahdoton erottaa toisistaan samasta putkesta (kuvio 33).



KUVIO 34. *Pseudomonas aeruginosa*, *Micromonas micros* ja *Staphylococcus aureus*.

Pseudomonas aeruginosa samensi kasvullaan tioglykolaattiputken yläosan, koska se on ehdoton aerobibakteeri (kuvio 34). *Micromonas micros* ja *Staphylococcus aureus* kasvoivat putkessa sekaisin ja molempien kasvu oli raemaista (kuvio 34). *Pseudomonas aeruginosa* erotti putken pinnalta, mutta *Micromonas microsta* ja *Staphylococcus aureusta* ei erottanut toisistaan putkesta.

POHDINTA

Työmme tavoitteena oli selvittää millä tavalla tutkimamme bakteerit kasvavat tioglykolaattiputkessa, sekä voidaanko tätä tietoa hyödyntää osana bakteerin alustavaa tunnistusta. Tarkoituksenamme oli selvittää, miten tutkimiemme bakteerien kasvu sijoittuu tioglykolaattiputkeen ja miltä kasvu näyttää. Saaduista tuloksista oli tarkoitus koota kuvamateriaali HUSLABin Kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osaston käyttöön.

Tutkimuksessamme valokuvasimme tioglykolaattiputket sekä yhden että kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen. Työhömmme valitsimme kuitenkin kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen otetut kuvat, koska niissä kasvu näkyi mielestämme selkeimmin. Ottamistamme valokuvista voi nähdä bakteerille ominaisen kasvun tioglykolaattiputkessa. Kaikki tutkittavat bakteerit kasvoivat tioglykolaattiputkessa kirjoissa kuvatulla tavalla. Kokkibakteerit kasvoivat niille tyypillisenä raemaisena kasvuna ja sauvabakteerit kasvoivat enemmän harsomaisena. Liikkuvat sauvat kuten *E. coli* samensivat koko putken. Fakultatiivisesti anaerobit bakteerit kasvoivat kauttaaltaan koko tioglykolaattiputkessa. Obligatorisesti aerobit bakteerit kasvoivat putken pinnassa, koska ne vaativat ehdottomasti happea kasvuunsa. Obligatorisesti anaerobisten bakteerien kasvu sijoittui putken hapettomaan alaosaan. Bakteerittoman alueen eli estovyöhykkeen kokoon vaikutti bakteerin happiherkkyys. Mitä herkempi bakteeri oli hapelle, sitä suuremman estovyöhykkeen se jätti putken yläosaan. Mikroaerofiilit bakteerit kasvoivat kauttaaltaan koko tioglykolaattiputkessa suosien kuitenkin enemmän anaerobista osaa putkesta.

Tutkimuksessamme ei ilmennyt suurempia ongelmia. Suurin osa tutkittavista bakteereista kasvoi hyvin tioglykolaattiputkissa. Kuten Toronton yliopistossa vuonna 1996 tehty vertailututkimus rikasteputkista osoittaa, tioglykolaattiputki sopii hyvin laboratorioissa tutkittavien bakteerien kasvatukseen (Scythes – Louie – Simor 1996: 1804). Säilytimme kuvatut tioglykolaattiputket huoneenlämmössä. Parin viikon huoneenlämmössä säilytyksen jälkeen huomasimme joissakin putkissa hometta. Tämä kertoo, ettei tioglykolaattiputki sovi bakteerien pitkäaikaiseen säilytykseen. Samaa todetaan myös Kalifornian yliopistossa vuonna 1995 tehdyssä tutkimuksessa, jossa tutkitaan tioglykolaattiputken ja lihaliemiputken sopivuutta bakteerien säilytykseen (Claros ym. 1994: 2505).

Tutkimuksessamme ongelmia tuottivat muutamat hitaasti ja niukasti kasvavat bakterikannat. Jouduimme kasvattamaan *Micromonas microsta*, *Lactobacillus acidophilusta* ja *Propionibacterium acnesta* noin viikon ennen kuin saimme bakterikasvun näkyviin. *Campylobacter jejuni* ja *Corynebacterium jeikeiumista* jouduimme tekemään vahvemman bakterisuspension, koska ne eivät kasvaneet hyvin tioglykolaattiputkissa 1/100 ja 1/1000 laimennoksissa. *Fusobacterium necrophorumin* tioglykolaattiputkiviljelyn päädyimme tekemään suoraan maljalta, koska emme saaneet eri laimennoksia kasvamaan putkissa. Bakterien heikkoon kasvuun saattoi vaikuttaa, niiden happiherkkyys, minkä vuoksi ne kärsivät laimennossarjoja tehtäessä. Myös tioglykolaattiputkien kasvatusta +37 °C saattoi vaikuttaa bakterien kasvuun esim. *Campylobacter jejuni* kasvaa parhaiten +42 °C:ssa.

Pidämme tutkimuksessamme saatuja tuloksia luotettavina, koska otimme huomioon mahdolliset virhelähteet ja poissuljimme ne. Virhelähteitä työssämme voi olla tioglykolaattiputkien kontaminoituminen muilla kuin tutkittavalla bakteerilla. Tämän virhelähteen poissuljimme tekemällä tioglykolaattiputkissa kasvavista bakterimassoista gramvärjäykset ja puhtasviljelmät, joilla varmistimme, että tutkittavat bakteerit kasvoivat putkissa puhtaina. Maljojen kasvatusta väärissä kasvuolosuhteissa voisi olla myös mahdollinen virhelähde. Tällöin olosuhteet eivät vastaa bakteerin kasvuvaatimuksia. Selvitimme etukäteen millaiset ovat tutkittavien bakterien kasvuolosuhteet ja kasvatimme maljat sen mukaan.

Märkäviljelytyöpisteissä tehtävissä tioglykolaattiputkiviljelmissä kasvaa harvoin vain yhtä bakteeria, joten kuvamateriaalin kuvia ei voi suoraan verrata potilasnäytteistä viljeltyihin tioglykolaattiputkiin. Mutta kokin ja sauvan erottaa myös useampaa bakteeria sisältävästä tioglykolaattiputkesta. Kuvaamissamme tioglykolaattiputkissa on myös muutama putki, joissa kasvaa kahta tai kolmea bakteeria. Näistä kuvista voi nähdä, minkälainen kasvu on putkissa, jotka sisältävät useampia bakteereita. Jos olisi ollut enemmän aikaa tutkimuksen tekemiseen, olisimme voineet viljellä vielä lisää useampaa bakteeria sisältäviä tioglykolaattiputkia.

Mielestämme tioglykolaattiputkea voidaan käyttää paremmin hyödyksi märkäviljelytyöpisteissä alustavassa bakterien tunnistuksessa yhdessä gramvärjäyksen ja pesäkemorfologian kanssa. Putkessa olevasta bakterikasvusta näkee onko kyseessä raemaista kasvua muodostava kokkibakteeri vai harsomaisesti kasvava sauvabakteeri. Tioglyko-

laattiputkesta tunnistaa hyvin myös *E. colin*, jolle on ominaista samentaa runsaalla kasvullaan koko putki ja peittää alleen muiden bakteerien kasvut. Myös *Clostridium perfringensin* kaasun tuottaminen tioglykolaattiputken pintaan, yhden yön kasvatuksen jälkeen, olisi hyvä tietää. Tällä perusteella voidaan bakteeri alustavasti nimetä ja ilmoittaa hoitavaan yksikköön. Koska *Clostridium perfringens* aiheuttaa kaasukuoliota, varhainen hoidon aloittaminen on erityisen tärkeää potilaan pelastamiseksi. Myös näytteessä olevan anaerobisen bakteerin kasvun voi havaita putkesta estovyöhykkeen eli bakteerittoman alueen avulla.

Valmistimme saaduista tuloksista kuvallisen materiaalin HUSLABin bakteriologian osastolle. Kuvamateriaalia voivat käyttää hyödyksi bakteriologian osaston opiskelijat sekä työntekijät märkäviljelytyöposteissä. Tioglykolaattiputkista koottu kuvamateriaali toimii apuvälineenä opeteltaessa putkesta saatavan informaation hyödyntämistä osana bakteerien alustavaa tunnistusta. Tioglykolaattiputkesta saatavaa informaatiota voidaan käyttää hyödyksi yhdessä gramvärjäyksen ja pesäkemorfologian kanssa jatkotunnistustestejä valittaessa. Alustavasti voidaan päätellä, onko kyse kokki- vai sauvabakteerista, ja miten bakteeri käyttää happea.

LÄHTEET

- Bauman, Robert W. (toim.) 2004: Microbiology. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings.
- Bioinformatics Support Portal 2003: Enterococcus faecalis. Verkkodokumentti. Päivitetty 30.8.2006. <www.ebi.ac.uk/2can/home.html> Luettu 21.10.2006.
- bioMérieux 1997: Densimat Käyttöohje. Toimintaperiaate. V.B 01.97.
- Björklöf, Katarina – Korhola, Matti – Salmela, Hanna – Schauman, Kristiina 2000: Mikrobiologian uusi sanasto. Englanti - Suomi - Ruotsi - Selitys suomeksi, Suomi - Englanti. Helsinki: Mikrobiologikilta.
- Bridson E.Y. 1998: The Oxoid Manual. 8th edition. England: Oxoid Limited.
- Claros, Marina C. – Citron, Diane M. - Coldstein Ellie J. 1995: Survival of Anerobic Bacteria in Various Thioglycolate and Chopped Meat Broth Formulations. Journal of Clinical Microbiology 9. 2505-2507.
- Forbes, Betty A. – Sham, Daniel F. – Weissfeld, Alice S. 1998: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10th edition. St Louis: Mosby.
- Heino, Jyrki - Vuento, Matti 2002: Solubiologia. Porvoo: WSOY.
- Hellstén, Soile (toim.) 2002: Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Jyväskylä: Suomen Kuntaliitto.
- Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti - Valtonen, Ville (toim.) 2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja I ja II. Jyväskylä: Kustannus Oy Duodecim.
- Koneman, Elmer W. – Allen, Stephen D. – Janda, William M. – Schreckenberger, Paul C. – Winn Jr., Washington C. 1997: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th edition. Philadelphia: Lippincott.

Liimatainen, Oili 2000: Gramvärjäys. Moodi 4-5/2000. 126- 128.

Mahon, Connie R. – Manuselis, George 2000: Textbook of Diagnostic Microbiology. 2nd edition. Philadelphia: W.B. Saunders.

Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen James H. – Pfaller Michael A. - Yolken, Robert H. 2003: Manual of Clinical Microbiology Volume 1. 8th edition. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Pfaller, Michael A. – Tenover, Fred C. – Yolken, Robert H. 1999: Manual of Clinical Microbiology. 7th edition. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Pönkä, Antti 1999: Ruokamyrkytykset ja elintarvikehygienia. Helsinki: Suomen ympäristöterveys Oy.

Salkinoja-Salonen, Mirja (toim.) 2002: Mikrobiologian perusteita. Helsinki: Helsingin Yliopisto.

Scythes, Karen D. – Louie, Marie – Simor, Andrew E. 1996: Evaluation of Capacities of 10 Broth Media. Journal of Clinical Microbiology 7. 1804- 1807.

Tarkka, Eveliina 2006: Työohje. Gramvärjäys. HUSLAB. Kliinisen mikrobiologian vastuualue. Bakteriologian osasto. Testiohjeet. Ohje T101. Versio 1.11. Päiväys 28.6.2006.

Tarkka, Eveliina 2004: Työohje. Laimennosten teko. HUSLAB. Kliinisen mikrobiologian vastuualue. Bakteriologian osasto. Työpiste: Elatusaineiden laadunvarmistus. Versio 1.10. Päiväys 11.10.2004.

Tupasela, Minna – Vesterinen, Heidi – Villman, Jenni 2005: Oppimismateriaali gramvärjäyksestä. Opinnäytetyö. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia. Sosiaali- ja terveysala.