

Janika Holmsten

House-bakteerien tutkiminen ja tunnistus MALDI-TOF MS -tekniikalla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

12.12.2016

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Janika Holmsten House-bakteerien tutkiminen ja tunnistus MALDI-TOF MS - tekniikalla 23 sivua + 6 liitettä 7.12.2016
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Laatupäällikkö Elina Kuula Tutkintovastaava Jarmo Palm
<p>House-bakteerilla tarkoitetaan sellaista mikro-organismia, joka on kehittynyt sietämään tehdasolosuhteita. Kyseinen mikrobi on kehittänyt selviytymisstrategioita, joita se käyttää apunaan selviytyäkseen eri stressitekijöistä, kuten laitteiden desinfioinneista ja puhdistuksista. Strategioihin voivat kuulua esimerkiksi korkeampi lämmönsietokyky, korkeampi suola- tai klooripitoisuuden sietokyky sekä kyky suojautua UV-säteilyltä.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, löytyykö suomalaisesta kosmetiikkatehtaasta mahdollisesti house-bakteereja. Bakteereja kerättiin tehtaan sisätilojen ilmasta laskeumamaljoille kuutena eri tutkimuskertana ja bakteerit tunnistettiin MALDI-TOF-massaspektrometrillä. Tavoitteena oli löytää sellaiset bakteerit, jotka ovat sopeutuneet tehtaan olosuhteisiin, ja ryhtyä jatkotoimenpiteisiin.</p> <p>Opinnäytetyössä käytiin läpi mikrobien yleisimpiä selviytymisstrategioita, kuten pigmenttien tai lämpöshokkiproteiinien käyttöä. Lisäksi tutustuttiin kolmeen kosmetiikkateollisuudelle vaarallisimpaan mikrobiin ja niiden käyttämiin strategioihin. Työssä käsitellään myös lyhyesti yleistyvää MALDI-TOF MS–tekniikkaa sekä bakteerien tunnistamiseen käytettyä SARAMIS™-tietokantaa.</p> <p>Opinnäytetyötutkimuksessa ei löydetty house-bakteereja. Kosmetiikkayritys käyttää opinnäytetyössä kerättyä informaatiota jatkossa tuotekehityksessään.</p>	
Avainsanat	MALDI-TOF MS, SARAMIS™, VITEK® MS

Author(s) Title Number of Pages Date	Janika Holmsten Research and identification of house organisms with MALDI – TOF MS technique 23 pages + 6 appendices 7 December 2016
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	
Instructor(s)	Elina Kuula, Quality Manager Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>A house bacterium is a microorganism that has developed to tolerate conditions in a manufacturing plant. It has developed survival strategies which it uses to survive an area of different stress factors, such as sanitizing or cleaning. These strategies may include increased heat tolerance, higher saline or chlorine concentration tolerance or resistance to UV radiation.</p> <p>The purpose of this study was to research if there are any house organisms in a Finnish cosmetics manufacturing plant. Samples of bacteria were collected from the indoor air using petri dishes with nutrient agar. These samples were gathered in a total of six days of research and the found bacteria were identified using MALDI – TOF – mass spectrometry. The goal was to find any bacteria that had adapted to the living conditions of the plant and possibly take further action.</p> <p>The thesis researches the most common survival strategies of microbes, such as pigments and heat shock proteins. It also examines three of the most dangerous microbes in cosmetics industry and the strategies these microbes use to survive. This thesis also briefly covers the increasingly popular MALDI – TOF MS technology and the SARAMIS™ database that is used to identify unknown microorganisms.</p> <p>No house organisms were found during this study. The cosmetics manufacturer will use the information provided in this thesis in their product development.</p>	
Keywords	MALDI-TOF MS, SARAMIS™, VITEK® MS

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	House-organismit	1
2.1	Bakteerien selviytymisstrategiat	2
2.1.1	Solunulkoiset polymeerirakenteet	2
2.1.2	Pigmentit	3
2.1.3	Sideroforit – raudansitojat	4
2.1.4	Lämpöshokkiproteiinit (HSP)	4
2.2	Testimenetelmät voivat vaikuttaa house-organismien kehitykseen	6
3	Vaarallisimmat mikrobit kosmetiikassa	7
3.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.3	<i>Candida albicans</i>	10
4	MALDI-TOF MS	11
4.1	Yleistä	11
4.2	Menetelmä	13
5	Työn suoritus ja tulokset	16
6	Tulosten käsittely ja tulkinta	18
7	Loppupäätelmät	23
	Lähteet	24

Liitteet

- Liite 1. Tutkimustulokset, päivä 1
- Liite 2. Tutkimustulokset, päivä 2
- Liite 3. Tutkimustulokset, päivä 3
- Liite 4. Tutkimustulokset, päivä 4
- Liite 5. Tutkimustulokset, päivä 5
- Liite 6: Lethen – agar - maljojen resepti

Lyhenteet

MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
VITEK® MS	bioMérieuxin valmistama MALDI-TOF –laite
HSP	Heat Shock Protein, lämpöshokkiproteiini
ESP	Extracellular Polymer, solunulkoinen polymeeri
CHCA	kanelihappo
SARAMIS™	Spectral Archive and Microbial Identification System - tietokanta
IVD	In Vitro Diagnostics - tietokanta
THG –agar	tryptofaani – hiiva – glukoosi -kasvatusalusta

1 Johdanto

House-bakteerilla tarkoitetaan sellaista mikro-organismia, joka on kehittynyt sietämään tehdasolosuhteita. Kyseinen mikrobi on kehittänyt selviytymisstrategioita, joita se käyttää apunaan selviytyäkseen eri stressitekijöistä, kuten laitteiden desinfioinneista ja puhdistuksista. Strategioihin voivat kuulua esimerkiksi korkeampi lämmönsietokyky, korkeampi suola- tai klooripitoisuuden sietokyky sekä kyky suojautua UV-säteilyltä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, löytyykö suomalaisesta kosmetiikkatehtaasta mahdollisesti house-bakteereja. Bakteereja kerättiin tehtaassa sisätilojen ilmasta laskeumamaljoille kuutena eri tutkimuskertana ja bakteerit tunnistettiin MALDI-TOF - massaspektrometrillä. Tavoitteena oli löytää sellaiset bakteerit, jotka ovat sopeutuneet tehtaassa olosuhteisiin ja ryhtyä jatkotoimenpiteisiin.

Opinnäytetyössä käytiin läpi mikrobien yleisimpiä selviytymisstrategioita, kuten pigmenttien tai lämpöshokkiproteiinien käyttöä. Lisäksi tutustuttiin kolmeen kosmetiikkateollisuudelle vaarallisimpaan mikrobiin ja niiden käyttämiin strategioihin. Työssä käsitellään myös jatkuvasti yleistyvää MALDI-TOF MS-tekniikkaa sekä bakteerien tunnistamiseen käytettyä SARAMIS™-tietokantaa.

2 House-organismit

Laadunvalvonnassa saatetaan löytää samaa mikrobia rutiinitarkastusten yhteydessä useita kertoja kuukausien ja vuosien aikana. Usein syynä on huolimattomuus kriittisissä tuotteen valmistusvaiheissa. Mikrobien löytyminen tuotemassoista tai valmiista tuotteista viittaa kontaminoituneisiin raaka-aineisiin tai tehdasolosuhteisiin tottuneihin mikrobeihin, house-organismeihin.

Kosmetiikassa käytetään raaka-aineina paljon epäorgaanisia ja orgaanisia yhdisteitä, joita mikrobit voivat käyttää energianlähteenään silloin kun vettä on saatavilla. Mikrobien esiintyvyyteen vaikuttavat veden saanti, pH, tuotejäät, siivoukseen ja sanitointiin käytettävien pesuaineiden jäät sekä lämpötila. Mahdollisia bakteerilähteitä ovat vesi, raaka-aineet, ilmanvaihto, hyönteiset ja jyrsijät kuten rotat sekä työntekijät, jotka käsittelevät puolivalmiita tuotteita. (1, s. 185.)

2.1 Bakterien selviytymisstrategiat

Bakterien selviytymisstrategiat ovat sellaisia morfologisia tekijöitä ja fysiologisia prosesseja, jotka auttavat bakteeria selviytymään sitä stressaavissa olosuhteissa. Ne nostavat mikrobin vastustuskykyä muun muassa ultraviolettisäteilylle, kloori- ja vetyperoksidipitoisille pesuaineille, ei-tappavalle lämmölle ja ravinnepöyhyydelle. Näihin strategiioihin kuuluvat eksopolysakkaridikapselit, pigmentit, stressiproteiinit kuten lämpöshokkiproteiinit ja sideroforit sekä membraaniproteiinien modifikaatiot. (1, s. 186-187.)

Usein mikrobin metabolia vahingoittuu stressaavissa olosuhteissa, kuten lyhyessä altistuksessa korkealle paineelle tai lämpötilalle tuotteiden valmistuksen yhteydessä. Suurin osa bakteereista ei kestä stressiä ja kuolee altistuksen aikana tai sen jälkeen. Joskus bakteeri selviää, mutta sen metabolia vahingoittuu stressin johdosta. Tällöin bakterien kasvuvaihe pitenee ja bakteerit eivät kestä sekundaarisia stressinaiheuttajia. Laadunvalvonnassa käytettävät testimenetelmät varmistavat, että myös vahingoittuneet bakteerit elpyvät ja ne löydetään rutiinitarkastuksissa. (1, s. 186-187.)

Joskus bakteerit selviävät tarkastuksista huomaamatta. Tällöin ne elpyvät myöhemmin ja kontaminoivat tuotteen. Tämä tunnetaan nimellä Phoenix-ilmiö. (1, s. 186-187.)

2.1.1 Solunulkoiset polymeerirakenteet

Normaalin kasvun aikana bakteerit tuottavat solunulkoisia polymeereja (extracellular polymers, EPS), kuten dekstraania, hyaluronihappoa ja kompleksisia polysakkarideja. Solunulkoisten polymeerien tuotto riippuu kasvatusalustan rautapitoisuudesta. Raudan puute ja pinta-aktiivisten aineiden läsnäolo vaikuttavat EPS:ien tuotantoon. Esimerkiksi *Pseudomonas*-suvun bakteerit erittävät alginaatti-nimistä polymeeria. (1, s. 187-188.)

EPS:t edesauttavat bakterien adheesiota pintoihin. Alginaattikuidut auttavat muodostamaan biofilmejä, jotka suojaavat solua ulkoisilta riskitekijöiltä, kuten pinta-aktiivisilta aineilta tai antibiooteilta. Biofilmejä muodostaneita bakteereita on erittäin vaikea tuhota. Alginaatti muodostaa bakterin ympärille geelimatriksin, joka estää vettä haihtumasta, edesauttaen bakterin selviämistä kuivissa oloissa. Lisäksi EPS:t toimivat ravinne-

varastoina ja niiden avulla bakteerit voivat kasvaa ravinnepöyhissä oloissa. (1, s. 187-188.)

2.1.2 Pigmentit

Bakteereja on tunnistettu niiden erittämien pigmenttien avulla jo vuosikymmeniä, mutta niiden bakteeria suojaavia ominaisuuksia on alettu tutkia vasta äskettäin. Pigmenttien uskotaan suojaavan solua tukahduttamalla yksiatomista happea ja estäen vapaita radikaaleja. Esimerkiksi *Staphylococcus aureuksen* ja *Serratia marcescensin* pesäkkeiden väri johtuu karotenoidista ja *Micrococcus*-, *Vibrio*- ja *Bacillus*- sukujen edustajat tuottavat melaniinia. (1, s. 188–189.)

Pigmentit, kuten edellä mainitut karotenoidit, ovat eräänlaisia antioksidantteja. Happiradikaalit voivat hapettaa solukalvon lipidejä, joka aiheuttaa ketjureaktion ja vakavaa vahinkoa solulle. Tämä altistaa solun muille vaaroille ja taudinaiheuttajille. Yksiatomista happea syntyy esimerkiksi fagosytoosissa, UVA–altistuksessa ja lipidi hydroperoksidien bimolekulaarisessa hajoamisessa. Yksiatominen happi ei kuitenkaan ole happiradikaali, mutta sen reaktiot yhdessä aromaattisten kaksoissidosten kanssa muodostavat hydroperoksideja ja endoperoksideja, jotka hapettavat lipidejä. (30)

Hitaasti kasvavat, pigmenttiä erittävät bakteerit selviävät muita helpommin klooratusta vedestä. Reaktiivisia happiradikaaleja syntyy myös kloorauksen yhteydessä. Melaniini suojaa ympäristön muilta uhilta, kuten UV-säteilyltä, aivan niin kuin ihmisilläkin. (1, s. 188–189.)

Usein pesäkkeiden pigmentoituminen huomataan, kun bakteeria on kasvatettu tavallista kauemmin. Pidempi inkubaatioaika luo usein stressaavat olosuhteet, kuten pH:n muutoksen tai ravinteiden loppumisen. Tällöin bakteeri alkaa tuottaa pigmenttejä, jotka suojaavat sitä muutoksilta. Tämä on tärkeä tietää tehdasolosuhteissa, sillä pigmenttiä erittävien bakteerien löytäminen voi viitata siihen, että ne ovat sopeutuneet tehdasolosuhteisiin ja muuttuneet vastustuskykyisiksi puhdistus- tai säilöntäaineille. (1, s. 188–189.)

2.1.3 Sideroforit – raudansitojat

Rauta on tärkeä osa bakteerien metaboliaa. Se toimii osana elektroninkuljettajaproteiineja sekä entsyymien kofaktoreina. Luonnossa rautaa on kuitenkin hyvin vähän saatavilla: sillä on alhainen liukenevuus neutraalissa ja emäksisessä pH:ssa. Vähärautaisissa oloissa bakteeri tuottaa sideroforeja eli raudan sitoja ja raudan säätelemiä solukalvoproteiineja, jotka kuljettavat siderofori-rautakompleksin solun sisään. Sideroforien pienestä koosta (500–1000 D) johtuen ne läpäisevät helposti suodattimia ja niiden stabiilius auttaa niitä sietämään lämpöä, joka saattaa vahingoittaa kosmetiikan raaka-aineita ja lopullisia tuotteita sekä itse bakteeria. Sideroforit saattavat jäädä tuotteeseen lämpökäsittelyn jälkeen, jolloin tuotteeseen jälkeensä joutuneet bakteerit voivat käyttää niitä omassa metaboliassaan. (1, s. 189.)

Pseudomonas-suvun bakteerit tuottavat kahta pigmenttiä, pyochelinia ja pyoverdiniä, jotka muuttavat kasvatusalustan väriä bakteerin kasvun aikana: pyochelin sitoo raudan ja tuottaa (pH:sta riippuen) viininpunaisen kromoforin, kun taas pyoverdin värjää agarin fluoresoivan kelta-vihreäksi *P. aeruginosalle* tyypillisesti. Jotkin *P. aeruginosa*- ja *B. cepacia* – lajikkeet, jotka eivät itse tuota pyochelinia, voivat käyttää muiden lajien tuottamia sideroforeja hyväksi omassa metaboliassaan. (1, s. 189.)

Vettä sisältävät kosmetiikan reseptit eivät yleensä sisällä raudan suoloja, sillä rauta voi toimia tehokkaana hapettimena ja käynnistää vapaiden radikaalien reaktioita. Näiden reaktioiden seurauksena tuotteen väri ja tuoksu voivat muuttua. Tuotteisiin lisätyt kela-toivat aineet eristävät raudan ja muiden raskasmetallien ionit, jotta ne eivät voi toimia tehokkaina hapettimina. (1, s. 189.)

2.1.4 Lämpöshokkiproteiinit (HSP)

Lämpöshokkiproteiineiksi (heat shock proteins) kutsutaan proteiineja, joita bakteeri tuottaa stressin vaikutuksesta. Lämpöshokkiproteiinien kiihtynyt synteesi alkaa yleensä muutamien minuuttien kuluttua stressin laukaisemisesta. Niihin lukeutuvat oksidatiiviseen stressiin tarkoitetut proteiinit kuten katalaasi ja peroksidaasi sekä proteiinien synteesiin, kuljetukseen ja laskostumiseen liittyvät proteiinit.

Stressin alla tuotetut proteiinit toimivat samalla tavalla kuin stressin ulkopuolella. Ne saattavat vähentyä merkittävästi stressitekijöiden ilmetessä, jolloin niiden synteesi kiih-

tyy ja konsentraatio kasvaa. Erilaisia stressitekijöitä mikroympäristöissä aiheuttavat muun muassa orgaaniset liuottimet, äärimmäiset lämpötilat ja paineet, hapettimet, halidit, alhainen veden aktiivisuus, äärimmäiset pH-arvot sekä epätavalliset pinta-aktiiviset aineet ja ravinteet. Osa edellä mainituista stressitekijöistä saattaa esiintyä kosmetiikka-tehtaissa, aiheuttaen lisääntyneen lämpöshokkiproteiinien tuoton. Proteiinit suojaavat bakteereita, joita voi esiintyä valmistusvälineisiin jääneissä tuotejäämissä, seisovassa vedessä tuotantotiloissa, mahdollisissa pesuainejäämissä tai itse tuotantovälineissä, kuten pumpuissa, letkuissa tai venttiileissä. (1, s. 190–191.)

UV-säteily voi oikeissa olosuhteissa (veden ja orgaanisten yhdisteiden läsnäolo) luoda aktiivisia happiradikaaleja, kuten H_2O_2 , hydroksyyli-radikaaleja OH^\cdot sekä superoksidgeja O_2^\cdot . Nämä radikaalit aiheuttavat oksidatiivisen stressin, joka johtuu hapettimien liiasta saatavuudesta solun sisällä. Kun oksidatiivinen stressi ylittää bakteerin sietokyvyn solun DNA, RNA, proteiinit ja lipidit voivat vahingoittua. Reaktiona oksidatiiviseen stressiin solu alkaa tuottaa lämpöshokkiproteiineja, jotka auttavat solua kestämään stressiä lisäämällä DNA:n korjausta. (1, s. 190–191.)

Tehdasoloissa lämpöshokkiproteiineja tuottavat bakteerit voivat kehittyä vastustamaan paremmin hapettimia ja siten myös UV-säteilyä. Bakteerit usein käyttävät samankaltaisia mekanismeja stressin sietämisessä, joten altistuminen yhdelle tekijälle voi luoda vastustuskyvyn toiselle. (1, s. 190–191.)

Siivous- ja sanitointiprosessit, jotka käyttävät höyryä ja kuumuutta desinfioimiseen, voivat myös tuottaa lämpöshokkiproteiineja niissä mikro-organismeissa, jotka selviävät kuumakäsittelystä. Lämmön on vaikea kulkeutua tiivisteiden, viskoosisten tuotejäämien ja mahdollisten biofilmien läpi ja tunkeutua niiden sisälle. Ei-tappava lämpötila voi tappaa osan soluista, mutta jäljelle jäävät alkavat tuottaa stressireaktiona lämpöshokkiproteiineja. Sama ilmiö toistuu desinfioivien aineiden kohdalla, ja stressistä selviytyneet bakteerit voi olla vaikeampaa tappaa niille kehittyvän vastustuskyvyn vuoksi. (1, s. 190–191.)

2.2 Testimenetelmät voivat vaikuttaa house-organismien kehitykseen

Tehtaat tekevät jatkuvasti rutiinitestauksia raaka-aineille ja tuotteille. Näitä testejä tehdessä tulee varmistaa, että käytetyt menetelmät eivät omalta osaltaan salli house-organismien kehittymistä.

Säilöntäaineiden tehokkuustesteillä etsitään sopiva ja konsentraatioltaan oikea säilöntäaine tuotteelle. Säilöntäaine hyväksytään, jos se täyttää sille asetetut kriteerit. Tuote voi kontaminoitua, jos säilöntäainetta on liian vähän tai se on väärä. Tuotteelle epäso- piva säilöntäaine voi edesauttaa house-organismien kehittymistä.

Valmiiden tuotteiden testimenetelmien tulee varmistaa, että mahdolliset terveydelle vaaralliset ja tuotteen pilaavat organismit huomataan testausvaiheessa. Ongelmia syn- tyy silloin, kun organismi on kehittänyt suojakseen vastustuskyvyn esimerkiksi kuu- muudelle, puhdistusaineille tai jopa säilöntäainesysteemille.

Mikrobiologisessa testauksessa käytetään elvytysjärjestelmää, johon sisältyvät joko diluentti ja agar tai diluentti ja kasvatusliuos. Elvytysjärjestelmän tulee inaktivoida tuot- teeseen lisätyt säilöntäaineet, jotta tuotteen mahdollisesti kontaminoineet bakteerit saadaan kasvamaan. Myös tuotteen valmistusvaiheessa mahdollisesti vahingoittuneet bakteerit halutaan elvyttää. Inkubaatiolämpötilan tulee olla tarpeeksi alhainen, jotta lämmön aiheuttama stressi ei johda pidentyneeseen kasvuvaiheeseen tai estä vahin- goittuneiden organismien kasvua. Valmistajan tulee validoida käyttämänsä elvytysjär- jestelmä ja osoittaa, että järjestelmä estää säilöntäaineiden toiminnan ja sallii bakteeri- en kasvun.

Tuotteista löytyville bakteereille on asetettu sallitut rajat: <1000 cfu/g ja silmätuotteissa < 100 cfu/g. Mikäli kontaminaatiota on kuitenkin tapahtunut ja otetussa näytteessä kas- vaa bakteereja, laadunvalvonta ottaa uusintanäytteen ja varmistaa, että tuote on puh- das.

Puhdistus- ja desinfektioaineille, UV-säteilylle, antibiooteille ja säilöntäaineille vastustuskykyisiä bakteereja kutsutaan superbakteereiksi. Superbakteerien syntyyn vaikuttavat seuraavat tekijät:

- ei-tappava annos desinfioivia aineita: alhainen konsentraatio tai liian lyhyt vaikutusaika,
- liian lyhyt UV-altistus,
- ei-tappava annos puhdistus- tai säilöntäaineita, joiden jäämiä löytyy mahdollisesti huonosti puhdistetuista letkuista, säiliöistä ja muista työvälineistä, joihin on jäänyt vettä.

Tehtaan tulee validoida puhdistusprosessit ja niissä käytettävät puhdistusaineet ja todeta niiden toimivuus. Puhdistusprosessien etenemistä tulee seurata ja ne tulee ehdottomasti suorittaa asianmukaisesti. (1, s. 194–198.)

3 Vaarallisimmat mikrobit kosmetiikassa

Tässä luvussa perehdytään kolmeen tutkituimpaan ja vaarallimpaan kosmetiikalle tärkeään mikrobiin. Mikrobit ovat morfologisilta ja fysiologisilta ominaisuuksiltaan helposti ympäristöönsä sopeutuvia, joten niihin tulee kiinnittää erityishuomiota kosmetiikkatuotteita suunniteltaessa. Niitä myös käytetään tuotteiden suunnitteluvaiheessa säilöntäaineiden tehokkuuden testaamiseen.

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas-suvun bakteerit ovat gramnegatiivisia, liikkuvia, aerobisia sauvoja, jotka kuuluvat gammaproteobakteerien lahkoon. *Pseudomonas* esiintyy maaperässä ja vedessä sekä kasvien pinnoilla, *P. aeruginosa* löytyy pieniä määriä myös ihmisen suolistosta ja iholta. *P. aeruginosa* on usein harmiton, mutta voi aiheuttaa hengenvaarallisia infektioita varsinkin ihmisillä, joilla on syystä tai toisesta alhainen vastustuskyky. Vaikka bakteeri ei pääse infektoimaan tervettä kudosta, voi se infektoida ihan minkä tahansa kudoksen niiden vahingoittuessa. Tyypillisimpiä *P. aeruginosan* aiheuttamia

infektioita ovat virtsa- ja hengitystieinfektiot, pehmytkudosinfektiot sekä luu- ja niveltulehdukset.

P. aeruginosa on useita piirteitä, jotka aiheuttavat sen patogeenisyyden. Se kasvaa hyvin vaatimattomissa oloissa ja tunnetaan bakteerina, joka kasvaa myös tislatussa vedessä. Yksinkertaisimmissa kasvatusalustoissa on hiilenlähteenä asetaattia ja typpilähteenä ammoniumsulfaattia. Se voi myös käyttää yli 75 orgaanista yhdistettä ravinnolähteenään. Bakteerin optimaalisin kasvulämpötila on 37 °C, mutta se voi kasvaa jopa 42 °C:ssa. Se sietää äärimmäisiä olosuhteita, kuten korkeaa lämpötilaa, korkeaa suolapitoisuutta ja useita antibiootteja.

P. aeruginosa on kolme eri tunnistettavaa pesäketyyppiä: Luonnosta eristettyjen bakteerien pesäkkeet ovat pieniä ja röpelöisiä; suuret, sileät, reunoilta litteät ja keskeltä kohonneet pesäkkeet; hengitys- ja virtsatieinfektioista eristetyt bakteerit ovat limaisia, joka viittaa alginaatin muodostumiseen.

P. aeruginosa tuottaa kahta eri pigmenttiä: fluoresoivaa pyoverdiniä ja sinistä pyocyaninia. Pyocyaninia se tuottaa alustalla, joka sisältää vähän rautaa ja pigmentillä onkin olennainen osa bakteerin metaboliassa. Sen antibioottiresistenttiys johtuu suurilta osin sen gramnegatiivisesta soluseinästä sekä sen kyvystä muodostaa suojaavia biofilmejä. *P. aeruginosa* jakaa elinympäristönsä maaperässä aktinomykeettien, sienten ja muiden bakteerien kanssa. Niiden tuottamat luontaiset antibiootit ovat auttaneet *Pseudomonas aeruginosa* kehittämään omaa vastustuskykyään. Vain muutama antibiootti tappaa voi bakteerin, mutta jotkut kannat ovat resistenttejä myös niille. (2)

Edellä mainitut selviytymisstrategiat muuttuvat virulenssitekijöiksi bakteerin aiheuttaessa infektion. *P. aeruginosan* virulenssitekijöihin kuuluvat lipopolysakkaridit, flagellat, proteolyttiset entsyymit, toksiinit, joilla on alhainen molekyylipaino, aktiiviset effluksipumput, biofilmit, sekä tehokas solunulkoinen viestintä. Useat näistä tekijöistä tekevät *Pseudomonaksista* vaikeasti hoidettavia mutta myös haastavia tuhota, jos ne ovat asettuneet taloksi tehdasolosuhteisiin. (1, s. 265 – 281.)

3.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus kuuluu usein muun stafylokokki-lajin kanssa ihon normaalimikrobistoon. Sitä löytyy pääasiassa nenän limakalvoilta, mutta myös iholta, suun limakalvoilta ja ruoansulatusjärjestelmästä. Stafylokokit ovat grampositiivisia, halkaisijaltaan 1 µm:n kokoisia pyöreitä soluja. *S. aureus* on fakultatiivisesti anaerobinen, ja se tuottaa hapettomissa olosuhteissa maitohappoa. Se on katalaasiposiitivinen ja oksidaasinegatiivinen. *S. aureus* kasvaa suurina, keltaisina pesäkkeinä ravinnerikkaalla kasvualustalla; väri johtuu karotenoidipigmentistä. *S. aureus* on sopeutunut hyvin äärimmäisiin olosuhteisiin; se kasvaa 15 - 45 °C:ssa ja jopa 15-prosenttisessä NaCl-liuoksessa.

Staphylococcus aureus on ainoa stafylokokki-laji, joka tuottaa koagulaasientsyymiä. Kaikki *S. aureus* -kannat eivät kuitenkaan tuota entsyymiä. Koagulaasi on suuressa roolissa bakteerin selviytymisessä sen infektoidessa isäntäkudoksen, ja sitä käytetään yleisesti *S. aureuksen* tunnistamisessa.

S. aureus aiheuttaa useita eri infektioita, joihin kuuluvat muun muassa aivokalvontulehdus, keuhkokuume, limaa tai mätää muodostavat infektiot, virtsatieinfektiot. Ruokamyrkytystapauksissa bakteeri vapauttaa toksineja, toksisessa shokkioireyhtymässä superantigenejä. Sairaalaolosuhteissa bakteeri infektoi leikkaushaavoja ja saattaa päästä infektoimaan kudoksia myös kehon sisään asennettavien laitteiden, kuten tekonivelien, kautta. (3)

MRSA eli metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* on edelleen ongelma sairaalaympäristössä. Se aiheuttaa samanlaisia oireita ja infektioita kuin *S. aureus*, mutta siihen eivät tehoa muiden stafylokokkien hoitoon käytettävät penisilliinin sukuiset antibiootit. MRSA leviää huonon käsihygienian seurauksena hoitohenkilökunnasta potilaaseen tai potilaan koskiessa saastunutta pintaa. Huolellisten torjuntatoimien vuoksi MRSA ei ole Suomessa levinnyt yhtä laajalle kuin Keski-Euroopassa, jossa 25 - 50 % stafylokokki-infektioista on MRSA:n aiheuttamia. Suomessa ja muissa Pohjoismaissa luku on 2 - 5 %. MRSA:iin tehoavat useat bakteerit ja se infektoi ihmisen usein vain muutamaksi tunniksi tai päiväksi. Antibioottiresistenttensä vuoksi se on kuitenkin äärimmäisen vaarallinen infektoidessaan sairaalapotilaat tai potilaat, joilla on heikentynyt immuunipuolustus. (3, 4)

S. aureusella on useita eri virulenssitekijöitä, jotka yhdessä toimiessaan aiheuttavat infektioita. Näihin lukeutuvat esimerkiksi

- solukalvoproteiinit, jotka edesauttavat kolonisaatiota isäntäkudokseen
- leviämistä edistävät entsyymit, esimerkiksi kinaasi
- solukalvon ominaisuudet, jotka ehkäisevät fagosyyttien tuhoavaksi joutumisen
- biokemialliset ominaisuudet, jotka auttavat bakteeria selviytymään, mikäli se joutuu fagosyytin syötäväksi: katalaasi ja karotenoidit
- isäntäkudoksen solukalvoa vahingoittavat toksiinit, jotka tuhoavat eukaryoottisolujuen solukalvon: hemolysiinit, leukotoksiinit
- antibioottiresistenttiys, jonka bakteeri on joko saanut toiselta bakteerilta konjugation myötä tai mutaation kautta
- eksotoksiinit, jotka vahingoittavat isäntäkudosta tai muuten aiheuttavat taudin oireita. (3)

3.3 *Candida albicans*

Candida albicans:n ei lueta kuuluvan ihon normaaliflooraan, vaikka sitä löytyy 40 %:lla terveistä aikuisista. (6) Se on dimorfinen sieni, eli sitä esiintyy sekä yksisoluisena että rihmaisena solukkona.

C. albicans ei normaalisti aiheuta infektioita, mutta voi oikeissa olosuhteissa ylikasvaa ja aiheuttaa hiivainfektion. Usein näissä tapauksissa kehon immuunipuolustus on häiriintynyt esimerkiksi antibioottikuurin, muun lääkityksen, säteilyn tai immuunipuolustusta heikentävien sairauksien vuoksi. Tyypillisempiä *C. albicansin* aiheuttamia infektioita ovat suun ja emättimen hiivatulehdukset, kynsivallin tulehdus ja tulehdukset ihon kosteissa taiteissa.

C. albicansin soluseinä koostuu useista polysakkarideista, kuten kitiinistä ja mannaanista. Soluseinän koostumus tekee siitä hydrofobisen. Hiiva voi muuttaa soluseinän hydrofobisuuden hydrofiiliseksi 30 minuutissa olosuhteiden sitä vaatiessa. Esimerkiksi vaginan epiteelisoluihin kiinnittyvät *C. albicans* -solujen ituputket ovat hydrofobisempia kuin hiivasolut ja ne kiinnittyvät paremmin kudokseen. Solujen kiinnittymistä eri kudoksiin säätelevät myös siihen erikoistuneet reseptorit.

Candida albicans kykenee infektoimaan minkä tahansa kudoksen ja pystyy olosuhteista riippuen muuttamaan fenotyyppiään. Muutos fenotyypissä ilmenee infektiolueella ja samalla alueella voi esiintyä monta eri fenotyyppiä. Kyvyn muuttaa fenotyyppiä uskotaan vaikuttavan hiivan patogeenisyyteen ja virulenssiin.

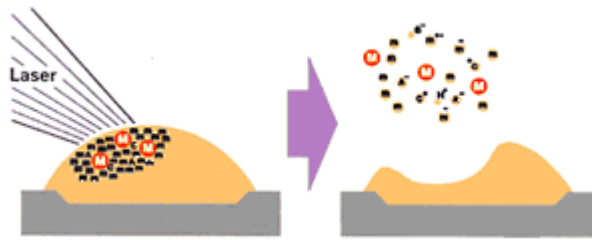
Opportunistisesta patogeenisyydestään huolimatta *C. albicans* voi olla hengenvaarallinen. Erityisesti palovammapotilaat ovat herkkiä useille samanaikaisille eri *Candidojen* aiheuttamille infektioille. (5)

4 MALDI-TOF MS

4.1 Yleistä

MALDI-TOF-massaspektrometrillä tarkoitetaan matriksiavustettua laserdesorptio/ionisaatio-lentoaika – massaspektrometriä. Yksinkertainen, tarkka ja nopeita tuloksia antava tekniikka on yleistynyt nopeasti. Se on korvannut bakteerien aikaavieviä, monimutkaisia metaboliatestejä, sillä MALDI-TOF:lla tuloksia saadaan jopa minuuteissa. Usein MALDI on yhdistetty lentoaika-massaspektrometriin, koska sen massa-alue on hyvin laaja (1–500 kDa).

MALDI-TOF MS -tekniikassa hyvin pieni määrä mikrobimassaa siirrostetaan näytelevylle ja sen päälle pipetoidaan 1 µl matriisia. Matriisi absorboi massaspektrometrin ultravioletin, jonka aallonpituus on 337 nm, ja muuttaa sen lämpöenergiaksi. Pieni osa matriisista kuumenee muutamassa nanosekunnissa ja höyrystyy, mukanaan osa näytteestä.



Kuva 1: Näytteen ionisointi massaspektrometrin sisällä (Lähde: shimadzu.com. 14.11.2016. Muokattu.)

Kuvassa 1 on esitetty vasemmalla matriisiin sekoitettu näyte, jota pommitetaan laserilla. Oikealla näyte on höyrystynyt tyhjiöön, ja siinä on sekaisin matriisia ja näytettä sekä eri kationeja ja anioneja. Kuten kuvasta 1 näkyy, vain pieni osa näytteestä irtoaa ja päätyy detektorille.

Lentoaikamassaspektrometria (TOF) perustuu siihen, että erikokoiset molekyylit liikkuvat eri nopeuksilla. Molekyylit kiihdytetään vakiojännitteellä niin, että niillä on sama energiapotentiaali. Positiivisesti varautuneet ionit sinkoavat tyhjiössä m/z -arvonsa mukaisesti, jolloin pienemmät molekyylit saapuvat ensimmäisinä detektorille. Massaspektrometri muodostaa spektrin niistä ajoista, jotka molekyyleiltä kestää saapua detektorille ja vertaa saatua spektriä tietokannan spektreihin. (7; 8; 9.)

Kuvassa 2 on esitetty työssä käytetty, bioMérieuxin valmistama VITEK MS® -laite.



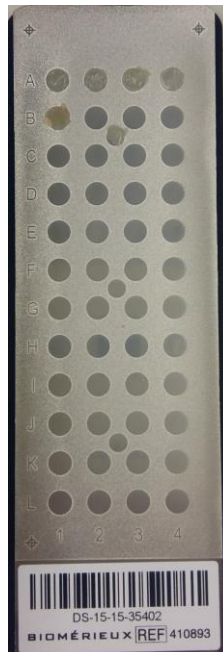
Kuva 2: Biomérieuxin VITEK® MS –laite.

4.2 Menetelmä

MALDI-TOF–massaspektrometrianalyysissä käytetään puhdasta, tuoretta mikrobikasvustoa. Mikäli kasvuston puhtaus on epävarmaa, on tehtävä erotusviljely, josta tehdään jatkoviljelynä puhdasviljelmä. Kahta tai useampaa bakteeria sisältävä näyte antaa ristiiriitaisen spektrin ja epäluotettavan tuloksen. Kasvuston on myös oltava tuore; suositeltava ikä bakteerien osalta on 24 tuntia. Parhaan tuloksen saamiseksi olisi myös hyvä käyttää laitevalmistajan suosimia kasvualustoja.

Bakteerimassaa siirrostetaan näytelevylle näytetäplään 1 µl:n siirrostussilmukalla. Mikäli bakteerimassaa on liikaa tai liian vähän, laite ei saa tarpeeksi hyvää spektriä ja

tunnistus epäonnistuu. Näytteen päälle pipetoidaan 1 µl matriisia, joka on bakteereita tunnistettaessa yleensä heikko orgaaninen happo. Mikäli tunnistetaan homeita tai hiivoja, matriisi ja protokolla ovat erilaisia. Matriisi sitoo näytteen näytelevyyn ja se vaaditaan, jotta kuuma laser ei hajota näytteestä irtoavia biomolekyylejä.



Kuva 3: MALDI – TOF MS- analyysissä käytettävä näytelevy, jossa paikat 48 näytteelle.

Kuvassa 3 on esitetty MALDI-TOF MS –analyysissä käytettävä näytelevy. Levyssä on paikat 48 näytteelle ja kolmelle kontrollille, jotka laite mittaa ensimmäisinä. Kyseinen näytelevy on käytössä bioMérieuxin laitteistossa, ja näytelevyjä voi ajaa kerralla neljä kappaletta. Tällöin näytteitä voi yhdellä tutkimuskerralla analysoida yhteensä jopa 192.

Kuvassa 3 näytelevyn ensimmäiseen kontrollipisteeseen ja viiteen ensimmäiseen näytekaivoon on siirrostettu bakteerimassaa. Siitä nähdään myös, että kahdessa ensimmäisessä näytekaivossa on sopiva määrä näytettä. Kolmessa seuraavassa näytettä on liikaa ja siirrostus on epäsiisti. Myös kontrollinäytettä on liikaa ja se on levinnyt näytekaivon ulkopuolelle. Levinnyt näyte voi olla hankala tunnistaa, ja se saattaa kestää kauemmin kuin siistin näytteen tunnistaminen.

Menetelmää käytettäessä ajetaan jokaista 16:tta näytettä vastaan siis kontrollinäyte (kuvassa 3 keskellä ylhäällä). Kontrollina käytetään *Escherichia coli* –bakteerin kantaa ATCC 8739. Laite tunnistaa ensin kontrollin kaksi kertaa, ennen kuin alkaa tunnistaa

muita näytteitä. Kontrolli tulee ajaa päivittäin, jotta varmistetaan laitteen toimintakunto. Tällöin laitteen saaman spektrin arvoja verrataan säädettyihin arvoihin.

Opinnäytetyössä käytettiin SARAMIS™-tietokantaa. Toinen bioMérieuxin VITEK® MS –laitteen tietokannoista, IVD, on erikoistunut mikrobi diagnostiikkaan. SARAMIS™-tietokannan toiminta perustuu niin sanottuun superspektri SuperSpectra™:aan. Superspektri on muodostettu useiden hyvin tunnettujen mikrobien mittaustulosten perusteella. Siihen sisältyy bakteerien eri sukujen, kantojen ja lajien niille ominaiset biomarkerit. SARAMIS™-tietokannasta löytyy jopa 2 800:n eri mikro-organismien spektrit. Tietokanta koostuu useista ihmisten ja eläinten patogeeneista ja ympäristössä esiintyvistä mikro-organismeista. (10)

Kun näyte on ajettu, tietokanta ilmoittaa tuloksen kaikista tarkimman taksonomisen datan mukaan, kuten sukutasolla ”*Genus Enterobacter*” tai lajitasolla ”*Escherichia coli*”. Tietokanta antaa tuloksen ja ilmoittaa sille prosentteina korkeimman luottamustason sekä ilmoittaa luottamustason värikoodilla (kuva 3). (11, s. 7-2)

Tarkkuus	Värikoodi
> 99,9 %	Tumman vihreä
99,9 - 90,0 %	Vaalean vihreä
90,0 - 80,0 %	Keltainen
80,0 - 75,0 %	Valkoinen

Kuva 4: SARAMIS™-tietokannan tulosten luottamustasot ja niiden värikoodit.

Tunnistukset, jotka jäävät luottamustasoltaan alle 75 %:n, eivät näy tulosikkunassa; laite ilmoittaa tunnistusprosentiksi 0,00. Joskus tulos voi myös olla ristiriitainen: laite tunnistaa näytteen kahdeksi tai useammaksi bakteeriksi superspektrin avulla vähintään 80 %:n luottamustasolla. Ristiriitainen tunnistus voi johtua epäpuhtaasta näytteestä tai komplekseista lajeista, jotka on eritelty ja tunnistettu tietokannassa. Tietokanta ei esimerkiksi erota *Escherichia colia* ja *Shigella*-suvun bakteereja toisistaan, sillä niiden spektrit ovat niin lähellä toisiaan. Tällöin käyttäjän täytyy itse valita, kumman tunnistuksen hyväksyy oikeaksi. Valintaikkunasta voi valita, onko bakteeri tunnistettu suku-, laji- vai peräti kantatasolla. (11, s. 7-4.)

Luvussa esitelty menetelmä on spesifinen vain bioMérieuxin VITEK® MS –laitteelle ja SARAMIS™-tietokannalle sekä bakteeritunnistuksille. Toisella laitevalmistajalla Brukerilla on erilainen protokolla.

5 Työn suoritus ja tulokset

Työ suoritettiin suomalaisessa kosmetiikkatehtaassa. Työn tarkoituksena oli kartoittaa mahdollisten house- ja ympäristöbakteerien määrää ja laatua tehtaan tuotanto- ja varastotiloissa. Työssä tutkittiin 52 eri kohdetta kolmena päivänä viikossa kahden viikon ajan. Tutkimuskohteet pyrittiin valitsemaan mahdollisimman monipuolisesti. Kohteista 28 oli ennalta määriteltyjä ja niitä tehtaassa tutkittiin rutiinilla kerran kuukaudessa, mutta bakteereja ei tunnisteta. Loput 24 kohdetta valittiin opinnäytetyötä varten.

Alkuperäiset, loppukeväästä otetut näytteet hylättiin analyysilaitteiston ollessa epäkunnossa ja työtä jatkettiin lomien jälkeen heinäkuussa. Työssä käytettiin letheen-agaria, johon lisättiin polysorbaatti 80:tä (Tween 80) säilöntäaineiden neutraloimiseksi (liite 6). Lisäksi käytettiin ulkomaisen valmistajan homespesifisiä Sabouraud-maljoja, mutta homeita ei identifioitu puutteellisen protokollan ja ajan loppumisen vuoksi. Yhden tutkimuspäivän näytteet ehdittiin hävittää.

Petrimaljoille otettiin ilmasta laskeumanäytteet siten, että maljat seisoivat tehtaan tiloissa kansi auki neljä tuntia kerrallaan, jonka jälkeen niitä inkuboitiin 35 °C:ssa viisi päivää. Inkuboinnin jälkeen maljojen pesäkkeet laskettiin ja ne säilöttiin odottamaan tutkimusta.

MALDI - TOF MS-analysit vaativat 24 tuntia vanhat bakteerikasvustot, joten bakteereista tehtiin puhtasviljelmät noin 24 tuntia ennen ajoa. Puhtasviljelmissä käytettiin niin ikään letheen-agaria, mutta työn loppupuolella siirryttiin käyttämään THG-agaria, sillä näytteet valmisteltiin koululla harjoittelun loputtua.

Haasteena MALDI- TOF MS-analysissä oli saada sopiva määrä bakteerimassaa näytelevylle. Tuntemattomat ympäristöbakteerit olivat paikoin hyvin hankalia siirrostaa; ne saattoivat olla limaisia, kovia tai sitkeitä. Liikaa siirrostui erityisesti niitä näytteitä, jotka sitkeytensä vuoksi olivat haastavia saada irtoamaan siirrostussilmukasta tai kasva-

tusalustasta. Tutkimuksen edetessä ja samojen bakteerien toistuessa opittiin kuitenkin siirrostamaan suhteellisen hyvin ja tunnistukset onnistuivat pääosin erinomaisesti.

Työssä käytettiin yksinomaan SARAMIS™-tietokantaa, joka on tarkoitettu tutkimuskäyttöön. Näytteitä ajettiin yhteensä 962, joista osa oli rinnakkaisnäytteitä. Rinnakkaisnäytteiden siirrostuksella poissuljettiin siirrostusvirheet ja varmistettiin bakteeritunnistus. Tutkimuksen loppupuolella siirrostukset onnistuivat niin hyvin, että voitiin ajaa näytteitä ilman rinnakkaisia siirrostuksia. Näytteiden käsittelyn harjaantuminen ilmenee myös näytteiden ja tunnistusten laatussa: tunnistuksia on kahdelta viimeiseltä tutkimuspäivältä enemmän kuin ensimmäisiltä tutkimuspäiviltä.

Tunnistusten vähyyteen voi vaikuttaa myös letheen-agarin käyttö tutkimuksen alkuvaiheessa. Puhdasviljelmille olisi tullut käyttää THG- tai veriagaria, jotta olisi saatu mahdollisimman laadukasta bakteerikasvustoa analyysiä varten.

Tunnistukset onnistuivat pääosin hyvin: 962 näytteestä tunnistettiin 548. Taulukossa 1 on laskettu tunnistusprosentit kaikille luottamustasoille, mukaan lukien ristiriitaisille tuloksille (luottamustaso alle 75 %), joille on itse määritetty tunnistettu bakteeri.

Taulukko 1. Tunnistusprosentit

Luottamustaso	Tunnistus - %
> 99,9 %	19,2 %
99,9 - 90,0 %	10,8 %
90,0 - 80,0 %	10,4 %
80,0 - 75,0 %	5,09 %
< 75,0 %	10,0 %

Alle 75 %:n tunnistuksia ei huomioida lainkaan tulosten käsittelyssä.

Kokonaisuudessaan kaikkien tunnistettujen näytteiden määrä kaikista näytteistä oli 57 %. Lisäksi taulukosta 1 nähdään, että yli 99,9 %:n tunnistuksia on eniten. Liitteisiin (liitteet 1 - 5) on koottu kaikki tutkimustulokset. Liitteistä ilmenee, minä päivänä alkuperäiset näytteet on otettu ja mistä tutkimuskohteista. Lisäksi taulukoista voi nähdä kaikki tutkimuskohteista löydetyt bakteerit ja niiden tunnistusprosentit.

6 Tulosten käsittely ja tulkinta

Työn tavoitteena oli löytää mahdollisia house-bakteereita, jotka ovat pesiytyneet tehtaahan varasto-, tuotanto- ja pakkaamo- sekä laboratoriotiloihin. Tunnistetuista bakteereista huomataan, että mitään vaarallisia ja patogeenisiä bakteereita ei tehtaalta löytenyt. Suurimmat ja toistuvat löydökset koostuivat *Micrococcus luteus* -bakteerista ja iholla esiintyvistä *Staphylococcus*-lajeista. Taulukkoon 2 on koottu löydettyjen bakteerien osuudet kaikista tunnistuksista, joita oli yhteensä 548.

Tuloksiin tulee suhtautua varauksella. Alle 75 %:n tunnistuksia ei voida pitää varmoina ja jopa alle 90 %:n tunnistukset ovat tietyissä tapauksissa epävarmoja ja vaatisivat jatkotestejä lopullisen tunnistuksen varmistamiseksi. Alle 80 %:n tunnistukset on jätetty pois taulukosta 2.

Ympäristössä esiintyvien bakteerien, kuten *M. luteus* ja *Bacillus pumilus*, löytymistä osattiin odottaa. Iholla esiintyvien *Staphylococcus*-lajien ilmentyminen laskeumamaljanäytteissä oli odottamatonta. Syytä tälle ei ole löydetty. Osa näytteistä on kerätty sellaisista tiloista, joissa ihmisiä kulkee jatkuvasti. Työntekijöillä on päällään suojavarustus (hiussuoja, suojakäsineet ja puhtaat työvaatteet). Tehtaan tuotanto-, varasto- ja laboratoriotiloissa on koneellinen ilmastointi. Kenenkään ei tiedetä koskeneen näytemaljoihin.

Näytekohteista 1–5, 7–14, 15–17, 22–23, 29, ja 32–36 ovat tuotantotiloista, kohteet 6, 18–19, 25–26, 28 ja 30–31 ovat erilaisista pesutiloista, kohteet 21, 27 ja 52 ovat laboratoriotiloista ja loput kohteet varastotiloista tai käytäviltä. Liitteitä 1–5 tulkitsemalla voi nähdä, että bakteeritunnistuksissa ei ole merkitsevää eroa eri kohdetyyppien välillä. Näiden tunnistusten valossa ei voida todeta, että esimerkiksi varastotiloissa olisi enemmän mikrobeja kuin laboratoriotiloissa. Lajisto poikkeaa kuitenkin huomattavasti: varasto- ja pesutiloista löytyi suurempi määrä erilaisia bakteereja, kuten *Bacillus*-lajien edustajia (taulukot 3 ja 4), jotka itiöivät ja leviävät siten ilmassa, kun taas tuotanto- ja laboratoriotiloista löytyy huomattavat määrät eri *Staphylococcus*-lajeja. Stafylokokkeja löytyi myös muistakin tiloista ja niitä löytyi määrällisesti eniten eri paikoista, kuten taulukkoa 5 tarkastellessa voi huomata. Lisäksi usea bakteeritunnistus on pesutiloista peräisin olevasta näytteestä, kuten *Delftia acidovorans* ja *Providencia rettgeri*, mikä taas voi selittyä sillä, että tiloissa on paljon vettä läsnä. Vettä voi jäädä pesutiloihin huomaamatta, mikä edesauttaa bakteerien kasvua näissä kohteissa.

Taulukko 2. Tunnistettujen bakteerien osuudet kaikista tunnistetuista näytteistä

Eri bakteerien osuudet tunnistetuista näytteistä	
<i>Micrococcus luteus</i>	49,8 %
<i>Staphylococcus hominis</i>	6,4 %
<i>Staphylococcus epidermis</i>	6,2 %
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4,2 %
<i>Staphylococcus capitis</i>	1,8 %
<i>Bacillus pumilus</i>	0,7 %
<i>Pseudomonas putida</i>	0,7 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,7 %
<i>Aerococcus viridans</i>	0,5 %
<i>Moraxella osloensis</i>	0,5 %
<i>Staphylococcus cohnii</i>	0,4 %
<i>Bacillus subtilis</i>	0,4 %
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	0,4 %
<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,4 %
<i>Delftia acidovorans</i>	0,4 %
<i>Brevundimonas diminuta</i>	0,4 %
<i>Kocuria rosea</i>	0,4 %
<i>Staphylococcus warneri</i>	0,2 %
<i>Pantoea agglomerans</i>	0,2 %
<i>Acinetobacter junii</i>	0,2 %
<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,2 %
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0,2 %
<i>Staphylococcus lentus</i>	0,2 %
<i>Providencia rettgeri</i>	0,2 %
<i>Bacillus cereus</i>	0,2 %
<i>Proteus vulgaris</i>	0,2 %

Yksikään bakteeri, lukuun ottamatta edellä mainittua *M. luteusta* ja *Staphylococcus* –lajeja, ei esiinny tutkimuskohteissa useammin kuin kerran. Niitä on kuitenkin voinut kasvaa ensimmäisinäkin tutkimuspäivinä, mutta siirrostus tai kasvatus ei ole onnistunut ja siksi tunnistusta ei ole saatu. Jotta bakteerit voitaisiin luokitella tehtaaseen pesiyty-neiksi house-bakteereiksi, tulisi bakteerien esiintyä tutkimustuloksissa samoissa tutki-muskohteissa monta kertaa. Taulukoihin 3 ja 4 on koottu lyhyet esittelyt ja kuvaukset löydetyistä bakteereista. Taulukoista näkee myös, että samaa bakteeria ei löydy useis-ta eri kohteista useita kertoja. Suurimmassa osassa näytteenkeräystiloista tuotteet on

suojattu niitä varten suunnitelluilla pakkauksilla, joten kontaminaatio ilman kautta on mahdotonta.

Taulukko 3: Löydettyjen bakteerien kuvaukset

Bakteeri	Kuvaus	Kohde- nro
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Aerobinen, Gram-negatiivinen sauvabakteeri. Esiintyy useissa nestemäisissä ympäristöissä. On todettu aiheuttavan sairaalainfektioita. (12)	4, 38
<i>Moraxella osloensis</i>	Oksidaasipositiivinen, Gram-negatiivinen kokki. Esiintyy ympäristössä ja ihmisen suolistossa. Aiheuttaa infektioita erityisesti syöpäpotilailla, joihin se tarttuu esimerkiksi virtsakatetriin kautta. (13)	8, 37
<i>Pseudomonas oryzae</i>	Gram-negatiivinen, oksidaasinegatiivinen. Sen pesäkkeet ovat yleensä keltaisia, kovia tai ryppyisiä. Esiintyy ympäristössä, kuten maaperässä. Aiheuttaa sairaalainfektioita. (14,15)	14
<i>Pseudomonas putida</i>	Gram-negatiivinen sauvabakteeri, jolla on flagelloja. Kasvaa hapellisissa vesi- ja maaperäympäristöissä. Osa bakteerin kannoista elää symbioosissa kasvien kanssa. Pystyy hajottamaan orgaanisia liuottimia, kuten tolueenia sekä polystyreenivaahtoa, jota on aiemmin pidetty biohajoamattomana. (16)	16
<i>Delftia acidovorans</i>	Aerobinen, Gram-negatiivinen sauvabakteeri. Aiheuttaa harvoin infektioita, sillä viihtyy paremmin ympäristöbakteerina. (17)	19
<i>Rhizobium</i>	Gram-negatiivinen sauva, jota esiintyy maaperän orgaanista ainetta sisältävässä osassa. (18)	20
<i>Bacillus cereus</i>	Itiöivä, Gram-positiivinen sauvabakteeri. Yleinen vesistöissä, kasveissa, ilmassa ja maaperässä sekä ihmisen suolistossa. Itiöt kestävät erittäin hyvin erilaisia stressinaiheuttajia, kuten kuivuutta ja korkeaa lämpötilaa. Aiheuttaa ruokamyrkytyksiä. (19) Sen esiintyvyyttä seurataan tarkasti kosmetiikkateollisuudessa.	25
<i>Bacillus pumilus</i>	Itiöivä, Gram-positiivinen sauvabakteeri. Esiintyy maaperässä ja joskus kasvien juurissa, jossa se ehkäisee muiden mikro-organismien infektioita. Sen proteaaseja on alettu hyötykäyttää eri teollisuuden aloilla, kuten ruoka- ja kemikaaliteollisuudessa. Vain muutama <i>B. pumilus</i> aiheuttama ruokamyrkytys on todettu ihmisillä. (20)	34, 47

Taulukko 4: Löydettyjen bakteerien kuvaukset (jatkoa sivulta 17)

<i>Bacillus megaterium</i>	Muiden <i>Bacillusten</i> tapaan Gram-positiivinen, aerobinen sauva. Esiintyy maaperässä. Ei patogeeninen. (21)	34, 40
<i>Bacillus subtilis</i>	Muiden <i>Bacillusten</i> tapaan Gram-positiivinen, aerobinen sauva. Sitä esiintyy maaperässä ja kasveissa. <i>B. subtilis</i> on kehittänyt useita stressinsietomenetelmiä menestyäkseen. Eivät ole patogeenisia. (22)	11
<i>Brevundimonas diminuta</i>	Ympäristössä esiintyvä, Gram-negatiivinen sauva. Elää erityisesti vesiympäristöissä. Ei patogeeninen. (23)	28
<i>Providencia rettgeri</i>	Gram-negatiivinen ympäristöbakteeri, joka elää sekä vesistöissä että maaperässä. Patogeeninen. (24)	28
<i>Aerococcus viridans</i>	Gram-positiivisia, ilmassa eläviä kokkibakteereja. Aiheuttavat mm. virtsatieinfektioita. (25)	28
<i>Proteus vulgaris</i>	Kuuluu enterobakteerien ryhmään ja elää ihmisen elimistössä osana normaalia mikroflooraa. Aiheuttaa yleensä haavainfektioita. (26)	39
<i>Pantoea agglomerans</i>	Enterobakteereihin kuuluva Gram-negatiivinen sauva-bakteeri. Elää kasveissa ja maaperässä. Suvustaan juuri <i>P. agglomerans</i> aiheuttaa ihmisten infektioita. (27)	51
<i>Kocuria rosea</i>	Gram-positiivinen kokki, joka kuuluu aktinobakteereihin. Sitä esiintyy vesistöissä ja maaperässä, mutta myös ihmisen iholla. Voi aiheuttaa infektioita. (28)	47
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Elää joka puolella ympäristössä. Gram-positiivinen, nopeasti kasvava bakteeri. (29)	47

Taulukoista 3 ja 4 nähdään, että kaikki bakteerit ovat ympäristössä eläviä bakteereita. Osa bakteereista on patogeenisia, mutta suurin osa niistäkin vain ihmisillä, joiden immuunipuolustus on jostain syystä häiriintynyt. Lisäksi taulukkoon 5 on koottu kaikkien löydettyjen *Staphylococcus*-lajien lyhyet ominaisuudet. Kaikki taulukossa esitetyt stafylokokit ovat grampositiivisia ja koagulaasinegatiivisia.

Taulukko 5: Löydettyjen stafylokokkien kuvaukset

Bakteeri	Kuvaus	Kohde- nro
<i>Staphylococcus hominis</i>	Koagulaasinegatiivinen, Gram-positiivinen bakteeri. Kuuluu ihmisten ja eläinten ihon normaalimikrobistoon. Voi aiheuttaa infektioita ihmisillä, joiden immuunipuolustus on heikentynyt. (31)	2, 3, 4, 8, 12, 13, 16, 21, 24, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41,44, 45, 52
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Kuuluu ihmisen ihon ja limakalvojen normaalimikrobistoon. Infektoi ihmisen yleensä katetrien tai implanttien kautta, johtuen sen kyvystä muodostaa limaa, joka taas edesauttaa sen tarttumista pinnoille. (32)	1, 2, 5, 11, 14, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 37, 38, 45, 46, 51
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Ihmisen ihon normaalimikrobistoon kuuluva bakteeri. Ei aiheuta infektioita, mikäli ihmisen immuunipuolustus ei ole häiriintynyt. Nimensä mukaisesti kykenee hemolyysiin. (33)	3, 4, 9, 11, 14, 15, 19, 21, 24, 37, 38
<i>Staphylococcus capitis</i>	Kuuluu myöskin ihon normaalimikrobistoon, eikä ole vaarallinen terveille ihmisille. (34)	2, 15, 28, 33, 34, 45
<i>Staphylococcus cohnii</i>	Kuuluu ihon normaalimikrobistoon. Ei aiheuta infektioita terveitä ihmisiä. (35)	30, 34
<i>Staphylococcus warneri</i>	Kuuluu myöskin ihon normaalimikrobistoon. Kontaminoi erilaisia proteeseja, mutta ei muuten ole vaarallinen ihmisille. (36)	47
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Ei kuulu ihmisen ihon normaalimikrobistoon. Toinen yleisimmistä virtsatietulehduksen aiheuttajista nuorilla naisilla. Sitä on myös eristetty kuolleiden eläinten ruhoista. (37)	33
<i>Staphylococcus lentus</i>	Eristetty lampaista, vuohen utareista ja ihmisen virtsanäytteistä. Ei kuulu ihmisen ihon normaalimikrobistoon. Infektoi potilaita, joiden immuunipuolustus on heikentynyt. (38)	47

7 Loppupäätelmät

Opinnäytetyön tarkoituksena oli löytää mahdollisia house-bakteereja. Opinnäytetyössä esiteltyjen tulosten varjolla voidaan sanoa, että house-bakteereja ei löytynyt. Lisätutkimuksia, kuten pinta- ja pyyhkäisynäytteiden ottamista ja tunnistamista, olisi voitu tehdä ja näin vielä varmistaa tulokset.

Kosmetiikkayritys käyttää opinnäytetyössä kerättyä informaatiota jatkossa tuotekehityksessään.

Lähteet

- 1 Orth PhD, Donald S. 2010. Insights into Cosmetic Microbiology. Allured Business Media.
- 2 Todar PhD, Kenneth. 2008-2012. Verkkodokumentti. <textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>. Luettu 8.8.2016.
- 3 Todar PhD, Kenneth. 2008-2012. Verkkodokumentti. <textbookofbacteriology.net/staph.html>. Luettu 8.8.2016
- 4 Lumio, Jukka. 2013. Verkkodokumentti. Terveyskirjasto. <www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00586>. 25.3.2013. Luettu 8.8.2016.
- 5 Orth PhD, Donald S. 1993. Handbook of Cosmetic Microbiology. Marcel Dekker, Inc.
- 6 Hannuksela, Matti. 2012. Verkkodokumentti. Terveyskirjasto. <www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00703>. 17.8.2012. Luettu 9.8.2016.
- 7 Niiranen, Jukka; Jaarinen Soili. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Edita, Helsinki.
- 8 VITEK MS®: MALDI-TOF Microbial Identification System. 2016. bioMérieuxin www-sivut. <www.biomerieux-industry.com/biopharma/vitek-ms-0>. Luettu 27.10.2016.
- 9 Principles of MALDI-TOF Mass Spectrometry. 2016. Shimadzun www-sivut. <www.shimadzu.com/an/lifescience/maldi/princpl1.html>. Luettu 27.10.2016.
- 10 Efremov, Georgi D. 2013. Verkkodokumentti. RCGEB. <manu-icgib.mk/Upload/dokumenti/Saramis%20ICGIB%20eng.pptx>. Luettu 27.10.2016.
- 11 VITEK® MS Plus: Workflow User Manual. bioMérieux S.A.
- 12 Burke A Cunha, M.D. et al. 2016. Verkkodokumentti <www.emedicine.medscape.com/article/237024-overview>. 18.3.2016. Luettu 30.10.2016.

- 13 Hadano, Y; Ito, Kenta et al. 2012. Verkkodokumentti. NCBI. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3479945/>>. 17.10.2012. Luettu 30.10.2016.
- 14 Woo, Kwang-Sook et al. 2014. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3970301/>>. 21.3.2014. Luettu 30.10.2016.
- 15 Decker, CF et al. 1991. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2001143>>. 03/1991. Luettu 14.11.2016.
- 16 *Pseudomonas putida*. 2016. MicrobeWikin www.sivut.kenyon.edu/microbewiki/index.php/Pseudomonas_putida. <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_putida>. 18.4.2016. Luettu 30.10.2016.
- 17 Bilgin, Huseyin et al. 2015. Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4644013/>. Luettu 30.10.2016
- 18 *Agrobacterium radiobacter*. 2013. MicrobeWikin www.sivut.kenyon.edu/microbewiki/index.php/Agrobacterium_radiobacter. <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Agrobacterium_radiobacter>. 18.5.2013. Luettu 30.10.2016.
- 19 *Bacillus cereus*. 2016. Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran www.sivut.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/bacillus-cereus/>. 31.3.2016. Luettu 30.10.2016.
- 20 *Bacillus pumilus*. 2012. MicrobeWikin www.sivut.kenyon.edu/microbewiki/index.php/Bacillus_pumilus. <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_pumilus>. 26.4.2012. Luettu 30.10.2016.
- 21 *Bacillus megaterium*. 2015. MicrobeWikin www.sivut.kenyon.edu/microbewiki/index.php/Bacillus_megaterium. <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_megaterium>. 29.9.2015. Luettu 30.10.2016

- 22 *Bacillus subtilis*. 2015. MicrobeWikin www-sivut. <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_subtilis>. 7.6.2015. Luettu 30.10.2016
- 23 *Brevundimonas diminuta*. 2013. MicrobeWikin www-sivut. <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Brevundimonas_diminuta>. 30.7.2013. Luettu 30.10.2016.
- 24 McAuley, David Pharm.D. 1993-2016. Verkkodokumentti. <<http://www.globalrph.com/Providencia-species.htm>>. 8.6.2016. Luettu 30.10.2016.
- 25 Gopalachar, A.S. et al. 2004. Verkkodokumentti. Reseach gate. <https://www.researchgate.net/publication/8209062_Urinary_tract_infection_caused_by_Aerococcus_viridans_a_case_report>. 5.12.2014. Luettu 30.10.2016.
- 26 Szabo, Dora et al. 2002. Verkkodokumentti. <<http://www.antimicrobe.org/b226.asp>>. Luettu 14.11.2016.
- 27 Cruz, Andrea T. et al. 2007. Verkkodokumentti. Journal of Clinical Microbiology. <<http://jcm.asm.org/content/45/6/1989.full>>. 18.4.2007. Luettu 30.10.2016.
- 28 Purty, Shasikala et al. 2013. Verkkodokumentti. NCBI. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826069/>>. 10/2013. Luettu 30.10.2016.
- 29 Hay, Rod J. 2009. Verkkodokumentti. <http://journals.lww.com/co-infectiousdisease-disease-ses/Fulltext/2009/0400/Mycobacterium_chelonae__a_growing_problem_in_soft.2.aspx>. 4/2009. Luettu 14.11.2016.
- 30 Terao, Junji et al. 2011. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022065/>>. 1/2011. Luettu 14.11.2016.

- 31 McAuley, David Pharm.D. 1993-2016. Verkkodokumentti. <<http://www.globalrph.com/Staph-hominis.htm>>. 8.6.2016. Luettu 7.12.2016.
- 32 *Staphylococcus epidermis*. 2011. MicrobeWikin [www-sivut.kenyon.edu/index.php/Staphylococcus_epidermidis](http://www.sivut.kenyon.edu/index.php/Staphylococcus_epidermidis)>. 22.4.2011. Luettu 7.12.2016.
- 33 *Staphylococcus haemolyticus*. 2013. Staphylococcus haemolyticus [www-sivut.staphylococcushaemolyticus.org/](http://www.sivut.staphylococcushaemolyticus.org/)>. Luettu 7.12.2016.
- 34 *Staphylococcus capitis*. Bode science center [www-sivut.kenyon.edu/index.php/Staphylococcus-capitis.html](http://www.bode-science-center.com/center/relevant-pathogens-from-a-z/staphylococcus-capitis.html)>. Luettu 7.12.2016.
- 35 *Staphylococcus cohnii*. Abis encyclopedia [www-sivut.tgw1916.net/Staphylococcus/cohnii.html](http://www.sivut.tgw1916.net/Staphylococcus/cohnii.html)>. Luettu 7.12.2016.
- 36 *Staphylococcus warneri*. Abis encyclopedia [www-sivut.tgw1916.net/Staphylococcus/warneri.html](http://www.sivut.tgw1916.net/Staphylococcus/warneri.html)>. Luettu 7.12.2016.
- 37 *Staphylococcus saprophyticus*. 2010. MicrobeWikin [www-sivut.kenyon.edu/index.php/Staphylococcus_saprophyticus](http://www.sivut.kenyon.edu/index.php/Staphylococcus_saprophyticus)>. 20.8.2010. Luettu 7.12.2016.
- 38 *Staphylococcus lentus*. Abis encyclopedia [www-sivut.tgw1916.net/Staphylococcus/lentus.html](http://www.sivut.tgw1916.net/Staphylococcus/lentus.html)>. Luettu 7.12.2016.

Liite 1: Tutkimustulokset, päivä 1

Tutkimuskohteen numero	Löytynyt bakteeri	Tunnistus- %
2	<i>Staphylococcus epidermis</i>	81,6 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	80,0 %
	<i>Bacillus cereus</i>	99,9 %
	<i>Bacillus sp.</i>	79,2 %
	<i>Staphylococcus capitis</i>	86,7 %
4	<i>Bacillus cereus</i>	85,5 %
5	<i>Micrococcus luteus</i>	86,0 %
7	<i>Micrococcus luteus</i>	86,0 %
8	<i>Staphylococcus hominis</i>	76,5 %
	<i>Bacillus sp.</i>	> 75,0 %
9	<i>Micrococcus luteus</i>	96,5 %
10	<i>Staphylococcus sp.</i>	> 75,0 %
11	<i>Bacillus sp.</i>	> 75,0 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	96,5 %
12	<i>Staphylococcus hominis</i>	86,7 %
13	<i>Staphylococcus sp.</i>	> 75,0 %
15	<i>Staphylococcus capitis</i>	96,9 %
16	<i>Staphylococcus hominis</i>	76,8 %
18	<i>Micrococcus luteus</i>	> 75,0 %
19	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,9 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	81,6 %
21	<i>Micrococcus luteus</i>	94,6 %
22	<i>Micrococcus luteus</i>	92,7 %
23	<i>Staphylococcus epidermis</i>	90,5 %
24	<i>Staphylococcus hominis</i>	86,7 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
25	<i>Bacillus sp.</i>	> 75,0 %
27	<i>Micrococcus luteus</i>	81,7 %
28	<i>Micrococcus luteus</i>	89,4 %
31	<i>Bacillus pumilus</i>	87,5 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	92,7 %

Tutkimuskohteen numero	Löytynyt bakteeri	Tunnistus- %
32	<i>Micrococcus luteus</i>	94,6 %
34	<i>Micrococcus luteus</i>	78,2 %
35	<i>Micrococcus luteus</i>	94,6 %
36	<i>Micrococcus luteus</i>	82,7 %
37	<i>Micrococcus luteus</i>	84,0 %
41	<i>Staphylococcus hominis</i>	86,7 %
44	<i>Staphylococcus hominis</i>	76,5 %
49	<i>Micrococcus luteus</i>	79,2 %

Liite 2: Tutkimustulokset, päivä 2

Tutkimuskohteen numero	Löytynyt bakteeri	Tunnistus-%
1	<i>Micrococcus luteus</i>	75,0 %
2	<i>Micrococcus luteus</i>	82,5 %
3	<i>Micrococcus luteus</i>	95,3 %
4	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,9 %
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,2 %
5	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
8	<i>Micrococcus luteus</i>	78,2 %
10	<i>Bacillus</i> sp.	> 75,0 %
14	<i>Staphylococcus epidermis</i>	96,8 %
21	<i>Staphylococcus epidermis</i>	75,6 %
25	<i>Leifsonia</i> sp.	> 75,0 %
26	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
27	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
28	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus capitis</i>	97,0 %
30	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
31	<i>Micrococcus luteus</i>	95,3 %
32	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,9 %
33	<i>Micrococcus luteus</i>	99,4 %
	<i>Staphylococcus capitis</i>	99,8 %
36	<i>Bacillus</i> sp.	> 75,0 %
37	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,9 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
40	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
43	<i>Micrococcus luteus</i>	99,4 %
44	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
45	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,9 %
47	<i>Bacillus pumilus</i>	99,9 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Dermaococcus</i> sp.	> 75,0 %

Liite 3: Tutkimustulokset, päivä 3

Tutkimuskohteen numero	Löytynyt bakteeri	Tunnistus-%
2	<i>Staphylococcus hominis</i>	91,8 %
3	<i>Micrococcus luteus</i>	96,2 %
4	<i>Micrococcus luteus</i>	86,1 %
	<i>Bacillus</i> sp.	> 75,0 %
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,9 %
5	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	99,9 %
8	<i>Micrococcus luteus</i>	77,4 %
9	<i>Micrococcus luteus</i>	76,1 %
10	<i>Bacillus</i> sp.	> 75,0 %
	<i>Micrococcus</i> sp.	> 75,0 %
11	<i>Bacillus subtilis</i>	99,9 %
12	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Bacillus</i> sp.	> 75,0 %
13	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus hominis</i>	89,3 %
14	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	99,9 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
15	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,9 %
16	<i>Acinetobacter</i> sp.	76,8 %
	<i>Pseudomonas putida</i>	99,9 %
	<i>Gordonia</i> sp.	> 75,0 %
17	<i>Kytococcus sedentarius</i>	84,0 %
18	<i>Bacillus pumilus</i>	99,0 %
19	<i>Delftia acidovorans</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	97,4 %
20	<i>Bacillus</i> sp.	> 75,0 %
21	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	85,1 %
22	<i>Staphylococcus epidermis</i>	88,2 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	98,7 %
23	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
24	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus caprae/capitis</i>	90,0 %
27	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %

Tutkimuskohteen numero	Löytynyt bakteeri	Tunnistus-%
28	<i>Brevundimonas diminuta</i>	86,3 %
	<i>Aerococcus viridans</i>	92,0 %
30	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
31	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
32	<i>Micrococcus luteus</i>	88,5 %
34	<i>Micrococcus</i> sp.	> 75,0 %
	<i>Bacillus</i> spp.	> 75,0 %
35	<i>Staphylococcus</i> sp.	> 75,0 %
	<i>Staphylococcus hominis</i>	76,5 %
36	<i>Micrococcus luteus</i>	98,7 %
37	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	99,9 %
38	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	92,1 %
40	<i>Bacillus megaterium</i>	99,9 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	75,8 %
44	<i>Micrococcus luteus</i>	99,4 %
46	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	78,6 %
47	<i>Kocuria rosea</i>	93,4 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
48	<i>Micrococcus luteus</i>	99,4 %
50	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
51	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Kocuria</i> sp.	88,8 %

Liite 4: Tutkimustulokset, päivä 4

Tutkimuskohteen numero	Löytynyt bakteeri	Tunnistus-%
1	<i>Staphylococcus epidermis</i>	89,6 %
2	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Bacillus</i> sp.	99,9 % > 75,0 %
3	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
4	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>	99,9 % 99,9 %
5	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus epidermis</i>	99,9 % 99,9 %
8	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Moraxella osloensis</i> <i>Bacillus</i> sp.	99,9 % 96,5 % > 75,0 %
9	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,9 % 99,9 %
10	<i>Bacillus</i> sp. <i>Micrococcus luteus</i>	> 75,0 % 99,9 %
11	<i>Paenibacillus</i> sp. <i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus epidermis</i>	> 75,0 % 99,9 % 99,9 % 78,2 %
12	<i>Bacillus</i> sp. <i>Micrococcus luteus</i>	> 75,0 % 99,9 %
14	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,9 % 96,7 %
15	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,9 %
16	<i>Arthrobacter</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp.	> 75,0 % > 75,0 %
18	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
19	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Micrococcus luteus</i>	99,9 % 92,5 %
20	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus epidermis</i>	99,4 % 99,9 %
21	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus epidermis</i>	99,9 % 99,9 % 90,6 %

Tutkimuskohteen numero	Löytynyt bakteeri	Tunnistus-%
24	<i>Actinomyces</i> sp.	> 75,0 %
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	92,7 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
25	<i>Arthrobacter</i> sp.	> 75,0 %
	<i>Bacillus pumilus</i>	99,9 %
	<i>Bacillus</i> spp.	> 75,0 %
	<i>Exiguobacterium</i> sp.	> 75,0 %
27	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
30	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	93,9 %
33	<i>Bacillus</i> sp.	> 75,0 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Paenibacillus</i> sp.	> 75,0 %
34	<i>Bacillus megaterium</i>	84,0 %
	<i>Staphylococcus capitis</i>	96,9 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
35	<i>Bacillus</i> sp.	> 75,0 %
	<i>Kocuria</i> sp.	> 75,0 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	98,9 %
36	<i>Micrococcus luteus</i>	98,7 %
	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,9 %
37	<i>Staphylococcus hominis</i>	90,0 %
38	<i>Micrococcus luteus</i>	89,5 %
39	<i>Proteus vulgaris</i>	92,0 %
40	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
44	<i>Micrococcus luteus</i>	88,5 %
45	<i>Micrococcus luteus</i>	94,6 %
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	82,3 %
	<i>Staphylococcus capitis</i>	76,8 %
47	<i>Staphylococcus warneri</i>	99,9 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Paenibacillus</i> sp.	> 75,0 %
48	<i>Micrococcus luteus</i>	92,8 %
51	<i>Pantoea agglomerans</i>	99,9 %
	<i>Micrococcus</i> sp.	> 75,0 %
52	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,9 %

Liite 5: Tutkimustulokset, päivä 5

Tutkimuskohteen numero	Löytynyt bakteeri	Tunnistus-%
1	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Bacillus</i> sp.	99,9 % > 75,0 %
2	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
3	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Micrococcus luteus</i>	99,9 % 99,9 % 99,9 %
4	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Moraxella</i> sp.	99,9 % 80,3 % 99,9 % > 75,0 %
5	<i>Bacillus</i> sp. <i>Micrococcus luteus</i>	> 75,0 % 85,4 %
7	<i>Micrococcus luteus</i>	78,4 %
8	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
9	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
10	<i>Micrococcus luteus</i>	99,3 %
11	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Bacillus</i> sp.	99,9 % > 75,0 %
12	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>	98,0 % 99,9 % 96,0 %
15	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,9 %
16	<i>Burkholderia</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp.	87,6 % 75,2 %
19	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
20	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Rhizobium radiobacter</i>	99,9 % 99,9 %
21	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
23	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus epidermis</i>	92,5 % 99,9 %
24	<i>Acinetobacter junii</i> <i>Staphylococcus epidermis</i>	99,9 % 99,9 %
25	<i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Providencia</i> sp. <i>Bacillus cereus</i>	97,4 % > 75,0 % 85,0 %

Tutkimuskohteen numero	Löytynyt bakteeri	Tunnistus-%
28	<i>Providencia rettgeri</i>	84,7 %
	<i>Providencia sp.</i>	84,0 %
	<i>Microbacterium sp.</i>	> 75,0 %
	<i>Arthrobacter sp.</i>	> 75,0 %
30	<i>Staphylococcus caprae</i>	93,0 %
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	90,2 %
	<i>Pseudomonas putida</i>	99,9 %
	<i>Dermacoccus sp.</i>	> 75,0 %
31	<i>Staphylococcus hominis</i>	83,2 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
32	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
33	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9 %
34	<i>Staphylococcus cohnii</i>	87,0 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Bacillus pumilus</i>	99,9 %
	<i>Bacillus sp.</i>	> 75,0 %
	<i>Staphylococcus hominis</i>	91,8 %
	<i>Dermacoccus sp.</i>	> 75,0 %
35	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Bacillus sp.</i>	> 75,0 %
36	<i>Bacillus sp.</i>	> 75,0 %
	<i>Dermacoccus sp.</i>	> 75,0 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
37	<i>Dermacoccus sp.</i>	> 75,0 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Moraxella osloensis</i>	96,5 %
38	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,9 %
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,9 %
39	<i>Oerskovia turbata</i>	77,9 %
	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,9 %
40	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
41	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,9 %
43	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %

Tutkimuskohteen numero	Löytynyt bakteeri	Tunnistus-%
47	<i>Mycobacterium chelonae</i>	75,0 %
	<i>Micrococcus luteus</i>	96,0 %
	<i>Dermaococcus</i> sp.	> 75,0 %
	<i>Staphylococcus lentus</i>	95,7 %
48	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
50	<i>Micrococcus luteus</i>	89,4 %
51	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	99,9 %
52	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9 %

Liite 6: Letheen – agar - maljojen resepti

Letheen - agar -maljojen resepti	
Agaria	130,25 g
RO - vettä	2,5 l
Tween 80:ä	3,5 ml/pullo

1. Liuotetaan agarjauhe 2,5 l:aan RO - vettä.
2. Kaadetaan autoklaavipulloihin, n. 500 ml/pullo.
3. Pipetoidaan 3,5 ml Tween 80:ä pulloihin.
4. Autoklavoidaan nesteohjelmalla 121 °C:ssa 20 minuuttia.