

STADIA

HELSINGIN AMMATTIKORKEAKOULU

Säilytysolosuhteiden vaikutus anaerobisten bakteerien kasvuun FAA-maljalla

Bioanalytiikan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
9.11.2007

Laura Ahonen



Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikka			
Tekijä/Tekijät			
Laura Ahonen			
Työn nimi			
Säilytysolosuhteiden vaikutus anaerobisten bakteerien kasvuun FAA-maljalla			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Syksy 2007	40	
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Fastidious Anaerobe Agareja, eli FAA-maljoja käytetään HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastualueen bakteriologian osastolla anaerobisten bakteerien viljelyn yleismaljana. Tähän asti maljoja on säilytetty normaaliatmosfäärissä. Bakteriologian osasto halusi, että säilytysolosuhteiden vaikutus anaerobisten bakteerien kasvuun tutkittaisiin, jotta tiedettäisiin minkälaista käytäntöä FAA-maljojen säilytyksessä tulisi käyttää, jotta kasvatustulokset olisivat parhaat mahdolliset.</p> <p>Tutkimuksessa käytettiin 19 anaerobista bakteerilajia ja niistä jokaista kasvatettiin kolmella eri maljalla. Maljoja säilytettiin kolmessa eri atmosfäärissä, normaaliatmosfäärissä, typpikaapissa ja hiilidioksidirikkaassa anaerobioosissa. Maljat olivat atmosfääreissä vähintään 18 tuntia. Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat olivat peräisin kansainvälisistä referenssikokoelmista, eivätkä olleet potilasnäytteitä.</p> <p>Tutkimuksen tulos oli se, että säilytysolosuhteiden kaasukoostumuksella ei ollut suurta vaikutusta bakteerien kasvun määrään, pesäkkeiden kokoon tai pesäkemorfologiaan. Esiintyneet pienet erot voitiin laskea normaalin vaihtelun piiriin kuuluvaksi.</p> <p>Saaduista tuloksista tehtiin sellainen johtopäätös, että bakteriologian osastolla ei ole tarvetta muuttaa FAA-maljojen säilytysolosuhteita ja he voivat jatkaa nykyistä maljojen säilytyskäytäntöä. Tämä johtopäätös siksi, että tutkimuksen tulosten perusteella nykyinen säilytyskäytäntö ei vaikuta bakteeriviljelyiden tulosten laatuun.</p>			
Avainsanat			
anaerobiset bakteerit, FAA-malja, säilytysolosuhteet			



Degree Programme in		Degree	
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care Services	
Author/Authors			
Laura Ahonen			
Title			
The Effect of Storage Conditions of the FAA Plates on the Growth of Anaerobic Bacteria			
Type of Work	Date	Pages	
Final Project	Autumn 2007	40	
<p>ABSTRACT</p> <p>Fastidious Anaerobe Agar (FAA) plates are used in the bacteriology division of the laboratory of clinical microbiology in HUSLAB as the general culture plates when searching for possible anaerobic bacteria from a patient sample. Currently the agar plates are stored in the ambient laboratory atmosphere. The bacteriology division wanted an investigation into the effects of the storage conditions of FAA plates on the growth of anaerobic bacteria. The results of the investigation were to be evaluated to see whether changes in storage methods would give an improved growth.</p> <p>I investigated agar plates stored in different gas compositions prior to use, in normal atmosphere and alternative chambers providing one nitrogen rich atmosphere and one with a carbon dioxide rich anaerobic atmosphere. The plates were exposed to each atmosphere for periods not less than 18 hours. I used 19 different anaerobic bacterial strains to conduct the investigation. The strains I used to conduct the investigation were from international reference collections and were not patient samples.</p> <p>The results of this investigation showed no significant difference in the amount of bacterial growth on the agar plates, or in the size or morphology of the bacterial colonies in the subsequent primary cultures produced on the plates. Variation within the samples was within expected tolerances of normal experimentation.</p> <p>I concluded from the results that there is no reason for the division of bacteriology to change its current practice of storing the FAA plates in a normal atmosphere. This is because the current practice does not effect the quality of the results of the bacterial cultures.</p>			
Keywords			
agar plates, anaerobic bacteria, FAA, storage conditions			

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	ANAEROBISET BAKTEERIT	4
2.1	Anaerobisten bakteerien ominaisuudet	4
2.2	Anaerobisten bakteerien aiheuttamat infektiot ja diagnosointi	5
3	TUTKIMUKSEN SUORITUS	6
3.1	Aikaisempia tutkimuksia aiheesta	6
3.2	Tutkimusongelma ja -asetelma	9
3.3	Tutkimuksessa käytetyt bakteerit	10
3.3.1	Tutkimuksessa käytettyjen bakteerien alkuperä	10
3.3.2	Grampositiiviset bakteerit	12
3.3.3	Gramnegatiiviset bakteerit	14
3.4	Tutkimuksessa käytetyt työvälineet	17
3.4.1	FAA-malja	17
3.4.2	Anaerobiset kasvatusastiat ja anaerobikehittimet	18
3.4.3	Typpikaappi	19
3.5	Tutkimuksessa käytetyt maljojen säilytysolosuhteet	20
3.6	Käytännön tutkimuksen suoritus	20
4	TUTKIMUKSEN TULOKSET JA LUOTETTAVUUS	24
4.1	Tutkimuksen tulokset	24
4.2	Tuloksien luotettavuus	33
5	POHDINTA	35
	LÄHTEET	38
	KUVALÄHTEET	40

1 JOHDANTO

Opinnäytetyöni aihe on anaerobimaljojen säilytysolosuhteiden vaikutus primääriviljelyn viljelytuloksiin. Työ on tehty HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osaston pyynnöstä. Työssäni tutkin onko anaerobisten bakteerien kasvatukseen käytettävien kasvatusaljojen säilytysolosuhteilla vaikutusta anaerobisten bakteerien kasvuun kyseisillä maljoilla. Tarkoitukseni on saada selville, kasvavatko näytteessä olevat anaerobiset bakteerit maljoilla paremmin, jos maljoja on ennen kasvatusta säilytetty anaerobisissa olosuhteissa, vai onko niin, että säilytysolosuhteilla ei ole vaikutusta bakteerien kasvuun. Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat eivät ole peräisin potilasnäytteistä vaan tutkimuskäyttöön tarkoitetuista referenssikokoelmista.

HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolla on haluttu, että asia selvitetäisiin, jotta osastolla tiedettäisiin mitä anaerobimaljojen säilytystapaa heillä tulisi noudattaa. Asiasta ei ole osastolla aikaisemmin tehty tutkimusta ja maljojen säilytyksessä on noudatettu useampia tapoja. Toisinaan niitä on säilytetty valmistuksen jälkeen jonkinasteisessa anaerobioosissa niin sanotuissa suhinakaapeissa ja toisinaan taas, kuten aerobisten bakteerien viljelyssä käytettyjä maljoja, eli viileissä jääkaappiolosuhteissa normaalissa atmosfäärissä.

Primääriviljelyssä potilaasta otettu näyte viljellään viljelymaljalle, jotta nähtäisiin kasvaako näytteenottokohdassa bakteereja. Anaerobisten bakteerien viljelyä tehdään bakteriologian osastolla pääasiassa niin sanotussa märkäpisteissä, joihin tulevat näytteet on otettu sellaisista kohdista elimistöä, joissa epäillään olevan tulehdus. Tällaisia alueita ovat muun muassa haavat ja märkäpaiseet, jotka voivat esiintyä niin limakalvoilla, iholla kuin myös elimistön steriileissä osissa, esimerkiksi vatsaontelossa. Yleensä tulehdusepäilyn ja näytteenoton indikaationa ovat selvät tulehdukseen viittaavat merkit näytteenottokohdassa ja muut tulehdukseen viittaavat oireet. HUSLABin bakteriologian osastolla on pääperiaatteena se, että anaerobisten bakteerien viljely tehdään aina silloin, kun näyte on niin sanottu syvä näyte. Näyte on tällöin otettu joko elimistön steriililtä alueelta, eli alueelta, jolla ei normaalisti ole minkäänlaista normaaliflooraa, tai iholta tai limakalvolta sellaisista kohdista, joissa voidaan olettaa anaerobisille bakteereille olevan suotuisat elin- ja kasvuolosuhteet.

Anaerobisten bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosointia voi haitata se, että bakteerit eivät kasvakaan näytteestä tehdyllä viljelyllä vain siksi, että bakteeri on ehtinyt kuolla ennen kuin malja, jolle se on viljelty, on päässyt anaerobiseen atmosfääriin kasvatusastiassa. Ideaalisinta olisi, että näyte ei missään vaiheessa joutuisi kosketuksiin ilman hapen kanssa. Valitettavasti tätä ei voida kaikissa tapauksissa taata. Joissakin, etenkin pienemmissä laboratorioissa tämä voi johtua siitä, että anaerobisen viljelykaapin hankintakulut olisivat varsin suuret suhteessa anaerobista viljelyä vaativien näytteiden määrän suhteen.

HUSLABin klinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolla ei ole anaerobista viljelykaappia. Bakteriologian osastolla näytteet käsitellään työjonokohtaisesti. Työjonot perustuvat näytteen tai näytteiden lähettävän yksikön perusteella. Tämä tarkoittaa, että kaikki näytteestä tulevat kasvatusmaljat ja -putket viljellään samassa työpisteessä ja samaan aikaan laminaarivirtauskaapissa. Monissa bakteriologian märkätyöpisteen työjonokohtaisissa työpisteissä tulee useimmista näytteistä myös anaerobisia viljelyitä. Bakteriologian osastolla ollaan koettu loogisemmaksi ja toimivammaksi tavaksi viljellä yhdellä kertaa kaikki näytteet, sen sijaan, että ensin käytäisiin viljelemässä näytetikusta anaerobiset näytteet ja tämän jälkeen viljeltäisiin mahdollisesti eri paikassa aerobiseen atmosfääriin menevät kasvatusmaljat.

Primääriviljely on näytteen diagnosoinnin kannalta tärkeä ja anaerobisten bakteerien kohdalla ehkä jopa ratkaiseva kohta laboratorion työprosessissa. Jos bakteeri on kuollut näytteen jo saapuessa laboratorioon, niin silloin ei mikään toimenpide tai työskentelyympäristö laboratoriossa enää saa sitä henkiin. Laboratorioissa pyritään kuitenkin aina työskentelemään niin, ettei bakteeri ainakaan viljelyn aikana kuolisi ja diagnosointi täten vaikeutuisi. Opinnäytetyöni taustalla on ollut laboratorion halu säätää työtavat ja työvälineiden säilytysolosuhteet sellaisiksi, että viljelytulos on paras mahdollinen. Laboratorio, joka toimii nykyisen kaltaisten tulostavoitteiden maailmassa, joutuu miettimään ja tasapainoilemaan työtapojensa valinnoissa löytääkseen sen työtavan, joka on sekä taloudellisin että tuottaa teknisesti parhaan mahdollisen diagnostisen tuloksen.

Anaerobiviljelyssä käytettyjä maljoja on bakteriologian osastolla säilytetty valmistuksen jälkeen ensisijaisesti jääkaappilämpötilassa ja normaaliatmosfäärissä, josta ne on nostettu huoneenlämpöön tarpeen mukaan. Yöksi päivän aikana käyttämättä jääneet maljat on siirretty takaisin jääkaappiin. Jossain vaiheessa anaerobisissa viljelyissä käytettyjä maljoja säilytettiin niin sanotuissa suhina-kaapeissa, mutta tästä käytännöstä luovuttiin, koska sen hyödyistä ja tehosta ei oltu vakuuttuneita. Asian suhteen on toimittu enemmän niin sanotun mutu-tuntuman perusteella kuin minkään varsinaisen tieteellisen tutkimustiedon perusteella. Nykypäivänä akkreditoitujen laboratorion toimintatavat tulee olla tarkasti dokumentoitu, jolloin on tärkeää, että toimintatapojen taustoja ja syitä kysyttäessä on laboratorion antaa kunnollinen ja perusteltu vastaus. Tämän takia on koettu tärkeäksi tehdä aiheesta tutkimus, jonka tuloksia voidaan käyttää niin laboratorion nykyisen toimintatavan arvioinnissa kuin myös sen käytön perustelussa.

2 ANAEROBISET BAKTEERIT

2.1 Anaerobisten bakteerien ominaisuudet

Anaerobiset bakteerit ovat prokaryootteja, joiden metabolia perustuu siihen, että elektroninsiirtoketjun lopussa elektronin vastaanottajana toimii joku muu aine kuin happi. Useat aerobiset bakteerit ovat kykeneväisiä myös anaerobiseen metaboliaan ja monet aerobisiksi bakteereiksi mielletyt lajit itse asiassa kasvavat paremmin anaerobisissa olosuhteissa. Yleisesti anaerobisiksi bakteereiksi kutsutut bakteerit ovat obligatorisia anaerobeja, koska ne eivät siedä happea lainkaan. Kuitenkin anaerobisten bakteerien kyvyssä säilyä elossa happialtistuksessa on eroja. Monien anaerobisten bakteerien esiintyminen ihmiskehon alueilla, jotka ovat selvästi kosketuksissa ilman hapen kanssa, perustuu yleisesti ottaen siihen, että ympärillä olevat aerobiset bakteerit käyttävät ympärillä olevan hapen omaan metaboliaansa, tuottaen samalla anaerobisille bakteereille sopivan, hapettoman mikroatmosfäärin. (Vaara – Skurnik – Sarvas 2005: 72–73.)

Anaerobiset bakteerit noudattavat samoja gramvärjäytyvyyden lainalaisuuksia kuin aerobiset bakteerit. Anaerobisista bakteereista löytyy niin sauvoja kuin kokkejakin. Osa anaerobisista bakteereista pystyy myös tuottamaan itiöitä, joiden avulla ne voivat säilyä bakteerille muuten epäedullisissa oloissa. Itiöt kestävät varsinaista bakteerisolua paremmin lämpöä, kuivuutta ja säteilyä, ja ne voivat säilyä jopa vuosikymmeniä, odottaen mahdollisia kasvulle ja lisääntymiselle otollisia olosuhteita. (Vaara ym. 2005: 69.)

Monet anaerobiset bakteerit ovat osa ihmisen normaaliflooraa. Niitä esiintyy etenkin suun ja hengityselinten alueella, suolistossa sekä sukupuolielinten alueella. Suoliston normaalifloorasta anaerobisten bakteerien osuus on yli 99 %. (Vaara ym. 2005: 72–73.) Normaalisti ne elävät näissä edellä mainituissa paikoissa rauhassa, aiheuttamatta isännälleen mitään varsinaista haittaa.

2.2 Anaerobisten bakteerien aiheuttamat infektiot ja diagnosointi

Anaerobisten bakteerien aiheuttamat infektiot ovat usein opportunisti-infektioita, eli ne aiheuttavat infektion paikassa, jossa niitä ei yleensä esiinny, esimerkiksi elimistön normaalisti steriileillä alueilla silloin, kun ihmisen immuniteetti on alentunut, esimerkiksi leikkauksen tai trauman seurauksena (Jousimies-Somer – Carlson 2005: 239–240; Jousimies-Somer – Vuento 2005: 241–242). Tästä johtuen monet anaerobisten bakteerien aiheuttamat, tai ainakin osittain aiheuttamat, infektiot ovat usein vakavia, koska ihminen on usein infektion saadessaan muutenkin haavoittuvainen ja heikko puolustautumaan patogeenejä vastaan. Infektioissa anaerobisia bakteereita tavataan usein sekainfektioissa yhdessä aerobisten bakteerien kanssa. Huomattavasti harvemmin ne aiheuttavat infektion yksinään, vaikka sekään ei ole täysin mahdotonta. (Vaara ym. 2005: 72–73.)

Bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosoinnin perustana toimii edelleen bakteeriviljely, vaikka viime vuosina uudet tekniikat, etenkin molekyylibiologiset, ovat vallanneet alaa mikrobiologisessa diagnostiikassa. Myös anaerobisten bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosoinnin lähtökohtana on tulehduskohdasta otetusta näytteestä ja näytemateriaalista tehty bakteeriviljely. (Carlson – Koskela 2003: 23.) Molekyylibiologiset menetelmät toimivat perusdiagnostiikassa lähinnä lisäteknikiokoina vaikeasti diagnosoitavissa tapauksissa. Molekyylibiologia on toiminut bakteriologian alalla enemmänkin uuden tiedon hankinnan menetelmänä kuin perusdiagnostiikan välineenä. Diagnostiikassa molekyylibiologisilla menetelmillä on ollut suurin hyöty lääkeresistenttien bakteerikantojen diagnosoinnissa ja löytämisessä.

Anaerobisten bakteerien viljelyn haastavuus ja hankaluus liittyvät siihen, että monet anaerobiset bakteeriset ovat obligatorisia anaerobeja, jolloin niiden hapensietokyky on lähes tai täysin nolla (Vaara ym. 2005: 72). Tämä asettaa näytteiden otolle ja kuljetukselle omat vaatimuksensa. Koska hoitava lääkäri ei voi etukäteen tietää minkälainen mikrobi mahdollisen tulehduksen on aiheuttanut, tulisi näytteiden otossa aina ottaa huomioon anaerobisen bakteerin mahdollisuus ja toimia sen mukaan. Näytteet tulee ottaa alueilta ja kohdista, joilla selvästi on infektion merkkejä, kuten punotusta, turvotusta tai märkimistä. Näytteet siis tulisi ottaa ja kuljettaa laboratorioon niin, että näyte olisi mahdollisimman

vähän tekemisissä ilmassa olevan hapen kanssa. Näytteitä otettaessa on myös oltava huolellinen sen suhteen, ettei näyte, etenkin syvänäyte, pääse kontaminoitumaan infektiokohdan ja -alueen normaaliflooralla. Tämä on erityisen tärkeää silloin, kun näytettä otetaan kehon steriileiltä alueilta, etenkin silloin kun näytteenotto tapahtuu ihon ja/tai limakalvon läpi. (Carlson – Koskela 2003: 29.)

Näytteet tulisi näytteenoton jälkeen toimittaa tutkimuksen tekevään mikrobiologian laboratorioon mahdollisimman pian. Laboratoriossa viljely tulisi suorittaa mahdollisimman nopeasti, ja ne maljat, joilla viljellään näytteessä mahdollisesti olevia anaerobisia bakteereja tulisi asettaa kasvamaan anaerobiseen atmosfääriin mahdollisimman nopeasti viljelyn jälkeen. Kaikkein ideaalisinta olisi, että anaerobiset viljelyt voitaisiin tehdä kyseiseen tarkoitukseen tarkoitettussa viljelykaapissa, jossa on anaerobinen atmosfääri. Tällöin voitaisiin minimoida se riski, että näytteessä olevat anaerobiset bakteerit kuolisivat viljelyvaiheessa. Joissakin laboratorioissa on kuitenkin päätetty olla investoimatta kyseisenlaiseen viljelykaappiin. Syyt voivat olla monenlaiset. Joko anaerobisen viljelykaapin käyttöaste jäisi näytteiden vähyyden takia alhaiseksi tai sitten viljelyiden teon järjestely muulla lailla on loogisempaa. Jälkimmäinen järjestely on käytössä HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolla.

3 TUTKIMUKSEN SUORITUS

3.1 Aikaisempia tutkimuksia aiheesta

Monien tutkijoiden mielestä opinnäytetyöni aihe ei ehkä ole ollut niitä kaikkein mielenkiintoisimpia ja tästä johtuen aiheesta tehtyjen tutkimusten, tai sitä edes jotenkin sivuavien tutkimusten, löytäminen on ollut enemmän kuin haastavaa. Tämä ei kuitenkaan tarkoita, että tutkimukseni aihe ei olisi mielenkiintoinen tai tärkeä. Aihetta sivuavista tutkimuksista kertovien löytämieni artikkeleiden määrän voi laskea yhden käden sormilla. Aihetta on jonkin verran käsitelty ulkomaisissa oppikirjoissa, mutta niissäkään se ei ole päässyt kovin laajaan käsittelyyn (Forbes – Sahm – Weissfeld 1998: 693; Koneman – Allen – Janda – Schreckenberger – Winn 1997: 722.) Miksi näin mielenkiintoinen aihe on jätetty varsin tutkimattomaksi, onkin sitten oma kysymyksensä. Joko alan ammattilaiset ja tutkijat

eivät ole tulleet ajatelleeksi asiaa kovin usein tai sitten he ovat kokeneet muut anaerobisten bakteerien kasvuun ja bakteerien elossa kasvatukseen saamiseen liittyvät seikat paljon tärkeimmiksi tutkimuskohteiksi.

Jonkin verran opinnäytetyöni aihetta sivuavan tutkimuksen ovat tehneet Charles W. Hanson ja William J. Martin vuonna 1976. Tutkimuksessaan Hanson ja Martin tutkivat erilaisia anaerobisissa viljelyissä käytettyjä veriagar-maljoja ja sitä kuinka hyvin eri bakteerilajit kasvavat eri maljoilla. Samassa tutkimuksessa he tutkivat myös käytettyjen agarien iän ja säilytysolosuhteiden vaikutusta bakteerien kasvuun. He käyttivät tutkimuksessaan niin kaupallisesti valmistettuja kasvatusmaljoja kuin myös itse valmistettuja tuoreita agarmaljoja. Osissa maljoista oli myös mukana erilaisia ravinnetekijöitä ja myös niiden vaikutusta bakteerien kasvuun arvioitiin tutkimusta tehtäessä. (Hanson – Martin 1976: 394–399.)

Löytämäni tiedon perusteella anaerobisten bakteerien viljelyissä käytettyjen agar-maljojen säilytysolosuhteilla voi olla jonkinlaista vaikutusta viljelyn tuloksiin. Samalla selvisi, etenkin Hansonin ja Martinin tutkimuksessa, että enemmän vaikutusta oli säilytysolosuhteiden ja säilytysajan yhteisvaikutuksella kuin pelkillä säilytysolosuhteilla (Hanson – Martin 1976: 397).

Hanson ja Martin säilyttivät maljoja viileässä, noin +4 °C:ssä, sekä tilassa, jossa lämpötila oli normaali huonelämpötila ja jossa oli jatkuva hiilidioksidin virtaus. Tutkimuksessaan he seurasivat maljoilla tapahtuvia pH:n muutoksia, kun niitä säilytettiin hiilidioksidivirtauksessa. Muutokset agarin pH:ssa olivat suhteellisen pieniä kun säilytystä oli 72 tunnista aina 12 päivään. Tämän jälkeen pH:n muutokset olivat huomattavasti suurempia, pH:n laskiessa selvästi siitä, mitä se oli silloin kun malja valmistettiin. (Hanson – Martin 1976: 397.)

Tutkimuksessaan Hanson ja Martin saivat tulokseksi sen, että itse valmistetuilla, ravintotekijöitä sisältävillä maljoilla bakteerien pesäkkeet olivat hieman suurempia kuin kaupallisesti valmistetuilla maljoilla. Omaan työhöni liittyen he saivat sellaisia tuloksia, että maljojen säilytyksellä hiilidioksidivirtauksessa 72 tuntiin asti ei ollut suurempaa vaikutusta bakteerien kasvuun. Maljoja säilytettäessä yli 72 tuntia jatkuvassa

hiilidioksidivirtauksessa, kasvutulos heikkeni, mitä ilmeisimmin pH:n laskun ja maljojen kuivumisen takia. (Hanson – Martin 1976: 394.)

Myös Patrick R. Murray (1978) on käsitellyt jonkin verran säilytysolosuhteiden vaikutusta kasvutulokseen. Hänen säilytysolosuhteiden vertailussaan käytettiin viittä erilaista kaupallisesti valmistettua anaerobisten bakteerien kasvatukseen tarkoitettua maljaa. Maljat toimitettiin laboratorioon 24 tunnin kuluessa niiden valmistuksesta. Maljoja käytettiin joko heti välittömästi niiden laboratorioon saapumisen jälkeen tai sitten niitä säilytettiin kuljetuspakkauksessa +4 °C:ssä aina kuuteen viikkoon saakka. (Murray 1978: 708–709.)

Murrayn tutkimuksessa ei varsinaisesti tutkittu erilaisia säilytysolosuhteita. Enemmän huomiota sai kasvatusaljojen säilytysaikoja ja niiden vaikutusta anaerobisten bakteerien kasvuun. Tuloksena selvisi se, että maljojen säilytysajalla on jonkin verran vaikutusta bakteerien kasvuun. Murrayn tutkimuksessa käytetyistä bakteerilajeista suurin osa kasvoi varsin hyvin maljoilla joiden ikä oli 4 viikkoa tai vähemmän. Tutkimuksessa selvisi se, että erilaiset kasvatusaljat huononivat ajan myötä eri tahtia. Kaiken kaikkiaan päätelmänä voitiin tehdä se, että mitä tuorempi kasvatusalja, sitä parempi. (Murray 1978: 710, 713.)

Monia kirjallisia lähteitä lukiessa tuli kuitenkin sellainen vaikutelma, että säilytysolosuhteiden vaikutuksesta ei välttämättä olla ihan samaa mieltä, eikä etenkin siitä, onko ero kuinka merkittävä. Lähteitä lukiessa tulee sellainen vaikutelma, että ei ole olemassa täysin yhtenäistä mielipidettä siitä, kuinka suuri vaikutus maljoilla olevaan agariin imeytyneellä ilman hapella on anaerobisten bakteerien kasvuun maljoilla. Enemmän huolta säilytysolosuhteissa on aiheuttanut se, ovatko maljat mahdollisesti päässeet kuivumaan. Itse valmistetut maljat on suositeltavaa käyttää kahden viikon kuluessa valmistuksesta, etteivät ne kuivuisi ja ettei niihin muodostuisi kasvua rajoittavia peroksiedeja. Anaerobinen säilytys vähentää imeytynyttä happea, mutta sillä ei ole vaikutusta peroksidien syntymiseen. (Forbes ym. 1998: 693.)

Omassa tutkimuksessani olen tutkinut vain säilytysolosuhteiden vaikutusta anaerobisten bakteerien kasvuun maljoilla. Tutkin sitä, miten säilytyksessä maljoja ympäröivä kaasuympäristö vaikuttaa bakteerien kasvuun maljoilla. Minulla ei ollut tarkoituksena

selvittää niitä kaikkia syitä, jotka mahdollisesti aiheuttavat ne kemialliset muutokset, jotka puolestaan ovat niitä asioita, jotka vaikuttivat bakteerien kasvuun maljoilla.

Säilytysaikojen vaikutusta bakteerien kasvuun ei myöskään ollut tarkoitus tutkia. Pystyin vakioimaan käytettyjen kasvatusmaljojen iän siten, että jokainen käyttämäni malja oli samasta valmistuserästä. Tällöin ei syntynyt sellaista tilannetta, että kasvatuksessa syntyneet erot olisivat johtuneet siitä, että kasvatuksissa käytetyt maljat olisivat eri-ikäisiä. Maljojen saaminen samasta erästä ei ollut vaikeaa, koska anaerobisten bakteerien kasvatuksessa käytettyjä FAA-maljoja valmistetaan normaalisti varsin paljon, koska se on laboratoriossa käytetyin anaerobisten bakteerien kasvatusmalja.

Tutkimukseni käytännön suorituksen mallina käytettiin Summasen, McTeaguen, Väisäsen, Strongin ja Finegoldin vuonna 1998 tekemää ja vuonna 1999 raportoitua tutkimusta, jossa verrattiin erilaisia anaerobisen atmosfäärin tuottamisessa käytettyjä mekanismeja ja tekniikoita. Tutkimuksessa käytettiin joko tuoreita bakteerikantoja tai $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssä maidossa säilöttyjä kantoja. Tutkimuksessa kantoja kasvatettiin anaerobisissa atmosfääreissä, jotka oli saatu aikaan kolmella eri tavalla. (Summanen – McTeague – Väisänen – Strong – Finegold 1999: 5.)

Summasen työryhmän tekemän tutkimuksen tarkoitus oli selvittää anaerobisten bakteerikantojen elpymistä erilaisilla tavoilla aikaansaaduissa anaerobisissa olosuhteissa. Tutkimuksessa selvitettiin kantojen elpymisprosentti sekä tutkittiin kasvaneiden bakteeripesäkkeiden kokoa. Tutkimuksen kohteena oli myös metyleeninen pelkistymisnopeus kasvatusastioissa olleissa anaerobi-indikaattorissa (Summanen ym. 1999: 6.)

Omassa tutkimuksessani ei tutkittu samoja asioita kuin Summasen, McTeaguen, Väisäsen, Strongin ja Finegoldin tutkimuksessa. Tutkimukseni käytännön järjestelyt kuitenkin jäljittelivät heidän tutkimuksensa käytännön toteutusta. (Summanen ym. 1999: 7.)

3.2 Tutkimusongelma ja -asetelma

Työni tutkimusongelma ja tutkimusasetelma on seuraavanlainen:

Minkälaisia vaikutuksia anaerobiviljelyssä käytetyn FAA-maljan säilytysolosuhteiden kaasuatmosfäärin eroilla on anaerobisten bakteerien kasvuun kyseisillä maljoilla?

Tämän kysymyksen vastauksessa tulisi tulla ilmi säilytysolosuhteiden kaasuatmosfäärin vaikutus kasvutulokseen sen jälkeen, kun kaikki viljelyvaiheessa esiintyvät mahdolliset virhetekijät ja niiden vaikutukset on otettu huomioon. Kysymyksen vastausta tutkiessa pitäisi tulla esille sellaista informaatiota, jonka perusteella pitäisi pystyä päättämään olisiko perusteltua että bakteriologian osastolla siirryttäisiin säilyttämään anaerobisissa viljelyissä käytettyjä kasvatusmaljoja anaerobisessa atmosfäärissä, vai voidaanko osastolla jatkaa tähän asti käytettyä tapaa säilyttää maljoja normaalissa atmosfäärissä ilman että anaerobisten bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosointi kärsisi siitä merkittävästi. Tutkimuksessa käytetyt kaasuatmosfäärit olivat normaali atmosfääri, typpivoittoinen atmosfääri ja anaerobinen atmosfääri. Kasvatus tehtiin HUSLABin klinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osaston normaalin anaerobisten bakteerien kasvatuskäytännön mukaan, eli viljelyn jälkeen maljoja kasvatettiin anaerobisessa atmosfäärissä 48 tuntia, jonka jälkeen ne tutkittiin ja kasvatuksen tulokset kirjattiin ylös ja tämän jälkeen maljat laitettiin takaisin kasvatukseen, jossa ne olivat siihen asti, että viljelystä oli kulunut 7 vuorokautta.

3.3 Tutkimuksessa käytetyt bakteerit

3.3.1 Tutkimuksessa käytettyjen bakteerien alkuperä

Käyttämäni bakteerilajit on valinnut ohjaajani mikrobiologi FT Merja Rautio. Bakteerilajeista useat edustavat yleisimpiä infektiota aiheuttavia anaerobisia bakteereja (Koneman ym. 1997: 712–715). Monet niistä ovat bakteereja, jotka esiintyvät osana ihmisen normaaliflooraa niin iholla, limakalvoilla kuin myös suolistossa (Jousimies-Somer – Ristola 2005: 232–233; Jousimies-Somer – Carlson 2005: 239–240; Jousimies-Somer – Vuento 2005: 241; Wren 2007: 365).

Työssäni olen käyttänyt 20 eri bakteerilajia. Edempänä käsittelen niitä hieman tarkemmin. Käytetyt bakteerilajit ovat seuraavat: *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*,

Bacteroides thetaiotamicron, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella bivia*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Clostridium difficile*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Eggerthella lenta*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *Finegoldia magna*, *Micromonas micros* ja *Veillonella parvula*.

Tutkimuksessani käytetyt bakteerikannat ovat alun perin lähtöisin kansainvälisestä ATCC-kannoista, eli American Type Culture Collectionista. ATCC on voittoa tuottamaton maailmanlaajuinen tutkimus- ja biomateriaalikeskus. Se on toiminut vuodesta 1925 lähtien, jolloin joukko tiedemiehiä katsoi, että maailmassa on tarve keskitetylle mikro-organismien kokoelmalle, joka olisi kaikkien tieteentekijöiden käytössä. ATCC kerää, säilyttää, identifioi ja jakaa kaikenlaisia mikro-organismeja, solulinjoja ja muita vastaavanlaisia biomateriaaleja niin yksityisen ja julkisen sektorin käyttöön. Pitkän historiansa ja tunnollisen tutkimustyönsä takia ATCC on muodostunut maailmalla tunnustetuksi referenssimateriaalin toimittajaksi. (ATCC 2007.)

Bakteriologian osastolla säilytyksessä olevat ja tässä tutkimuksessani käytetyt ATCC-kannat on osittain otettu säilöön erilaisista laaduntarkkailunäytteistä (Rautio 2007a.) Bakteriologian osastolle tulee laaduntarkkailunäytteitä niin kotimaasta, lähinnä Labqualityn laaduntarkkailukierroksilta, sekä ulkomailta, lähinnä Yhdistyneestä kuningaskunnasta UK NEQASilta (United Kingdom National External Quality Assessment Service), joka toimii Yhdistyneessä kuningaskunnassa ulkopuolisen laaduntarkkailun järjestönä. Se toimittaa laaduntarkkailunäytteitä myös ulkomailla oleville asiakkailleen samalla lailla kuin meidän kotimaisella Labqualitylla on asiakkaita ulkomailla.

Bakteerit olivat säilöttynä maitoon -70 °C:ssä, josta otin ne kasvatukseen. Ennen varsinaista työhöni kuuluvaa kasvatusta elvytin kannat, jonka jälkeen tein niistä vielä FAA-maljoille puhdasviljelmät, jotta varmasti sain varsinaiseen työhöni kuuluviin testikasvatuksiin puhtaat bakteerikannat. (Rautio 2007a.)

3.3.2 Grampositiiviset bakteerit

Grampositiiviset bakteerit värjäytyvät gramvärjäyksessä tumman sinisiksi tai tumman violeteiksi. Grampositiivisten bakteerin soluseinä muodostuu solukalvosta ja sen ulkopuolella olevasta varsin paksusta peptidoglykaanikerroksesta. Tästä seuraa, että grampositiiviset bakteerit ovat usein herkkiä muun muassa penisilliinille ja sen johdannaisille. (Vaara ym. 2005: 62.) Gramvärjäyksessä grampositiiviset bakteerit värjäytyvät kristallivioletin vaikutuksesta violetiksi. Jodikaliumjodidiliuos kiinnittää kristallivioletin värikompleksimolekyylit. Värjäyksessä seuraavaksi käytettävä asetonialkoholiliuos romahduttaa grampositiivisten bakteerien soluseinän niin, etteivät kristallivioletin suuret värikompleksimolekyylit pääse ulos solusta, aiheuttaen grampositiivisten bakteerien värin. Grampositiivisten bakteerien kyky olla päästämättä kristalliviolettimolekyylejä ulos solusta perustuu myös osittain soluseinämän teikohappojen muodostaman tiukan ristikkorakenteen takia. Gramvärjäyksessä käytettävällä safraniinilla ei ole vaikutusta grampositiivisten bakteerien värjäytyvyyteen. (Forbes ym. 1998: 137; Kurkinen 2006; Carlson – Koskela 2003: 22.)

Grampositiivisia sauvabakteereita tutkimusmateriaalissani edustavat *Clostridium difficile*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes* ja *Eggerthella lenta*. Näistä bakteereista kliinisesti tärkeimpiä ja yleisimpiä ovat klostridit.

Klostridit ovat varsin suurikokoisia grampositiivisiä, mutta epätasaisesti värjäytyviä ja itiöllisiä bakteereja. Niitä esiintyy yleisimmin maaperässä sekä lämminveristen eliöiden suolistoista. (Jousimies-Somer – Ristola 2005: 228.) *Clostridium difficile* on ehkä tunnetuin klostridi. Se on varsin happiherkkä ja täten sitä pidetään vaikeasti viljeltävänä bakteerina. *Clostridium difficile* on varsin yleinen vastasyntyneiden ja imeväisten suolistoissa. Terveiden aikuisten suolistoissa se taas on varsin harvinainen. *Clostridium difficilen* luonnollinen esiintymisympäristö on edelleen jokseenkin epäselvä. Se erittää ainakin kahta eri toksiinia. *Clostridium difficile* ja sen erittämät toksiinit ovat yleisimpiä mikrobilääkehoitoon liittyvien pseudomembranoottisten koliittien ja lievempien antibioottiripuleiden aiheuttajia. Diagnoosi perustuu yleisimmin sekä bakteeriviljelyyn että toksiinien osoittamiseen ulostenäytteestä. (Jousimies-Somer – Ristola 2005: 234–235.)

Clostridium perfringens on yleinen ruokamyrkytyksiä aiheuttava bakteeri. Myrkytyksen aiheuttaa bakteerin aiheuttama enterotoksiini ja oireet ilmaantuvat 7-15 tunnin kuluttua ruoan nauttimisesta. Yleinen oire on kouristuksenomaiset vatsakivut. Myrkytyksestä toipuu yleensä muutamassa päivässä. Ruokamyrkytyksen takana on yleensä huonosti kypsytetty liha tai uudelleen lämmitetyn ruoan epätäydellinen lämmitys. (Jousimies-Somer – Ristola 2005: 233.) *Clostridium perfringens* voi myös aiheuttaa kaasukuoliota sille edullisissa tilanteissa ja olosuhteissa. Kaasukuolio voi syntyä kun bakteerin energiantuotannon syntyneet liukenemattomat typpi- ja vety-molekyylit voivat jäädä vaurioituneeseen kudokseen. Näin syntyneet kaasukuplat voidaan todeta kuvantamistutkimuksissa. Hoitamattomana kaasukuolio voi johtaa potilaan kuolemaan jopa muutamissa tunneissa. Hoitona on nekroottisen ja infektoituneen kudoksen poisto sekä antibioottihoito. (Jousimies-Somer – Ristola 2005: 232–233.)

Clostridium clostridioforme voi olla osallisena monissa erilaisissa infektioissa, kuten esimerkiksi haavainfektioissa. Se on usein yhtenä osallisena sekainfektioissa, etenkin vatsaontelon alueen erilaisissa infektioissa. Sen virulenssi on heikompi kuin *Clostridium perfringens*illä, mutta sen merkitys etenkin immuunivajeisten potilaiden kohdalla on kasvanut, koska se on resistentti monille antibiooteille. (Jousimies-Somer – Ristola 2005: 233.)

Clostridium sporogenes on usein osa suoliston normaaliflooraa. Sitä löytyy myös paljon ympäristöstä. Se tuottaa itiöitä ja voi aiheuttaa kaasukuoliota. (Kunkel 2007.)

Eggerthella lenta on yksi *Eggerthella*-suvun bakteereista. Toisin kuin klostridit, *Eggerthella lenta* ei muodosta itiöitä. Se kuuluu ihmisen suoliston normaaliflooraan, jossa se osallistuu kolesterolin ja sappihappojen metaboliaan (Jousimies-Somer – Carlson 2005: 239). Sen on harvemmin todettu aiheuttavan infektioita, mutta siitä huolimatta sen tiedetään aiheuttaneen bakteremioita. *Eggerthella lentan* aiheuttamaan bakteremiaan on totuttu liittämään korkea kuolleisuus, mutta silloinkin taustalla on ollut muita perussairauksia. Bakteeria on eristetty myös umpilisäkenäytteistä, jotka on leikattu lapsilta, joilla on epäilty umpilisäkkeen tulehdusta. Sen on myös tiedetty aiheuttaneen kierukan käyttöön liittyntä sisäsynnyttimien tulehdusta. (Landais – Doudier – Imbert – Fenollar – Brouqui 2007: 1063–1065.)

Tutkimusmateriaalissani grampositiivisia kokkibakteereja olivat *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptoniphilus asaccarolyticus*, *Finegoldia magna* ja *Micromonas micros*. Näitä bakteereja yhdistää se, että aikaisemmin ne on ryhmitelty kaikki *Peptostreptococcus*-suvun alle. Vielä aikaisemmin nämä bakteerit oli luokiteltu kuuluvaksi *Peptococcus*-sukuun. Varsin vähän aikaa sitten on ehdotettu, että *Peptostreptococcus*-suvun ainoa laji olisi *Peptostreptococcus anaerobius*. (Jousimies-Somer – Carlson 2005: 240.)

Peptostreptococcus anaerobius, *Peptoniphilus asaccarolyticus*, *Finegoldia magna* ja *Micromonas micros* kuuluvat yleisesti ihmisen suoliston, ihon, sukupuolielimien limakalvojen ja suun normaaliflooraan. *Finegoldia magna* on yleinen löydös märkäpesäkkeiden yhteydessä sekä iho- ja pehmytkudosinfektioissa. *Peptostreptococcus anaerobius* on usein löydetty bakteeri sukupuolielinalueiden infektioissa sekä monissa sekainfektioissa. *Micromonas micros* taas puolestaan on useimmiten tavattu etenkin suun ja kaulan alueen infektioissa, kuten esimerkiksi kurkkupaiseessa, aikuisparodontiitissa sekä kaulan absesseissa ja selluliiteissa. Edellä mainitut kokkibakteerit ovat usein herkkiä nitroimidatsolille sekä penisilliinille. (Jousimies-Somer – Carlson 2005: 239–240.)

3.3.3 Gramnegatiiviset bakteerit

Gramnegatiiviset bakteerit värjäytyvät gram-värjäyksessä punaisiksi. Gramnegatiivisten bakteerien soluseinä on rakenteeltaan erilainen kuin grampositiivisten bakteerien soluseinä. Gramnegatiivisten bakteerien soluseinäessä solukalvon päällä oleva peptidoglykaanikerros on paljon ohuempi kuin grampositiivisilla bakteereilla. Tämän ohuen peptidoglykaanikerroksen päällä on vielä erityinen ulkomembraani, joka omalta osaltaan kompensoi peptidoglykaanikerroksen ohuutta, mutta sen lisäksi sillä on muitakin tehtäviä. Ulkomembraani rakentuu niin biologisista kalvoista kuin lipopolysakkaridista. Lipopolysakkaridin tehtävä on suojella bakteerisolua ulkopuolisilta, bakteerille haitallisilta aineilta. Tämä on yksi syy miksi monet gramnegatiiviset bakteerit ovat grampositiivisia bakteereita luonnostaan resistentimpiä antibiooteille. Lipopolysakkaridi toimii myös antigeeninä, eli se pystyy stimuloimaan elimistön immuunipuolustusta. (Vaara ym. 2005: 63–64.)

Gramvärjäyksessä gramnegatiiviset bakteerit värjäytyvät grampositiivisten bakteerien lailla violetiksi kristallivioletin vaikutuksesta. Jodikaliumjodidiliuoksen jälkeen käytettävä asetoni-alkoholiliuos ei, toisin kuin grampositiivisten bakteerien kohdalla, romahduta gramnegatiivisten bakteerien soluseinämää, sen erilaisen rakenteen takia. Gramnegatiivisten bakteerien soluseinämän ohut peptidoglykaanikerros ei sisällä samalla lailla teikohappojen muodostamia ristikkorakenteita kuin grampositiivisten bakteerien paksumpi peptidoglykaanikerros. Sen sijaan asetoni-etanoliliuos huuhtelee kristallivioletin värikompleksimolekyylit pois gramnegatiivisista bakteereista. Tämän jälkeen käytettävä safraniini värjää gramnegatiiviset bakteerit punaisiksi. (Forbes ym. 1998: 137; Kurkinen 2006; Carlson – Koskela 2003: 22.)

Tutkimuksessani käytetyistä gramnegatiiviset bakteerit olivat yhtä bakteerilajia lukuunottamatta sauvabakteereja. Tutkimuksessani mukana olleet gramnegatiiviset sauvabakteerit olivat *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella bivia*, *Prevotella intermedia* ja *Prevotella melaninogenica*. Tutkimuksessani käytetyt gramnegatiiviset bakteerit edustavat yleisimmin infektioissa tavattavia anaerobisia bakteereja (Forbes ym. 1998: 690).

Gramnegatiiviset anaerobiset sauvabakteerit ovat yleensä ihmisen normaaliflooraan kuuluvia bakteereja. Niitä esiintyy esimerkiksi nielussa, suuontelossa, genitaalialueella, suolistossa ja vaginassa. (Koneman ym. 1997: 744.) Ne voivat aiheuttaa infektion silloin kun ihmisen kehon puolustusmekanismit ovat heikentyneet. Ne voivat aiheuttaa infektion lähes kaikkialla kehossa. Tyypillisesti gramnegatiivisia sauvabakteereja esiintyy muun muassa haavainfektioissa, vatsakalvo- ja umpilisäketulehduksissa, ihon märkäpesäkkeissä, hampaan kiinnityskudosinfektioissa, viisaudenhammasinfektioissa ja sisäsynnyttimien infektioissa. (Jousimies-Somer – Vuento 2005: 241–242.)

Bacteroides fragilis-ryhmän bakteerit, eli *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus* ja *Bacteroides thetaiotamicron*, ovat yleisiä suoliston normaaliflooran bakteereja. *Bacteroides fragilis* ja *Bacteroides thetaiotamicron* ovat tästä ryhmästä yleisimmin kliinisistä näytteistä eristettyjä bakteereja. Ne voivat pahimmillaan aiheuttaa veriviljelypositiivisia bakteremioita. *Bacteroides vulgatus* eristetään harvemmin kliinisistä näytteistä, mutta

todella harvinainen sekään ei ole. (Engelkirk – Duben-Engelkirk 2000: 607; Jousimies-Somer – Vuento 2005: 242; Koneman ym. 1997: 746.)

Useat fusobakteerit ovat osa ihmiskehon normaaliflooraa. *Fusobacterium nucleatum* on yleinen suuontelossa ja tämän tähden se on yleisesti eristetty bakteeri hengityselimistöstä ja aivoista peräisin olevista näytteistä. *Fusobacterium necrophorum* on voimakkaasti patogeeninen bakteerilaji, jonka asema osana ihmisen ylempien hengitysteiden normaaliflooraa on kyseenalainen. *Fusobacterium necrophorum* on aiheuttajana lähinnä lapsilla ja nuorilla aikuisilla esiintyvän nieluinfektion aiheuttamassa syvän kaulalaskimon tromboosissa, Lemierren taudissa (Mäkisalo 2007). Fusobakteerit ovat varsin happiherkkiä ja jokseenkin vaativia kasvutekijöiden suhteen. Ne eivät kasva kaikilla anaerobisiin bakteeriviljelyihin tarkoitetuilla kasvatusalustoilla. Parhaiten fusobakteerien kasvatukseen sopii FAA-malja. (Wren 2007: 365.)

Porphyromonas asaccharolytica, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* ja *Prevotella melaninogenica* ovat niin sanottuja pigmentoituneita bakteerilajeja. *Porphyromonas asaccharolytica* lukuunottamatta nämä bakteerit ovat osa ihmisen ylähengityselimistön ja suun alueen normaaliflooraa ja ovat usein osallisena näiden alueiden anaerobi-infektioissa. Tällaisia infektioita ovat muun muassa keuhkopaiseet ja aspiraatiokeuhkokuumeet *Porphyromonas asaccharolytica* kuuluu suoliston, emättimen ja ulkoisten sukupuolielinten alueen normaaliflooraan. (Jousimies-Somer – Vuento 2005: 242.) *Porphyromonas gingivalis* ja *Prevotella intermedia* ovat usein osallisia hampaiden kiinnityskudosinfektioissa. *P. gingivalis*, joka tuottaa kudostuhoa aiheuttavia proteolyttisiä entsyymejä, on tärkeä aikuisparodontiitin aiheuttaja. (Jousimies-Somer – Vuento 2005: 242–243.)

Toisin kuin yllämainitut *Prevotella*-suvun bakteerit, *Prevotella bivia* ei kuulu niin sanottuihin pigmentoituneisiin bakteereihin. Se kuuluu emättimen normaaliflooraan, joten sitä löytyy usein obstetrisissa ja gynekologisissa infektioissa. Sitä on myös eristetty ihon pehmytosainfektioista sekä muun muassa rintarauhasen ja kainalon paiseiden yhteydessä olleista märkäpesäkkeistä, sekä joskus myös verestä että pään ja kaulan alueen muista infektioista. (Jousimies-Somer – Vuento 2005: 243; Koneman ym. 1997: 758.)

Tutkimukseni ainut gramnegatiivinen kokkibakteeri oli *Veillonella parvula*. *Veillonella parvula* on pieni nitraattipositiivinen kokkibakteeri, joka yleisimmin esiintyy normaaliflooran osana suolistossa, suuontelossa sekä genitaalialueiden limakalvoilla. Sitä löytyy harvemmin näytteistä infektion aiheuttajana. Yleisin raportoitu *Veillonella parvulan* aiheuttama infektio on osteomyeliitti, eli luuydintulehdus. (Fisher – Denison 1996: 3235.) Sillä ja muilla *Veillonelloilla* on yleensä alentunut herkkyys penisilliinille (Jousimies-Somer – Vuento 2005: 246).

3.4 Tutkimuksessa käytetyt työvälineet

3.4.1 FAA-malja

Työni tärkeimmät työvälineet ja varsinaiset tutkimuskohteet olivat kasvatusmaljat. Kasvatusmaljana käytettiin anaerobiviljelyssä yleisesti käytettyä FAA-maljaa (Fastidious Anaerobe Agar), joka oli valmistettu HUSLABin elatusaineosastolla.

FAA-malja on rikas anaerobisten bakteerien kasvatukseen käytetty yleismalja. Se on yleensä lampaanverimalja, jonka perusaineksina toimivat peptoni, glukoosi, tärkkelys ja agar. Maljalla on myös K-vitamiinia ja hemiiniä, jota on tässä enemmän kuin monissa muissa anaerobisten bakteerien kasvatuksessa käytetyissä maljoissa. (Chapin – Lauderdale 2003: 372.)

Bakteriologian osastolla käytetyt ja elatusaineosaston valmistamat maljat sisältävät edellä mainittuja tärkeitä komponentteja, mutta lampaan veren sijaan maljoilla käytetään hevosen verta (HUSLAB 2007). Maljojen valmistuksessa käytetään Lab M:n valmistamaa Fastidious Anaerobe Agar LAB 90-valmista pulveria (Lab M Ltd, Bury, Englanti). Elatusaine valmistetaan deionisoituun veteen autoklavoidaan +121 °C:n lämpötilassa. Siinä seosta pidetään 15 minuutin verran, minkä jälkeen se jäädytetään +48 °C:een ja siihen lisätään hevosen veri. Tämän jälkeen elatusaine annostellaan muovisille petrimaljoille. (HUSLAB 2007; Lab M 2007.)

3.4.2 Anaerobiset kasvatusastiat ja anaerobikehittimet

Anaerobiviljelyssä käytetään erityisiä kasvatusastioita, joihin tuotetaan erilaisin tekniikoin anaerobinen atmosfääri mahdollistamaan anaerobisten bakteerien kasvua. Kasvatusastiat ovat pääasiassa muovisia ja läpinäkyviä lieriöitä, joihin kasvatukseen menevät maljat asetetaan erityiseen maljakehikkoon. Kehikon tarkoituksena on lähinnä pitää astiassa olevat maljat paremmin paikoillaan silloin kun astioita nostetaan ja siirretään paikasta toiseen ja sen avulla



KUVIO 1. Kasvatusastia ja FAA-maljoja (Ahonen 2007).

astia on helpommin täytettävissä ja tyhjennettävissä. (Kuvio 1.) Bakteriologian osastolla on käytössä myös metallisia, läpinäkymättömiä kasvatusastioita, joissa on muovinen, läpinäkyvä kansi, mutta niitä kasvatusastioita ei käytetty tämän tutkimuksen teossa.

HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastualueen bakteriologian osastolla anaerobisen atmosfäärin tuottamiseen kasvatusastioihin käytetään erityisiä anaerobikehittämiä. Kehittimien tarkoituksena on muuttaa astiassa oleva happi lähinnä hiilidioksidiksi. Bakteriologian osaston käyttämät anaerobikehittimet ovat BD:n (Becton, Dickinson and Company) valmistamat ja myymät BD GasPak™ EZ Gas Generating Sachet. Ne ovat pusseja, jotka sisältävät epäorgaanista karbonaattia, aktiivihiihtä, askorbiinihappoa ja vettä. Ne aktivoituvat joutuessaan kosketuksiin ilman kanssa. Pussi laitetaan kasvatusastiaan ja astia suljetaan. Ilman vaikutuksesta kehitin alentaa kasvatusastiassa olevan hapen määrää ja samanaikaisesti pussissa oleva epäorgaaninen karbonaatti tuottaa astiaan hiilidioksidia, luoden anaerobisen atmosfäärin. Anaerobinen atmosfääri tulisi olla kasvatusastiassa kahden ja puolen tunnin kuluessa. 24 tunnin kuluessa kasvatusastiassa tulisi olla vähintään 15 prosentin verran hiilidioksidia. (BD 2004.)

Anaerobisessa kasvatuksessa viljellyt maljat asetetaan kasvatusastiaan, johon niiden lisäksi laitetaan anaerobikehitin sekä indikaattori. Indikaattorin tehtävänä on osoittaa se, että astiaan on muodostunut anaerobinen atmosfääri, eikä esimerkiksi kasvatusastian kansi ole vuotanut. Bakteriologian osastolla käytetään Merckin valmistamaa Anaerotest[®]-nimistä anaerobi-indikaattoria. Indikaattorin toimintaperiaate on se, että aerobisissa olosuhteissa indikaattorissa oleva väriaine, metyleenisininen, on hapettuneessa muodossaan ja on täten väriltään sininen. Osoitus tapahtuu niin, että indikaattorin väri muuttuu siinä vaiheessa kun anaerobinen atmosfääri on saavutettu. Hapettomissa, eli anaerobisissa olosuhteissa väriaine muuttuu värittömäksi leukometyleenisiniksi, joka muuttaa indikaattorin valkoiseksi. Indikaattori muuttuu takaisin, eli hapettuu, siniseksi kun happea on taas sen ympäristössä. Tämä indikaattori tulee kastaa veteen ennen anaerobiseen kasvatusastiaan asettamista. (Merck 2003.)

3.4.3 Typpikaappi

Bakteriologian osastolla on ollut aikaisemmin käytössä typpikaappi jota on myös kutsuttu suhinakaapiksi. Tälläkin hetkellä osastolla käytetään samalla lailla toimivia niin sanottuja suhinapönttöjä, joihin laitetaan odottamaan ne anaerobisessa viljelyssä käytetyt maljat, jotka hieman myöhemmin laitetaan anaerobikasvatusastioihin. Tämä tehdään silloin kun tiedetään, että samaan kasvatusastiaan on vielä tulossa samassa kasvatusvaiheessa olevia anaerobimaljoja. Niin kaapissa kuin myös pöntöissä käytetään kaasua, jolla pyritään pitämään happipitoisuus mahdollisimman alhaisena. Bakteriologian osastolla kyseisenä kaasuna käytetään typpeä, N₂, josta kaappien nimi, typpikaappi. Kaapit oli valmistettu bakteriologian osastolle mittatilaustyönä. (Rautio 2007b.) (Kuvio 2.)



KUVIO 2. Typpikaappi (Ahonen 2007).

3.5 Tutkimuksessa käytetyt maljojen säilytysolosuhteet

Jokaista käytettyä bakteerikantaa kohden käytettiin kolmea kasvatusmaljaa, eli yksi malja kutakin säilytysolosuhdetta kohden. (Rautio 2007a.) Ennen viljelyä käytettävät maljojen säilytystavat olivat normaali atmosfääri, eli maljoja säilytettiin kuten tähän asti FAA-maljoja on säilytetty. Maljat olivat jääkaapissa yön yli ja seuraavana, eli varsinaisen viljelypäivänä ne nostettiin huoneenlämpöön lämpenemään ennen viljelyä, kuten tällä hetkellä normaalistikin toimitaan. Viljelyvaiheessa maljat olivat huoneenlämpöisiä. (Rautio 2007a.)

Toinen säilytystapa oli niin sanotussa typpikaapissa pitäminen (Rautio 2007a.) Typpikaapissa käytetään typpikaasua syrjäyttämään ilman happi ja täten luomaan anaerobisille bakteereille hieman edullisimmat olosuhteet hengissä pysymisen kannalta. Tyhjien maljojen suhteen tarkoitus on ollut saada normaalista atmosfääristä poikkeava kaasuseos kaappiin, joka sitten vähentäisi hapen diffuuntoitumista maljoilla olevaan agariin.

Kolmas käytettävä säilytystapa oli anaerobioosi, jossa hapen syrjäyttävänä kaasuna toimi anaerobikehittimen tuottama hiilidioksidi. Viljelemättömät maljat suljettiin anaerobisten bakteerien viljelyissä käytettyyn kasvatusastiaan anaerobikehittimen ja indikaattorin kanssa samalla lailla kuin normaalisti laitetaan viljeltyt maljat kasvamaan anaerobisessa atmosfäärissä. Toisin kuin varsinaisessa bakteerien kasvatuksessa kasvatusastioita ei kuitenkaan säilytetty lämpökaapissa vaan huoneenlämmössä. (Rautio 2007a.)

Näillä tavoin oli tarkoitus saada kolme erilaista säilytysolosuhdetta, joissa kaikissa oli toisistaan poikkeava kaasujen koostumus ja katsoa mikä kaasukoostumus olisi kaikkein optimaalisin anaerobisten bakteerien viljelyssä käytetyille maljoille. Maljojen valmistuksen jälkeen ja ennen asettamista tutkittaviin säilytysolosuhteeseen maljoja oli säilytetty +4 °C:ssä.

3.6 Käytännön tutkimuksen suoritus

Työni ensimmäisenä vaiheena oli bakteerikantojen elvytys -70 °C:stä. Tämä tapahtui 6.9.2007. Elvytyksessä käytetyt FAA-maljat olivat olleet anaerobisessa atmosfäärissä

edellisen yön, eli elvytysviljelyä edeltävänä päivänä suljin ne anaerobiseen kasvatusastiaan yhdessä anaerobikehittimen ja indikaattorin kanssa. Maljat jaoin neljän maljan ja bakteerikannan joukoissa yhteensä viiteen astiaan. Tämä siksi, koska lopullisessa kasvatuksessa astioihin tuli kolme maljaa jokaista bakteerilajia kohden ja tämä tarkoitti yhteensä 12:sta maljaa. Myös happialtistuksen pituuden vakioiminen tutkimuksessa käytettyjen kantojen välillä oli tämän jakamisen takana, elvytyksenkin aikana.

Elvytyksessä bakteerikannat saivat kasvaa torstai-iltapäivästä (6.9.2007.) seuraavaan maanantai-iltapäivään (10.9.2007.), eli yhteensä neljä päivää. Näiden neljän päivän aikana kasvatusastioita ei siis avattu. Tällä haluttiin taata se, että kannoissa olevat hitaasti kasvavat bakteerilajit saisivat aloitettua kasvunsa rauhassa.

Maanantaina 10.9.2007 tein elvytetyistä bakteerikannoista vielä puhtasviljelmät. Suurin osa kannoista oli puhtaita jo elvytysvaiheen kasvatuksessa ja monista niistäkin kannoista joissa oli kontaminaatiokasvua, oli puhtaita alueita maljalla, mistä pystyin ottamaan materiaalia puhtasviljelmää varten. Ongelmia oli ainoastaan kahden bakteerikannan kohdalla. *Prevotella melaninogenica* ei kasvanut lainkaan ja maljalla oli ainoastaan kontaminaatiopesäkkeitä. Päätimme yhdessä ohjaavan laboratoriohoitaja Heli Nisosen kanssa, että teen kannasta toisen elvytysyrityksen.

Toinen hieman ongelmainen bakteerikanta oli *Porphyromonas asaccharolytica*, jonka maljalla kasvoi useita erilaisia pesäkkeitä, joiden joukosta oli varsin vaikeaa selvittää, mikä oli oikea pesäke. Yhdessä ohjaavan laboratoriohoitajan kanssa konsultoimme toista mikrobiologia, koska ohjaava mikrobiologini ja laboratorion varsinainen anaerobiekspertti oli lomalla kyseisellä viikolla. Tutkimme maljaa sekä maljaskoopin avulla, että UV-valon avulla, joiden perusteella teimme valintamme bakteeripesäkkeiden joukosta.

Puhtasviljelmät saivat kasvaa noin 48 tuntia. Varsinainen viljelypäivä oli keskiviikko 12.9.2007. Tiistaina 11.9.2007 varsinaisessa kasvatuksessa käytetyt maljat asetin tutkittaviin atmosfääreihin. Kasvatuksessa käytetyt maljat oli valmistettu 6.9.2007, joten ne olivat varsinaisen kasvatuksen alkaessa kuusi päivää vanhoja.

Nimesin maljat kunkin bakteerilajin mukaan ja asetin ne kuhunkin kolmeen säilytysolosuhteeseen. 20 maljaa laitoin säilytykseen jääkaappiin yön yli. Toiset 20 maljaa asetin typpikaappiin. Tämän jälkeen kaappiin päästettiin maksimaalisesti N₂-kaasua noin kymmenen minuutin ajan. Tämän jälkeen kaikki kaasuhanat suljettiin ja kaapin annettiin olla suljettuna. Kolmannet 20 maljaa asetin anaerobisiin kasvatusastioihin asianmukaisesti anaerobikehittimen ja indikaattorin kanssa. Astioita oli yhteensä viisi ja jokaisessa oli neljä maljaa. Tämä oli siksi, että varsinaisessa viljelyssä astioihin tuli jokaista bakteerilajia kohden kolme maljaa. Yhteen kasvatusastiaan tuli siis varsinaisessa viljelyssä yhteensä 12 maljaa. Säilytysaika kaikille maljoille oli yön yli, eli vähintään 18 tuntia.

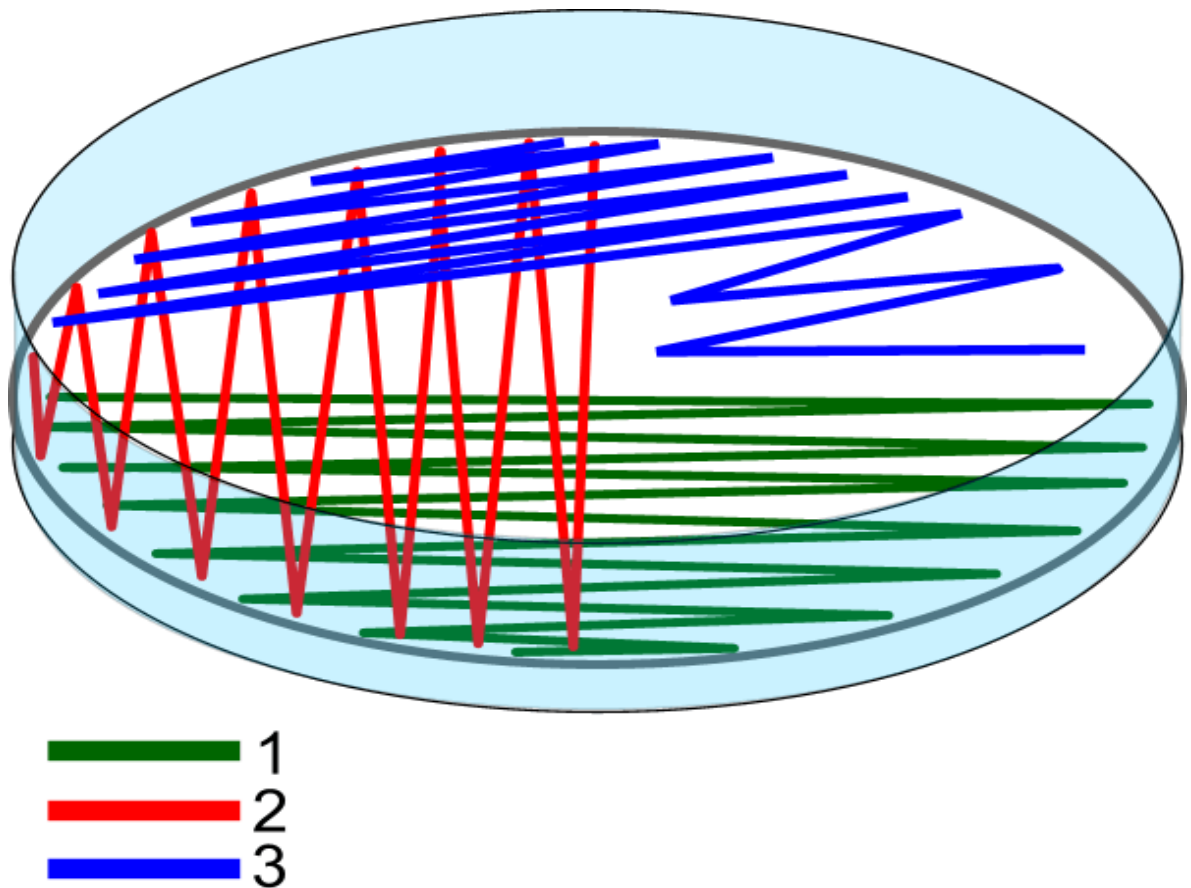
Keskiviikkona 12.9.2007 suoritin tutkimuksen tuloksia antavat viljelyt. Puhdasviljelmistä tein suspensiot 2 millilitraan keittosuolaliuosta. Suspensioiden sameus vastasi McFarland standardia 0,5. Näitä suspensioita levitin jokaiselle maljalle 10 µl:n verran. Tällä tavoin pyrin vakioimaan jokaiselle maljalle tulevan bakteerimäärän, jotta tuloksia arvioitaessa voitiin päästä tarkempiin ja parempiin päätelmiin säilytysolosuhteiden mahdollisesti vaikutuksesta bakteerien kasvuun maljoilla, ja jotta mahdolliset erot eivät johtuisi epäsuhtaisista bakteerimääristä eri maljoilla.

Sekä suspensioiden teko että bakteerien viljely maljoille tapahtui neljä bakteerikantaa kerrallaan. Tämä siksi ettei bakteerikantojen välillä olisi tullut liiallista epäsuhtaa happialtistuksen ajallisen pituuden suhteen. Astiat, joissa anaerobisessa atmosfäärissä säilytetyt maljat olivat, avasin mahdollisimman myöhään, jotta kyseiset maljat olisivat mahdollisimman vähän aikaa tekemisissä hapen kanssa. Suljin maljat nopeasti viljelyn jälkeen kasvatusastioihin. Myös alkuperäiset elvytysmaljat ja puhdasviljelmät laitoin takaisin kasvatusastioihin anaerobiseen atmosfääriin.

Prevotella melaninogenica ei kasvanut toisellakaan elvytysyrityksellä. Maljalla kasvoi jotain aivan toisia organismeja, jotka mikrobiologi arvioi olevan propionibakteereja. Keskustelin asiasta ohjaavan mikrobiologini kanssa ja yhteisymmärryksessä päätimme jättää kyseisen bakteerin kokonaan pois tutkimuksesta. Tutkittavien bakteerien määrä siis väheni yhdellä ja täten lopullisessa tarkastelussa oli mukana vain 19 bakteerilajia. Päätöksen perusteena oli se, että tutkimuksessa oli mukana muita *Prevotella*-sukuun kuuluvia bakteerilajeja.

Porphyromonas asaccharolytica kohdalla tutkimme tehtyä puhdasviljelmää yhdessä mikrobiologin kanssa. Maljalla näytti edelleen kasvavan useampia bakteerilajeja. Fluoresenssi-valon avulla päädyimme tutkimaan yhden kannan reaktiota indolin kanssa. *Porphyromonas asaccharolytica* on indoli-positiivinen, samoin maljalta tutkimamme bakteerikanta. Tämän testin perusteella teimme NaCl-suspension kyseisestä pesäkkeestä.

Kuten edellä mainitsin, varsinainen tutkimusviljely suoritettiin NaCl-liuokseen tehdystä bakteerisuspensiosta 10 µl:n viljelysilmukalla. Hajotus maljalla tehtiin kolmeen osaan, ensimmäisen viljelyalueen ollessa noin puolet kasvatusmaljan pinta-alasta ja niin sanottu tiuhan viljelyn alue. Toinen ja kolmas alue maljalla olivat varsinaisia hajotusalueita, joilla tehdyt viljelyvedot eivät olleet yhtä tiuhaan vedettyjä kuin ensimmäisellä alueella. (Kuvio 2.)



KUVIO 2. Viljelyvedot ja hajotusalueet kasvatusmaljoilla, viivojen numerointi viittaa hajotusalueen järjestysnumeroon (Brooks 2007).

Maljojen annettiin tämän jälkeen kasvaa 48 tuntia. Tämän jälkeen avasin astiat yksi kerrallaan, tutkin maljat ja merkitsin muistiin siihen mennessä saadut kasvatustulokset. Tämän jälkeen suljin maljat takaisin kasvatusastioihin ja annoin niiden kasvaa tämän jälkeen seuraavaan keskiviikkoon, jolloin kokonaiskasvatusajaksi muodostui viikko. Tämä kasvatusaikataulu vastaa bakteriologian osaston normaalia käytäntöä anaerobisten näytteiden kasvatuksessa.

Ensimmäisellä maljojen katsontakerralla katsoin maljoja ja merkitsin tuloksia ylös pääasiassa yksin. Ohjaava laboratoriohoitajani opasti minua ensin maljojen katselussa ja tämän jälkeen työskentelin itsenäisesti. Toisella katsontakerralla, viikon kasvatuksen jälkeen, katselin maljat yhdessä ohjaajani Merja Raution kanssa.

4 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA LUOTETTAVUUS

4.1 Tutkimuksen tulokset

Tuloksien ylöskirjaamista varten tein taulukon, johon vapaamuotoisesti kirjasin maljoilla näkyvän bakteerikasvun määrän, pesäkkeiden koon ja muut mahdolliset huomautukset, jotka liittyivät kasvun määrään tai pesäkkeiden ulkonäköön. Kasvun määrän arvioin silmämääräisesti. Bakteeripesäkkeiden koon mittasin ensimmäisellä tarkastelukerralla tavallisella viivoittimella ja toisella tarkastelukerralla tarkemmalla työntömitalla. Joitakin maljoja lukuunottamatta valokuvasin myös maljat. Valokuvaamatta jäivät sellaiset maljat, joiden bakteerikasvustosta ei olisi saanut kuvasta mitään selvää, vaikka silmin tarkasteltuna bakteerikasvu oli hyvin nähtävissä.

Ensimmäiset tulokset kirjasin ylös perjantaina 14.9.2007, 48 tunnin kasvatuksen jälkeen. Kasvun määrää arvioin sen perusteella millä hajotusalueella bakteeripesäkkeitä kasvoi. Tämä oli toisinaan hieman ongelmallista, koska joissakin yksittäistapauksissa pesäkkeiden kokonaismäärä oli varsin pieni, mutta jokaiselta kolmelta hajotusalueelta niitä löytyi.

Bakteeripesäkkeistä arvioin kasvun määrän ja pesäkkeiden koon lisäksi niiden ulkonäköä. Ulkonäössä vertailin nimenomaan sitä, vaikuttiko maljan säilytysatmosfääri pesäkemorfologiaan, eli oliko ulkonäössä mitään eroja säilytysatmosfäärien välillä. Muutamien bakteerilajien kohdalla arvioimme meidän tutkimuksen tekijöiden mielenkiinnosta myös bakteerien tuottamaa hajua. Haju ei kuitenkaan kuulunut varsinaisiin arviointikohtiin, koska se harvemmin kuuluu virallisiin bakteerien tunnistuskeinoihin. Ainoastaan *Clostridium difficile*n kohdalla hajua voidaan käyttää diagnosoinnissa apuna, koska sen tuottama haju on sille niin ominainen ja vahva. UV-valon avulla katsoin, että jokainen bakteerikanta reagoi yhtenäisesti valoon. Tutkin näin siis sen, oliko bakteerikantojen sisällä eroja fluoresensseissa. Bakteerilajit reagoivat eri lailla UV-valoon, toisten fluoresoidessa voimakkaammin kuin toiset. Tämän tarkastelun tulos oli se, että maljasta riippumatta fluoresenssit bakteerilajien sisällä olivat yhtenäiset.

Pesäkkeiden kokoa ja ulkonäköä vertasin vain ja ainoastaan muihin saman lajin kasvustoihin. Tämä luonnollisesti siitä syystä, että eri bakteerilajeilla on luonnostaan erikokoiset ja -näköiset pesäkkeet, ja täten kasvutulokset eri bakteerilajien välillä eivät ole vertailukelpoisia toistensa kanssa ja täten eivät antaisi mitään lisäinformaatiota tutkimuksen tuloksien arvioinnissa.

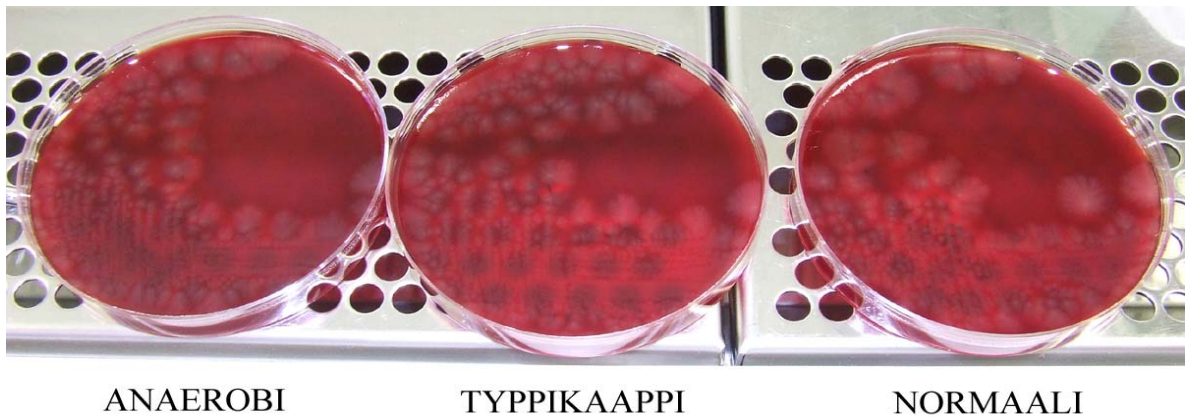
Tulokset olen koonnut tähän raporttiin taulukon muodossa. Taulukkoja on kaksi. Ensin käyn läpi maljojen ensimmäisellä tarkastelukerralla saadut tulokset ja vasta niiden jälkeen toisella tarkastelukerralla saadut tulokset. Taulukkojen alle olen koonnut yksittäisiä huomioita ja selventäviä kohtia eräiden bakteerilajien kohdalta, sekä liittänyt käsitellyistä bakteerilajeista valokuvia niiden kasvatusmaljoista. Kuvat olen ottanut itse. Kuvissa maljat ovat samassa asennossa kuin kuviossa 2 oleva viljelytapaesimerkki, eli viljelyalue 1 on maljan alaosassa. Taulukoissa kasvun määrä on merkitty +-merkeillä. Koska hajotus maljoilla tehtiin kolmelle alueelle, kasvun määrää arvioitiin sen perusteella kuinka monella alueella kasvua näkyi. Kolme +-merkkiä siis tarkoittaa sitä, että kasvua löytyi kaikilta kolmelta alueelta. Tämä ei kuitenkaan kerro kaikkea siitä, kuinka tiheästi pesäkkeitä kullakin alueella oli.

TAULUKKO 1. Kasvatustulokset, kasvun määrä ja pesäkkeiden läpimitta, 48 tunnin kasvatuksen jälkeen

BAKTEERILAJI	ANAEROBIOOSI	TYPPIKAAPPI	NORMAALI
<i>Bacteroides fragilis</i>	+++ 3 mm	+++ 2–3 mm	++ 2–3 mm
<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	+++ 3 mm	+++ 3 mm	++ 2 mm
<i>Bacteroides vulgatus</i>	+++ 3 mm	++ 3 mm	+++ 4 mm
<i>Prevotella bivia</i>	+++ 2 mm	+++ 2 mm	+++ 2,5 mm
<i>Prevotella intermedia</i>	++ 1 mm	++ 0,9 mm	++ 1 mm
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	+++ 4 mm	+++ 3 mm	+++ 3 mm
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+++ 1 mm	+++ 1 mm	+++ 1 mm
<i>Veillonella parvula</i>	+++ 0,5 mm	+++ 0,5 mm	+++ 0,5 mm
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	+++ 1 mm	++ alle 0,5 mm	++ alle 0,5 mm
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	+++ 2 mm	+++ 2 mm	+++ 2 mm
<i>Peptoniphilus asaccarolyticus</i>	+++ 1 mm	+++ 1 mm	++ 1 mm
<i>Finegoldia magna</i>	++ hyvin pieniä	++ hyvin pieniä	+ hyvin pieniä
<i>Micromonas micros</i>	+++ hyvin pieniä	+++ hyvin pieniä	+++ hyvin pieniä
<i>Clostridium clostridioforme</i>	++ 1,5 mm	++ 1,5 mm	++ 1,5 mm
<i>Clostridium perfringens</i>	+++ 5 mm	+++ 4 mm	+++ 4 mm
<i>Clostridium sporogenes</i>	+++ 1 / 6 mm	+++ 1 / 6 mm	+++ 1 / 5 mm
<i>Clostridium difficile</i>	++ 5 mm	++ 4 mm	++ 5 mm
<i>Eggerthella lenta</i>	+++ 1 mm	+++ 1 mm	+++ alle 1 mm
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+ pientä	+ pientä	+ pientä

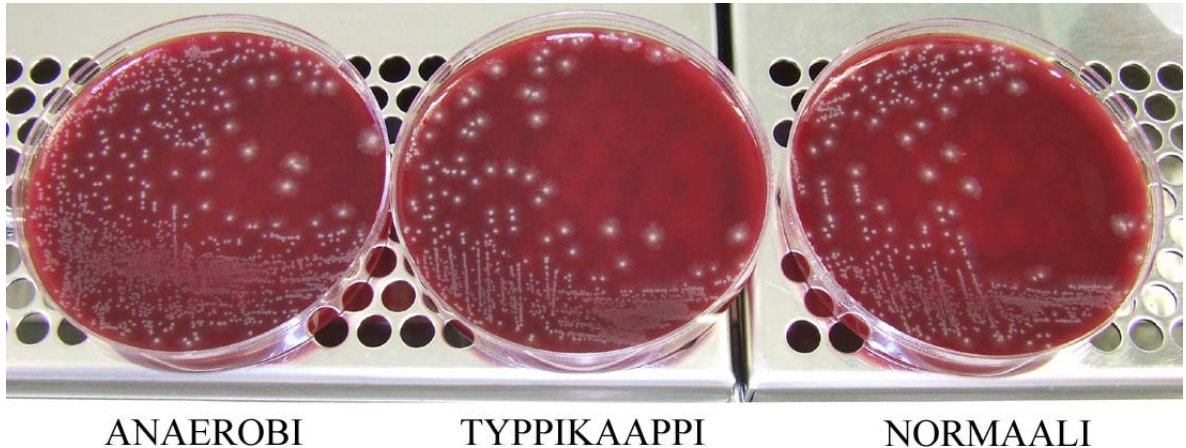
Yllä olevasta ensimmäisen tarkastelun tulostaulukosta (taulukko 1) näkee hyvin nopeasti, että maljojen säilytysolosuhteiden eroista huolimatta, kasvun määrässä ei ole suuria eroja, monissa paikoin ei lainkaan. Bakteripesäkkeiden läpimitoissa ei myöskään esiinny suuria eroja.

*Clostridium perfringens*in kohdalla oli huomattavaa se, että anaerobisessa atmosfäärissä säilytetyn kasvatusmaljan 2. hajotusalueella bakteripesäkkeitä oli noin 20, kun taas normaaliatmosfäärissä säilytetyn kasvatusmaljan 2. hajotusalueella bakteripesäkkeitä oli vain noin yhdeksän. (Kuvio 3.) On kuitenkin huomattava, että jos kyseessä olisi ollut steriililtä alueelta otetun näytteen primääriviljely, pesäkkeiden määrällä ei olisi diagnoosin tekemisen kannalta suurta merkitystä, vaan sillä, että maljalla olisi ylipäättänsä ollut kasvua. Joka tapauksessa pesäkkeet olivat tunnistettavissa pesäkemorfologian perusteella, eikä pesäkkeiden halkaisijoissa ollut suurempaa eroa. Jos kyseessä olisi ollut aidon potilasnäytteen primääriviljely, maljalta olisi pystynyt tekemään tarvittavat tunnistukset ja pesäkkeistä olisi voinut lähteä tekemään tarvittavia jatkotestejä bakterilajin tunnistuksen tueksi.



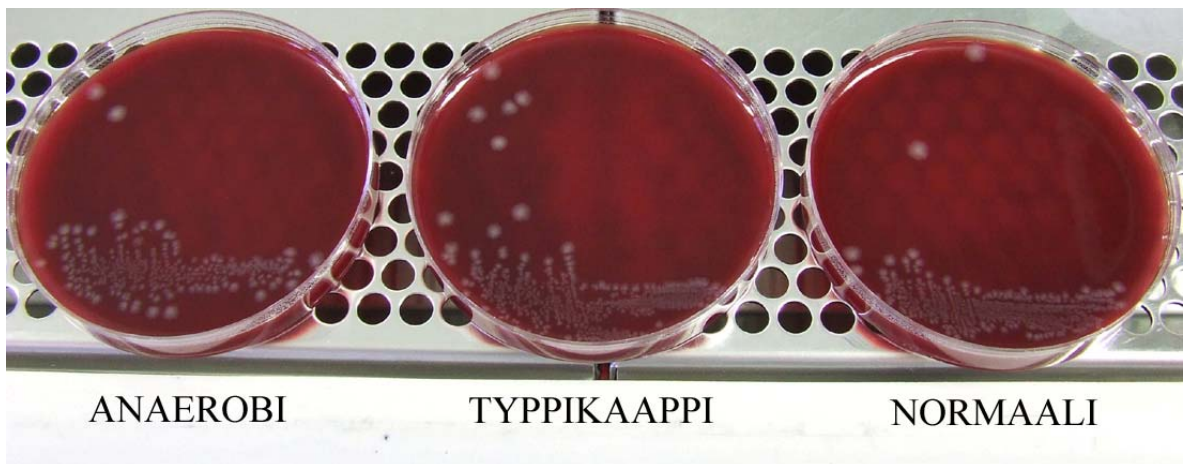
KUVIO 3. *Clostridium perfringens* 48 tunnin kasvatuksen jälkeen (Ahonen 2007).

*Clostridium sporogenes*in kohdalla anaerobisessa atmosfäärissä säilytetyllä maljalla oli silmämääräisesti arvioituna enemmän bakteeripesäkkeitä kuin normaaliolosuhteissa säilytetyllä maljalla. Tästä huolimatta kasvun määrä oli hyvä ja runsas jokaisella kolmella maljalla. (Kuvio 4.)



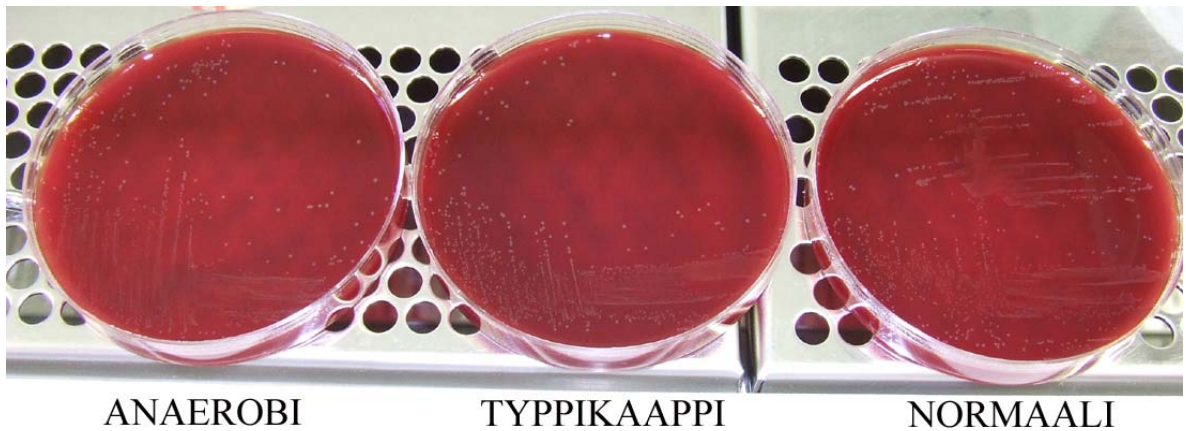
KUVIO 4. *Clostridium sporogenes* 48 tunnin kasvatuksen jälkeen (Ahonen 2007).

*Clostridium difficile*en kohdalla esiintyi vastaavaa ilmiötä. *C. difficile*llä oli varsin kitsas kasvu kaiken kaikkiaan, mikä on lajille ominaista. On huomattavaa, että kasvun niukkuus oli samanlaista jokaisella maljalla, joten voidaan sanoa, että kasvun niukkuus johtuu bakteerista itsestään eikä suinkaan maljasta ja siitä minkälaisissa olosuhteissa maljaa oli säilytetty ennen viljelyä. (Kuvio 5.)



KUVIO 5. *Clostridium difficile* 48 tunnin kasvatuksen jälkeen (Ahonen 2007).

Eggerthella lenta-bakteerin kohdalla normaaliatmosfäärissä säilytetyllä maljalla oli voimakas bakteeripesäkekasaus keskellä maljaa, minkä uskon johtuvan siitä, että viljelyvaiheessa viljelyssä käytetystä viljelysilmukassa ollut suspensiopisara on pudonnut siihen kohtaan maljaa eikä suinkaan maljan reuna-alueelle, mille se oli tarkoitus saada. Kasvun määrään kolmella eri hajotusalueella se ei kuitenkaan vaikuttanut suuremmissa määrin. Aina voi kuitenkin keskustella siitä, onko suspensiopisaran putoaminen keskelle maljaa kuitenkin vaikeuttanut kasvun oikean määrän arviointia. (Kuvio 6.)



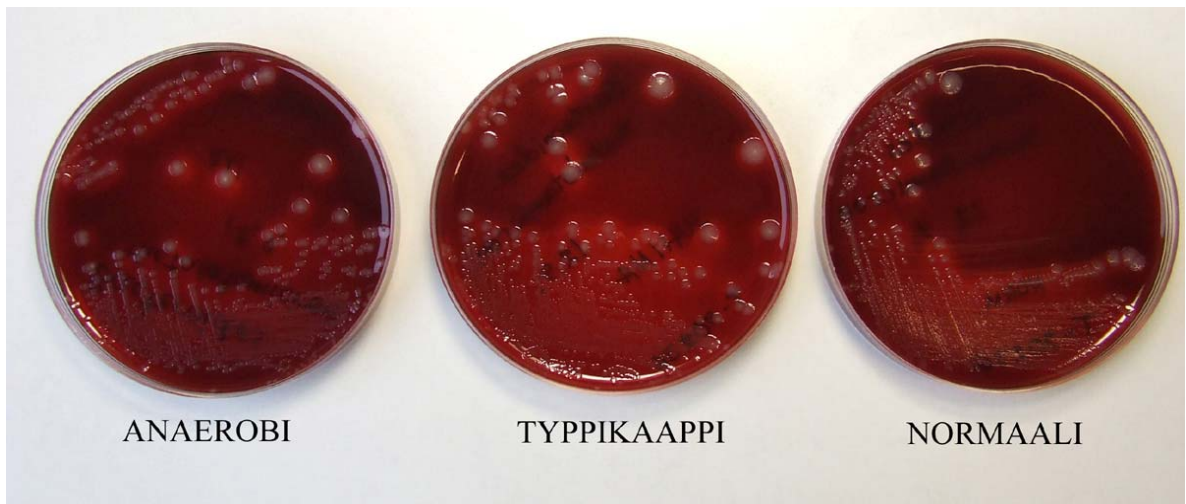
KUVIO 6. *Eggerthella lenta* 48 tunnin kasvatuksen jälkeen (Ahonen 2007).

TAULUKKO 2. Kasvatustulokset, kasvun määrä ja pesäkkeiden läpimitta, 7 vuorokauden kasvatuksen jälkeen

BAKTEERILAJI	ANAEROBIOOSI	TYPPIKAAPPI	NORMAALI
<i>Bacteroides fragilis</i>	+++ 3–3,3 mm	+++ 2,3–3,4 mm	++ 2,2–4,9 mm
<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	+++ 2,9–4,7 mm	+++ 2,7–4,5 mm	++ 2,3–3,9 mm
<i>Bacteroides vulgatus</i>	+++ 4,1–5,5 mm	+++ 3,6–5 mm	+++ 3,6–5,8 mm
<i>Prevotella bivia</i>	+++ 3,3–4,6 mm	+++ 3,3–4,1 mm	+++ 3,3–4,5 mm
<i>Prevotella intermedia</i>	+++ 1,8–2,7 mm	+++ 1,5–3,1 mm	+++ 1,5–2,9 mm
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	+++ 2,9 / 7 mm	+++ 2,8 / 6,9 mm	+++ 2,8 / 7,7 mm
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+++ 2,8 mm	+++ 2,7 mm	+++ 2,4–3,2 mm
<i>Veillonella parvula</i>	+++ 1,4 mm	+++ 1,4 mm	+++ 1,5 mm
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	+++ 1,6–1,8 mm	++ alle 2,5 mm	++ alle 1,7–2,1 mm
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	+++ 1,3–2,3 mm	+++ 1,8–2,4 mm	+++ 1,2–3,2 mm
<i>Peptoniphilus asaccarolyticus</i>	+++ 2 mm	+++ 1,9 mm	+++ 1,1–2,3 mm
<i>Finegoldia magna</i>	++ 0,7 mm	++ 0,5 mm	++ 0,6 mm
<i>Micromonas micros</i>	+++ 1 mm	+++ 0,7 mm	+++ 0,5 mm
<i>Clostridium clostridioforme</i>	++ 3,3 mm	++ 3,5 mm	++ 3,8–5,2 mm
<i>Clostridium perfringens</i>	+++ 5,3 mm	+++ 6,9 mm	+++ 8,8 mm
<i>Clostridium sporogenes</i>	+++ 1,2 / 9,5 mm	+++ 1 / 6 mm	+++ 1 / 7 mm
<i>Clostridium difficile</i>	++ 4,5 mm	++ 3,7 mm	++ 4,4 mm
<i>Eggerthella lenta</i>	+++ 2,2 mm	+++ 1,8 mm	+++ 1,1 mm
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+++ 1–1,6 mm	+++ 1,2–1,4 mm	+++ 1,1–1,8 mm

Lisäkasvatuksessa kasvua tuli joidenkin bakteerilajien kohdalla lisää, mutta suurimman osan kohdalla kasvun määrässä ei ollut eroja ensimmäisen ja toisen tarkastelukerran välillä. Eniten kasvuaan oli lisännyt *Porphyromonas gingivalis*. Sen kohdalla kasvun lisäys oli samansuuruinen jokaisella maljalla.

Muita kuin varsinaiseen kasvun määrään liittyviä huomion- ja mainitsemisen arvoisia asioita ovat *Bacteroides thetaiotamicron*-bakteerin maljalla aiheuttama hemolyysi. Hemolyysiä esiintyi jokaisella kasvatusmaljalla ja jokaisella maljalla se oli samanlainen. (Kuvio 7.) *Prevotella intermedia*-bakteeri tuotti lajille ominaisen mustan pigmentin jokaisella maljalla ja jokaisella niistä pigmentoituminen näytti samanlaiselta. (Kuvio 8.)



KUVIO 7. *Bacteroides thetaiotamicron*, 7 vuorokauden kasvatuksen jälkeen (Ahonen 2007).



KUVIO 8. *Prevotella intermedia*, 7 vuorokauden kasvatuksen jälkeen (Ahonen 2007).

Kuten mainitsin jo aikaisemmin, kasvaneista bakteeripesäkkeistä arvioitiin myös pesäkemorfologiaa, koska anaerobisten bakteerien tunnistuksessa pesäkemorfologialla on tärkeä osa. Kaikkia maljoja tarkasteltuamme totesimme, että pesäkemorfologiassa ei ollut eroja bakteerilajien sisällä, eli maljojen säilytysatmosfäärillä ei ollut vaikutusta pesäkkeiden ulkonäköön. Bakteerit siis pystyttiin tunnistamaan jokaiselta maljalta lajille tyypillisen pesäkemorfologiansa perusteella.

Tutkimuksen yhtenä tarkoituksena on vastata tutkimusongelmaan. Seuraavaksi vastaan tämän tutkimuksen tutkimusongelmaan tutkimuksesta saatujen tuloksien perusteella.

Tuloksia läpikäydessä kävi ilmi, että FAA-maljojen säilytysolosuhteilla, tässä tutkimuksessa kaasuatmosfäärillä, ei ole kovin suuria vaikutuksia primääri viljelyn tulokseen. Tuloksista voi nähdä, että bakteerien kasvumäärät eivät näytä olevan riippuvaisia siitä, minkälaisessa kaasuatmosfäärissä kasvatuksessa käytettyjä maljoja on säilytetty juuri ennen viljelyä. Bakteeripesäkkeiden kokoon säilytysolosuhteiden eroilla ei ollut myöskään suurempaa vaikutusta. Normaaliatmosfäärissä säilytetyillä maljoilla bakteeripesäkkeiden koko oli keskimääräisesti hieman pienempi kuin anaerobisessa atmosfäärissä säilytetyillä maljoilla, mutta yleensä erot eivät olleet kovin suuria, yleensä muutamien millimetrin kymmenesosan suuruisia. Pesäkemorfologiaan maljojen säilytysolosuhteiden erilaisuuksilla

ei ollut minkäänlaista vaikutusta, pesäkkeet olivat jokaisella maljalla bakteerilajille ominaisen näköisiä ja muotoisia.

Erot bakteerien kasvumäärissä, pesäkkeiden koossa ja pesäkemorfologiassa eivät olleet hyvin merkittäviä eikä niillä täten ole vaikutusta primääriviljelyn tulokseen siinä määrin, että voitaisiin sanoa, että normaaliatmosfäärissä säilytetyiltä maljoilta diagnosointi olisi vaikeampaa tai laadultaan huonompaa kuin anaerobisessa atmosfäärissä säilytetyiltä maljoilta. Näkyvät pienet vaihtelut kasvun yleismäärässä, pesäkkeiden määrässä ja koossa voidaan katsoa olevan normaalin vaihtelun piirissä. Näiden tuloksien perusteella voidaan tehdä se johtopäätös, että HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osasto voi jatkaa anaerobisten bakteerien viljelyssä käytettyjen maljojen säilytyksessä tähänkin asti käyttämäänsä toimintatapaa, eli normaalissa atmosfäärissä säilyttämistä, koska viljelytulosten laatuun sillä ei ole vaikutusta.

4.2 Tuloksien luotettavuus

Tuloksiin vaikuttavia asioita oli monia. Bakteerikantojen elvytys toimi paremmin kuin olimme uskoneetkaan. Kantoja säilytetään maidossa monia vuosia, joten aina ei voi olla varma siitä ovatko bakteerit, etenkin anaerobiset bakteerit, säilyneet maidossa elävinä. Se, että vain yksi kanta 20:stä oli ilmiselvästi kuollut, oli varsin positiivinen puoli tutkimuksen käytännön tekemisen sujumisen kannalta.

Pesäkkeiden koon mittaamisen kannalta olisi ollut parempi, jos molemmilla mittauskerroilla olisin käyttänyt samaa mittausvälinettä. Mitä tarkempi, sen parempi, siitäkin huolimatta, että lopullisia tuloksia tarkastellessa voi päätellä sen, että koska erot pesäkkeiden läpimitoissa olivat pieniä, paremmalla mittaustarkkuudella en luultavasti olisi päätenyt erilaisiin tuloksiin kuin mitä nyt sain. Pesäkkeen kokoon vaikuttaa myös se, kuinka tiheä kasvusto on, eli erillään olleet pesäkkeet olivat selvästi suurempia kuin tiheän kasvuston alueella. Pieniä eroja saattoi siis tulla siitä johtuen miten tiheästi pesäkkeet olivat sijoittuneet hajotusviljelyssä.

Saatujen tuloksien heikkous lienee se, että sattuman osuutta on äärimmäisen vaikea arvioida. Jos olisin tehnyt jokaista suspensiota kohti esimerkiksi kolme kertaa kolmen

maljan sarjat, olisin voinut arvioida sattuman osuutta tuloksiin paremmin. Tämä olisi kuitenkin lisännyt työmäärää ja työhön vaadittua aikaa, jolloin työn tekemiseen olisin tarvinnut työparin. Toisaalta on huomioitava, että vaikka tekemäni ja käyttämäni bakteerisuspensiot eivät tarkasti kaikki olleet toistensa kanssa juuri samanvahvuisia, maljoille kuitenkin päätyi samanvahvuista bakteerisuspensiota jokaisen bakteerilajin kohdalla. Koska kasvatustulokset eivät olleet bakteerilajien välillä kovinkaan vertailukelpoisia, suspensioiden vahvuuksien pienet erot eivät ole vaikuttaneet tuloksien arviointiin.

Suspensioiden sameus ja bakteerimäärä suspensioissa pyrittiin pitämään samana jokaista maljaa kohden sekoittamalla bakteerimassa NaCl-liuokseen kunnolla. Suspensioita tehdessä on aina se vaara, että bakteerimassa sedimentoituu putken pohjalle, jolloin nesteen pintaosissa on pienempi bakteerikonsentraatio kuin pohjaosissa. Välttääkseni sen, että bakteerilajien sisällä olisi erilaisia bakteerikonsentraatioita maljoille viljelyssä 10 µl:ssa suspensiota, viljelysilmukkaan otettiin suspensiota sen pintaosista. Tällä menetelmällä pyrittiin myös välttämään se, ettei viljelysilmukan varteen tarttuisi ja maljalle kulkeutuisi ”ylimääräisiä” bakteerisoluja suspensiosta.

Tutkimuksessa käyttämäni säilytysolosuhteiden kaasukoostumuksen vakiointi oli vaikeinta typpikaapin osalta. Sille ei ollut minkäänlaista mittaria, jolla olisi voinut varmistua siitä, että kaapissa olisi ollut koko säilytysajan normaalia huoneilmaa enemmän typpeä. En minä eivätkä muutkaan laboratorion henkilökunnasta tienneet kuinka tiivis typpikaappi loppujen lopuksi oli. Normaaliatmosfäärissä ei myöskään ollut mitään indikaattoria, mutta koska kyse oli kaasukoostumuksesta, jossa voitiin olettaa olevan normaali määrä happea sekä kaasukoostumuksesta joka on normaalia hengitysilmaa, en katso, että normaaliatmosfäärin kohdalla indikaattorin puuttuminen olisi kovin suuri luotettavuustekijä. Anaerobisen atmosfäärin kohdalla ei myöskään ollut käytettävissä tarkkaa kaasukoostumuksen kertovaa indikaattoria, mutta anaerobioosin kohdalla tärkeintä olikin tietää se, että suurin osa, ellei jopa kaikki kasvatusastiassa alun perin ollut happi on korvautunut jollakin muulla kaasulla. Tätä muutosta osoittamaan on kuitenkin indikaattori ja sen antama tieto astian sisäisestä kaasuatmosfääristä ja sen koostumuksesta oli tarpeeksi tarkka takaamaan sen, että astiassa olleet maljat todella olivat anaerobisessa atmosfäärissä.

Edellä mainituista pienistä epävarmuustekijöistä huolimatta tutkimuksen tulosta voidaan pitää erittäin luotettavana, koska otos oli varsin kattava ja mukana olivat kliinisesti tärkeimmät anaerobiset bakteerilajit. Monesta suvusta oli valittuna useampia edustajia ja kasvuvaatimuksiltaan hyvinkin vaativia lajeja. Tämän lisäksi jokaisessa kasvatusastiassa säilyi anaerobinen atmosfääri varsinaisen kasvatuksen aikana, eli astioiden kannet eivät vuotaneet missään vaiheessa. Tutkimuksessa mukana olleilla bakteereilla oli siis hyvät olosuhteet kasvaa tutkimuksen aikana.

5 POHDINTA

Sain tutkimuksestani tuloksia, joita voidaan käyttää HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolla nykyisten työskentelytapojen arviointiin. Se, että bakteriologian osastolla ei tarvitse muuttaa anaerobisten bakteerien viljelyissä käytettyjen maljojen säilytysolosuhteita, tarkoittaa sitä, että osastolla ei tarvitse tehdä taloudellisia panostuksia maljojen säilytyspaikkojen suhteen eikä työntekijöiden tarvitse opetella uusia työskentelytapoja. Työntekijöille on aina miellyttävämpää, jos työskentelytapoja ei tarvitse muuttaa. Taloudellisesti osastolle on hyvä, jos toimintatapoja tutkivissa tutkimuksissa todetaan, että siihen asti käytössä ollut toimintatapa on laadullisesti hyvä. Tällöin osaston johtohenkilöiden ei tarvitse löytää vuosibudjettiin rahaa laiteinvestointeihin, koska sellaiseen ei ole ilmaantunut tarvetta.

Verrattaessa tekemäni tutkimuksen tuloksia aikaisempiin tämän aihealueen tutkimuksiin, voin sanoa, että saamani tulokset eivät eroa aiheesta aikaisemmin tehtyjen tutkimuksien tuloksista. Saamani tulokset ovat samansuuntaiset, eli säilytysolosuhteiden kaasukoostumuksella ei ole niin positiivista kuin negatiivistakaan vaikutusta anaerobisten bakteerien kasvuun niiden kasvatukseen tarkoitettulla elatusainemaljalla. Mahdolliset jatkotutkimukset aiheesta voisivat laajentua säilytyksen pituuden arviointiin sekä säilytyslämpötilojen vaikutuksen arviointiin. On kuitenkin varsin aiheellista miettiä ovatko tämänkaltaiset tutkimukset tarpeen työelämän kannalta. Oman tutkimukseni perusteella voidaan sanoa, että bakteriologian osaston nykyiset työskentelytavat ovat tarpeeksi laadukkaat. Huomioon on otettava myös se, että esimerkiksi säilytyslämpötilojen

vaikutuksista agarmaljojen laatuun on tehty tutkimuksia monien tahojen toimesta, ja niiden tutkimusten perusteella on tehty päätökset siitä, missä lämpötiloissa maljoja säilytetään.

Minulle tutkimuksen tekeminen oli mielenkiintoinen oppimisprojekti. Opin asioita tieteellisen tutkimuksen tekemisestä, teoreettisen taustan tutkimisesta ja rakentamisesta tukemaan käytännön tutkimuksen suoritusta. Tutkimuksen tekemisen aikana tuli selväksi, että vanha sanonta, ”hyvin suunniteltu on puoliksi tehty”, pitää varsin hyvin paikkansa. Hyvä työsuunnitelma ja asioiden etukäteen miettiminen ja niistä keskusteleminen helpottaa käytännön suoritusta hyvin paljon. Järjestelyt työn suoritusta varten on paljon helpompi tehdä, kun tiedetään miten tutkimus on tarkoitus suorittaa. Kaikkea ei voida tarkalleen suunnitella, koska usein tällaisten tutkimusten kohdalla tulee eteen asioita, jotka eivät ole suunnitelmien mukaisia. Työsuunnitelma tehdään esittämään ideaalia tutkimustilannetta ja täten toimii todellisen suorituksen ohjenuorana. Oman tutkimukseni kohdalla ei kuitenkaan ilmaantunut suuria hankaluuksia ja paljon odottamattomia asioita. Sain tehdä tutkimukseni pitkälti alkuperäisen suunnitelmani mukaan. Alkuperäiseen työsuunnitelmaan tuli se muutos, että luovuimme bakteerikasvustojen tarkastelusta 24 tunnin kasvatuksen jälkeen, koska se ei kuulu bakteriologian osaston normaaliin työrutiiniin. Tämä tosin myös poisti tutkimuksesta niin sanotut rinnakkaisnäytteet, mutta koska näyttemateriaali oli muuten laaja, se ei vaikuttanut tutkimuksen tulosten luotettavuuteen.

Työn teoreettiseen taustaan tutustuessa pääsin syventymään yhteen kliinisen mikrobiologian ja bakteriologian osa-alueista. Anaerobisiin bakteereihin ja niiden aiheuttamiin tulehduksiin ei koulun opintojen puitteissa päässyt kovinkaan syvällisesti tutustumaan. Täten opinnäytetyöni teko syvensi ja laajensi bakteriologista tuntemustani ja tietopohjaani. Tutkimuksen teko tuki siis vaihtoehtoisten ammattiopintojeni suorittamista. Työn teko lomittui yhteen vaihtoehtoisiin ammattiopintoihin kuuluvan työharjoittelun kanssa. Harjoittelujaksojen aikana opin perusasioita anaerobisten bakteeriviljelyjen teosta ja siitä, miten niihin liittyvät rutiinit bakteriologian osastolla hoidetaan. Tämä auttoi tutkimukseni käytännön osuuden suorittamista, kun perusasiat anaerobisten bakteeriviljelyiden teosta olivat hallussa. Vaikka viljelytekniikka on varsin helppo oppia, vie kuitenkin hieman aikaa saada se sujumaan miltei rutiininomaisesti. Anaerobisten bakteerien viljelyssä on kuitenkin tärkeää, että viljely sujuu mahdollisimman nopeasti, jotta

bakteerit eivät viljelyvaiheessa kuolisi. Työharjoittelujakson takia sain siis hioa viljelytekniikkaani ennen tutkimukseni suoritusta.

Lopuksi haluan kiittää ohjaajaani Merja Rautiota ohjauksesta, avusta ja neuvoista sekä ohjaavaa laboratoriohoitajaani Heli Nisosta avusta etenkin käytännön työn suorituksen ohjauksessa ja järjestelyssä. Bakteriologian osaston henkilökunta suhtautui tutkimuksen suoritukseen positiivisesti ja kannustavasti, ja vastasivat kysymyksiini kykynsä mukaan.

LÄHTEET

- ATCC 2007: The Global Bioresource Center™. Verkkodokumentti. <<http://www.atcc.org/?siteRedirectOverride=y>> . Luettu 17.9.2007.
- BD 2004: BD GasPak™ EZ Gas Generating Container Systems. Tuoteseloste ja käyttöohje.
- Carlson, Petteri – Koskela, Markku 2003: Bakteriologinen diagnostiikka. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaeheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja II. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 20–35.
- Chapin, Kimberle C. – Lauderdale, Tsai-Ling 2003: Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen, James H. – Pfaller, Michael A. – Tenken, Robert H (edit.): Manual of Clinical Microbiology 8th Edition, Volume 1. Washington D.C.: ASM Press. 354–383.
- Engelkirk, Paul G. – Duben-Engelkirk, Janet 2000: Anaerobes of Clinical Importance. Teoksessa Mahon, Connie R. – Manuselis, George (edit.): Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 565–622.
- Fisher, Randall G. – Denison, Mark R. 1996: *Veillonella parvula* Bacteremia without an Underlying Source. Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1996, Vol. 34, No. 12. 3235–3236.
- Forbes, Betty A. – Sahm, Daniel F. – Weissfeld, Alice S. 1998: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Tenth Edition. St. Louis: Mosby.
- Hanson, Charles W. – Martin, William J. 1976: Evaluation of Enrichment, Storage, and Age of Blood Agar Medium in Relation to Its Ability to Support Growth of Anaerobic Bacteria. Journal of Clinical Microbiology, Nov. 1976, Vol. 4, No. 5. 394–399.
- HUSLAB 2007: Fastidious Anaerobe Agar. Elatusaineosaston työohjeet.
- Jousimies-Somer, Hannele – Carlson, Petteri 2005: Muita anaerobisia grampositiivisia bakteereja. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaeheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1. painoksen muuttamaton jatkopainos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 237–240.
- Jousimies-Somer, Hannele – Ristola, Matti 2005: *Clostridium*-lajit. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaeheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1. painoksen muuttamaton jatkopainos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 228–236.

- Jousimies-Somer, Hannele – Vuento, Risto 2005: *Bacteroides fragilis* ja muita anaerobisia gramnegatiivisia bakteereja. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1. painoksen muuttamaton jatkopainos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 241–246.
- Koneman, Elmer W. – Allen, Stephen D. – Janda, William M. – Schreckenberger, Paul C. – Winn, Jr., Washington C. 1997: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth Edition. Philadelphia – New York: Lippincott.
- Kunkel, Dennis 2007: Dennis Kunkel Microscopy. Verkkodokumentti. Päivitetty 15.9.2007. <<http://www.denniskunkel.com/DK/Bacteria/261287E.html>>. Luettu 8.10.2007.
- Kurkinen, Tuula 2006: Mikro-organismien tutkiminen. Luentomonistheet ja -muistiinpanot. Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia, syksy 2006.
- Lab M 2007: LAB090 – Fastidious Anaerobe Agar (FAA). Verkkodokumentti ja siihen liittyvä PDF-tiedosto. <http://www.labm.com/product_details.htm?product_id=237>. Luettu 21.9.2007.
- Landais, Cécile – Doudier, Barbara – Imbert, Guenièvre – Fenollar, Florence – Brouqui, Philippe 2007: Application of *rrs* Gene Sequencing To Elucidate the Clinical Significance of *Eggerthella lenta* Infection. Journal of Clinical Microbiology, Mar. 2007, Vol. 45, No. 3. 1063–1065.
- Merck 2003: Anaerotest[®] -anaerobi-indikaattorin käyttöohje. Versio 2003-04-30. Merck KGaA.
- Murray, Patrick R. 1978: Growth of Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria on Agar Media: Effects of Media Composition, Storage Conditions, and Reduction Under Anaerobic Conditions. Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1978, Vol. 8, No. 6. 708–714.
- Mäkisalo, Heikki 2007: Anaerobi-infektiot kirurgin näkövinkkelistä. Luento. Laboratoriolääketiede ja näyttely 2007. Helsinki. 4.10.2007.
- Rautio, Merja 2007a. Mikrobiologi. HUSLAB, mikrobiologian laboratorio, bakteriologian osasto. Helsinki. Sähköpostiviesti Laura Ahoselle 9.5.2007.
- Rautio, Merja 2007b. Mikrobiologi. HUSLAB, mikrobiologian laboratorio, bakteriologian osasto. Helsinki. Suullinen tiedonanto Laura Ahoselle syyskuu 2007.
- Summanen, P.H. – McTeague, M. – Väisänen, M-L. – Strong, C.A. – Finegold, S.M. 1999: Comparison of Recovery of Anaerobic Bacteria Using the **Anoxomat**[®], Anaerobic Chamber, and GasPak[®] Jar Systems. Anaerobe February 1999. 5–9.

- Vaara, Martti – Skurnik, Mikael – Sarvas, Matti 2005: Bakterisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vahti, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1. painoksen muuttamaton jatkopainos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 51–75.
- Wren, Mike 2007: The fusobacteria: underrated anaerobic pathogens. *The Biomedical Scientist* May 2007. 365–367.

KUVALÄHTEET

- Ahonen, Laura 2007: Opinnäytetyön tekijän itse ottamat valokuvat opinnäytetyöprosessista.
- Brooks, Peter 2007: Tätä opinnäytetyötä varten tehty piirros, perustuen Laura Ahosen luonnokseen.