

Roope Niinimäki

Salmonellakromogeenialustojen vertailututkimus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööryö

13.11.2014

| | |
|--|---|
| Tekijä Otsikko | Roope Niinimäki Salmonellakromogeenialustojen vertailututkimus |
| Sivumäärä Aika | 66 sivua + 7 liitettä 13.11.2014 |
| Tutkinto | Insinööri (AMK) |
| Koulutusohjelma | Bio- ja elintarviketekniikka |
| Suuntautumisvaihtoehto | Biolääketiede |
| Ohjaajat | DI Milla Meriluoto ETM Anna Holm Lehtori Carola Fortelius |
| <p>Salmonellat ovat gramnegatiivisia suolistobakteereja, jotka voivat aiheuttaa ihmisellä suo- listo- tai yleisinfektion. Tästä syystä elintarviketeollisuudessa salmonellamääryityksiä teh- dään sekä tuotteista että tuotantoympäristöistä säännöllisesti. Näitä salmonellamääryityksiä tehdään pääsääntöisesti ISO 6579:2002: <i>Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.</i> -viljelymenetelmän mukaisesti.</p> <p>Tutkimuksen tarkoituksena oli korvata Valio Oy:llä ISO 6579:2002 -menetelmässä ksyloo- si-lysiini-desoksikolaatti-agarin rinnalla käytettävä briljantinvihreä-fenolipuna-laktoosi- sakkaroosi-agar, jollakin seuraavista kromogeenialustoista: <i>ChromID Salmonella</i>, <i>Harle- quin Salmonella ABC Medium</i>, <i>IBISA</i>, <i>Rambach</i>, <i>CHROMagar Salmonella Plus</i> tai <i>Brillian- ce Salmonella</i>.</p> <p>Ennen varsinaista maljavalidointia tehtiin alustava maljavertailu, jonka perusteella vali- doinnista poistettiin herkkyydeltään ja spesifisyydeltään huonommaksi havaitut alustat. Alustavan maljavertailun jälkeen karsittiin pois <i>ChromID Salmonella</i>, <i>Harlequin Salmonella ABC Medium</i>, <i>IBISA</i> ja <i>Rambach</i> -agarit varsinaisesta validointivaiheesta.</p> <p>Tutkimuksen varsinaisessa validointivaiheessa verrattiin <i>CHROMagar Salmonella Plus</i> ja <i>Brilliance Salmonella</i> -alustojen toimivuutta ISO 6579:2002 -menetelmän mukaisessa vilje- lyssä keinotekoisesti kontaminoiduilla näytematriiseilla. Tulokseksi saatiin, että testatut kromogeenialustat olivat käytettyjä selektiivialustoja huomattavasti herkempiä ja spesifi- sempiä. Kromogeenialustojen keskinäisessä vertailussa paremmaksi osoittautui <i>Oxoidin</i> valmistama ja <i>Fisher Scientificin</i> toimittama <i>Brilliance Salmonella</i> -malja.</p> | |
| Avainsanat | salmonella, ISO 6579:2002 -menetelmä, validointi, kromogee- nialusta |

| | |
|---|--|
| Author(s) Title | Roope Niinimäki Comparison of salmonella chromogenic agars |
| Number of Pages Date | 66 pages + 7 appendices 13 November 2014 |
| Degree | Bachelor of Engineering |
| Degree Programme | Bio- and Foodtechnology |
| Specialisation option | Biomedicine |
| Instructor(s) | Milla Meriluoto, MSc. (Tech.) Anna Holm, MSc. Carola Fortelius, Lecturer |
| <p>Salmonella are Gram-negative intestinal bacteria that can cause an intestinal inflammation or sepsis in humans. Therefore, salmonella tests are constantly performed on products and production environments in the food industry. These salmonella tests are conducted mainly by a method specified in the ISO 6579:2002 standard <i>Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp -culture</i>.</p> <p>The aim of this validation project was to substitute <i>Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose -agar</i>, used parallel with <i>Xylose Lysine Deoxycholate -agar</i> in the ISO 6579:2002 method of Valio Oy, with one of the subsequent chromogenic media: <i>ChromID Salmonella</i>, <i>Harlequin Salmonella ABC Medium</i>, <i>IBISA</i>, <i>Rambach</i>, <i>CHROMagar Salmonella Plus</i>, or <i>Brilliance Salmonella</i>.</p> <p>Prior to the validation, a preliminary plate comparison was made, which resulted in the exclusion of insensitive and unspecific media. On the basis of the results of the preliminary plate comparison, <i>ChromID Salmonella</i>, <i>Harlequin Salmonella ABC Medium</i>, <i>IBISA</i> and <i>Rambach</i> agars were excluded from the actual validation stage of the project.</p> <p>At the actual validation stage of the thesis project the functionality of <i>CHROMagar Salmonella Plus</i> and <i>Brilliance Salmonella</i> media were compared by using these agars as plating media in the ISO 6579:2002 method when analyzing artificially contaminated sample matrices. The results obtained indicated that the chromogenic media were more sensitive and specific than the selective media that was previously used in the ISO 6579:2002 method by Valio Oy. When comparing the chromogenic media with each other, <i>Brilliance Salmonella</i> medium, manufactured by <i>Oxoid</i>, proved to be a better medium than <i>CHROMagar Salmonella Plus</i>, manufactured by <i>CHROMagar</i>.</p> | |
| Keywords | salmonella, ISO 6579:2002 -method, validation, chromogenic medium |

Sisällys

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| | KIRJALLISUUSKATSAUS | 2 |
| 2 | Salmonella | 2 |
| 2.1 | Salmonelloosi | 2 |
| 2.2 | Salmonella meijeriteollisuudessa | 3 |
| 2.3 | ISO 6579:2002 -standardimenetelmä | 4 |
| 2.4 | <i>BAX® System PCR</i> -menetelmä salmonellan detektointiin | 5 |
| 2.5 | Muut salmonellan detektointi- ja identifointimenetelmät | 6 |
| 2.6 | Salmonellakromogeenialustojen toimintaperiaate | 7 |
| 3 | Tutkimuksessa käytetyt selektiivi- ja kromogeenialustat | 9 |
| 3.1 | Ksyyloosi-lysiini-desoksikolaatti-agar | 11 |
| 3.2 | Briljantinvihreä-fenolipuna-laktoosi-sakkarooziagar | 12 |
| 3.3 | <i>Rambach</i> -agar | 13 |
| 3.4 | <i>ChromID Salmonella</i> -agar | 14 |
| 3.5 | <i>Brilliance Salmonella</i> -agar | 15 |
| 3.6 | <i>IBISA</i> -agar | 16 |
| 3.7 | <i>Harlequin Salmonella ABC Medium</i> -agar | 18 |
| 3.8 | <i>CHROMagar Salmonella Plus</i> -agar | 19 |
| 4 | Pseudomonaat | 21 |
| 5 | <i>Citrobacter</i> -suku | 22 |
| | KOKEELLINEN OSUUS | 23 |
| 6 | Materiaalit ja menetelmät | 23 |
| 6.1 | Tutkimuksessa käytetyt elatusaineet | 24 |
| 6.1.1 | Liemet | 24 |
| 6.1.2 | Agaralustat | 24 |
| 6.1.3 | Varmistustestit | 26 |
| 6.2 | Tutkimuksessa käytettävät bakteerit | 26 |
| 6.3 | Keinotekoisesti kontaminoidut näytematriisit ja kontaminointibakteerit | 28 |
| 6.4 | Tarvikkeet, laitteet ja tilat | 28 |
| 6.5 | Alustava maljavertailu | 29 |
| 6.6 | Näytteiden keinotekoinen kontaminointi | 29 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.7 | Keinotekoisesti kontaminoitujen näytteiden analysointi ISO-menetelmällä | 29 |
| 6.8 | <i>BAX-PCR</i> -menetelmä | 32 |
| 6.9 | Laskut | 33 |
| 7 | Tulokset | 34 |
| 7.1 | Alustava maljavertailu | 34 |
| 7.1.1 | Pesäkkeiden ulkomuoto <i>XLD</i> :llä | 37 |
| 7.1.2 | Pesäkkeiden ulkomuoto <i>BPLS</i> :llä | 40 |
| 7.1.3 | Pesäkkeiden ulkomuoto <i>Rambach</i> :lla | 41 |
| 7.1.4 | Pesäkkeiden ulkomuoto <i>ChromID</i> :llä | 43 |
| 7.1.5 | Pesäkkeiden ulkomuoto <i>CHROMagar</i> lla | 45 |
| 7.1.6 | Pesäkkeiden ulkomuoto <i>Brilliance</i> :lla | 47 |
| 7.1.7 | Pesäkkeiden ulkomuoto <i>ABC</i> :llä | 49 |
| 7.1.8 | Pesäkkeiden ulkomuoto <i>IBIS</i> alla | 51 |
| 7.2 | Näytteiden keinotekoinen kontaminointi | 52 |
| 7.3 | Salmonellan kasvu rikastetuista ja keinotekoisesti kontaminoiduista tuotenäytteistä kromogeenialustoilla | 54 |
| 7.4 | Salmonellan kasvu rikastetuista, keinotekoisesti kontaminoiduista ympäristönäytteistä kromogeenialustoilla | 56 |
| 7.5 | Salmonellan kasvu rikastetuista, keinotekoisesti kontaminoiduista tuote- ja ympäristönäytteistä kromogeenialustoilla verrattuna <i>BAX-PCR</i> -tuloksiin | 59 |
| 7.6 | <i>BAX-PCR</i> -menetelmän suhteelliset oikeellisuudet, spesifisyydet sekä herkkyudet verrattuna ISO-menetelmään | 60 |
| 8 | Tulosten tarkastelu | 61 |
| 8.1 | Salmonellakromogeenialustan valinta <i>BPLS</i> -alustan tilalle | 61 |
| 8.2 | Salmonellakromogeenialustojen välinen vertailu | 61 |
| 8.3 | <i>BAX-PCR</i> - ja ISO-menetelmien vertailu | 62 |
| 9 | Pohdinta | 62 |
| | Lähteet | 63 |
| | Liitteet | |
| | Liite 1. Alustava maljavertailu (2 vrk, 37±1°C) | |
| | Liite 2. <i>XLD</i> ja <i>BPLS</i> , valmistusohjeet | |
| | Liite 3. <i>ABC</i> ja <i>Rambach</i> , valmistusohjeet | |
| | Liite 4. <i>CHROMagar</i> ja <i>TSA</i> , valmistusohjeet | |
| | Liite 5. <i>BHI</i> , <i>PPV</i> ja <i>RVS</i> , valmistusohjeet | |
| | Liite 6. <i>TSI</i> ja <i>Urea</i> , valmistusohjeet | |

Liite 7. Yhteenvetotaulukko Brilliance Salmonella ja CHROMagar Salmonella Plus -
kromogeenialustoista

Sanasto

| | |
|------------------------------|---|
| <i>ABC</i> | <i>Harlequin Salmonella ABC Medium -agar</i> |
| <i>BAX-PCR</i> -menetelmä | <i>BAX® System PCR Salmonella -menetelmä</i> |
| <i>BPLS</i> | <i>Briljantinvihreä-fenolipuna-laktoosi-sakkaroosi-agar</i> |
| <i>Brilliance</i> | <i>Brilliance Salmonella -agar</i> |
| <i>CHROMagar</i> | <i>CHROMagar Salmonella Plus -agar</i> |
| <i>ChromID, SM2, SM ID 2</i> | <i>ChromID Salmonella -agar</i> |
| <i>IBISA</i> | <i>IBISA-agar</i> |
| ISO-menetelmä | Standardimenetelmä, ISO 6579:2002: <i>Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.</i> |
| <i>MKTTn</i> | <i>Müller-Kauffmann Tetrationsaatti-novobiosiini -rikasteliemi</i> |
| PPV | Puskuroitu peptonivesi -esirikastusliemi |
| <i>Rambach</i> | <i>Rambach-agar</i> |
| <i>RVS</i> | <i>Rappaport-Vassiliadis Soya -rikasteliemi</i> |
| TSA | Tryptoni Soija -agar |
| <i>TSI</i> | <i>Triple Sugar Iron -agarputki</i> |
| Urea | Urea-agarputki |
| <i>XLD</i> | Ksyloosi-lysiini-desoksikolaatti-agar |

Tutkimuksessa käytettyjen salmonellojen lyhenteet ja tarkat nimet

| | |
|------------------------------------|---|
| <i>Salmonella</i> Abony | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony |
| <i>Salmonella</i> Infantis | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis |
| <i>Salmonella</i> spp. | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>spp.</i> |
| <i>Salmonella</i> Senftenberg | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Senftenberg |
| <i>Salmonella</i> Dublin | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin |
| <i>Salmonella</i> Stockholm | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Stockholm |
| <i>Salmonella</i> Agona | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona |
| <i>Salmonella</i> Bovismorbificans | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Bovismorbificans |
| <i>Salmonella arizonae</i> | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> |
| <i>Salmonella diarizonae</i> | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> |
| <i>Salmonella enterica</i> | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis |

1 Johdanto

Ihmisen salmonellainfektio aiheutuu suun kautta. Yleensä infektion aiheuttaa elintarvikkeessa lisääntynyt salmonellabakteeri, joka siirtyy elintarvikkeen mukana ihmiseen. Salmonella aiheuttaa ihmisellä suolistoinfektion tai pahemmassa tapauksessa yleisinfektion eli sepsiksen. Muiden salmonellojen kuin *Salmonella* Typhin ja *Salmonella* Paratyphin aiheuttama salmonelloosikuolleisuus on pieni, mutta infektoituneen ihmisen korkea ikä ja perussairaudet ovat riskitekijöitä, jotka voivat aiheuttaa yhdessä salmonellainfektion kanssa vakavia seuraamuksia. (Ruutu 2009)

Mikäli elintarvikkeessa havaitaan salmonellakontaminaatio, elintarvikkeen tuotanto joudutaan keskeyttämään, kunnes kontaminaation lähde on selvinnyt, ja kontaminoituneet linjat on puhdistettu salmonellasta. Tästä aiheutuu yleensä merkittäviä taloudellisia tappioita ja pahimmassa tapauksessa koko tuotantolaitos joudutaan sulkemaan. On siis erittäin tärkeää, että salmonella voidaan osoittaa nopeasti ja luotettavasti näytteestä.

Valio Oy:llä ensisijaisena salmonellamääritysmenetelmänä käytetään tuotenäytteiden analysoinnissa *BAX-PCR Salmonella* -menetelmää. Mikäli *BAX-PCR*-menetelmä antaa epäselvän tai alustavan positiivisen tuloksen, suoritetaan jatkotutkimuksia standardimenetelmän ISO 6579:2002: *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.* mukaisesti. Ympäristönäytteet tutkitaan myös ensisijaisesti *BAX-PCR*-menetelmällä, poislukien lattiakaivovesinäytteet. Lattiakaivovesinäytteet analysoidaan edelleen standardimenetelmän mukaisesti, koska *BAX-PCR*-menetelmää ei ole vielä validoitu kyseiselle näytetyypille.

Tutkimuksen tarkoituksena oli korvata ISO-menetelmässä ksyloosi-lysiini-desoksikolaatti-agarin (*XLD*) rinnalla käytettävä briljantinvihreä-fenolipuna-laktoosi-sakkaroosi-agar (*BPLS*-agar), jollakin tutkittavista kromogeenialustoista. Tavoitteena oli löytää alusta, joka on selektiivisempi ja jolla salmonella voidaan tunnistaa luotettavammin ja erottaa helpommin näytteestä kasvavasta muusta kasvusta. Lisäksi kasvu-alustan vaihtamisella toivottiin saavutettavan säästöjä, kun turhia jatkoviljelyjä ei tarvita.

KIRJALLISUUSKATSAUS

2 Salmonella

Salmonella on gramnegatiivinen sauva, joka kuuluu *Enterobacteriaceae*-heimoon. Salmonella on mesofiilinen, mutta sen on todettu kasvavan 7 - 46°C:n lämpötila-alueella. Optimaalinen kasvulämpötila salmonellalle on 37 °C, mikä vaikuttaa muun muassa patogeenisyyteen, sillä bakteerin pääasiallinen elinympäristö on isäntäelion sisällä (ihmiset ja eläimet). (Doyle & Beuchat 2007: 187.)

Salmonella ei tuota itiöitä, ja bakteerin kasvun optimi-pH:n alue ilmenee bakteerin patogeenisuuden mukaan. Optimi pH-alue on neutraali 6,5 - 7,5, mutta bakteeri pystyy kasvamaan pH-alueella 4,5 - 9,5. Suurimmalla osalla salmonelloista on flagella, jonka avulla ne voivat liikkua. On olemassa myös salmonelloja, jotka eivät liiku, sillä niillä ei ole flagellaa (*Salmonella Pullorum* ja *Salmonella Gallinarum*) tai flagella on toimimaton. Salmonella voi säilyä hengissä huolimatta elintarvikkeiden pakastamisesta ja kuivauksesta. (Doyle & Beuchat 2007: 187 - 192.)

Lisäksi salmonella on fakultatiivisesti anaerobinen eli se pystyy kasvamaan niin hapellisissa kuin hapettomissakin olosuhteissa. Salmonellabakteerin tarvitsema minimi a_w -arvo on 0,93, eikä salmonella kasva, jos NaCl-pitoisuus on yli 5 prosenttia. (Doyle & Beuchat 2007: 190 - 191.)

2.1 Salmonelloosi

Useimmiten ihmiset saavat salmonellatartunnan eläinten tai ihmisten ulosteilla saastuneiden elintarvikkeiden välityksellä. Mikäli saastuneiden elintarvikkeiden säilytysolosuhteet ovat salmonellalle suotuisat ja elintarvikkeiden kypsennys on riittämätöntä, salmonella pääsee lisääntymään elintarvikkeissa. Yleensä todennäköisimpiä salmonellatartunnan lähteitä ovat siipikarjan- ja sianliha, pastöroimaton maito sekä kasvikset. Vaikka salmonella luetaan zoonooseihin, suorat tartunnat eläinten ja ihmisten välillä ovat harvinaisia. (Evira 2013.)

Salmonellan itämisaika on 6 - 72 tuntia (THL 2014). Salmonellainfektiossa eli salmonelloosissa oireita ovat yleensä pahoinvointi, vatsakrampit ja vatsan kouristelu, ripuli,

kuume sekä päänsärky. Oireiden voimakkuus ja eri oireiden esiintyvyys ovat yksilökoh-
taisia. Tartunnan aiheuttamat oireet kestävät yleensä muutaman päivän. (Evira 2013.)
Toisaalta, tämän jälkeen tartunnan saanut henkilö toimii oireettomana taudinkantajana
yleensä 4 - 5 viikon ajan. Joillakin henkilöillä oireeton taudinkantaminen kestää jopa
useita kuukausia. (THL 2014.)

Suomessa on vuosina 2000 - 2012 esiintynyt vuosittain 0 - 6 epidemiaa (Evira 2013).
Lukumäärällisesti salmonellainfektiotapauksia on ilmoitettu Valtakunnalliseen tartunta-
tautirekisteriin 2000-luvulla 2000 - 3000 tapausta vuosittain, joista kotimaassa saatujen
salmonellainfektioiden osuus on ollut noin 15 prosenttia ja ulkomailla saatujen tartunto-
jen osuus noin 80 prosenttia. Tartuntamaata ei ollut ilmoitettu noin 5 prosentissa ta-
pauksista. Yleisimmin todetut salmonella-serotyypit ovat olleet *S. Enteritidis*, *S. Typhi-*
murium, *S. Stanley* ja *S. Virchow*. Valtaosa kotimaisista tartunnoista on ollut *S. Typhi-*
murium ja ulkomaisista *S. Enteritidis* -serotyypin aiheuttamia. (Zoonosikeskus 2014.)
Epidemiat ovat usein liittyneet joukkoruokailuun, ja osassa epidemioista tartunnan läh-
teenä on ollut Suomen rajojen ulkopuolelta tullut elintarvike. Yleensä ruokamyrkytyksen
on aiheuttanut saastunut elintarvike tai infektoitunut työntekijä, käsitellessään elintar-
vikkeita. (Evira 2013.)

2.2 Salmonella meijeriteollisuudessa

Meijeriteollisuudessa salmonellaa esiintyy harvoin. Kuitenkin raakamaito voi toimia
salmonellabakteerin välittäjänä. Salmonellaa on löydetty muun muassa raakamaidosta
valmistetuista pehmeistä *Vacherin*, *Brie* ja *Camembert* -valkohomejuustoista (Robinson
2002: 508). Salmonellaa voi päästä raakamaitoon huonon lypsyhygienian johdosta,
lehmän utareista tai maidonkäsittelyn aikana, esimerkiksi lypsykoneesta. Harvoissa
tapauksissa salmonella voi päästä raakamaitoon myös lehmän sisäisen salmonellain-
fektio seurauksena. Yleisin salmonellainfektio välittäjä lehmillä on kontaminoitunut
rehu. (Roberts 1996: 222 - 223.)

Salmonella kuolee pastöroinnissa. Kuitenkin pastörintiprosessin epäonnistuminen tai
pastöroidun maidon jälkikontaminaatio voi aiheuttaa salmonellariskin. Esimerkiksi Yh-
dysvalloissa havaittiin vuonna 1985 salmonellaepidemia, joka aiheutui kontaminoitu-
neesta pastöroidusta maidosta. (Robinson 2002: 112.) Tällöin syynä oli oletettavasti
maidon pastörinti valmistusprosessin alkuvaiheessa, ennen rasvattoman maidon ja
täysmaidon sekoittamista 2 prosenttiseksi maidoksi. Tutkijat olettivat, että salmonella-

bakteeri oli päätyntä maitoon täysmaidon ja rasvattoman maidon sekoitusputken kautta. (Van 1987.)

Osa salmonelloista on erittäin kestäviä ja hyvin ympäristöön sopeutuvia. Toisaalta salmonella on huono kilpailija monia maitohappobakteereja vastaan, mitä on tutkittu useissa eri tutkimuksissa (muun muassa Szala ym. 2012; Drago ym. 1997), joissa on testattu eri *Lactobacillus*-kantojen antagonistisia eli kasvua ehkäiseviä ominaisuuksia eri salmonellakantoja vastaan.

2.3 ISO 6579:2002 -standardimenetelmä

ISO 6579:2002 -standardimenetelmä (*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*) on kvalitatiivinen salmonellabakteerin osoittamismenetelmä. Menetelmä voidaan jakaa neljään osaan: näytteen esikäsittely- ja esirikastusvaiheeseen, rikastusvaiheeseen, maljaviljelyvaiheeseen sekä varmistusvaiheeseen. Kokonaisuudessaan ISO-menetelmän mukaiseen näytteen analysoimiseen kuluu aikaa 4 - 7 vuorokautta. (ISO 6579:2002 2013.)

ISO-menetelmän esirikastusliemenä käytetään puskuroitua peptonivettä (PPV), Ei-selektiivisen esirikastuksen tarkoituksena on vahvistaa näytteessä mahdollisesti olevaa salmonellaa siten, että se pystyy kasvamaan rikastusvaiheen selektiivisistä yhdisteistä huolimatta. (ISO 6579:2002 2013.)

Rikastusvaiheessa näytteessä mahdollisesti oleva salmonella rikastuu, ja muiden mikrobien kasvu estyy tai ne kuolevat rikastuslienen selektiivisten komponenttien ansiosta. ISO-menetelmän mukaisessa salmonellan detektoinnissa käytetään kahta, periaatteiltaan erilaista rikastusliettä rinnakkain. Nämä salmonellarikastusliemet ovat *Müller-Kauffmann* Tetrationsaatti novobiosiini -liemi (*MKTTn*), jossa selektiivisinä yhdisteinä toimivat suolat, briljantinvihreä ja novobiosiini, sekä *Rappaport-Vassiliadis*-soija-liemi (*RVS*), jonka selektiivisyys perustuu malakiitinvihreään, liemen magnesiumkloridipitoisuuteen sekä matalaan pH:seen. Lisäksi *RVS*-liemen sisältämä soijapeptoni edesauttaa salmonellan kasvua liemessä. (Corry ym. 2003.)

Salmonellan eristykseen ja viljelyyn käytetään ISO-menetelmässä kahta kiinteää kasvualustaa, joista pakollinen on *XLD*-agar. Toisena alustana voi käyttää laboratorion valitsemaa selektiivi- tai kromogeenialustaa. Rikastusliemiputkista siirrostetaan liettä

molemmille kasvualustoille, ja siirrostettuja maljoja inkuboidaan 1 - 2 vuorokautta 37 °C:ssa. (ISO 6579:2002 2013.)

Tyypillisen näköiset pesäkkeet varmistetaan biokemiallisin ja serologisin testein. Biokemiallisia varmistustestejä ovat esimerkiksi *Triple-Sugar-Iron (TSI)* -putket, ja urea-agarputket, joissa siirrostetun bakteerin tuottamat entsyymit saavat aikaan biokemiallisia reaktioita kasvualustan komponenttien kanssa. Reaktiot havaitaan värinmuutoksina putkissa. (ISO 6579:2002 2013.)

Urea-agarputkissa salmonellat eivät aiheuta biokemiallista reaktiota, sillä ne eivät muodosta ureaasia eli ovat ureaasinegatiivisia. Ureaasia muodostavat bakteerit muuttavat kasvaessaan urea-agarin värin keltaisesta punaiseksi. Ureaputkiin bakteeri siirrostetaan agarin vinopinnalle, kun taas *TSI*-putkiin bakteeri siirrostetaan sekä agarin vinopinnalle että pistoviljelynä agarin sisään. (ISO 6579:2002 2013.)

Tyypillisessä salmonellareaktiossa *TSI*-agarin pinta säilyy punaisena (laktoosi- ja sakkaroosinegatiivinen), agarin keskiosa muuttuu mustaksi (rikkivedyn muodostus) ja putken pohjalle muodostuu kaasua, joka aiheuttaa ilmakuplia agariin (kaasua glukoosista). Lisäksi pohjalla agarin väri on keltainen (happoa glukoosista), mutta tämä ei välttämättä näy, mikäli rikkivedyn muodostus on ollut voimakasta. (ISO 6579:2002 2013.)

Jos urea- ja *TSI*-putket ovat antaneet tyypillisen reaktion, tehdään agglutinaatiokoe. Koe suoritetaan polyvalenteilla seerumeilla ja salmonella-antiseerumeilla, joilla tarkastellaan sakkautumista. Jos seerumi-bakteeriseoksessa muodostuu sakkua, tulos on positiivinen. (ISO 6579:2002 2013.)

2.4 *BAX® System PCR* -menetelmä salmonellan detektointiin

BAX-PCR Salmonella -menetelmässä hyödynnetään *PCR*-tekniikkaa, johon on yhdistetty fluoresoivien leimojen käyttö *PCR*-tuotteiden mittaamiseksi. Menetelmä koostuu seuraavista vaiheista: näytteen esirikastuksesta PPV:ssä samalla tavoin kuin ISO-menetelmässä, solujen hajotuksesta valmiilla reagensseilla ja puskurilla, *BAX-PCR*-ajosta *BAX-PCR*-laitteella, *PCR*-tuotteen detektoinnista sekä positiivisen tuloksen varmistamisesta viljelemällä. *AFNOR Certificationin* (AFNOR Certification 2002) suorittamassa validointitutkimuksessa *BAX-PCR*-menetelmän suhteelliseksi tarkkuudeksi määritettiin 98,4 %, suhteelliseksi spesifisyydeksi 99,6 % ja suhteelliseksi herkkyudeksi

96,9 %, kun referenssimenetelmänä toimi ISO 6579:2002 -viljelymenetelmä. Näyttematriisina oli 425 tuotenäytettä, joista 98 kpl oli luonnollisesti kontaminoituneita, 98 kpl keinotekoisesti kontaminoituja ja 232 kontaminoitumattomia. Analysoituihin näytteisiin kuului maitotuotteita, lihaa, kalaa, vihanneksia, valmisruokia, leivonnaisia ja kananmunapohjaisia tuotteita. (AFNOR Certification 2002.)

2.5 Muut salmonellan detektointi- ja identifiointimenetelmät

Salmonellan detektointiin on saatavilla lukuisia eri menetelmiä perinteisten viljelymenetelmien lisäksi. Uusia menetelmiä on pyritty kehittämään, koska viljelymenetelmät ovat aikaa vieviä ja työläitä. (Odumeru & León-Velarde 2012.) Tässä kappaleessa on lueteltu muutamia näistä menetelmistä.

Immunomagneettisessa erottelussa (*IMS*) magneettiset partikkelit on päällystetty salmonellaspesifisillä vasta-aineilla, jotka tarttuvat esirikastettuun salmonellaan. Tämä salmonella-partikkeli-kompleksi erotetaan muusta näytteestä sähköisen magneettikentän avulla. Tätä tekniikkaa hyödyntävät tuotteissaan ainakin *Invitrogen (Dynabeads anti Salmonella)*, *LabM (Captive Salmonella)* ja *3M (Tecra Salmonella Unique)*. Menetelmän voi myös yhdistää muiden pikamenetelmien, kuten esimerkiksi *ELISA* tai *PCR*, kanssa analyysin herkkyuden parantamiseksi. (Odumeru & León-Velarde 2012.)

Agglutinaatiopikatestejä käytetään yleensä alustavien positiivisten salmonellatulosten varmistamiseen. Kaupallisia agglutinaatiotestikittejä ovat muun muassa *Remelin Remel Wellcolex Test*, *Color Salmonella*, *Oxoidin Oxoid Salmonella Latex Test* ja *Microgenin Microgen Salmonella latex confirmation assay*. (Odumeru & León-Velarde 2012.)

Entsyymivälitteisessä immunosorbenttimäärityksessä (*ELISA*) kuoppalevyn pohjalle on kiinnitetty vasta-aine, jolla näytteessä mahdollisesti olevat salmonella-antigeenit sidotaan kuoppalevyn pohjaan. Sidottuun antigeeniin liitetään vasta-ainedetektioentsyymi-kompleksi. Lopuksi kuoppalevyn kuoppiin lisätään entsyymisubstraatti-väri/fluoresoiva väriaine-yhdiste-kompleksia. Kun detektioentsyymi pilkkoo substraatin, väriaine tai fluoresoiva väriaine vapautuu, ja syntynyttä värireaktiota tai fluoresenssia mitataan kolorimetrisellä laitteella, kuten esimerkiksi menetelmään soveltuvalla spektrofotometrillä. Tällöin havaitaan, onko näytteessä salmonella-antigeenia vai ei. Kaupallisia *ELISA*-testauskittejä ovat muun muassa *BioControlin TRANSIA PLATE Salmonella Gold*, *R-Biopharm AG:n RIDASCREEN Salmonella ELISA* ja *3M:n*

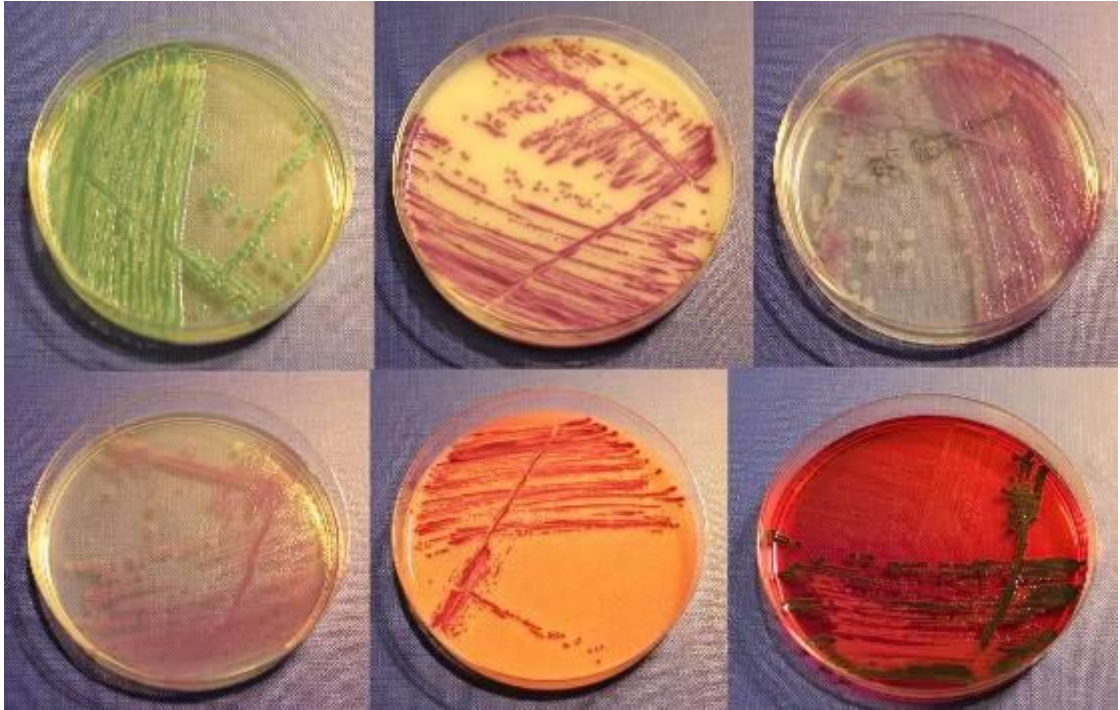
Tecra Salmonella Visual Immunoassay. Kaupallisia *ELISA*-testausjärjestelmiä valmistaa esimerkiksi *Biomérieux* (*VitekImmuno Diagnostics Assay System = VIDAS*). (Odumeru & León-Velarde 2012.)

Edellä mainittujen menetelmien lisäksi salmonellan osoittamiseen voidaan käyttää useita molekyyliagnostisia menetelmiä. Näitä ovat mm. polymeraasiketjureaktio (*PCR*), *Multiplex PCR* tai käänteistranskriptaasi-*PCR* (*RT-PCR*), jolloin detekointi tehdään esim. geelielektroforeesilla, sekä reaaliaikainen *PCR* (*qRT-PCR*). *Multiplex PCR* on *PCR*-menetelmä, jolla monistetaan useita *PCR*-tuotteita samassa ajossa, jolloin voidaan detektoida näytteestä useita patogeenejä samanaikaisesti. *PCR*-menetelmän ohessa voidaan käyttää nukleiinihappohybridisaatiota. (Odumeru & León-Velarde 2012.)

2.6 Salmonellakromogeenialustojen toimintaperiaate

Kromogeenisten alustojen toiminta perustuu elatusaineessa olevaan entsyymisubstraattiin, johon on kiinnitetty väriaine. Tämä substraatti on valittu elatusaineeseen siten, että sitä hydrolysoivat vain tiettyjen bakteerisukujen tuottamat entsyymit. Lisäksi bakteerin tunnistaminen voi tapahtua usean substraatti-kromogeeni-yhdisteen avulla. Tällöin bakteerilla tulee olla näitä kaikkia yhdisteitä hajottavia entsyymejä, jotta muodostuu tietynvärinen pesäke. Mikäli kromogeenimaljalla kasvaa muita mikrobeja, jotka eivät tuota substraattia pilkkovaa entsyymiä, muodostuu joko värittömiä tai eityypillisen värisiä pesäkkeitä. Joillakin alustoilla on useampia substraatti-kromogeenikomplekseja, jotta eri bakteerit kasvavat alustoilla erivärisinä riippuen siitä, mitä substraatti-kromogeenikompleksia ne pilkkovat. Tällöin saavutetaan suurempi spesifisyys ja herkkyys kuin perinteisillä salmonellamaljoilla, joissa hyödynnetään salmonellojen laktoosinegatiivisuutta ja kykyä tuottaa rikkivetyä. (Perry & Freydière 2007.)

Yleensä salmonellakromogeenialustojen toiminta perustuu alustojen sisältämiin α -galaktosidaasi-, β -galaktosidaasi-, β -glukosidaasi- ja esteraasientsyymien kromogeenisubstraatteihin. Näitä kromogeenisubstraatteja ovat esimerkiksi *X-Gal*, *X- α -Gal* ja *CHE-Gal*. (Manafi 2000: 212). Kuvasta 1 nähdään, että sama salmonellakanta voi kasvaa eri kromogeenimaljoilla erivärisenä ja -näköisenä riippuen kasvualustan sisältämistä substraatti-väriyhdistekomplekseista.



Kuva 1. Sama salmonellakanta voi näyttää erilaiselta maljatyypistä riippuen. *Salmonella* spp. ABC (vasen ylhäällä), Brilliance (keskellä ylhäällä), ChromID (oikea ylhäällä), CHROMagar (vasen alhaalla), Rambach (keskellä alhaalla) ja XLD (oikea alhaalla) -maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen.

Rambach ja monet muut kasvualustat sisältävät kromogeenistä substraattia β -galaktosidaasille. Tämä aiheuttaa sen, että ne patogeenit, jotka tuottavat β -galaktosidaasientsyymiä, hajottavat kromogeenisubstraatin vapauttaen tämän sisältämän väriainemolekyylin: Tällöin muun muassa *Escherichia coli* -pesäkkeet värjäytyvät sinisiksi. Rambach-maljan kyky erotella salmonellakannat muista mikrobeista perustuu siihen, että suurin osa salmonelloista ei tuota ollenkaan β -galaktosidaasia, mutta salmonelloilla on kyky fermentoida propyleeniglykolista, jolloin salmonella kasvaa maljalla punaisina pesäkkeinä. Punainen väri tulee pH-indikaattorin osoittamasta happamuuden muutoksesta (Rambach 1990.)

Esimerkiksi ABC-alustoissa on myös käytetty β -galaktosidaasin kromogeenisubstraattia salmonellakantojen ja muiden enterobakteerien erottelemiseksi salmonellan detektoinnissa. Tällä alustalla salmonellat erottuvat häiritsevästä kasvusta niiden tuottaman α -galaktosidaasin ansiosta: suuri osa salmonellakannoista tuottaa α -galaktosidaasientsyymiä, joka pilkkoo alustan sisältämän toisen kromogeenisubstraatin. Tästä seuraa se, että substraatissa oleva kromogeeni vapautuu bakteerin sisällä värjäten sen vihreäksi. ABC-agarin toimivuustutkimuksissa on todettu, että kyseinen

alusta on erittäin spesifinen, mutta ei kovin herkkä, sillä alustan selektiiviset ominaisuudet ovat heikot. (Perry ym. 1999.) Lisäksi Perry ym. (2002) totesivat laajamittaisessa mannertenvälisessä tutkimuksessa, että 45 prosenttia *Burkina Fasossa*, Afrikassa, eristetyistä salmonellakannoista eivät tuottaneet ollenkaan α -galaktosidaasia, jolloin nämä kannat olisivat jääneet detektoimatta rutiininomaisessa tarkastelussa. Tutkijat totesivat, että tästä syystä olisi ensiarvoisen tärkeää suorittaa kromogeenialustojen testaus ja validointi useilla eri maanosista eristetyillä salmonellakannoilla, jotta testauksessa voidaan huomioida kantojen väliset eroavaisuudet.

Kromogeenialustoissa hyödynnetään myös useimpien salmonellakantojen kykyä tuottaa rasvahappoestereitä esteraasientsyyminsä avulla. Harvoilla muilla enterobakteereilla on tämä entsyymi. Toisaalta muut mikrobit, kuten esimerkiksi pseudomonaat ja hiivat tuottavat esteraasientsyymejä, mutta näiden kasvu kromogeenialustalla voidaan estää selektiivisten aineiden avulla. Tämä voi tapahtua mm. siten, että kromogeeni-substraatti -kompleksiin on liitetty tiettyjen salmonellan kanssa samaa substraattia pilkkovien mikrobien kasvua estävä komponentti. Tällöin salmonellan kanssa samaa substraattia pilkkova mikrobi inhiboituu tai sen kasvu alustalla hidastuu merkittävästi. (Perry & Freydière 2007.) Tästä esimerkkinä on *Oxoidin Brilliance Salmonella* -kromogeenialusta, jossa on käytetty tätä tekniikkaa väärin positiivisten tulosten karsimiseksi tunnistuksessa (Oxoid 2010).

Vaikka kromogeenialustat eivät ole hyviä detektoitaessa salmonellaa suoraan, ilman esirikastus- ja rikastusvaiheita, maljalle viljelyistä näytteistä, joissa on paljon häiritsevää kasvua, ne voidaan yhdistää ISO-menetelmään *XLD*-maljan ohessa käytettäväksi; ISO-menetelmän salmonellaselektiivinen rikastusvaihe karsii pois häiritsevää kasvua, jolloin eri mikrobien muodostamien pesäkkeiden värierot on helpommin havaittavissa kasvualustalla. Tästä johtuen salmonellan detektointi näytteestä on huomattavasti helpompaa, koska tällöin kromogeenialustojen selektiivialustoja parempi herkkyys ja spesifisyys korostuvat. (Perry & Freydière 2007.)

3 Tutkimuksessa käytetyt selektiivi- ja kromogeenialustat

Tutkimuksessa käytettiin kaupallisia jauheesta valmistettuja tai valmiita alustoja. *XLD*-agarია käytetään ISO 6579:2002 -viljelymenetelmässä ensisijaisena kiinteänä kasvualustana. *XLD*:n rinnalla toisena alustana käytetään Valio Oy:n Mikrobiologinen laatu -

laboratoriossa *BPLS*-agarina. Testattavia alustoja *BPLS*-agarin tilalle oli kuusi. Taulukossa 1 on esitetty eri alustat, niillä valmistajien antamien tietojen mukaan tyypillisenä kasvavien salmonellapesäkkeiden väri, kasvualustoilla epätyypillisen salmonellapesäkkeen näköisenä kasvavat salmonellat sekä yleisimmät tyypillisten salmonellapesäkkeiden näköisinä kasvavat häiritsevät bakteerit.

Taulukko 1. Tutkimuksessa testatut selektiivi- ja kromogeenialustat.

| Kasvualustan nimi | Lyhenne | Tyypillisenä kasvavan salmonellapesäkkeen väri | Epätyypillisenä kasvavat salmonellat | Tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisinä kasvavat muut bakteerit |
|--|-------------------|--|---|--|
| Ksyloosi-lysiini-desoksikolaatti-agar | <i>XLD</i> | Musta / Punainen | Ei tiedossa | <i>Proteus sp.</i> |
| Briljantinvihreä-fenolipuna-laktoosi-sakkaroosi-agar | <i>BPLS</i> | Vaaleanpunainen | <i>Salmonella Typhi</i> | Jotkut laktoosi- ja sakkaroosinegatiiviset bakteerit |
| <i>Rambach</i> -agar | <i>Rambach</i> | Punainen | <i>Salmonella Typhi</i> / <i>Salmonella Paratyphi</i> | Ei tiedossa |
| <i>ChromID Salmonella</i> -agar | <i>ChromID</i> | Vaaleanpunainen / Malvanvärinen | <i>Salmonella Dublin</i> / <i>Salmonella Abortusovis</i> / <i>Salmonella Gallinarum</i> | Osa gramnegatiivisista sauvoista |
| <i>Brilliance Salmonella</i> -agar | <i>Brilliance</i> | Purppuranvärinen | <i>Salmonella Dublin</i> (hidas värinmuodostus) | Ei tiedossa |
| <i>IBISA</i> -agar | <i>IBISA</i> | Vihreä | Ei tiedossa | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| <i>Harlequin Salmonella ABC Medium</i> -agar | <i>ABC</i> | Vihreä/(Musta) | Ei tiedossa | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>E. coli</i> / <i>Klebsiella aerogenes</i> |
| <i>CHROMagar Salmonella Plus</i> -agar | <i>CHROM-agar</i> | Malvanvärinen | <i>Salmonella Dublin</i> | <i>Pseudomonas sp.</i> |

3.1 Ksyloosi-lysiini-desoksikolaatti-agar

XLD-maljat valmistettiin jauheesta (LabM: tuotenro. LAB 32, Labema) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Elatusaineen valmistusohjeet ovat liitteessä 2.

XLD-kasvualustan selektiivisyys perustuu elatusaineen sisältämien ravinteiden niukkuuteen sekä pieneen määrään natrium-desoksikolaattia. Myös elatusaineen sisältämät ksyloosi ja lyysiini suosivat salmonellan kasvua. Useat enterobakteerit tuottavat ksyloosista happoa, mutta salmonellat pilkkovat myös lyysiiniä pitääkseen kasvu ympäristön pH:n neutraalina. Kun kasvu ympäristön pH on neutraali, salmonellat pystyvät pelkistämään rikkivetyä tiosulfaattista. (LabM: XLD 2006.)

Laktoosinegatiiviset ja rikkivetypositiiviset salmonellat kasvavat maljalla tyypillisinä, muodostaen punaisia pesäkkeitä. Pesäkkeessä voi olla myös läpikuultava vaaleanpunainen reunus. Lisäksi tyypillisissä pesäkkeissä on musta keskusta, joka aiheutuu useimpien salmonellojen kyvystä pelkistää tiosulfaattia rikkivedyksi. Harvinaisemmat, laktoosinegatiiviset ja rikkivetynegatiiviset, salmonellat muodostavat vaaleanpunaisia pesäkkeitä, joissa on tummemman punainen keskusta. Laktoosiposiitiviset ja rikkivetypositiiviset salmonellat muodostavat keltaisia pesäkkeitä, joissa on musta keskusta. *Escherichia coli* sekä *Citrobacter sp.* muodostavat alustalla keltaisia pesäkkeitä. (LabM: XLD 2006.)

Kuvassa 2 on tyypillistä salmonellakasvua *XLD*-maljalla sekä varmistusviljelyä vaativaa häiritsevää kasvua: tutkimuksessa häiritsevänä bakteerina käytetty *Pseudomonas sp.* kasvoi *XLD*-maljoilla tyypillisen ja lähes tyypillisen näköisinä vaaleanpunaisina ja punaisina pesäkkeinä.



Kuva 2. *Salmonella* Abony (vasen) ja *Pseudomonas* sp. (oikea) XLD-maljoilla. Kuvan maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

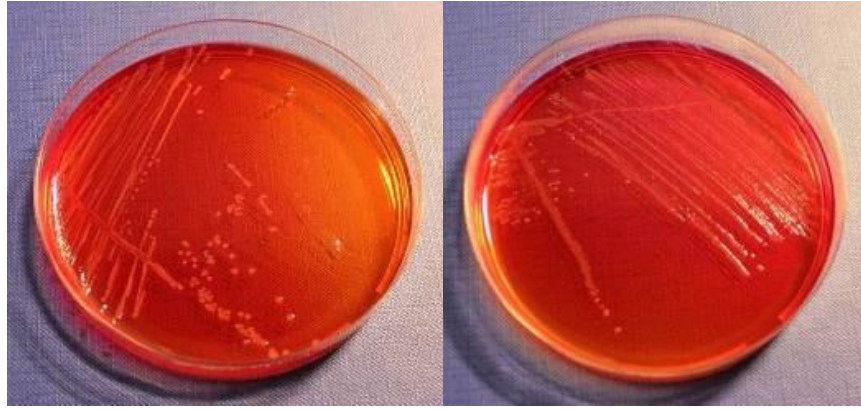
3.2 Briljantinvihreä-fenolipuna-laktoosi-sakkaroosiagar

BPLS-maljat valmistettiin jauheesta (Merck Millipore: tuotenro. 1.07237.0500, VWR) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Elatusaineen valmistusohjeet ovat liitteessä 2.

BPLS-kasvualustan selektiivisyys perustuu alustan sisältämään briljantinvihreään, joka estää grampositiivisten bakteerien, kuten esimerkiksi *Bacillus cereus* -bakteerin, ja myös monien gramnegatiivisten bakteerien kasvua. Alusta sisältää kahta sokeria, laktoosia ja sakkaroosia. Fenolipuna on pH-indikaattori, joka muuttaa alustan värin keltaiseksi pH:n laskiessa: pH laskee, kun alustalla kasvavat mikrobit pilkkovat sokeria tuottaen happoa. Suurin osa salmonelloista on laktoosi- ja sakkaroosinegatiivisia. (Merck Millipore: BPLS 2008.)

Laktoosinegatiiviset ja rikkivetypositiiviset salmonellat kasvavat *BPLS*-maljalla kiiltävänä, vaaleanpunaisina pesäkkeinä, joita ympäröi vaaleanpunainen tai punainen vyöhyke. Salmonellat kasvavat alustalla tyypillisinä ja hyvin, mutta maljan spesifisyys on heikko, sillä myös useat muut bakteerit kasvavat *BPLS*-maljoilla tyypillisen salmonellakasvun näköisinä. Laktoosi- tai sakkaroosipositiviset mikrobit ovat *BPLS*-maljalla keltavihreitä, ja niitä ympäröi maljalla keltavihreä alue. Tällaisia pesäkkeitä muodostavia bakteereita ovat muun muassa *Escherichia coli* sekä *Citrobacter* ja klebsiellat. Alusta ei sovellu *Salmonella* Typhin määrittämiseen näytteestä. (Merck Millipore: BPLS 2008.)

Kuvassa 3 on tyypillisen näköinen salmonellakasvu verrattuna tyypillisen salmonellakasvun näköiseen häiritsevään kasvuun *BPLS*-maljoilla. Molemmat bakteerit kasvavat vaaleanpunaisina pesäkkeinä, jolloin kuvan salmonellaa ja pseudomonasta on hyvin vaikea erottaa toisistaan.



Kuva 3. *Salmonella* Abony (vasen) ja *Pseudomonas* sp. (oikea) BPLS-maljoilla. Kuvan maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

3.3 *Rambach*-agar

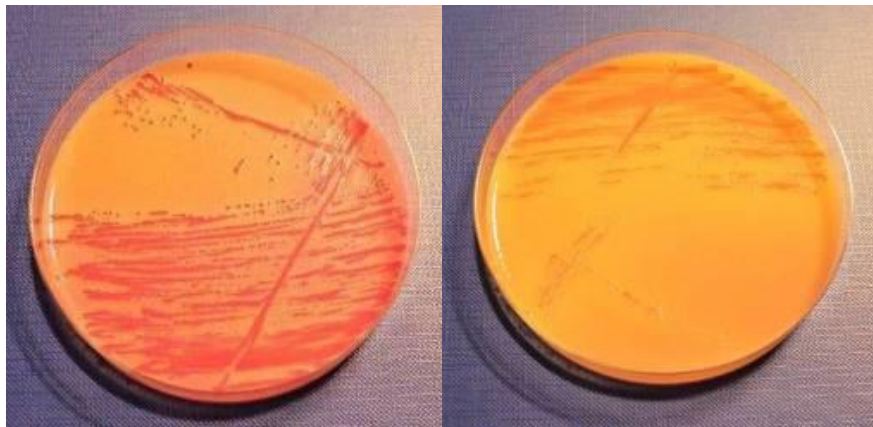
Rambach-alustat valmistettiin jauheesta sekä lisäaineesta (Merck Millipore: tuotenro. 1.07500.0001, VWR) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Valio Oy:n Mikrobiologinen laatu-laboratoriossa *Rambach*-alustaa on käytetty apuna ISO-menetelmän viljelytulosten varmistamisessa. Elatusaineen valmistusohjeet ovat liitteessä 3.

Samoin kuin *XLD*-kasvualustassa *Rambach*-agarin selektiivisyys perustuu elatusaineen sisältämään natrium-desoksikolaattiin, joka inhiboi erityisesti grampositiivisten bakteerien kasvua. Kuitenkin natrium-desoksikolaatin konsentraatio on alustassa niin pieni, että se ei inhiboi gramnegatiivisten ja enterobakteerien kasvua. Beeta-galaktosidaasientsyymiä tuottavat koliformit pilkkovat alustan sisältämää kromogeeni-substraattia (*X-Gal*) siten, että ne muodostavat sinivihreitä tai sinivioletteja pesäkkeitä. Alustaan on lisätty propyleeniglykolia, jota salmonellat fermentoivat tuottaen siitä happoa. Tämä aiheuttaa yhdessä pH-indikaattorivärin kanssa sen, että tyypilliset pesäkkeet (laktoosinegatiiviset ja rikkivetypositiiviset salmonellat) kasvavat maljalla punaisina, violetteina tai vaaleanpunaisina pesäkkeinä. (Rambach 1990.) Muut enterobakteerit ja gramnegatiiviset bakteerit, kuten esimerkiksi proteukset ja pseudomonaat, kasvavat alustalla joko keltaisina tai värittöminä (Merck Millipore: Rambach 2008).

Salmonella arizonae -kannat fermentoivat laktoosia, jolloin ne muodostavat *Rambach*-alustalla violetteja tai sinisiä pesäkkeitä. *Salmonella* Typhi ja *Salmonella* Paratyphi -serotyypit sekä harvinaisemmat *Salmonella* Moscow ja *Salmonella* Wassenaar -

serotyypit kasvavat maljalla värittöminä, koska ne eivät tuota happoa propyleeniglykolista. (Manafi 2000: 212.)

Kuvassa 4 on tyypillisen näköinen salmonellakasvu verrattuna lähes tyypilliseen salmonellakasvun näköiseen häiritsevään kasvuun *Rambach*-maljoilla. Molemmat bakteerit kasvavat vaaleanpunaisina pesäkkeinä, jolloin kuvassa vasemmalla olevaa salmonellaa ja oikealla olevaa pseudomonasta on hyvin vaikea erottaa toisistaan. Vaikka tässä tapauksessa tyypillinen salmonellakasvu ja häiritsevä kasvu voidaan erottaa kasvun runsauden ja värireaktion voimakkuuden perusteella, häiritsevä jouduttaisiin silti varmistamaan jatkoviljelyiden avulla.

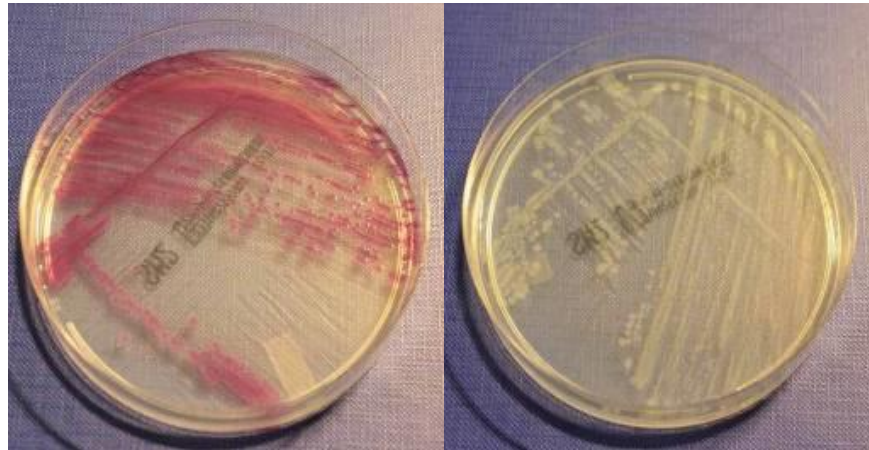


Kuva 4. *Salmonella* Abony (vasen) ja *Pseudomonas* sp. (oikea) *Rambach*-maljoilla. Kuvan maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

3.4 *ChromID Salmonella* -agar

ChromID Salmonella -maljat tilattiin valmiina maljoina *Biomerieux*:ltä (Biomerieux: tuotenro. 43 621). *ChromID*-maljojen kromogeenisyys perustuu esteraasi-, β -glukosidaasi- ja β -galaktosidaasientsyymeille tarkoitettuihin substraatteihin. Salmonellakannat tuottavat esteraasientsyymiä, mutta eivät β -glukosidaasi- ja β -galaktosidaasientsyymejä. Tämä aiheuttaa sen, että salmonellapesäkkeet kasvavat maljalla vaaleanpunaisina malvanvärisinä tai violetteina, ja muut mikrobit muodostavat muun muassa turkooseja, vaaleansinisiä tai värittömiä pesäkkeitä. Alusta inhiboi suurta osaa grampositiivisista bakteereista sekä hiivoja ja monia gramnegatiivisia bakteereja. Alustalla voidaan erottaa myös laktoosiposiivisia salmonelloja, kuten esimerkiksi *Salmonella* Typhi ja *Salmonella* Paratyphi. Osa muista gramnegatiivisista bakteereista salmonellan lisäksi voi muodostaa *ChromID*-alustalla tyypillisen näköisiä pesäkkeitä. Jotkin salmonellat, erityi-

sesti *Salmonella* Dublin, voivat muodostaa värittömiä tai vaaleita pesäkkeitä. (Biomérieux 2007: ChromID.) Kuvasta 5 havaitaan, että *Salmonella* Dublin kasvaa *ChromID*-maljalla värittömänä eli epätyypillisen näköisenä, kun tyypillisen näköinen salmonellakasvu on violetin tai malvanväristä. Kuvassa olevia maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan. Kun maljoja oli inkuboitu kahden vuorokauden ajan, *Salmonella* Dublin -pesäkkeisiin alkoi muodostumaan hailakkaa malvanväriä.



Kuva 5. *Salmonella* Abony (vasen) ja *Salmonella* Dublin (oikea) *ChromID Salmonella* -maljoilla. Kuvan maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

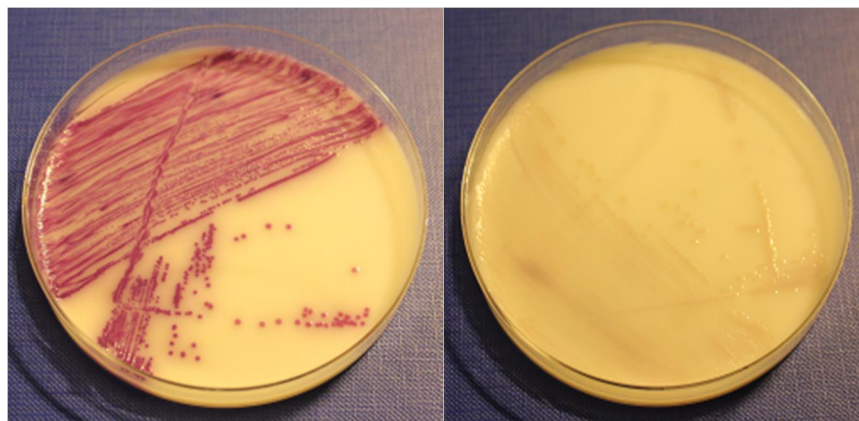
Vuonna 2009 tehdystä tutkimuksesta (Van Dijk ym. 2009) testattiin *ChromID Salmonella* -agarin toimivuutta salmonellalla (n=34) ja muilla mikrobeilla (n=19). Tällöin maljatyypin herkkyudeksi määritettiin 94,1 prosenttia (yhden ja kahden vuorokauden inkubointi) ja spesifisyydeksi 89,5 prosenttia (yhden vuorokauden inkubointi) sekä 78,9 prosenttia (kahden vuorokauden inkubointi).

3.5 *Brilliance Salmonella* -agar

Brilliance Salmonella -maljat (Oxoid: tuotenro. CM1092) tilattiin valmiina *Fisher Scientificilta*. (Oxoid: Brilliance Salmonella 2010.) *Brilliance*-alusta sisältää substraatin kaprylaatti-esteraasi- ja β -glukosidaasientsyymeille. Salmonellat tuottavat kaprylaatti-esteraasientsyymiä, jolloin ne muodostavat alustalla violetin-, purppuran- tai malvanvärisiä pesäkkeitä. On olemassa muitakin enterobakteereja, jotka tuottavat kaprylaatties-teraasientsyymiä, mutta myös β -glukosidaasientsyymiä, jota salmonella ei tuota. Tästä syystä nämä enterobakteerit muodostavat alustalle sinisiä, tummansinisiä tai liiloja pesäkkeitä. Alusta sisältää erityisesti *Escherichia coli*n, mutta myös muiden mikrobien kasvua estäviä molekyylejä, jotka on sidottu β -glukosidaasientsyymien substraattiin. Kun

tämä substraatti-inhiboiva molekyyli-kompleksi joutuu mikrobin sisään, kompleksi hajoaa, ja inhiboiva molekyyli vapautuu estäen mikrobin soluseinäsynteesin ja näin ollen aiheuttaen mikrobin kuoleman. Jos mikrobi ei tuota kompleksia pilkkovaa entsyymiä, kompleksi säilyy ehjänä, eikä se tällöin ole mikrobille haitallinen. (Oxoid: Brilliance Salmonella 2010.)

Monet gramnegatiiviset bakteerisuvut voidaan erottaa alustalta salmonelloista niiden muodostamien pesäkkeiden värin perusteella. Esimerkiksi *Citrobacterit* kasvavat alustalla värittöminä, ja klebsiellat enterobakteerit sekä serratiat kasvavat sinisinä pesäkkeinä. Jotkin pseudomonaat voivat kasvaa salmonellan näköisinä pesäkkeinä. *Brilliance Salmonella* -alusta soveltuu elintarvikenäytteiden analysoimiseen ISO 6579:2002 -standardin mukaisesti, mutta valmistaja ei suosittele sen käyttämistä *Salmonella* Typhi ja *Salmonella* Paratyphi -serotyypin eristämiseen. *Salmonella* Dublin -kannat voivat kasvaa *Brilliance*-alustalla värittöminä tai vaaleina pesäkkeinä. (Oxoid: Brilliance Salmonella 2010.) Kuvasta 6 havaitaan, että *Salmonella* Dublin kasvaa *Brilliance*-maljalla värittömänä eli epätyypillisen näköisenä samalla tavoin kuin *ChromID*-maljoilla. Kuvassa olevia maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan. Kun maljoja oli inkuboitu kahden vuorokauden ajan, *Salmonella* Dublin -pesäkkeisiin alkoi muodostumaan hailakkaa malvanväriä.

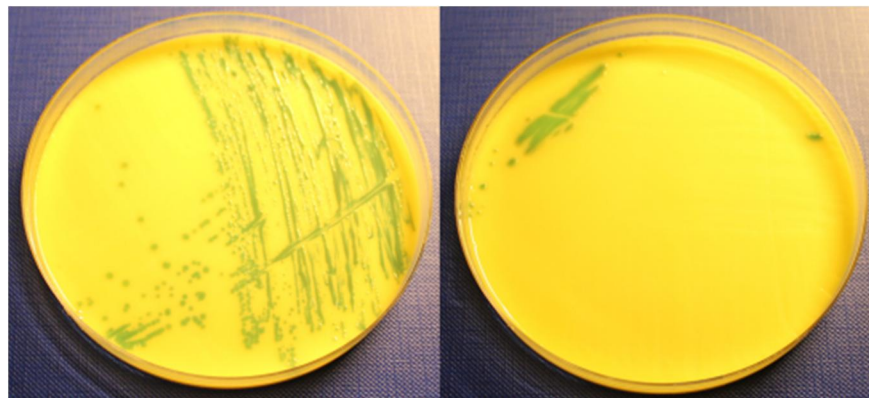


Kuva 6. *Salmonella* Abony (vasen) ja *Salmonella* Dublin (oikea) *Brilliance Salmonella* -maljoilla. Kuvan maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

3.6 IBISA-agar

IBISA-agar (AES Chemunex: tuotenro. AEB520060) tilattiin valmiina maljoina Biomérieux:ltä. Maljan toiminta perustuu esteraasientsyymien substraatteihin. Salmo-

nellat tuottavat esteraasientsyymejä, jotka pilkkovat kromogeenia sisältävää substraattia muodostaen vihreitä pesäkkeitä. Alusta sisältää esteraasientsyymisubstraattien lisäksi β -galaktosidaasientsyymien substraattia, jolloin β -galaktosidaasia tuottavat muut enterobakteerit muodostavat vaaleanpunaisia tai violetteja pesäkkeitä. Salmonellat eivät tuota β -galaktosidaasia. Jotkin mikrobit voivat kasvaa myös värittöminä pesäkkeinä. *IBISA*-maljoilla voidaan erotella myös laktoosiposiitivisia salmonellakantoja, kuten esimerkiksi *Salmonella* Typhi ja *Salmonella* Paratyphi. Maljan keltainen väri helpottaa tulosten lukemista maljalta luomalla kontrastia pesäkkeiden värin ja maljan välille. *IBISA*-malja sisältää muiden enterobakteerien kasvua estäviä yhdisteitä. Kuitenkin pseudomonaat voivat kasvaa *IBISA*-maljoilla salmonellan näköisinä pesäkkeinä. (AFNOR Certification 2011.) Kuvasta 7 voidaan havaita, että *Pseudomonas sp.* voi kasvaa tyypillisen värisenä *IBISA*-maljalla.



Kuva 7. *Salmonella* Abony (vasen) ja *Pseudomonas sp.* (oikea) *IBISA*-maljoilla. Kuvan maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

AFNOR Certificationin (AFNOR Certification 2011) suorittamassa alustan validointitutkimuksessa *IBISA*-maljan suhteelliseksi oikeellisuudeksi saatiin 91,9 prosenttia, suhteelliseksi herkkyudeksi 89,7 prosenttia ja suhteelliseksi spesifisyydeksi 93,8 prosenttia verrattuna ISO 6579:2002 -menetelmään. Näytematriisina tutkimuksessa oli 395 tuotennäytettä, joista 49 oli luonnollisesti kontaminoituneita, 149 kpl keinotekoisesti kontaminoituja ja 197 kontaminoimattomia. Näytteisiin lukeutui liha- ja maitotuotteita, vihanneksia, mereneläviä, eläinrehuja, kananmunia ja kananmunaa sisältäviä tuotteita sekä leivonnaisia. Samaisen validointitutkimuksen yhteydessä suoritettussa laboratorioiden välisessä vertailukokeessa maljan herkkyudeksi määritettiin 99,5 prosenttia ja spesifisyydeksi 100,0 prosenttia. Valmistajan mukaan alusta soveltuu eläinrehu- ja elintarvike- sekä ympäristönäytteiden, poislukien alkutuotannon näytteet, analysointiin. (AFNOR Certification 2011.)

3.7 *Harlequin Salmonella ABC Medium* -agar

Harlequin Salmonella ABC Medium -maljat valmistettiin jauheesta (LabM: tuotenro. HAL001, Labema Oy) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Elatusaineen valmistusohjeet ovat liitteessä 3.

Tyypillisissä salmonellapesäkkeissä on *ABC*-maljalla vihreä keskusta ja vaaleanvihreä tai vaalea reunus. Pesäkkeiden väri muodostuu siten, että salmonellat hydrolysoivat tuottamansa α -galaktosidaasientsyymien avulla *X- α* -galaktoosisubstraattia, joka pilkkoutuessaan vapauttaa sisältämänsä kromogeenin. (LabM: *Harlequin Salmonella ABC* 2006.)

Maljatyypillä epätyypillisen näköisenä kasvavat mikrobit tuottavat β -galaktosidaasientsyymiä, joka hajottaa *CHE*-galaktoosisubstraattia, jolloin muodostuu yhdessä alustan sisältämän ammoniumrautasitraatin kanssa mustia pesäkkeitä. Mustia pesäkkeitä muodostavat esimerkiksi *Escherichia coli*, *Citrobacter sp.* ja *Klebsiella aerogenes*. Shigellat kasvavat *ABC*-maljoilla värittöminä, paitsi jos ne tuottavat β -galaktosidaasientsyymiä, jolloin ne muodostavat mustia pesäkkeitä. Proteukset ja pseudomonaatit kasvavat elatusaineella värittöminä tai kellertävinä pesäkkeinä, poikkeuksena *Pseudomonas aeruginosa*, joka voi kasvaa myös vihreinä pesäkkeinä. (LabM: *Harlequin Salmonella ABC* 2006.)

Jotkin laktoosipositiiviset salmonellat, kuten esimerkiksi *Salmonella arizonae*, tuottavat β -galaktosidaasientsyymiä, ja kasvavat maljalla mustina pesäkkeinä. Tällaisia β -galaktosidaasientsyymiä tuottavia salmonellaserotyyppejä on hyvin vaikea erottaa muista *ABC*-maljalla mustia pesäkkeitä muodostavista mikrobeista. (Perry ym. 1999.)

Perryn ym. (1999) tutkimuksessa *Harlequin Salmonella ABC* -maljan herkkyys oli 99,7 prosenttia ja spesifisyys oli 90,5 prosenttia. Kuitenkin Nye ym. (2002) totesivat tutkimuksessaan, että *ABC*-kasvatusalusta on erittäin spesifinen, mutta häiritsevä kasvu alustalla on voimakasta elatusaineen heikon selektiivisyyden vuoksi, mikä vaikuttaa heikentävästi myös maljan herkkyyteen. Lisäksi Perry ym. (2002) totesivat laajamittaisessa mannertenvälisessä tutkimuksessa, että 45 prosenttia *Burkina Fasossa*, Afrikassa eristetyistä salmonellakannoista eivät tuottaneet ollenkaan α -galaktosidaasia, jolloin nämä kannat olisivat jääneet detektoimatta rutiininomaisessa tarkastelussa.

Kuvassa 8 ovat *Salmonella arizonae* ja *Enterobacter cloacae* -bakteerit, joiden muodostamia pesäkkeitä on mahdotonta erottaa toisistaan ABC-maljoilla. *Salmonella arizonae* kasvu ABC-maljalla on epätyypillisen näköistä eli pesäkkeet ovat mustia ja kiiltäviä.



Kuva 8. *Salmonella arizonae* (vasen) ja *Enterobacter cloacae* (oikea) Harlequin Salmonella ABC Medium -maljoilla. Kuvan maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

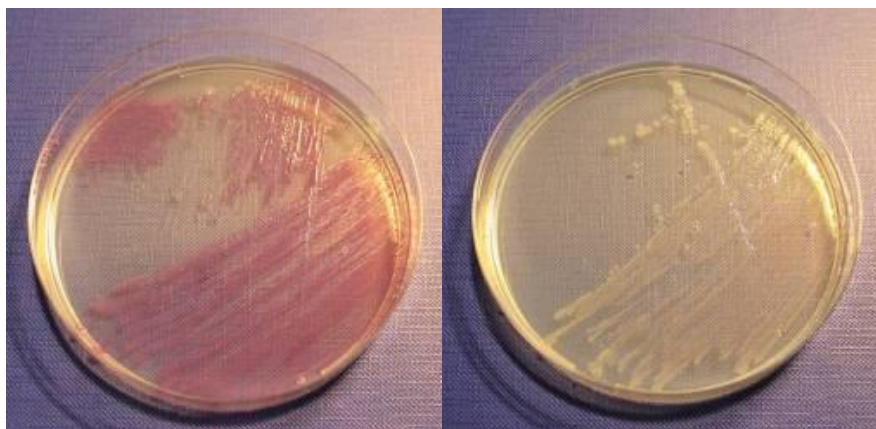
3.8 CHROMagar Salmonella Plus -agar

CHROMagar Salmonella Plus -maljat (CHROMagar: tuotenro. SA162, Labema) valmistettiin jauheesta ja lisäaineesta valmistajan ohjeiden mukaisesti. Elatusaineen valmistusohjeet ovat liitteessä 4.

Tyypilliset salmonellapesäkkeet ovat alustalla violetteja tai malvanvärisiä. Alustalla voidaan eristää myös *Salmonella* Typhi ja laktoosiposiitivisia salmonelloja, mutta *Salmonella* Dublin voi muodostaa värittömiä tai vaaleita pesäkkeitä. Muut gramnegatiiviset bakteerit kasvavat maljalla yleensä sinisinä, turkooseina tai värittöminä, kuten esimerkiksi jotkut proteukset ja *Escherichia coli*, pesäkkeinä. Jotkin *Escherichia coli* ja *Pseudomonas* -kannat voivat kuitenkin kasvaa hailakan malvanvärisinä tai violetteina, mikä voi aiheuttaa vääriä positiivisia tunnistuksia maljojenlukuvaiheessa. (CHROMagar 2011.) Tämä todettiin myös Gaillot:n ym. (1999) suorittamassa tutkimuksessa, jossa *Pseudomonas aeruginosa* aiheutti vääriä positiivisia tunnistuksia maljojenlukuvaiheessa.

Kuvassa 9 on tyypillinen salmonellakasvu ja epätyypillinen salmonellakasvu. Tyypillisenväriset salmonellapesäkkeet kasvavat CHROMagar-maljalla violetteina tai malvan-

värisinä, mutta *Salmonella* Dublin kasvaa alustalla värittömänä. Kuvassa olevia maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan. Kun maljoja oli inkuboitu kahden vuorokauden ajan, *Salmonella* Dublin -pesäkkeisiin alkoi muodostumaan hailakkaa malvanväriä.



Kuva 9. *Salmonella* Abony (vasen) ja *Salmonella* Dublin (oikea) *CHROMagar Salmonella Plus* -maljoilla. Kuvan maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

Gaillot ym. (1999) tekemässä tutkimuksessa *CHROMagar Salmonella Plus* -maljan herkkyudeksi määritettiin suoraan näytteestä viljeltynä 95 prosenttia ja esirikastuksen jälkeen 100 prosenttia. Samassa tutkimuksessa maljan spesifisyydeksi määritettiin 88,9 prosenttia. Näytematriisina toimi 508 ulostenäytettä, joista 20 oli salmonellapositiivisia.

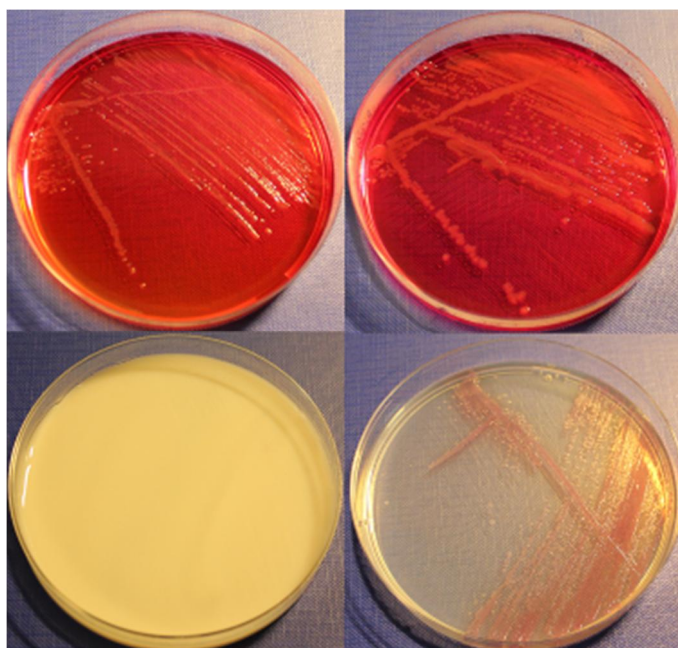
Lisäksi de Beaumont ym. (2006) tutkimuksessaan testasivat maljan spesifisyyttä 76 laktoosinegatiivisella salmonellaserotyypillä, joista *CHROMagar Salmonella* -maljalla tyyppillisen näköisiä pesäkkeitä muodosti 75 kantaa (99 prosenttia kaikista). Laktoosinegatiiviset serotyypit sisälsivät myös *Salmonella* Typhi ja *Salmonella* Paratyphi -kantoja. Samaisessa tutkimuksessa testattiin maljan toimivuutta myös 33 laktoosipositivisella kannalla. Tällöin *CHROMagar*-maljoilla tyyppillisenä näistä kasvoi 27 salmonellakantaa eli maljalta voitiin detektoida 82 prosenttia laktoosipositivisista salmonellakannoista.

4 Pseudomonaat

Pseudomonaat ovat suorita tai hieman käyriä, gramnegatiivisia sauvoja. Yleensä niillä on yksi tai useampi flagella. Pseudomonaat ovat pääsääntöisesti aerobisia, mutta jotkin kannat voivat kasvaa myös anaerobisissa olosuhteissa, mikäli ympäristössä on nitraattia. Jotkin pseudomonas-kannat ovat patogeenisiä tai opportunistisesti patogeenisiä. Bakteeria esiintyy kaikkialla luonnossa. (Brenner ym. 2005: 323.)

Pseudomonaat kasvavat lämpötila-alueella 4 - 45 °C, ja suurimmalla osalla optimikasvulämpötila on 28 °C. Pseudomonaat eivät siedä happamia olosuhteita, eli ne eivät pysty kasvamaan ympäristössä, jonka pH on alle 4,5. (Brenner ym. 2005: 328-330.)

Kuten kuva 10 osoittaa, Pseudomonaat voivat kasvaa häiritsevästi kasvuna salmonellan detektointiin käytetyillä elatusaineilla ja lähes tyypillisen salmonellapesäkkeiden näköisinä pesäkkeinä. Toisaalta, hyvin usein kasvu ei ole yhtä runsasta kuin salmonellalla, johtuen seuraavista tekijöistä: elatusaineet usein sisältävät myös pseudomonaiden kasvua inhiboivia yhdisteitä, ISO-menetelmän salmonellaselektiivinen rikastusvaihe karsii häiritsevien bakteerien kasvua sekä pseudomonaiden optimikasvulämpötilan alhaisuudesta.



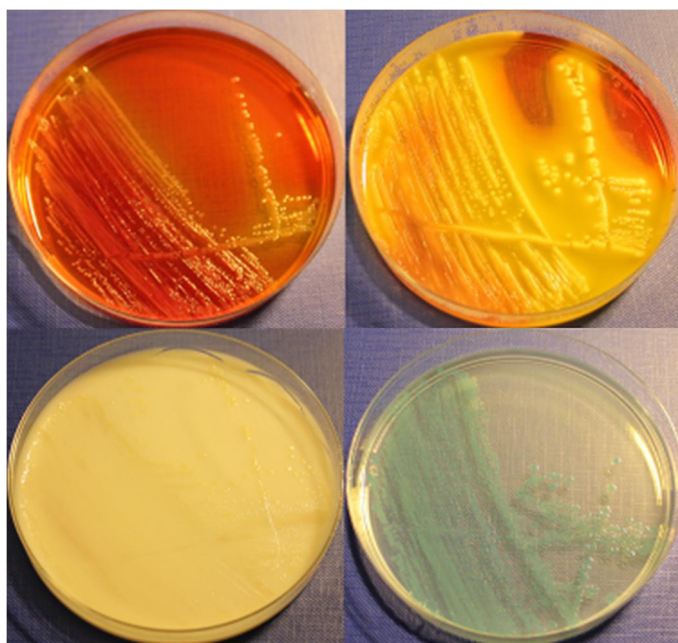
Kuva 10. *Pseudomonas* sp. BPLS (vasen ylhäällä), XLD (oikea ylhäällä), Brilliance (vasen alhaalla) ja CHROMagar (oikea alhaalla) -maljoilla. Kuvan maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

5 *Citrobacter*-suku

Citrobacterit ovat gramnegatiivisia sauvoja. Yleensä niillä on flagella. *Citrobacterit* ovat fakultatiivisesti anaerobeja. Useimmat lajit pystyvät käyttämään sitraattia yksittäisenä hiilenlähteenä. Osa lajeista voi olla patogeenisiä tai opportunistisesti patogeenisiä. *Citrobactereja* esiintyy maaperässä, vedessä ja jätevedessä sekä elintarvikkeissa. (Brenner ym. 2005: 651.)

Citrobacterit eivät yleensä fermentoi laktoosia, mutta ne tuottavat β -galaktosidaasia, ja fermentoivat muun muassa L-arabinoosia, maltoosia, D-ksyloosia, D-mannitolia ja D-sorbitolia. Suurin osa kannoista tuottaa rikkivetyä *Triple-Sugar-Iron* -agarilla (*TSI*), mikä voi vaikeuttaa ISO-menetelmän mukaisten varmistustestien tulkintaa. Lisäksi *Citrobacterit* voivat kasvaa *BPLS*-kasvualustalla tyypillisen näköisinä, mikäli ne fermentoivat laktoosia hitaasti. (Brenner ym. 2005: 651 - 652.)

Kuvasta 11 voidaan nähdä, miten tutkimuksessa käytetty *Citrobacter sp.* (M5265) kasvoi erilaisilla salmonella-alustoilla puhtasviljelmänä. *BPLS*-alustalla bakteeri kasvoi paikoitellen jopa tyypillisen salmonellakasvun näköisenä, mutta muilla alustoilla bakteeri kasvoi selkeästi epätyypillisen näköisinä pesäkkeinä.



Kuva 11. *Citrobacter sp.* *BPLS* (vasen ylhäällä), *XLD* (oikea ylhäällä), *Brilliance* (vasen alhaalla) ja *CHROMagar* (oikea alhaalla) -maljoilla. Kuvan maljoja on inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37°C:ssa.

KOKEELLINEN OSUUS

6 Materiaalit ja menetelmät

Ennen validointia tehtiin alustava maljavertailu, jonka perusteella oli tarkoitus rajata pois huonoiksi havaitut kasvualustat. Valinnassa kiinnitettiin huomiota pääasiassa elatusaineiden herkkyteen ja spesifisyyteen. Eri maljoiden toimivuuden välillä havaittiin merkittäviä eroja jo alustavan maljavertailun aikana, siirrostettaessa maljoille puhdasviljelmiä. Tulosten perusteella alustavan maljavertailun jälkeen karsittiin pois neljä kasvualustaa: *ChromID Salmonella*, *Harlequin Salmonella ABC Medium*, *IBISA* ja *Rambach* -maljat.

Tutkimuksen varsinaisessa validointivaiheessa verrattiin *CHROMagar Salmonella Plus* ja *Brilliance Salmonella* -kasvualustojen toimivuutta sekä keskenään että nykyisin ISO-menetelmässä käytössä olevien *XLD*- ja *BPLS*-maljoiden toimivuuteen. Vertailu suoritettiin ISO-menetelmän mukaisessa viljelyssä eri matriiseilla, jotka oltiin keinotekoisesti kontaminoitu salmonellalla ja häiritsevällä bakteerilla. Tulokseksi saatiin, että kromogeenialustat olivat ISO-menetelmässä käytettyjä selektiivialustoja huomattavasti herkempiä ja spesifisempiä. Keskinäisessä vertailussa paremmaksi osoittautui *Oxoidin* valmistama ja *Fisher Scientificin* toimittama *Brilliance Salmonella* -malja, vaikka *CHROMagarin* valmistama ja Labema Oy:n toimittama *CHROMagar Salmonella Plus* -malja olisi soveltunut myös hyvin ISO-menetelmän mukaiseen näytteiden tutkimiseen.

Lisäksi oli tarkoitus suorittaa alustavaa validointia tuotantoympäristön lattiakaivovesinäytteille *Salmonella BAX-PCR* -pikamenetelmän mukaiseen analysointiin, maljavalioidinnin ohessa. *BAX-PCR*-tulosten ja ISO-menetelmän antamien tulosten perusteella lattiakaivovesinäytteet soveltuvat analysoitaviksi *BAX-PCR Salmonella* -menetelmällä, joten validointia on kannattavaa jatkaa tämän näytetyypin osalta. Kappale käsittää tutkimuksessa käytetyt elatusaineet, bakteerit ja välineistön. Lisäksi kappaleessa on käyty läpi tutkimusmenetelmät, ja niiden toteuttaminen tutkimuksessa.

6.1 Tutkimuksessa käytetyt elatusaineet

6.1.1 Liemet

- Kasvatusliemi: *Brain-Heart-Infusion* -rikastusliemi (*BHI*)
 - o LabM: tuotenro. LAB049
 - o Toimittaja: Labema Oy
 - o exp. 2015/11
 - o Valmistusohje liitteessä 5

- Laimennosliemi: Peptonivesi (*PV*)
 - o LabM: tuotenro. MC024
 - o Toimittaja: Labema Oy
 - o exp. 2014/11

- Esirikastusliemi: Puskuroitu peptonivesi (*PPV*)
 - o Merck: tuotenro. 1.07228.0500
 - o Toimittaja: VWR
 - o exp. 2017/08
 - o Valmistusohje liitteessä 5

- Rikastusliemi: *Müller-Kauffmann* Tetrationsaatti-novobiosiini (*MKTTn*)
 - o bioTRADING: tuotenro. K820B010AA
 - o Toimittaja: Labema Oy
 - o exp. 2014/03

- Rikastusliemi: *Rappaport-Vassiliadis-Soija* (*RVS*)
 - o LabM: tuotenro. LAB086
 - o Toimittaja: Labema Oy
 - o exp. 2016/04
 - o Valmistusohje liitteessä 5

6.1.2 Agaralustat

Tutkimuksessa käytettiin ISO-menetelmässä nykyisin käytettävien *XLD*- ja *BPLS*-maljojen lisäksi kuutta eri kromogeenialustaa. Taulukossa 2 on lueteltu tutkimuksen

selektiivi- ja kromogeeniagarit, niiden valmistajat ja toimittajat. Tämän lisäksi taulukossa on myös tutkimusta varten tilattujen elatusaineiden toimitusajat sekä kaikkien kasvualustojen pakkausmuodot.

Taulukko 2. Eri maljatyypit, ja niiden keskeiset tiedot.

| Maljatyypit | Valmistaja | Tuotenumero | Toimittaja | Toimitusaika | Pakkausmuoto |
|--|---------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------|----------------------|
| <i>XLD</i> | <i>LabM</i> | LAB 32 | Labema Oy | - | Jauhe |
| <i>BPLS</i> | <i>Merck</i> | 1.07237.0500 | VWR | - | Jauhe |
| <i>Rambach</i> | <i>Merck</i> | 1.07500.0001 | VWR | - | Jauhe + supplementti |
| <i>ChromID Salmonella</i> | <i>Biomérieux</i> | 43 621 | <i>Biomérieux</i> | - | Valmismalja |
| <i>Brilliance Salmonella</i> | <i>Oxoid</i> | CM1092 | <i>Fisher Scientific Oy</i> | 3 - 4 vko | Valmismalja |
| <i>Harlequin Salmonella ABC Medium</i> | <i>LabM</i> | HAL001 | VWR | - | Jauhe |
| <i>CHROMagar Salmonella Plus</i> | <i>CHROMagar</i> | SA162 | Labema Oy | 2 - 3 vko | Jauhe + supplementti |
| <i>IBISA</i> | <i>AES Chemunex</i> | AEB520060 | <i>Biomérieux</i> | 1,5 kk | Valmismalja |

Kantojen tuoreuttamiseen ja puhdasviljelyiden tekemiseen käytettiin Tryptoni-soija-agarmaljoja (TSA), jotka valmistettiin jauheesta (LabM: tuotenro. LAB 11, exp. 2016/10, Labema Oy). Tämä kasvatusalusta on yleisalusta, jolla kasvavat kaikki bakteerit. TSA-kasvatusalustan valmistusohjeet löytyvät liitteestä 4.

6.1.3 Varmistustestit

- *Triple Sugar Iron* -putket (TSI)
 - o LabM: tuotenro. LAB053
 - o Toimittaja: Labema Oy
 - o exp. 2014/10
 - o Valmistusohje liitteessä 6

- Urea-agar-putket (Urea)
 - o LabM: tuotenro. LAB130
 - o Toimittaja: Labema Oy
 - o exp. 2016/07
 - o Valmistusohje liitteessä 6

6.2 Tutkimuksessa käytettävät bakteerit

Tutkimukseen valittiin eri salmonelloja (n=12), muita gramnegatiivisia bakteereja (n=16) sekä grampositiivinen bakteeri (n=1). Salmonellat valittiin siten, että saatiin eri kromogeenialustoilla sekä tyypillisiä että epätyypillisiä salmonellapesäkkeitä muodostavia bakteereja. Esimerkkinä harvinaisemmista salmonelloista olivat laktoosiposiitiviset salmonellat *Salmonella arizonae* ja *Salmonella diarizonae*. Muut bakteerit valittiin sen perusteella, miten niitä esiintyy elintarviketeollisuudessa. Osa valituista muista bakteerilajeista, kuten esimerkiksi *Citrobacter freundii* ja *Pseudomonas* sp., kasvaa tutkimusten (Gaillot ym. 1999; Cassar & Cuschieri 2003; Rambach 1990; Perry ym. 1999; Cooke ym. 1999) perusteella yhdellä tai usealla tutkimukseen valitulla kromogeenialustalla salmonellan näköisinä pesäkkeinä. Grampositiivinen bakteeri oli mukana tutkimuksessa testaamassa alustojen selektiivisyyttä. Taulukossa 3 on lueteltu tutkimuksessa käytetyt bakteerit ja niiden alkuperä.

Taulukko 3. Tutkimuksessa käytetyt bakteerit ja niiden alkuperä.

| | Bakteerin nimi | Kannan numero |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| Salmonellat | <i>Salmonella</i> Abony | M3790* |
| | <i>Salmonella</i> Infantis | M3267* |
| | <i>Salmonella</i> sp. | M2275* |
| | <i>Salmonella</i> Senftenberg | M2278* |
| | <i>Salmonella</i> Dublin | M3266* |
| | <i>Salmonella</i> Stockholm | M3485* |
| | <i>Salmonella</i> Agona | M3615* |
| | <i>Salmonella</i> Bovismorbificans | M3331* |
| | <i>Salmonella arizonae</i> | ATCC 13314 |
| | <i>Salmonella diarizonae</i> | ATCC 12325 |
| | <i>Salmonella enterica</i> | ATCC 51741 |
| | <i>Salmonella</i> Enteritidis | ATCC 13076 |
| Häiritsevät bakteerit | <i>Acinetobacter baumannii</i> | ATCC 19606 |
| | <i>Citrobacter freundii</i> | ATCC 6750 |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | ATCC 7002 |
| | <i>Proteus vulgaris</i> | ATCC 8427 |
| | <i>Pseudomonas</i> sp. | M5027* |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | M3384* |
| | <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 |
| | <i>Enterobacter cloacae</i> | ATCC 13047 |
| | <i>Aeromonas hydrophila</i> | ATCC 7966 |
| | <i>Bacillus cereus</i> | ATCC 11778 |
| | <i>Serratia marcescens</i> | M3358* |
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | M3335* |
| | <i>Citrobacter</i> sp. | M5265* |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC BAA-1705 |
| | <i>Citrobacter koseri</i> | ATCC 27156 |
| | <i>Citrobacter freundii</i> | ATCC 8090 |
| <i>Morganella morganii</i> | ATCC 25829 | |

*Valio Oy:n kantakokoelma

ATCC-kannat, jotka tilattiin Labema Oy:ltä, elvytettiin kantojen mukana tulleen *Kwik-stik*-ohjeen mukaan. Valio Oy:n oman kantakokoelman bakteerit tuoretettiin TSA-maljoille.

6.3 Keinotekoisesti kontaminoidut näytematriisit ja kontaminointibakteerit

Koska luonnollisesti kontaminoituneita näytteitä on vaikea saada, näytteet kontaminoitiin itse keinotekoisesti. Näytematriisit olivat:

- Valio Oy:n herajauhe
- Valio Oy:n kevytmaito
- Lattiakaivovesi, Valio Oy:n Lapinlahden tuotantolaitos
- Lattiakaivovesi 2, Valio Oy:n Lapinlahden tuotantolaitos

Alustavan maljavertailun perusteella tutkimuksen keinotekoiisiin kontaminointeihin valittiin *Salmonella* Abony (M3790) -kanta, joka kasvoi tyypillisen näköisenä kaikilla neljällä (*XLD*, *BPLS*, *Brilliance* ja *CHROMagar*) kasvualustalla. Häiritseväksi kannaksi valittiin tuotenäytteisiin *Citrobacter* sp. (M5265) ja lattiakaivovesinäytteisiin *Pseudomonas* sp. (M5027). Kontaminointien laskennalliset kontaminointiasteet olivat salmonellalla 5, 50 sekä 500 pmy:tä ja häiritsevällä kannalla kymmenkertaiset eli 50, 500 sekä 5000 pmy:tä. Kukin näyte kontaminoitiin sekä salmonellalla että häiritsevällä bakteerilla.

6.4 Tarvikkeet, laitteet ja tilat

Kaikki työvaiheet, joissa käsiteltiin salmonellaa, tehtiin erikseen määritetyssä Turvalaboratorio-tilassa. Muissa työvaiheissa noudatettiin toimipaikkakohtaista patogeeniyöskentely-ohjetta, jossa on määritetty tilat eri menetelmille ja työvaiheille. Tutkimuksessa käytettiin *BAX-PCR*-laitteistoa ja laboratorion perusvälineistöä ja -laitteistoa. Työssä tärkeimpiä laboratoriovälineitä ja -laitteita olivat siirrostussauvat ja -silmukat, koeputket, erlenmeyerpullot, mittalasis, laminaarivirtauskaapit, lämpökaapit ja koeputkisekoittaja. Maljojen valokuvaukseen käytettiin Canon-merkkistä järjestelmäkameraa.

6.5 Alustava maljavertailu

Kannat tuoretettiin TSA-maljoilla ennen viljelyä. Puhdasviljelmistä siirrostettiin 1 µl kutakin mikrobia tutkittaville kromogeeni- ja selektiivimaljoille. Maljoja inkuboitii 2 vuorokautta 37°C:ssa. Pesäkkeiden ulkomuotoa, väriä ja kokoa sekä maljan väriä tarkasteltiin suhteessa elatusaineen valmistajan antamiin kuvauksiin yhden ja kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Maljat myös valokuvattiin yhden ja kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Alustavan maljavertailun perusteella jatkoviljelyyn valittiin seuraavat maljat: *Brilliance Salmonella* ja *CHROMagar Salmonella Plus*.

6.6 Näytteiden keinotekoinen kontaminointi

Salmonella Abony (M3790), *Citrobacter* sp. (M5265) ja *Pseudomonas* sp. (M5027) tuoretettiin siirrostamalle ne TSA-maljoille, joita inkuboitii yhden vuorokauden ajan 37±1°C:ssa. TSA-maljoilta bakteerit siirrostettiin *BHI*-liemiputkiin, joita inkuboitii yhden vuorokauden ajan 37±1°C:ssa. Liemiputkista pipetoitiin laimennossarjat 10⁻⁸:aan asti. Laimennosputkista viljeltiin TSA-agarille laimennokset 10⁻⁶ - 10⁻⁹ liemen pitoisuusmäärittystä varten. Maljoja inkuboitii 37±1°C:ssa yhden vuorokauden ajan. Maljoilta laskettiin pesäkkeet, ja pesäkemäärän perusteella määritettiin *BHI*-liemiputken mikrobipitoisuus (pmy/ml). *BHI*-liemen pitoisuuden suuruusluokka määritettiin etukäteen esikokeiden avulla kullekin bakteerille erikseen.

Kymmenen rinnakkaista 25 g:n (kiinteät näytteet) tai 25 ml:n (nestemäiset näytteet) näytettä homogenoitii 225 ml:aan huoneenlämpöistä puskuroitua peptonivettä. Hera jauheen annettiin liueta PPV:een noin tunnin ajan. Keinotekoinen kontaminointi tehtiin siten, että esikokeen perusteella määritettyjä salmonellalaimennoksia (10⁻⁶, 10⁻⁷ ja 10⁻⁸) pipetoitiin 300 µl:aa kolmeen rinnakkaiseen näytteeseen. Samoihin näytteisiin lisättiin häiritsevää bakteeria kymmenkertainen määrä: tuotenäytteisiin lisättiin 415 µl:aa *Citrobacter* sp.:tä ja lattiakaivovesinäytteisiin 1150 µl:aa *Pseudomonas* sp.:tä. Lisäksi jokaisesta näytteestä tehtiin kontaminoimaton näyte eli nollanäyte. Näytteitä inkuboitii 37±1°C:ssa 18±2 tuntia.

6.7 Keinotekoisesti kontaminoitujen näytteiden analysointi ISO-menetelmällä

Kuvassa 12 näkyy ISO-menetelmän mukainen keinotekoisesti kontaminoitujen näytteiden analysointi työvaiheittain. Työvaiheet olivat keinotekoinen kontaminointi ja esirikas-

tus, rikastus, näytteiden viljeleminen, pesäkkeiden eristäminen ja puhdistaminen sekä varmistustestien teko.

RVS-rikastusliemiputket esilämmitettiin $41,5\pm 1$ °C:een ja *MKTTn*-putket 37 ± 1 °C:een, minkä jälkeen niihin pipetoitiin esirikastuslientä. *RVS*-putkiin pipetoitiin PPV:tä 0,1 ml:aa, ja *MKTTn*-putkiin 1 ml. Nollanäyte pipetoitiin ensimmäiseksi nollanäytteen kontaminaatoriskin välttämiseksi.

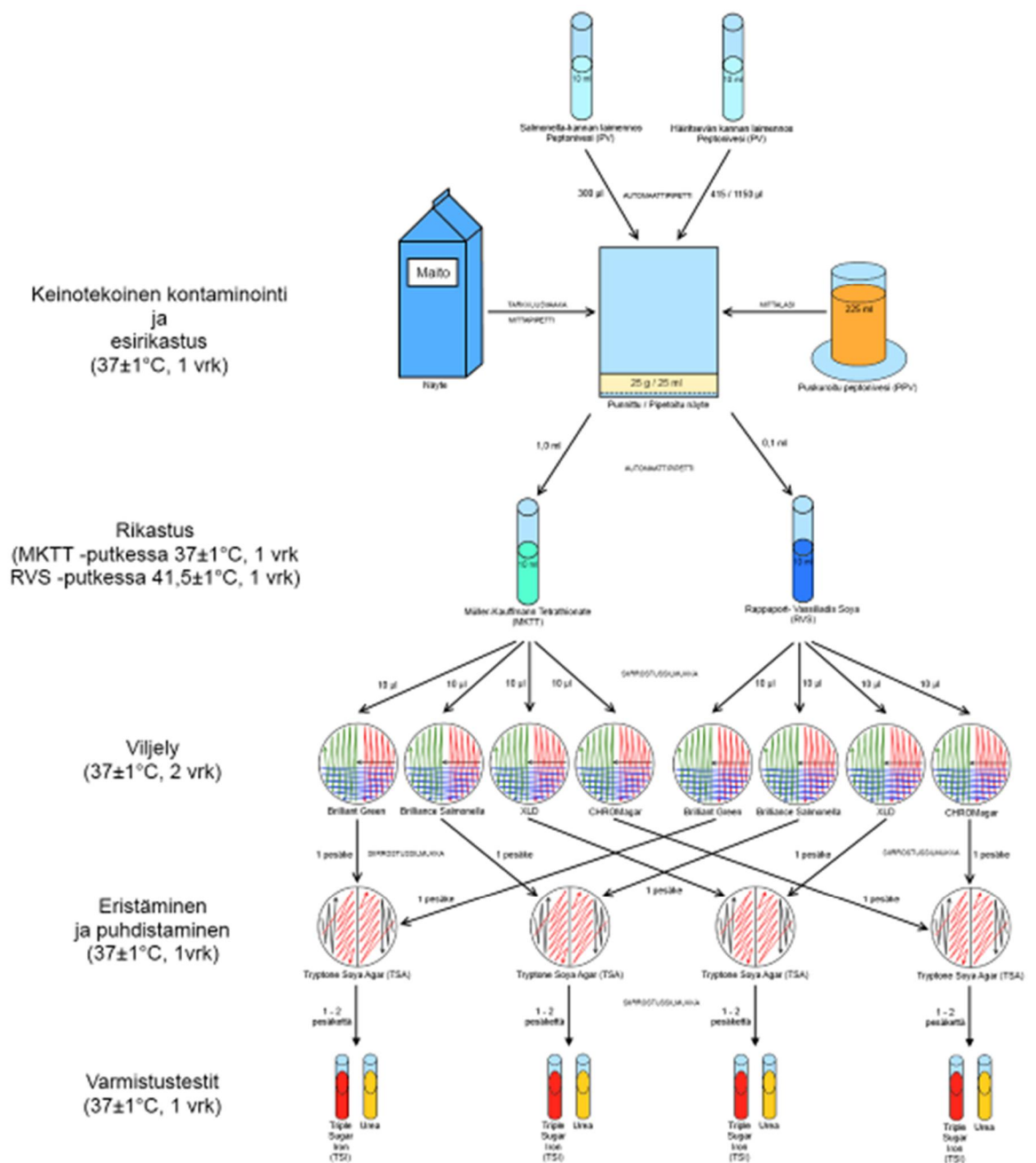
RVS-putkia inkuboitiin $41,5\pm 1$ °C:ssa ja *MKTTn*-putkia 37 ± 1 °C:ssa 24 ± 3 tuntia. *XLD*-, *BPLS*-, *CHROMagar*- ja *Brilliance*-maljoja kuivattiin laminaarivirtauskaapissa 15 minuutin ajan. Rikastusliemiputkista siirrostettiin 10 µl:n silmukallinen lientä maljoille steriilillä siirrostussilmukalla.

Siirrostetut maljat laitettiin inkuboitumaan lämpökaappiin 37 ± 1 °C:een, 24 ± 3 tunnin ajaksi. Seuraavana päivänä suoritettiin ensimmäinen tarkastelu, jolloin maljoista kirjattiin ylös maljakuvaukset, ja maljoja tarkasteltiin silmämääräisesti sekä ne valokuvattiin. Maljat laitettiin vielä uudelleen inkuboitumaan lämpökaappiin 37 ± 1 °C:een, 24 ± 3 tunnin ajaksi, jonka jälkeen suoritettiin maljojen toinen tarkastelu.

Jokaiselta maljalta valittiin tyypillisen salmonellan näköinen pesäke, joka siirrostettiin TSA-maljalle. Tähän päädyttiin, jotta varmistustesteihin otettavien pesäkkeiden lukumäärä ei nousisi liian korkeaksi. Alkuperäiset maljat säästettiin negatiivisen tuloksen varalta, jotta voitiin tarvittaessa valita toinen pesäke varmistukseen. Maljoja inkuboitiin 37 ± 1 °C:ssa yhden vuorokauden ajan.

TSA-maljoilta tehtiin Urea- ja *TSI*-agarputkitestit siirrostamalla yksi pesäke Urea-agarputken vinopinnalle, ja *TSI*-agarputken vinopinnalle sekä silmukalla agarin sisään putken pohjaan asti. Testit tehtiin viljelmistä, jotka olivat peräisin kromogeenialustoilta joko *RVS*- tai *MKTTn*-rikastuksen kautta.

Putkia inkuboitiin yhden vuorokauden ajan 37 ± 1 °C:ssa. Myös *Salmonella* Abony, *Citrobacter sp.* ja *Pseudomonas sp.* -puhdasviljelmistä viljeltiin Urea- ja *TSI*-putket. Reaktioita verrattiin näytteistä viljeltyjen bakteerien reaktioihin. Rinnalla verrattiin siirrostamattomia putkia. Näiden avulla voitiin havainnoida putkien sisältämän agarin luontaista värinmuutosta inkuboinnin yhteydessä.



Kuva 12. Keinotekoisesti kontaminoitujen näytteiden analysointi ISO 6579:2002 -standardimenetelmällä.

Herajauheen putkiteksteissä havaittiin sekakasvua eli salmonellapesäkkeen eristäminen oli epäonnistunut. Koska *Salmonella* Abony ja *Citrobacter sp.* -pesäkkeet ovat TSA-maljalla samannäköisiä, TSA-maljoilta ei pystytty huomaamaan sekakasvua silmämääräisesti. Tästä johtuen maljoilta siirrostettiin uudelleen mikrobimassaa *Brilliance Sal-*

monella -maljoille. Maljoja inkuboitiin 37 ± 1 °C:ssa yhden vuorokauden ajan, jonka jälkeen niiltä siirrostettiin tyypillisen näköinen pesäke uudestaan TSA-maljoille, joita inkuboitiin 37 ± 1 °C:ssa yhden vuorokauden ajan. TSA-maljalta otettiin erillispesäke, ja tästä tehtiin putkitestit positiivisen salmonellatuloksen todentamiseksi.

Häiritsevistä bakteereista tuotenäytteiden keinotekoisissa kontaminoinneissa käytetty *Citrobacter sp.* antoi lähes tyypillisen reaktion *TSI*-putkessa (kaasun muodostus, rikkivety ja punainen pinta), mutta epätyypillisen reaktion ureaputkessa (punaisen värin muodostuminen). Lattiakaivovesinäytteiden keinotekoisissa kontaminoinneissa häiritsevänä kantana käytetty *Pseudomonas sp.* oli ureanegatiivinen (ei värinmuutosta), jolloin ureaputkivarmistuksella ei voitu erotella salmonellakantaa ja pseudomonasta toisistaan. Kuitenkaan pseudomonas ei aiheuttanut *TSI*-putkessa reaktiota (punainen väri putkessa säilyi), joten salmonellakasvu voitiin erottaa *TSI*-putken avulla. Kaikkien varmistusviljelyiden yhteydessä tehtiin salmonellapositiivikontrollit ja häiritsevien kantojen kontrollit (tuotenäytteiden keinotekoisissa kontaminoinneissa *Citrobacter sp.* ja lattiakaivovesinäytteiden keinotekoisissa kontaminoinneissa *Pseudomonas sp.*), joihin näytteiden varmistusviljelyputkia verrattiin. Lisäksi tehtiin nollaputket, joihin ei siirrostettu mitään, agarin luontaisen, inkuboinnin yhteydessä tapahtuvan, lämpötilasta aiheutuvan värinmuutoksen havainnoimiseksi.

6.8 BAX-PCR-menetelmä

Keinotekoisesti kontaminoidut näytteet analysoitiin ISO-menetelmän lisäksi *BAX-PCR*-menetelmällä. *BAX-PCR*-menetelmässä näytteen solut hajotetaan entsyymaattisesti lämmön avulla. *BAX® System PCR Assay for Salmonella* -pakkaus (Dupont Qualicon) sisältää solujen hajotukseen tarvittavat puskuri- ja proteaasiliuokset. Putkiin pipetoitiin 200 µl solujen hajotus-puskuriliuosta, johon oli lisätty proteaasiliuosta *BAX-PCR*-menetelmäohjeen mukaan. Puskuroidusta peptonivedestä otettiin inkuboinnin jälkeen 5 µl:aa näytettä, joka pipetoitiin putkeen. (Valio Oy 2010.)

Putkia inkuboitiin 37 ± 2 °C:n kuivalämpöhauteessa 20 minuuttia, jonka jälkeen 95 ± 3 °C:n kuivalämpöhauteessa 10 minuuttia. Putkia jäähdytettiin kylmähauteessa viiden minuutin ajan ja siirrettiin pakastimeen. Näyteputket sulatettiin huoneenlämmössä ennen *BAX-PCR*-ajoa. Näyteputkista pipetoitiin 50 µl:aa *BAX Salmonella PCR*-putkiin, jotka sisälsivät *PCR*-reagenssipelletin. Näytteen lisäämisen jälkeen putket siirrettiin *BAX-*

PCR-laitteeseen. Laitteen ohjelma sisältää PCR-ajon ja monistuneen tuotteen detekti-
on. Laite antaa joko positiivisen (+) tai negatiivisen (-) tuloksen. (Valio Oy 2010.)

6.9 Laskut

Mikrobipitoisuus *BHI*-liemiputkessa laskettiin esikokeen ja kunkin näytteen kontami-
noinnin yhteydessä bakteerikantojen laimennoksista (10^{-7} ja 10^{-8}) seuraavalla, painote-
tun keskiarvon kaavalla:

$$\bar{x} = \frac{10_1^{-7} + 10_2^{-7} + 10_1^{-8} + 10_2^{-8}}{2 \cdot V_1 + 2 \cdot V_2}$$

10_1^{-7} = laimennoksesta 10^{-7} siirrostetun 1. maljan pesäkemäärä (pmy)

10_2^{-7} = laimennoksesta 10^{-7} siirrostetun 2. maljan pesäkemäärä (pmy)

10_1^{-8} = laimennoksesta 10^{-8} siirrostetun 1. maljan pesäkemäärä (pmy)

10_2^{-8} = laimennoksesta 10^{-8} siirrostetun 2. maljan pesäkemäärä (pmy)

V_1 = *BHI*-liemen pipetointitilavuus maljalle laimennoksesta 10^{-7} = 0,0000001 ml

V_2 = *BHI*-liemen pipetointitilavuus maljalle laimennoksesta 10^{-8} = 0,00000001 ml

BAX-PCR-menetelmän suhteellisen oikeellisuuden, spesifisyyden ja herkkyuden mää-
rittämiseen lattiakaivovesinäytteille käytettiin apuna taulukkoa 3, jolla tulokset luokitel-
tiin neljään eri kategoriaan.

Taulukko 4. *BAX-PCR*- ja ISO-menetelmien tulosten validointitaulukko (Valio Oy 2009).

| | ISO Positiivinen (R+) | ISO Negatiivinen (R-) |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| BAX Positiivinen (A+) | +/+ positive agreement (PA) | -/+ positive deviation (PD) (R-/A+) |
| BAX Negatiivinen (A-) | +/- negative deviation (ND) (A-/R+) | -/- negative agreement (NA) |

Alla on esitetty suhteellisten oikeellisuuksien (AC), spesifisyyksien (SP) ja herkkyysien
(SE) laskutavat:

Suhteellinen oikeellisuus: $AC = \frac{(PA+NA)}{N} \cdot 100 \%$

Suhteellinen spesifisyys: $SP = \frac{NA}{N-} \cdot 100 \%$

Suhteellinen herkkyys: $SP = \frac{PA}{N+} \cdot 100 \%$

$N =$ näytteiden kokonaismäärä ($NA + PA + PD + ND$)

$N- =$ vertailumenetelmän antamien negatiivisten tulosten määrä ($NA + PD$)

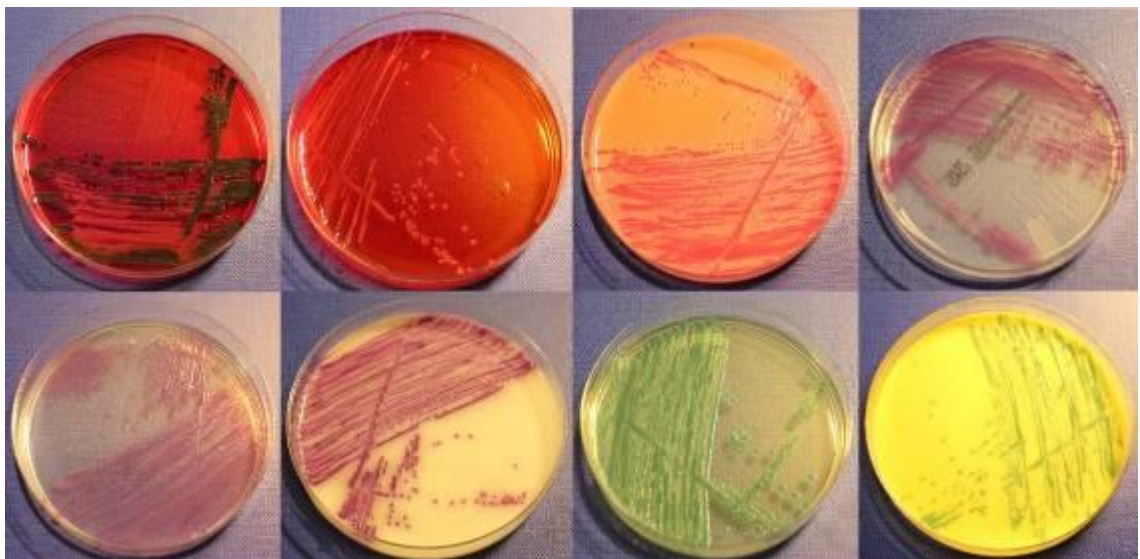
$N+ =$ vertailumenetelmän antamien positiivisten tulosten määrä ($PA + ND$)

7 Tulokset

7.1 Alustava maljavertailu

Alustavan maljavertailun jälkeen voitiin karsia pois neljä kromogeenialustaa (*ABC*, *ChromID*, *IBISA* ja *Rambach*) alustojen selektiivisten ominaisuuksien ja herkkyysien perusteella. *IBISA*-agar karsiutui pois jatkosta sen heikon saatavuuden vuoksi. Varsinaiseen tutkimukseen valittiin *Brilliance Salmonella* ja *CHROMagar*-maljat *XLD*- ja *BPLS*-maljojen lisäksi.

Suurin osa salmonelloista kasvoi eri kromogeenimaljoilla valmistajien antamien väri- ja pesäkekuvausten mukaisesti, jolloin muodostettiin käsitys tyypillisen näköisestä salmonellakasvusta eri kasvualustoilla. Kuvassa 13 on esitetty tyypillisen näköisten salmonelapesäkkeiden väri eri selektiivi- ja kromogeenimaljoilla.



Kuva 13. Tyypillisen näköinen salmonellakasvu eri maljatyypeillä. Maljatyypit vasemmalta oikealle ylhäällä: *XLD*, *BPLS*, *Rambach*, *ChromID*, ja vasemmalta oikealle alhaalla: *CHROMagar*, *Brilliance*, *ABC*, *IBISA*. *XLD*-maljalle oli viljelty *Salmonella* spp.:tä (M2275), ja muille maljoille oli viljelty *Salmonella* Abony -kantaa (M3790). Maljoja oli inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

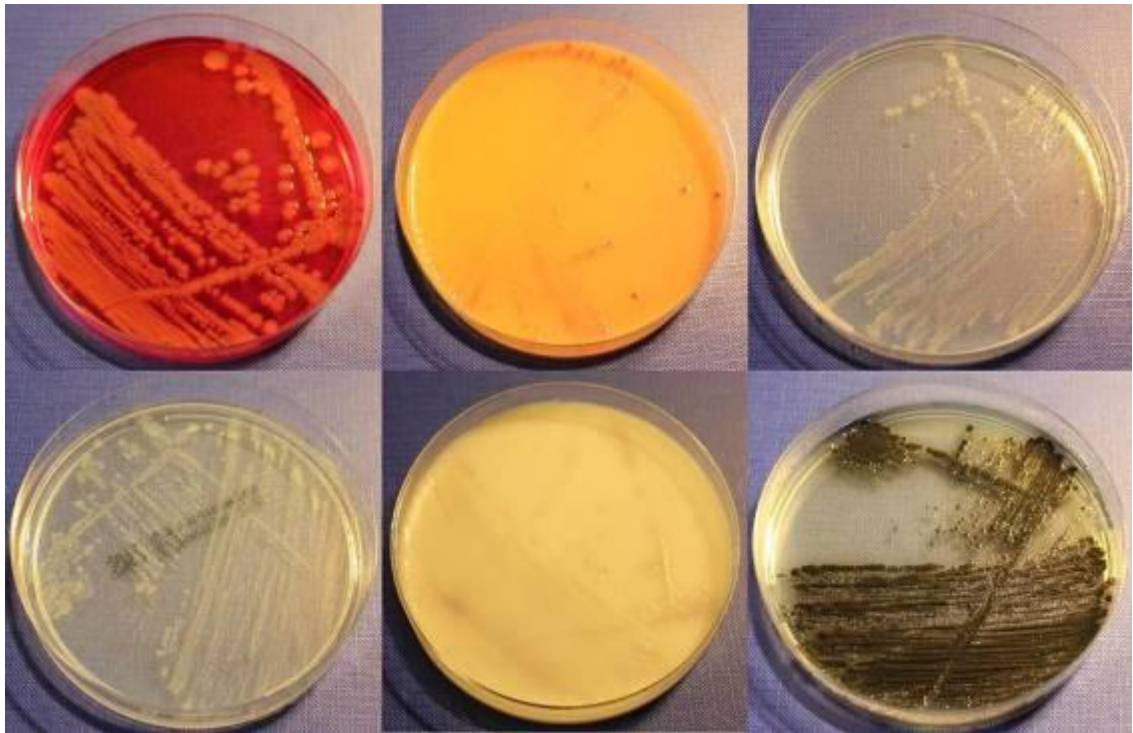
Osa tutkimuksessa käytetyistä salmonelloista kasvoi joillakin alustoilla epätyypillisen näköisinä pesäkkeinä verrattuna muihin salmonelloihin. *XLD*-alustalla epätyypillisen näköisiä salmonellapesäkkeitä muodostivat *Salmonella* Agona ja *Salmonella enterica*: nämä muodostivat *XLD*:llä keltaisia ja laakeita pesäkkeitä.

Rambachilla *Salmonella arizonae*, *Salmonella diarizonae* ja *Salmonella* Dublin muodostivat muista salmonelloista poikkeavia pesäkkeitä: *Salmonella arizonae* ja *Salmonella diarizonae* muodostivat maljalla violetteja ja liiloja pesäkkeitä, ja *Salmonella* Dublin muodosti lähes väritöntä kasvustoa maljalle yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen värireaktio voimistui hieman, jolloin *Salmonella* Dublin pesäkkeiden väri oli hailakan vaaleanpunainen.

ChromID:llä ainoastaan *Salmonella* Dublin kasvoi epätyypillisenä: kyseisen salmonellan muodostamat pesäkkeet olivat värittömiä ja läpikuultavia. *Brilliance*lla yksi salmonella muodosti epätyypillisen näköisiä pesäkkeitä: *Salmonella* Dublin muodosti värittömiä pesäkkeitä, ja värireaktio voimistui vain vähän kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen.

ABC:llä kolme eri salmonellaa muodosti poikkeavan värisiä pesäkkeitä: *Salmonella* spp., *Salmonella arizonae* ja *Salmonella diarizonae* kasvoivat *ABC*-maljoilla mustina pesäkkeinä, jolloin niitä oli vaikea erottaa monista häiritsevistä bakteereista (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri* ja *Citrobacter freundii*), jotka kasvoivat maljatyypillä myös mustina pesäkkeinä.

*CHROMagar*lla epätyypillisen näköisiä pesäkkeitä muodosti *Salmonella* Dublin, joka kasvoi maljalla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen värittömänä samalla tavoin kuin *ChromID*-maljalla. Kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen *Salmonella* Dublin -pesäkkeiden väri oli kuitenkin hailakan vaaleanpunainen. *BPLS*- ja *IBISA*-maljoilla kaikki salmonellat kasvoivat tyypillisen näköisinä salmonellapesäkkeinä. Alustavan maljavertailun tulokset on esitetty liitteessä 1. Kuvassa 14 on epätyypillisen näköistä salmonellakasvua eri maljatyypeillä.



Kuva 14. Epätyypillisen näköinen salmonellakasvu eri kasvualustoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Maljatyypit vasemmalta oikealle ylhäällä: XLD, Rambach, CHROMagar, ja vasemmalta oikealle alhaalla: ChromID, Brilliance, ABC. XLD-maljalle on viljelty *Salmonella* Agona -kantaa (M3615), Rambach, CHROMagar, ChromID ja Brilliance -maljoille on viljelty *Salmonella* Dublin -kantaa (M3266), ja ABC-maljalle on viljelty *Salmonella* diarizonae -kantaa (ATCC 12325).

Ainoa tutkimuksen bakteeri, joka ei kasvanut millään maljatyypillä, oli *Bacillus cereus*. Kyseisen grampositiivisen bakteerin ei oletettukaan kasvavan, mutta se sisällytettiin tutkimukseen osoittamaan maljojen selektiivisyyden toimimista. Kuitenkin usealla maljatyypillä joku tai useampi tutkimuksen häiritsevistä bakteereista kasvoi tyypillisen tai lähes tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisinä. Nämä häiritsevät bakteerit kasvoivat eri maljatyypeillä samanvärisinä tai lähes samanvärisinä kuin salmonellakasvu. Toki joillakin alustoilla, kuten esimerkiksi *Brilliance*lla, alusta inhiboi tällaisten bakteerien kasvua, jolloin kasvun heikkous voitiin luetella eroavaisuudeksi salmonellakasvun ja häiritsevän kasvun välille. Toisaalta rutiinitarkastelussa heikkokin tyypillisen värinen kasvu maljalla jouduttaisiin joka tapauksessa varmistamaan. Eniten tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisenä eri maljatyypeillä kasvoivat seuraavat häiritsevät bakteerit: *Pseudomonas* sp., *Citrobacter* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Citrobacter koseri*. Pesäkkeiden ulkomuoto muuttui vain vähäisesti toisen vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Kuvassa 15 näkyy eri maljatyypeille viljeltyjä häiritseviä bak-

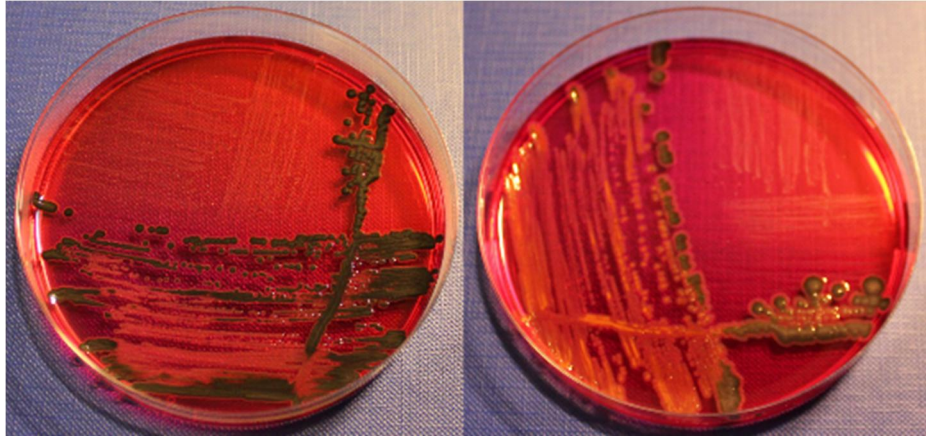
teereja, jotka kasvoivat lähes tyypillisten tai tyypillisten salmonellapesäkkeiden näköisinä maljoilla.



Kuva 15. Tyypillisen ja lähes tyypillisen salmonellakasvun näköinen häiritsevä kasvu eri maljatyypeillä yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Maljatyypit vasemmalta oikealle ylhäällä: *Rambach*, *CHROMagar*, *XLD*, ja vasemmalta oikealle alhaalla: *BPLS*, *Brilliance*, *ChromID*. *Rambach*- ja *Brilliance*-maljoille on viljelty *Aeromonas hydrophila* -kanta (ATCC 7966), ja *CHROMagar*-, *XLD*-, *BPLS*- ja *ChromID*-maljoille on viljelty *Pseudomonas sp.*:tä (M5027).

7.1.1 Pesäkkeiden ulkomuoto *XLD*:llä

XLD-maljoilla tyypillisen näköiset salmonellapesäkkeet olivat kiiltäviä, ja niissä oli musta keskusta. Pesäkkeiden halkaisija oli noin 2 - 4 millimetriä, ja niiden reuna oli joko läpikuultava tai punertava. Agarin väri oli kasvun alueella joko punainen tai pinkki. Kuvassa 16 on esimerkki tyypillisen näköisestä salmonellakasvusta *XLD*-maljalla.



Kuva 16. Tyypillisen näköinen salmonellakasvu *XLD*-maljalla yhden vuorokauden (vasen) ja kahden vuorokauden (oikea) inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Salmonella spp.*:tä (M2275).

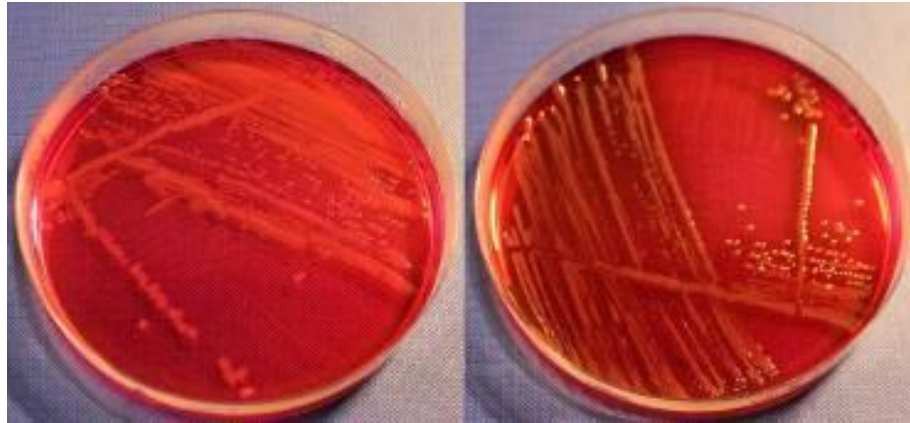
XLD-maljalla epätyypillisen salmonellapesäkkeen näköisinä kasvoivat *Salmonella Agona* ja *Salmonella enterica*. Nämä bakteerit muodostivat *XLD*-maljoilla laakeita keltaisia ja hieman röpelöisiä pesäkkeitä. Agarin väri oli kasvun alueella joko punainen tai pinkki. Kuvassa 17 ovat *XLD*-maljoilla epätyypillisinä kasvaneet salmonellat.



Kuva 17. Epätyypillisen näköinen salmonellakasvu *XLD*-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Salmonella Agona* -kantaa (M3615), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Salmonella enterica* (ATCC 51741).

Lähes tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisinä kasvavia häiritseviä bakteereja olivat *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas sp.*, *Citrobacter sp.* ja *Morganella morganii*. Kuvassa 18 on kaksi esimerkkiä lähes tyypillisen salmonellakasvun näköisestä häiritsevästä kasvusta *XLD*-maljoilla. Vaikka kuvassa olevissa *Pseudomonas sp.* ja *Morganella morganii* pesäkkeissä ei ole mustaa keskustaa, ne olivat silti lähes tyypillisen salmonellan näköisiä, sillä salmonella voi kasvaa *XLD*-agarilla myös

punaisina, häränsilmää muistuttavina pesäkkeinä, kun rikkivedyn muodostus on heikkoa.



Kuva 18. Lähes tyypillisen salmonellakasvun näköinen häiritsevä kasvu *XLD*-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Pseudomonas sp.*:tä (M5027), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Morganella morganii*-kantaa (ATCC 25829).

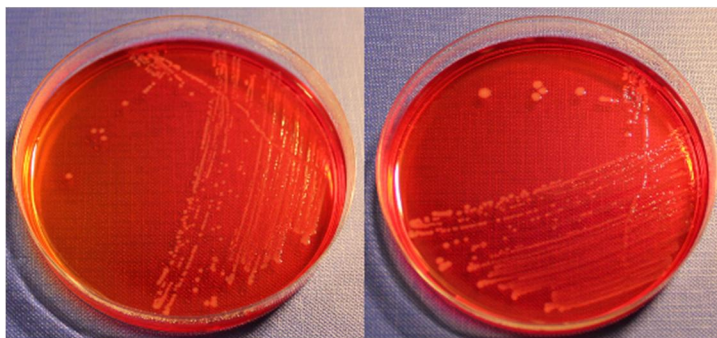
Häiritsevä kasvu kasvoi *XLD*-maljoilla pääsääntöisesti keltaisina pesäkkeinä, joiden halkaisija oli suurempi kuin salmonellapesäkkeiden halkaisija. *XLD*-agarin väri muuttui kellertäväksi tai keltaiseksi maljalle viljellystä häiritsevästä bakteerista riippuen. Kuvassa 19 on esimerkki häiritsevästä kasvusta *XLD*-maljalla. Kuten kuvassa, *Citrobacterit* muodostavat yleensä *XLD*:llä keltaisia pesäkkeitä.



Kuva 19. Häiritsevä kasvu *XLD*-maljalla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. *XLD*-maljalle oli viljelty *Citrobacter freundii*-kantaa (ATCC 6750).

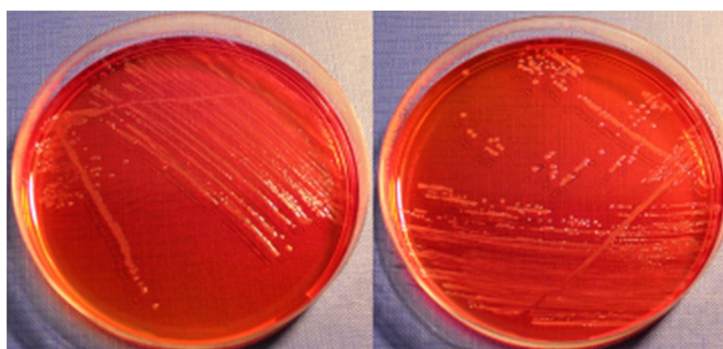
7.1.2 Pesäkkeiden ulkomuoto *BPLS*:llä

BPLS-maljoilla tyypillisen näköiset salmonellapesäkkeet olivat kiiltäviä, vaaleanpunaisia ja läpikuultavia. Pesäkkeiden halkaisija oli 1 - 2 millimetriä. Agarin väri oli kasvun alueella joko punainen, oranssi tai pinkki. Kuvassa 20 on esimerkki tyypillisen näköisestä salmonellakasvusta *BPLS*-maljalla. Mikään viljellyistä salmonelloista ei kasvanut *BPLS*-maljoilla epätyypillisenä tai häiritsevänä näköisenä.



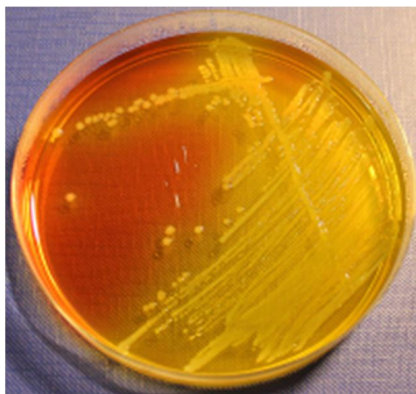
Kuva 20. Tyypillisen näköinen salmonellakasvu *BPLS*-maljalla yhden vuorokauden (vasen) ja kahden vuorokauden (oikea) inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Salmonella* Senftenberg -kanta (M2278).

Tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisinä häiritsevistä bakteereista kasvoivat *Pseudomonas* sp. ja *Citrobacter koseri*. Lähes tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisinä kasvoivat *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter* sp. ja *Morganella morganii*. Kuvassa 21 on kaksi esimerkkiä tyypillisen salmonellakasvun näköisestä häiritsevästä kasvusta. Kun verrataan kuvan 21 häiritsevää kasvua kuvan 20 tyypilliseen salmonellakasvuun, huomataan, että häiritsevää kasvua ei voinut erottaa tyypillisestä salmonellakasvusta.



Kuva 21. Tyypillisen salmonellakasvun näköinen häiritsevä kasvu *BPLS*-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Pseudomonas* sp.:tä (M5027), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Citrobacter koseri* -kanta (ATCC 27156).

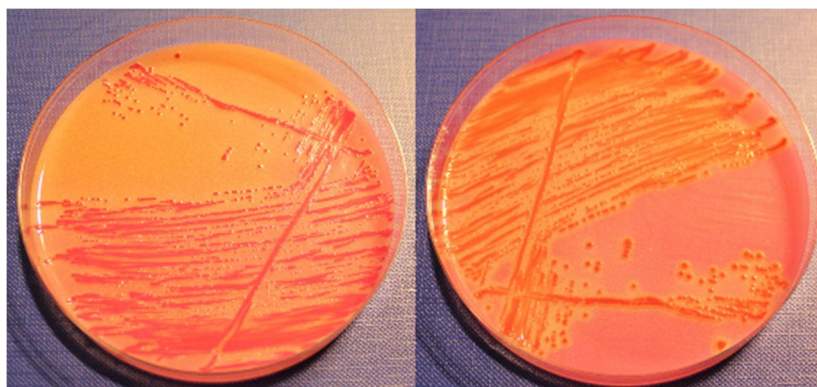
Häiritsevä kasvu kasvoi *BPLS*-maljoilla pääsääntöisesti keltaisina tai kellertävinä, läpikuultavina ja kiiltävinä pesäkkeinä, joiden halkaisija oli noin 1 - 3 millimetriä. *BPLS*-agarin väri muuttui kellertäväksi tai keltaiseksi häiritsevän kasvun alueella maljalle viljelystä häiritsevästä bakteerista riippuen. Kuvassa 22 on esimerkki häiritsevästä kasvusta *BPLS*-maljalla.



Kuva 22. Häiritsevä kasvu *BPLS*-maljalla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. *BPLS*-maljalle oli viljelty *Enterobacter cloacae*-kantaa (ATCC 13047).

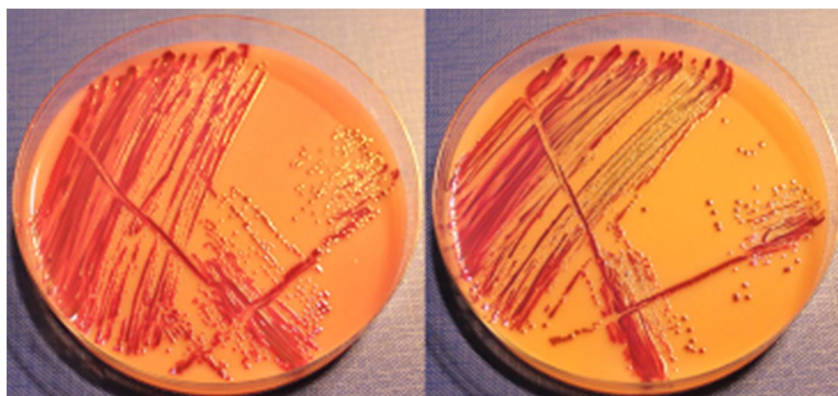
7.1.3 Pesäkkeiden ulkomuoto *Rambach*:lla

Rambach-maljoilla tyypillisissä salmonellapesäkkeissä oli punainen tai vaaleanpunainen keskusta sekä vaalea tai läpikuultava reunus. Halkaisijaltaan pesäkkeet olivat noin 1 - 2 millimetriä. Kuvassa 23 on esimerkki tyypillisestä salmonellakasvusta *Rambach*-maljalla.



Kuva 23. Tyypillisen näköinen salmonellakasvu *Rambach*-maljalla yhden vuorokauden (vasen) ja kahden vuorokauden (oikea) inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Salmonella* Abony -kantaa (M3790).

Rambach-maljoilla epätyypillisen salmonellapesäkkeen näköisinä kasvoivat *Salmonella arizonae* ja *Salmonella diarizonae*. Kuvasta 24 voidaan havaita, että kyseiset salmonelat kasvoivat maljoilla liiloina ja violetteina pesäkkeinä. Osassa *Salmonella diarizonae* -pesäkkeistä oli musta tai harmaanruskea keskusta. Lisäksi *Salmonella* Dublin -kannan värinmuodostus oli *Rambach*-maljalla heikkoa.



Kuva 24. Epätyypillisen näköinen salmonellakasvu *Rambach*-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Salmonella arizonae*:a (ATCC 13314), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Salmonella diarizonae*:a (ATCC 12325).

Rambach-maljoilla ei kasvanut tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisinä kasvavia häiritseviä bakteereja, mutta punertavaa väriä esiintyi *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter sp.* ja *Citrobacter koseri* -bakteerien kasvustoissa. Osalla häiritsevistä bakteereista pesäkkeiden väri muistutti *Salmonella arizonae* ja *Salmonella diarizonae* pesäkkeiden väriä.

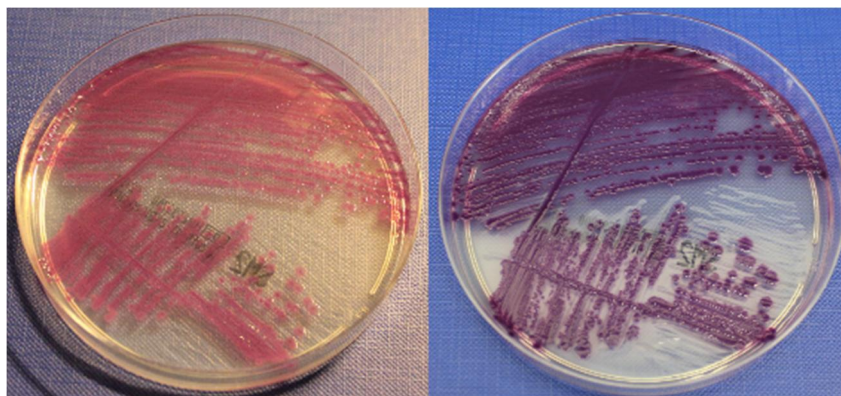
Häiritsevä kasvu kasvoi *Rambach*-maljoilla pääsääntöisesti vihreinä tai liiloina pesäkkeinä, joiden halkaisija oli noin 1 - 2 millimetriä. Kuvassa 25 on esimerkkejä häiritsevistä kasvusta *Rambach*-maljoilla.



Kuva 25. Häiritsevä kasvu *Rambach*-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Citrobacter freundii* -kantaa (ATCC 6750), keskimmäiselle maljalle oli viljelty *Enterobacter cloacae* -kantaa (ATCC 13047), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Citrobacter koseri* -kantaa (ATCC 27156).

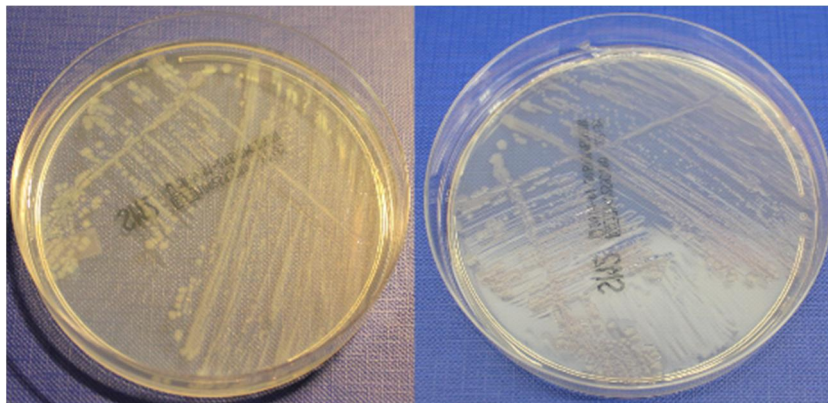
7.1.4 Pesäkkeiden ulkomuoto *ChromID*:llä

ChromID-maljoilla tyypillisissä salmonellapesäkkeissä oli malvanvärisen, violetti tai vaaleanpunainen keskusta, jota ympäröi läpikuultava vyöhyke. Pesäkkeet olivat kiiltäviä ja halkaisijaltaan noin 2 - 3 millimetriä. Agarin väri pysyi muuttumattomana. Kuvassa 26 on esimerkki tyypillisen näköisestä salmonellakasvusta *ChromID*-maljalla.



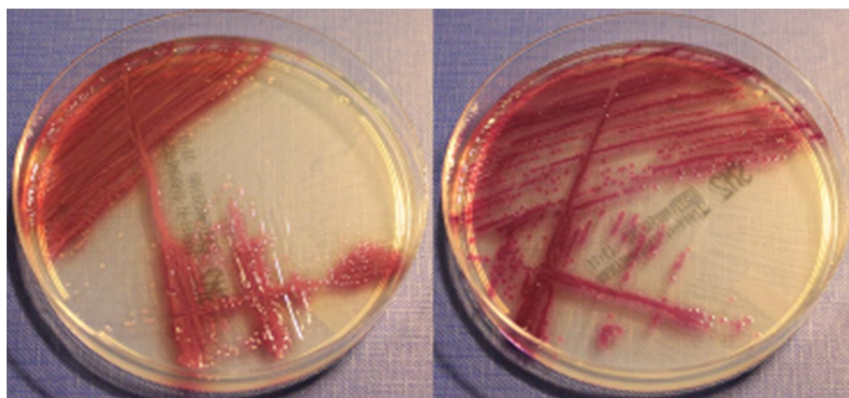
Kuva 26. Tyypillisen näköinen salmonellakasvu *ChromID*-maljalla yhden vuorokauden (vasen) ja kahden vuorokauden (oikea) inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Salmonella Infantis* -kantaa (M3267).

ChromID-maljalla epätyypillisenä eli häiritsevän kasvun näköisenä kasvoi *Salmonella Dublin* -kanta (M3266). Kuvasta 27 voidaan havaita, että kyseinen salmonellakanta kasvoi maljalla värittömänä sekä yhden että kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. *Salmonella Dublin* -kannan heikko värinmuodostus *ChromID*-agarilla oli kuitenkin erikseen mainittu valmistajan ohjeissa.



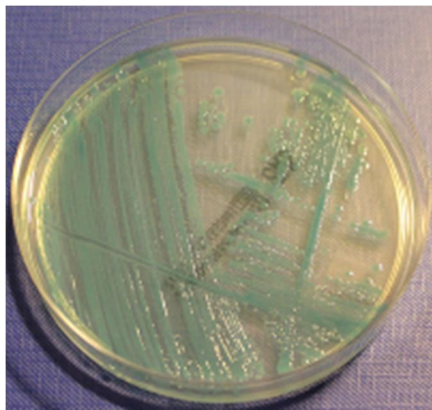
Kuva 27. Epätyypillisen näköinen salmonellakasvu *ChromID*-maljalla yhden vuorokauden (vasen) ja kahden vuorokauden (oikea) inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Salmonella* Dublin -kantaa (M3266).

Tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisinä kasvavia häiritseviä bakteereja olivat *Acinetobacter baumannii* ja *Pseudomonas* sp. Lähes tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisinä kasvoivat *Pseudomonas aeruginosa* ja *Aeromonas hydrophila*. Kuvassa 28 on esimerkkejä tyypillisen näköisen salmonellakasvun näköisestä häiritsevästä kasvusta *ChromID*-maljoilla.



Kuva 28. Tyypillisen salmonellakasvun näköinen häiritsevä kasvu *ChromID*-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Acinetobacter baumannii* -kantaa (ATCC 19606), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Pseudomonas* sp.:tä (M5027).

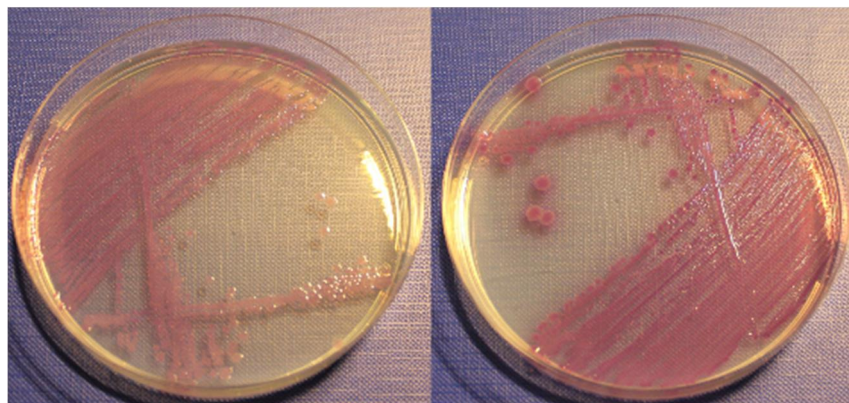
Häiritsevä kasvu kasvoi *ChromID*-maljoilla pääsääntöisesti turkooseina, vaaleansinisinä tai sinisinä pesäkkeinä, joiden halkaisija oli noin 1 - 3 millimetriä. Kuvassa 29 on esimerkki häiritsevästä kasvusta *ChromID*-maljalla.



Kuva 29. Häiritsevä kasvu *ChromID*-maljalla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. *ChromID*-maljalle oli viljelty *Citrobacter koseri*-kantaa (ATCC 27156).

7.1.5 Pesäkkeiden ulkomuoto *CHROMagar*lla

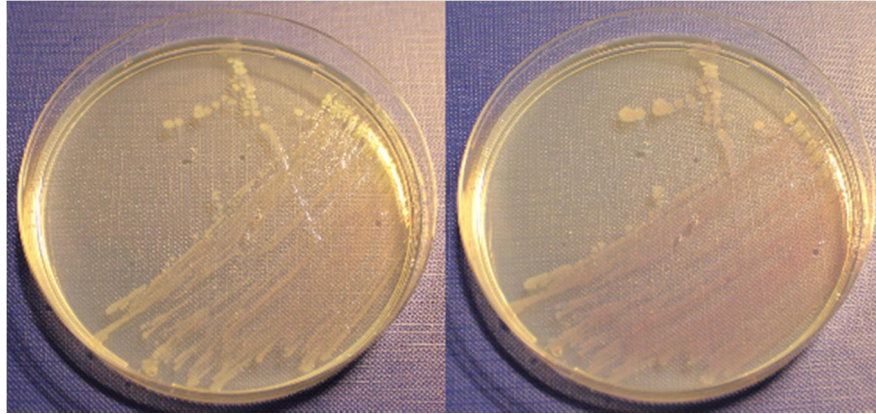
CHROMagar-maljoilla tyypillisissä salmonellapesäkkeissä oli vaaleanpunainen tai malvanvärisen keskusta, jota ympäröi vaalea, läpikuultava vyöhyke. Halkaisijaltaan pesäkkeet olivat noin 1 - 3 millimetriä, poislukien *Salmonella Agona* ja *Salmonella enterica* -pesäkkeet, joiden halkaisijat olivat hieman suuremmat. Agarin väri pysyi viljelyssä muuttumattomana eli värittömänä. Kuvassa 30 on esimerkki tyypillisen näköisestä salmonellakasvusta *CHROMagar*-maljalla.



Kuva 30. Tyypillisen näköinen salmonellakasvu *CHROMagar*-maljalla yhden vuorokauden (vasen) ja kahden vuorokauden (oikea) inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Salmonella Bovismorbificans* -kantaa (M3331).

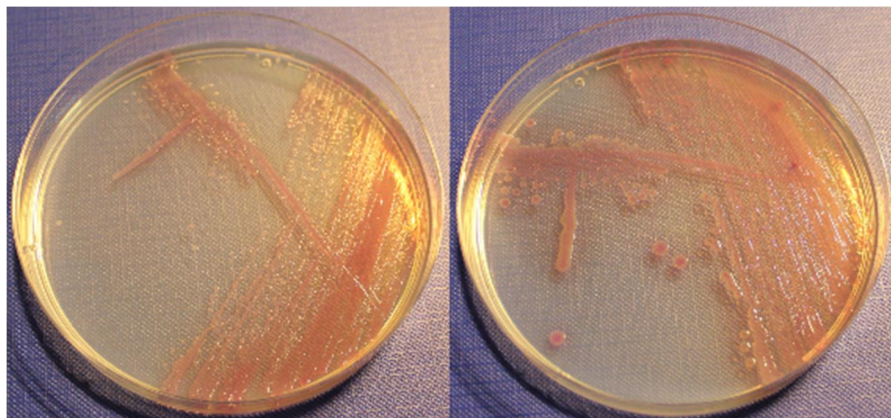
CHROMagar-maljalla epätyypillisenä eli häiritsevänä kasvun näköisenä kasvoi *Salmonella Dublin* -kanta. Kuvasta 31 voidaan havaita, että kyseinen salmonellakanta kasvoi

maljalla värittömänä yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen, mutta kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen pesäkkeissä alkoi näkyä hailakkaa malvanväriä. *Salmonella* Dublin -pesäkkeiden heikko värinmuodostus tai värittömyys *CHROMagar*-agarilla oli kuitenkin erikseen mainittu valmistajan ohjeissa.



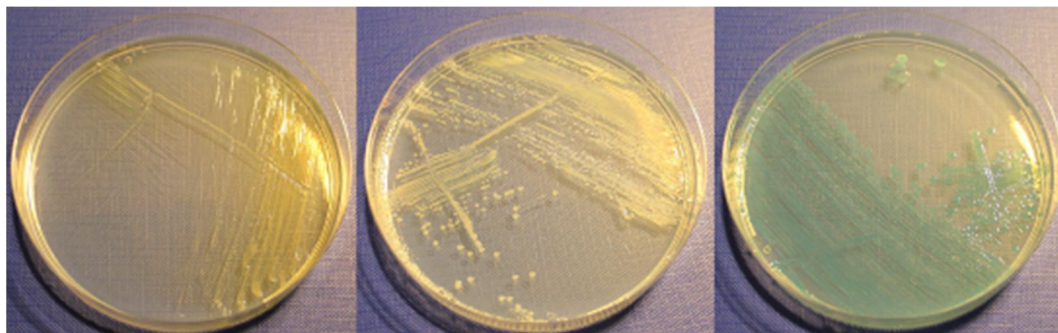
Kuva 31. Epätyypillisen näköinen salmonellakasvu *CHROMagar*-maljalla yhden vuorokauden (vasen) ja kahden vuorokauden (oikea) inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Salmonella* Dublin -kanta (M3266).

Tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisenä kasvoi *Pseudomonas sp.* (M5027). Kuvasta 32 voidaan havaita, että *Pseudomonas sp.* kasvoi *CHROMagar*-maljalla vaaleanpunaisina pesäkkeinä. Joillakin salmonellakannoilla pesäkkeiden värinmuodostus maljalla oli hidasta, mikä aiheutti ongelmia salmonellojen ja häiritsevien bakteerien erottelussa. Esimerkiksi verratessa *Pseudomonas sp.* ja *Salmonella diarizonae* (ATCC 12325)-pesäkkeiden väriä keskenään, ei näiden välillä voitu havaita merkittävää eroa.



Kuva 32. Tyypillisen salmonellakasvun näköinen häiritsevä kasvu *CHROMagar*-maljalla yhden vuorokauden (vasen) ja kahden vuorokauden (oikea) inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Pseudomonas sp.*:tä (M5027).

Häiritsevää kasvuä kasvoi *CHROMagar*-maljoilla pääsääntöisesti turkooseina, sinisinä, kellertävinä tai värittöminä pesäkkeinä, joiden halkaisija oli noin 1 - 3 millimetriä. Kuvassa 33 on esimerkkejä häiritseväästä kasvusta *CHROMagar*-maljoilla.



Kuva 33. Häiritsevää kasvuä *CHROMagar*-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Proteus mirabilis* -kantaä (ATCC 7002), keskimmäiselle maljalle oli viljelty *Escherichia coli* -kantaä (ATCC 25922), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Citrobacter koseri* -kantaä (ATCC 27156).

7.1.6 Pesäkkeiden ulkomuoto Brilliance:lla

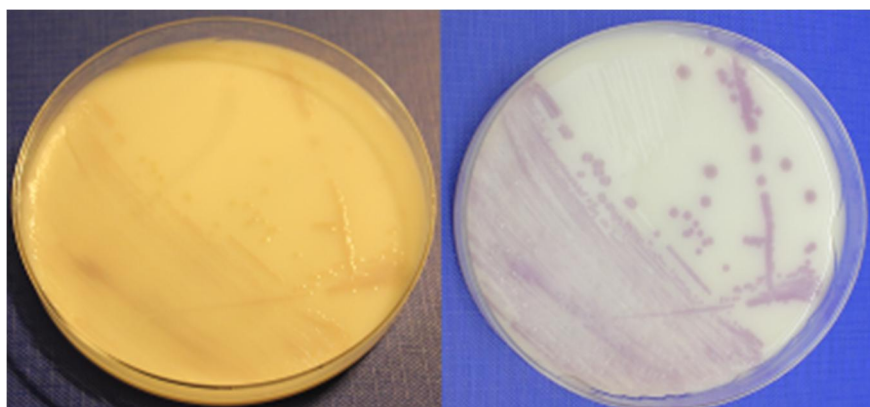
Brilliance-maljoilla tyypillisissä salmonellapesäkkeissä oli violetti tai malvanväriäinen keskusta ja vaaleampi reunus. Pesäkkeiden halkaisija oli noin 1 - 3 millimetriä. Kuvassa 34 on esimerkki tyypillisestä salmonellakasvusta *Brilliance*-maljalla.



Kuva 34. Tyypillisen näköinen salmonellakasvu *Brilliance*-maljalla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Salmonella Agona* -kantaä (M3615).

Brilliance-maljalla epätyypillisenä eli häiritsevän kasvun näköisenä kasvoi *Salmonella Dublin* -kanta, jonka pesäkkeiden värinmuodostus oli hidasta: yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen pesäkkeet olivat värittömiä ja läpikuultavia, mutta kahden vuorokauden jälkeen pesäkkeisiin oli tullut hailakka malvanväri. Kuvasta 35 näkyy *Salmonella*

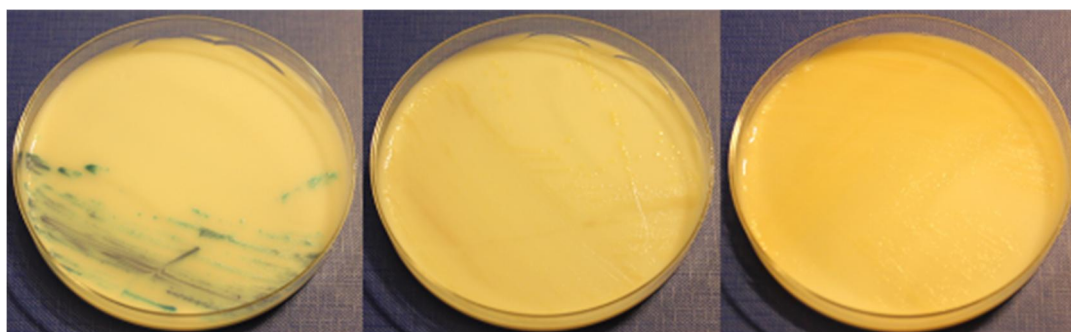
Dublin -kannan värinmuodostus *Brilliance*-maljalla. Hidas värinmuodostus *Brilliance*-agarilla oli kuitenkin erikseen mainittu valmistajan ohjeissa.



Kuva 35. Epätyypillisen näköinen salmonellakasvu *Brilliance*-maljalla. Maljalle oli viljelty *Salmonella* Dublin -kanta (M3266), ja pesäkkeiden väriä tarkasteltiin yhden vuorokauden (vasen malja) ja kahden vuorokauden (oikea malja) inkuboinnin jälkeen.

Tyypillisiä salmonellapesäkkeen näköisinä kasvavia häiritseviä bakteereja ei ollut, mutta kaikki värittöminä tai lähes värittöminä kasvaneet häiritsevät bakteerit olivat yhden näköisiä *Salmonella* Dublin -kannan muodostamien pesäkkeiden kanssa yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen.

Häiritsevä kasvu kasvoi *Brilliance*-maljoilla pääsääntöisesti värittöminä, kellertävinä tai sinertävinä pesäkkeinä, joiden halkaisija oli noin 1 - 2 millimetriä. Lisäksi häiritsevä kasvu inhiboitui melko tehokkaasti: osa häiritsevistä bakteereista kasvoi maljalla erittäin heikosti, mikä selkeytti maljojen tarkastelua. Kuvassa 36 on esimerkkejä häiritsevästä kasvusta *Brilliance*-maljoilla.



Kuva 36. Häiritsevä kasvu *Brilliance*-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Klebsiella oxytoca* -kanta (M3335), keskimmaiselle maljalle oli viljelty *Citrobacter* sp.:tä (M5265), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Morganella morganii* -kanta (ATCC 25829).

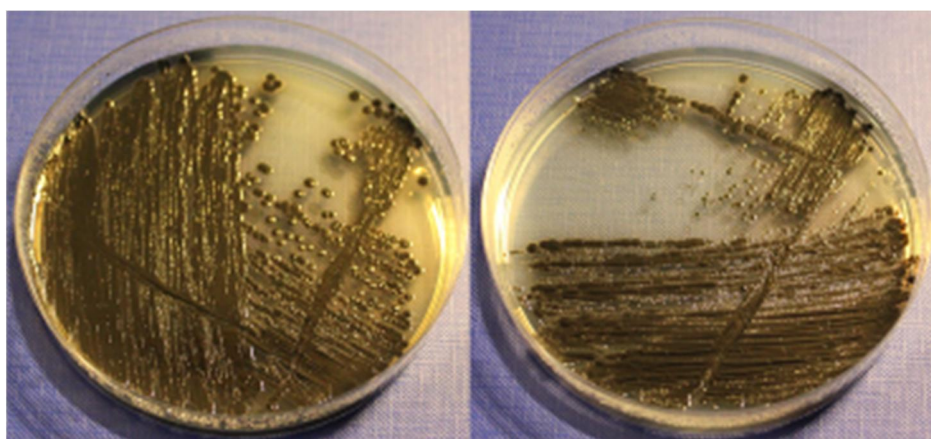
7.1.7 Pesäkkeiden ulkomuoto ABC:llä

ABC-maljoilla tyypillisissä salmonellapesäkkeissä oli vaaleanvihreä tai turkoosi keskusta ja vaalea reunus. Halkaisijaltaan pesäkkeet olivat noin 2 - 4 millimetriä. Kuvassa 37 on esimerkki tyypillisestä salmonellakasvusta ABC-maljalla.



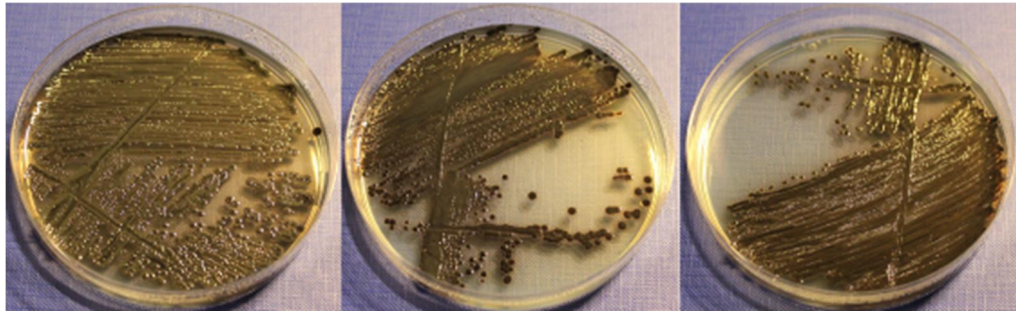
Kuva 37. Tyypillisen näköinen salmonellakasvu ABC-maljalla yhden vuorokauden (vasen) ja kahden vuorokauden (oikea) inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Salmonella* Abony-kantaa (M3790).

ABC-maljoilla epätyypillisen salmonellapesäkkeen näköisinä kasvoivat *Salmonella arizonae* (ATCC 13314) ja *Salmonella diarizonae* (ATCC 12325). Nämä salmonellat kasvoivat agarilla mustina pesäkkeinä. Kuvassa 38 on *Salmonella arizonae* ja *Salmonella diarizonae* ABC-maljoilla.



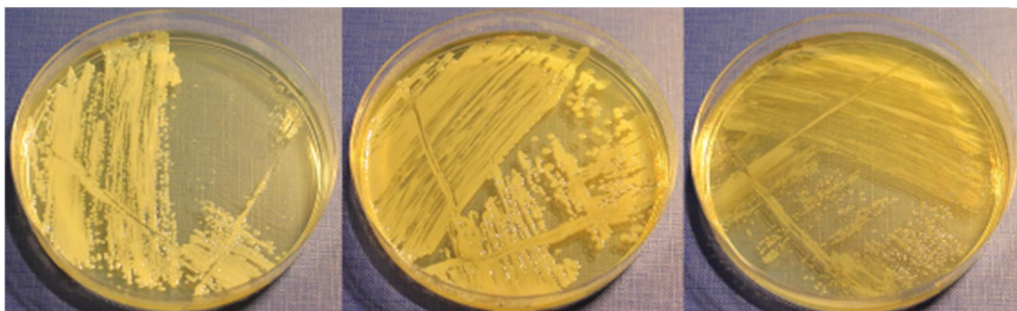
Kuva 38. Epätyypillisen näköinen salmonellakasvu ABC-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Salmonella arizonae*:a (ATCC 13314), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Salmonella diarizonae*:a (ATCC 12325).

Tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisenä ei kasvanut yksikään häiritsevästä bakteerista, mutta seuraavat bakteerit muodostivat ABC-maljalla mustia pesäkkeitä: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter sp.*, *Citrobacter koseri* ja *Citrobacter freundii*. Edellä mainittujen bakteerien muodostamat pesäkkeet olivat täysin tai lähes samannäköisiä kuin *Salmonella arizonae*:n ja *Salmonella diarizonae*:n ABC-maljalla muodostamat pesäkkeet. Kuvassa 39 on esimerkkejä ABC-maljalla mustia pesäkkeitä muodostavista häiritsevästä bakteereista.



Kuva 39. Epätyypillisen salmonellakasvun näköinen häiritsevä kasvu ABC-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Enterobacter cloacae* -kantaa (ATCC 13047), keskimmäiselle maljalle oli viljelty *Citrobacter koseri* -kantaa (ATCC 27156), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Citrobacter freundii* -kantaa (ATCC 8090).

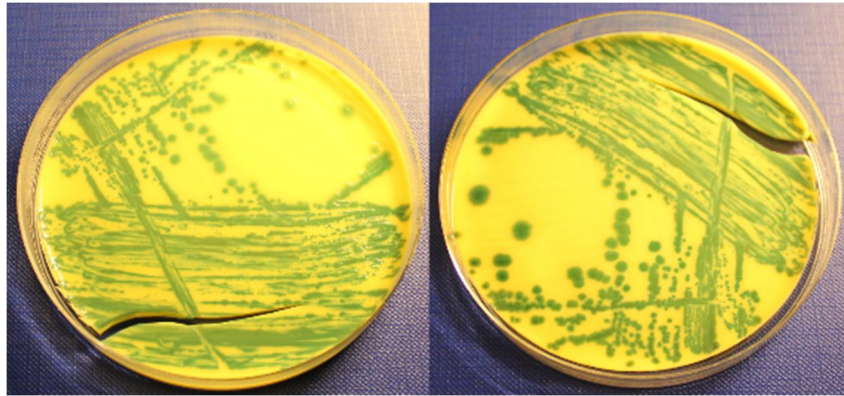
Häiritsevä kasvu kasvoi ABC-maljoilla pääsääntöisesti paitsi mustina myös kellertävinä tai vaaleina pesäkkeinä, joiden halkaisija oli välillä 1 - 4 millimetriä. Kuvassa 40 on esimerkkejä häiritsevistä kasvusta ABC-maljoilla. Monilla häiritsevillä bakteereilla värinmuodostus oli todella heikkoa, ja ne oli tästä syystä helppo erottaa salmonellapesäkkeistä.



Kuva 40. Häiritsevä kasvu ABC-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Acinetobacter baumannii* -kantaa (ATCC 19606), keskimmäiselle maljalle oli viljelty *Proteus mirabilis* -kantaa (ATCC 7002), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Morganella morganii* -kantaa (ATCC 25829).

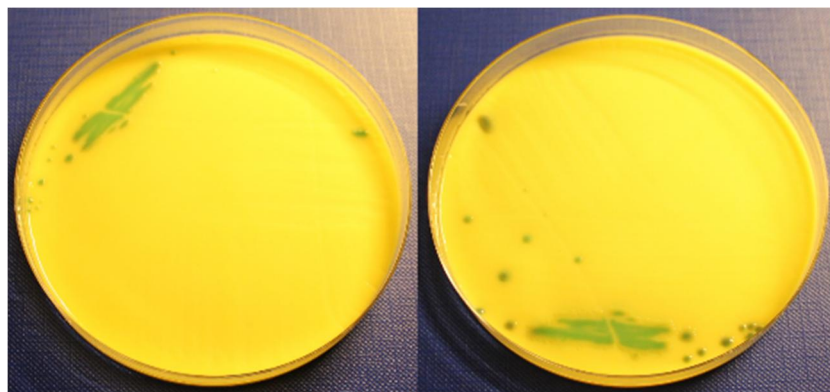
7.1.8 Pesäkkeiden ulkomuoto *IBISA*lla

IBISA-maljoilla tyypilliset salmonellapesäkkeet kasvoivat hailakan vihreinä. Salmonellakasvu oli maljoilla melko heikkoa vielä kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeenkin, mutta kaikki salmonellat kasvoivat alustalla tyypillisen salmonellan värisinä. Toisaalta myös häiritsevien bakteerien kasvu maljoilla inhiboitui suurelta osin. Kuvassa 41 on esimerkki tyypillisestä salmonellakasvusta *IBISA*-maljalla.



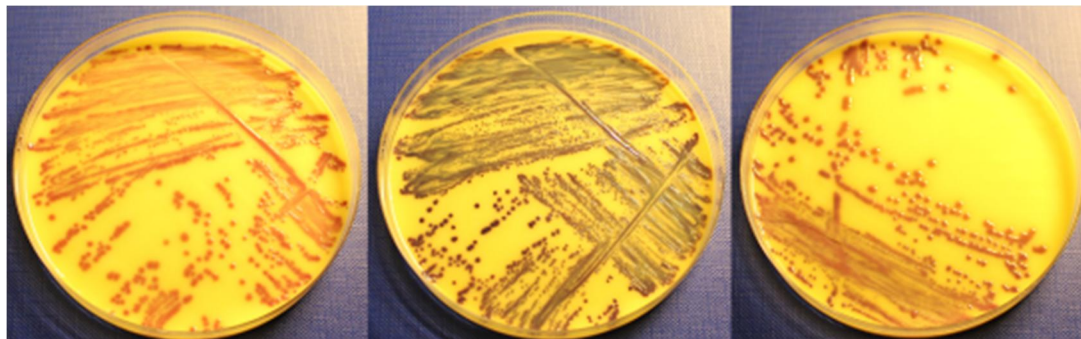
Kuva 41. Tyypillisen näköinen salmonellakasvu *IBISA*-maljalla yhden vuorokauden (vasen) ja kahden vuorokauden (oikea) inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Salmonella enterica:aa* (ATCC 51741).

Tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisenä kasvoi ainoastaan *Pseudomonas sp.* (M5027), jonka kasvu oli maljalla todella heikkoa. Kuvassa 42 on kyseinen bakteeri *IBISA*-maljalla.



Kuva 42. Tyypillisen salmonellakasvun näköinen häiritsevä kasvu *IBISA*-maljalla yhden vuorokauden (vasen) ja kahden vuorokauden (oikea) inkuboinnin jälkeen. Maljalle oli viljelty *Pseudomonas sp.:tä* (M5027).

Häiritsevää kasvuä kasvoi *IBISA*-maljoilla pääsääntöisesti harmaina, ruskeina tai punertavina pesäkkeinä. Kuvassa 43 on esimerkkejä häiritseväästä kasvusta *IBISA*-maljoilla. Monet häiritsevistä bakteereista kasvoivat maljoilla todella heikosti. Kuitenkin ne bakteerit, jotka kasvoivat maljoilla hyvin, olivat selkeästi epätyyppillisen värisiä ja näköisiä.



Kuva 43. Häiritsevää kasvuä *IBISA*-maljoilla yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Vasemmanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Citrobacter freundii* -kantaä (ATCC 6750), keskimmäiselle maljalle oli viljelty *Enterobacter cloacae* -kantaä (ATCC 13047), ja oikeanpuoleiselle maljalle oli viljelty *Klebsiella pneumoniae* -kantaä (ATCC BAA-1705).

7.2 Näytteiden keinotekoinen kontaminointi

Esikokeen perusteella bakteerit kasvoivat *BHI*-liemessä 37 °C:ssa yhden vuorokauden kasvatuksen jälkeen seuraavasti: *Salmonella* Abony:n pitoisuus oli $2,0 \cdot 10^9$ pmy/ml, *Citrobacter sp.*:n pitoisuus oli $1,7 \cdot 10^9$ pmy/ml ja *Pseudomonas sp.*:n pitoisuus oli $6,9 \cdot 10^8$ pmy/ml. Bakteerien pitoisuus *BHI*-liemessä näytteiden kontaminointia varten vaihteli *Salmonella* Abony:lla välillä $1,5 \cdot 10^9$ - $1,7 \cdot 10^9$ pmy/ml, *Citrobacter sp.*:llä välillä $1,4 \cdot 10^9$ - $1,7 \cdot 10^9$ pmy/ml ja *Pseudomonas sp.*:llä välillä $7,7 \cdot 10^8$ - $8,2 \cdot 10^8$ pmy/ml. Taulukossa 5 on esitetty kaikkien *BHI*-lienten bakteeripitoisuudet.

Taulukko 5. *BHI*-liemen bakteeripitoisuudet esikokeessa ja kontaminoinneissa.

| Bakteeri | <i>BHI</i> -liemen pitoisuus (pmy/ml) | | | | |
|-------------------------|---------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | Esikoe | Herajauhe | Kevytmaito | Lattiakaivovesi 1 | Lattiakaivovesi 2 |
| <i>Salmonella</i> Abony | $2,0 \cdot 10^9$ | $1,6 \cdot 10^9$ | $1,5 \cdot 10^9$ | $1,7 \cdot 10^9$ | $1,6 \cdot 10^9$ |
| <i>Citrobacter sp.</i> | $1,7 \cdot 10^9$ | $1,4 \cdot 10^9$ | $1,7 \cdot 10^9$ | - | - |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | $6,9 \cdot 10^8$ | - | - | $7,7 \cdot 10^8$ | $8,2 \cdot 10^8$ |

Esikokeesta saatujen *BHI*-lienten bakteeripitoisuuksien perusteella laskettiin tuotenäytteisiin pipetoitujen bakteerilaimennosten tilavuudet. Kyseiset tilavuudet, kontaminoinnissa käytetyt bakteerilaimennokset sekä tavoitesolumäärät ja laskennalliset solumäärät näytteissä on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. Tuotenäytteiden keinotekoinen kontaminointi.

| Bakteeri | Laimennosten pipetointitilavuus kontaminoinnissa | Kontaminoinnissa käytetyt laimennokset | Tavoitesolumäärä (pmy) | Laskennallinen solumäärä herajauheessa (pmy) | Laskennallinen solumäärä kevytmaidossa (pmy) |
|----------------------------|--|--|------------------------|--|--|
| <i>Salmonella</i> Abony | 300 µl | 10 ⁻⁸ | 5 - 10 | 5 | 4 |
| | | 10 ⁻⁷ | 50 - 100 | 47 | 44 |
| | | 10 ⁻⁶ | 500 - 1000 | 470 | 440 |
| <i>Citrobacter</i> sp. | 415 µl | 10 ⁻⁷ | 50 - 100 | 58 | 69 |
| | | 10 ⁻⁶ | 500 - 1000 | 580 | 690 |
| | | 10 ⁻⁵ | 5000 - 10000 | 5800 | 6900 |

Esikokeen perusteella laskettiin myös ympäristönäytteisiin pipetoitujen bakteerilaimennosten tilavuudet. Kyseiset tilavuudet, kontaminoinnissa käytetyt bakteerilaimennokset sekä tavoitesolumäärät ja laskennalliset solumäärät näytteissä on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Ympäristönäytteiden keinotekoinen kontaminointi.

| Bakteeri | Laimennosten pipetointitilavuus kontaminoinnissa | Kontaminoinnissa käytetyt laimennokset | Tavoitesolumäärä (pmy) | Laskennallinen solumäärä lattia-kaivovesi 1:ssä (pmy) | Laskennallinen solumäärä lattia-kaivovesi 2:ssa (pmy) |
|----------------------------|--|--|------------------------|---|---|
| <i>Salmonella</i> Abony | 300 µl | 10 ⁻⁸ | 5 - 10 | 5 | 5 |
| | | 10 ⁻⁷ | 50 - 100 | 50 | 48 |
| | | 10 ⁻⁶ | 500 - 1000 | 500 | 480 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | 1150 µl | 10 ⁻⁷ | 50 - 100 | 88 | 82 |
| | | 10 ⁻⁶ | 500 - 1000 | 880 | 820 |
| | | 10 ⁻⁵ | 5000 - 10000 | 8800 | 8200 |

7.3 Salmonellan kasvu rikastetuista ja keinotekoisesti kontaminoiduista tuotenäytteistä kromogeenialustoilla

Salmonella todettiin kaikista keinotekoisesti kontaminoiduista tuotenäytteistä ISO-menetelmällä. Kontaminoimattomista tuotenäytteistä (nollanäytteet) ei löydetty salmonellaa. Taulukossa 8 on esitetty ISO-menetelmän mukaisen tuotenäytteiden viljelyiden tulokset.

Taulukko 8. Tulokset tuotenäytteiden ISO-menetelmän mukaisesta salmonellan detektoinnista.

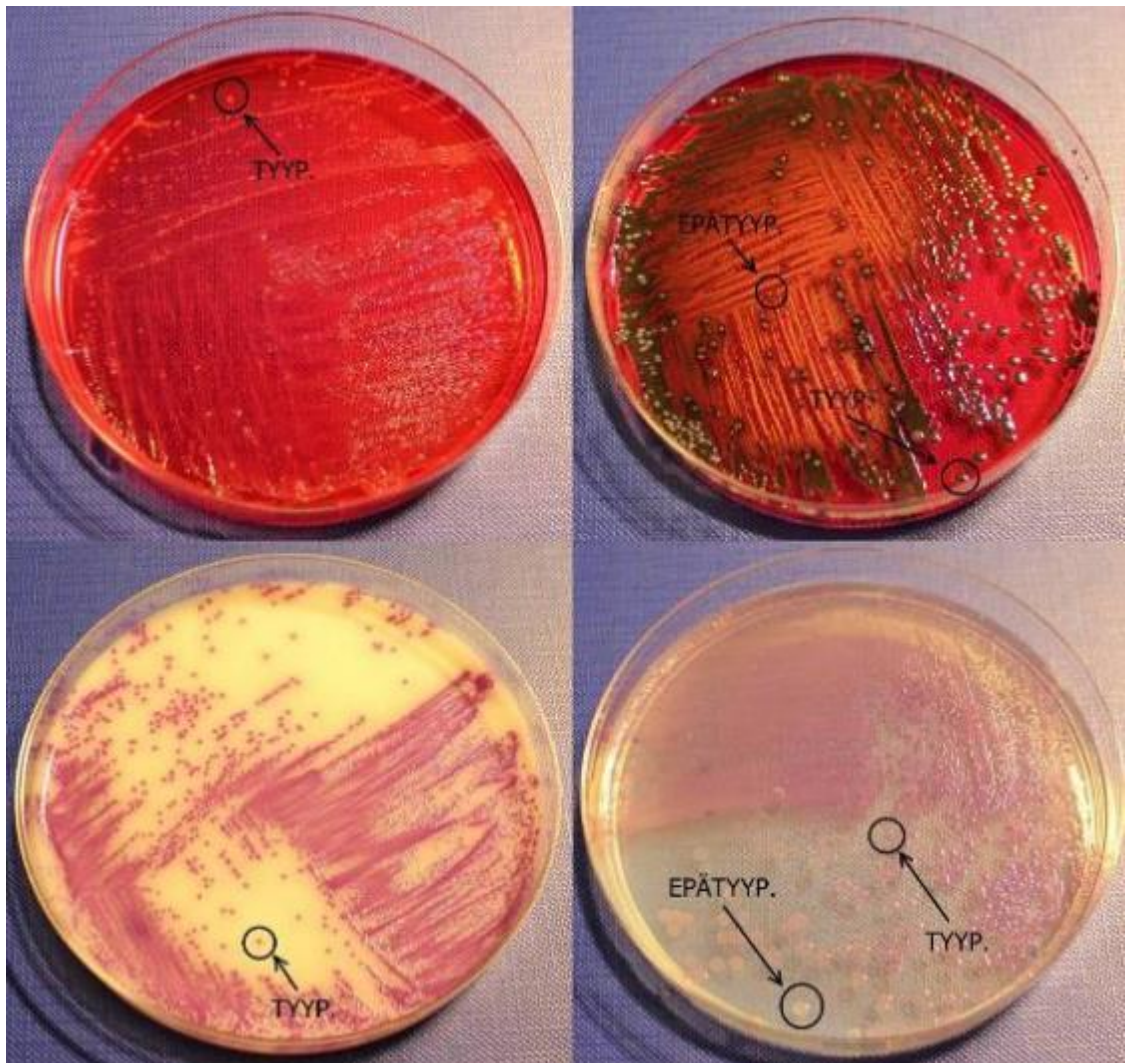
| Tuotenäytteet | | XLD | BPLS | Brilliance | CHROMagar |
|-------------------|--------------------------------|-----|------|------------|-----------|
| Herajauhe | Kontaminoidut näytteet (9 kpl) | ✓ | ✓* | ✓ | ✓ |
| | Nollanäyte | X | X | X | X |
| Kevytmaito | Kontaminoidut näytteet (9 kpl) | ✓ | ✓* | ✓ | ✓ |
| | Nollanäyte | X | X | X | X |

✓ = POSITIIVINEN/VARMISTETTU SALMONELLATULOS

✓* = POSITIIVINEN/VARMISTETTU SALMONELLATULOS, MUTTA MALJOJA TARKASTELTAESSA HÄIRITSEVÄ KASVU TYYPILLISTÄ TAI LÄHES TYYPILLISTÄ

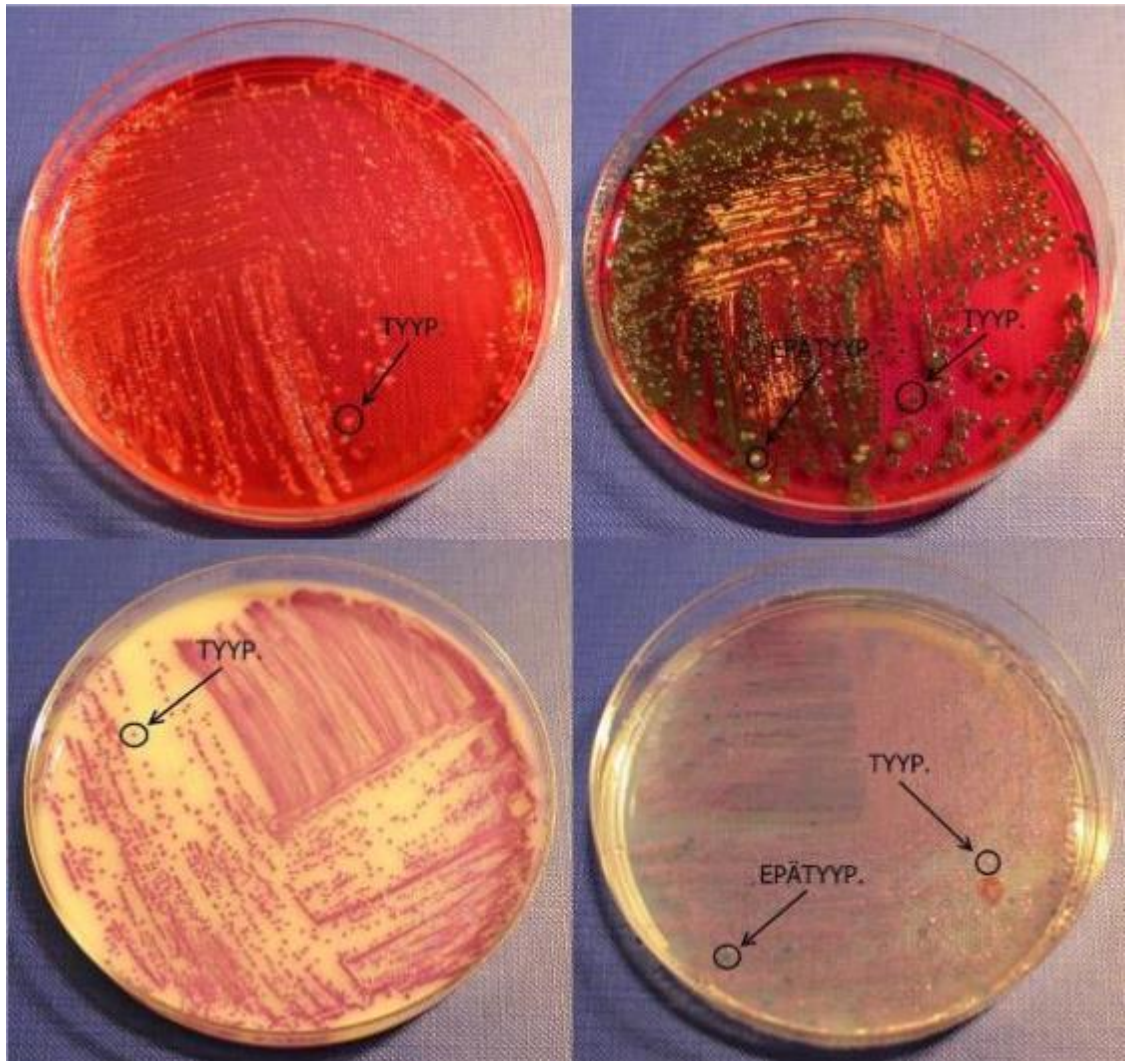
X = NEGATIIVINEN/EI TODETTU SALMONELLATULOS

Kuvasta 44 voidaan todeta, että salmonellapesäkkeiden tunnistettavuus eri maljatyypeillä vaihteli huomattavasti; *BPLS*-maljoilla salmonellapesäkkeitä oli todella vaikea erottaa häiritsevän bakteerin muodostamista pesäkkeistä. *XLD*-maljoilla salmonellapesäkkeiden tunnistaminen onnistui pääsääntöisesti hyvin, mutta maljatyyppillä oli jonkin verran häiritsevää kasvua. *Brilliance*-maljoilla häiritsevää kasvua oli joko erittäin vähän tai ei ollenkaan, joten salmonella oli helppo eristää kyseiseltä maljalta. *CHROMagar*-maljoilla häiritsevää kasvua oli jonkin verran enemmän kuin *Brilliance*-maljoilla, mutta silti huomattavasti vähemmän kuin *XLD*- ja *BPLS*-maljoilla.



Kuva 44. ISO-viljely herajauhenäytteestä *BPLS* (vas. ylä), *XLD* (oik. ylä), *Brilliance* (vas. ala) ja *CHROMagar* (oik. ala)-maljoilla. TYYP. = tyypillisen salmonellapesäkkeen näköinen pesäke, EPÄTYYP. = epätyypillinen häiritsevä pesäke. Maljoja oli inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

Kuvassa 45 on eri maljoille ISO-menetelmän mukaisesti viljelty kevytmaitonäyte. Kun verrataan kuvia 44 ja 45 keskenään, voidaan havaita, että maljat näyttävät suhteellisen samalta. Herajauhenäyte- ja kevytmaitonäytematriisit eivät vaikuttaneet pesäkkeiden ilmentymiseen eri maljatyypeillä.



Kuva 45. ISO-viljely kevytmaitonäytteestä *BPLS* (vas. ylä), *XLD* (oik. ylä), *Brilliance* (vas. ala) ja *CHROMagar* (oik. ala)-maljoilla. TYYP. = tyypillisen salmonellapesäkkeen näköinen pesäke, EPÄTYYP. = epätyypillinen häiritsevä pesäke. Maljoja oli inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

7.4 Salmonellan kasvu rikastetuista, keinotekoisesti kontaminoiduista ympäristönäytteistä kromogeenialustoilla

Salmonella todettiin kaikista keinotekoisesti kontaminoiduista ympäristönäytteistä ISO-menetelmällä. Kontaminoimattomista ympäristönäytteistä (nollanäytteet) ei löydetty salmonellaa. Taulukossa 9 on esitetty ISO-menetelmän mukaisen ympäristönäytteiden viljelyiden tulokset.

Taulukko 9. Tulokset ympäristönäytteiden ISO-menetelmän mukaisesta salmonellan detektoinnista.

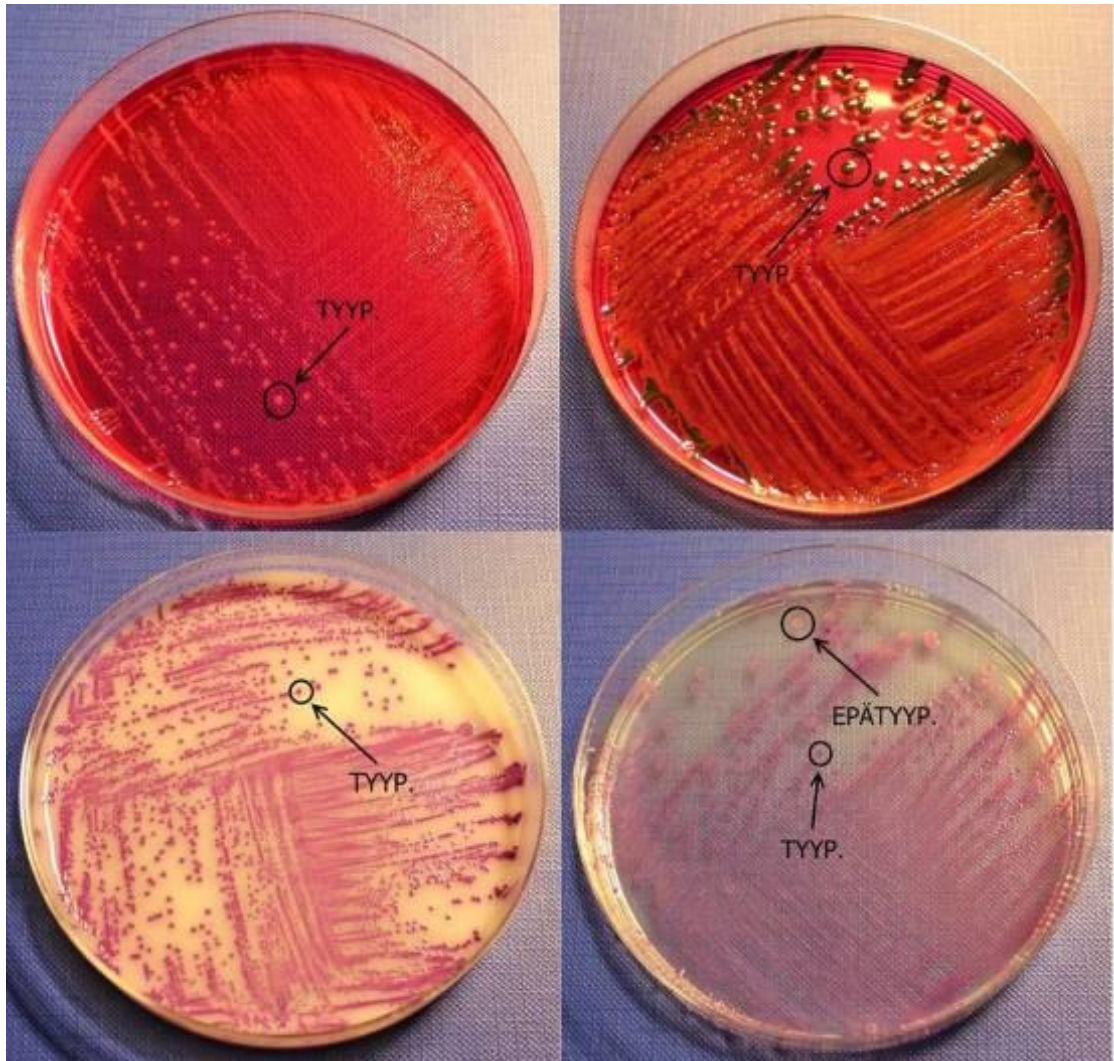
| Ympäristönäytteet | | XLD | BPLS | Brilliance | CHROMagar |
|--------------------------|--------------------------------|-----|------|------------|-----------|
| Lattiakaivovesi 1 | Kontaminoidut näytteet (9 kpl) | ✓ | ✓* | ✓ | ✓ |
| | Nollanäyte | X | X | X | X |
| Lattiakaivovesi 2 | Kontaminoidut näytteet (9 kpl) | ✓ | ✓* | ✓ | ✓ |
| | Nollanäyte | X | X | X | X |

✓ = POSITIIVINEN/VARMISTETTU SALMONELLATULOS

✓* = POSITIIVINEN/VARMISTETTU SALMONELLATULOS, MUTTA MALJOJA TARKASTELTAESSA HÄIRITSEVÄ KASVU TYYPILLISTÄ TAI LÄHES TYYPILLISTÄ

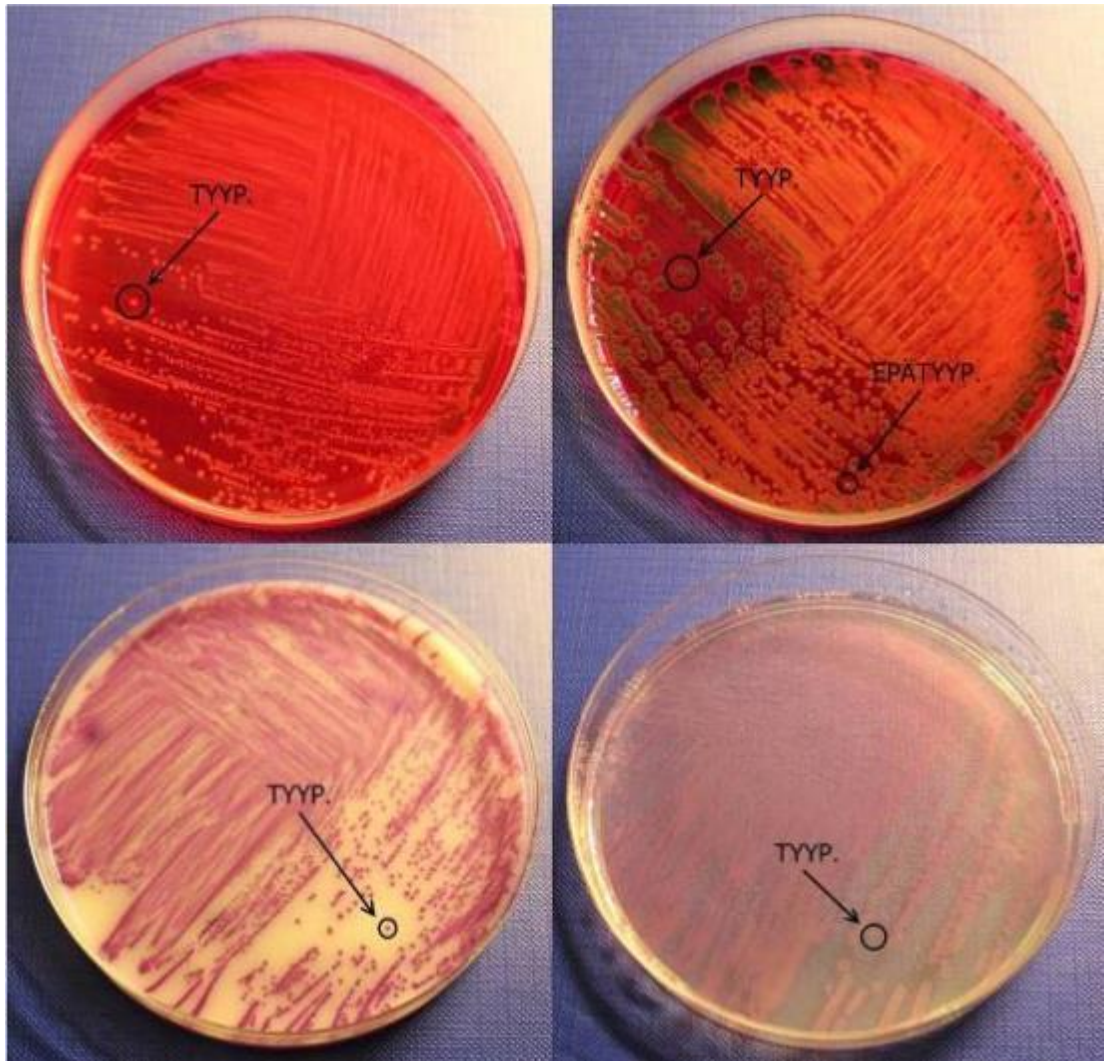
X = NEGATIIVINEN/EI TODETTU SALMONELLATULOS

Kuvasta 46 nähdään, että häiritsevää kasvua oli eri maljatyypeillä suhteellisen vähäisesti, mutta kasvua oli vaikea erottaa salmonellakasvusta *XLD*-, *BPLS*- ja *CHROMagar*-maljoilla. Sen sijaan *Brilliance*-maljoilla häiritsevää kasvu oli selkeästi erotettavissa tai sitä ei ollut ollenkaan.



Kuva 46. ISO-viljely 1. lattiakaivovesinäytteestä *BPLS* (vas. ylä), *XLD* (oik. ylä), *Brilliance* (vas. ala) ja *CHROMagar* (oik. ala)-maljoilla. TYYP. = tyypillisen salmonellapesäkkeen näköinen pesäke, EPÄTYYP. = epätyypillinen häiritsevä pesäke. Maljoja oli inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

Kuvassa 47 on eri maljoille ISO-menetelmän mukaisesti viljelty lattiakaivovesi 2 -näyte. Kun verrataan kuvia 46 ja 47 keskenään, voidaan havaita, että maljat näyttävät suhteellisen samalta. Lattiakaivovesi 1 ja lattiakaivovesi 2 -näytematriisit eivät vaikuttaneet pesäkkeiden ilmentymiseen eri maljatyypeillä.



Kuva 47. ISO-viljely 2. lattiakaivovesinäytteestä *BPLS* (vas. ylä), *XLD* (oik. ylä), *Brilliance* (vas. ala) ja *CHROMagar* (oik. ala)-maljoilla. TYYP. = tyypillisen salmonellapesäkkeen näköinen pesäke, EPÄTYYP. = epätyypillinen häiritsevä pesäke. Maljoja oli inkuboitu yhden vuorokauden ajan 37 °C:ssa.

7.5 Salmonellan kasvu rikastetuista, keinotekoisesti kontaminoituista tuote- ja ympäristönäytteistä kromogeenialustoilla verrattuna *BAX-PCR*-tuloksiin

BAX-PCR-menetelmä antoi kaikista keinotekoisesti kontaminoituista lattiakaivovesi- ja herajauhenäytteistä salmonellapositiivisen tuloksen, joten tulokset olivat yhtenevät ISO-viljelymenetelmän kanssa kaikilla alustoilla. *BAX-PCR* antoi negatiivisen tuloksen kaikista kontaminoimattomista näytteistä (nollanäytteet). Täten näillä matriiseilla kaikki validointiparametrit (suhteellinen oikeellisuus, suhteellinen herkkyys ja suhteellinen spesifisyys) olivat 100 prosenttia (Taulukko 10).

7.6 BAX-PCR-menetelmän suhteelliset oikeellisuudet, spesifisyydet sekä herkkyudet verrattuna ISO-menetelmään

ISO-menetelmällä pystyttiin detektoimaan ja eristämään salmonella kaikista keinotekoisesti kontaminoiduista lattiakaivovesi- sekä herajauhenäytteistä. BAX-PCR-menetelmä antoi lattiakaivovesien sekä herajauheen osalta täsmälleen samat tulokset kuin ISO-menetelmä eli kaikki BAX-PCR:llä analysoidut keinotekoisesti kontaminoidut ympäristönäytteet (n = 18) sekä herajauhenäytteet (n = 9) olivat positiivisia, ja kaikki kontaminoimattomat ympäristönäytteet (n = 2) sekä tuotenäyte (n = 1) olivat negatiivisia. Kummassakaan menetelmässä häiritsevän mikrobin kymmenkertainen määrä suhteessa salmonellan määrään ympäristö- ja herajauhenäytteissä ei aiheuttanut vääriä negatiivisia tuloksia. Taulukossa 10 on esitetty eri näytematriiseille tulosten pohjalta määritetyt suhteelliset oikeellisuudet, spesifisyydet ja herkkyudet.

Taulukko 10. BAX-PCR-menetelmän suhteelliset oikeellisuudet, spesifisyydet sekä herkkyudet tuote- ja ympäristönäytteille.

| BAX-PCR-menetelmä | | | | |
|--------------------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Näytematriisi | Näytteiden lkm | Suhteellinen oikeellisuus | Suhteellinen spesifisyys | Suhteellinen herkkyys |
| Herajauhe | 10 | 100,00 % | 100,00 % | 100,00 % |
| Lattiakaivovesi 1 | 10 | 100,00 % | 100,00 % | 100,00 % |
| Lattiakaivovesi 2 | 10 | 100,00 % | 100,00 % | 100,00 % |

8 Tulosten tarkastelu

8.1 Salmonellakromogeenialustan valinta *BPLS*-alustan tilalle

Salmonellakromogeenialustojen vertailututkimuksessa päädyttiin siihen tulokseen, että *Oxoidin* valmistama *Brilliance Salmonella* -malja soveltuu parhaiten Valio Oy:n mikrobiologisen laboratorion ISO-menetelmän toiseksi maljaksi *XLD*-agarin rinnalle, *BPLS*-agarin tilalle. *Brilliance*-maljalla pesäkkeiden värierot olivat selkeitä, ja maljatyypin inhiboi voimakkaasti häiritsevien mikrobien kasvua. *BPLS*-maljan suurimpana ongelmana olivat juuri väärät positiiviset tunnistukset viljelyvaiheessa, ja tästä aiheutuneet turhat varmistustestit; Tehdyn validointitutkimuksen perusteella voidaan olettaa, että *Brilliance*-kromogeenimaljan avulla turhien varmistusten määrä tulee putoamaan murto-osaan entisestä.

8.2 Salmonellakromogeenialustojen välinen vertailu

Salmonellapesäkkeet olivat huomattavasti helpommin havaittavissa *Oxoidin Brilliance Salmonella* -elatusaineelta kuin *XLD*, *BPLS* ja *CHROMagar Salmonella Plus* -elatusaineilta. Lisäksi *Brilliance Salmonella* -maljan selektiiviset ominaisuudet olivat merkittävästi paremmat kuin *CHROMagar Salmonella Plus* -maljan: *Brilliance Salmonella* -agar estii *Citrobacter sp.*:n ja *Pseudomonas sp.*:n kasvua. Tämä johti muun muassa siihen, että tuote- ja lattiakaivovesinäytteitä analysoitaessa häiritsevää kasvua oli todella vähäisesti tai ei ollenkaan. Toisaalta *CHROMagar*-elatusaineen etuna on sen säilyvyys: koska elatusaine voidaan tilata jauheena (jauhe + supplementti) ja valaa vain tarvittaessa maljoille, sillä on pidempi säilyvyysaika kuin *Brilliance*-valmismaljoilla. Kuitenkin ensisijaisena kriteerinä kromogeenialustan valitsemisessa oli maljan spesifisyys ja herkkyys. Huolimatta siitä, että spesifisyys ja herkkyys eivät olleet alustavassa maljavertailussa *Brilliance Salmonella* -agarin osalta parhaat, se osoittautui kuitenkin keino-otekoisesti kontaminoitujen lattiakaivovesi- ja tuotenäytteiden analysoinnissa todella spesifiseksi ja herkäksi maljaksi. Vaikka *CHROMagar Salmonella Plus* -agar osoittautui myös Valio Oy:n ISO-menetelmän mukaiseen viljelyyn hyvin soveltuvaksi elatusaineeksi, sen selektiiviset ominaisuudet eivät olleet yhtä hyvät kuin *Brilliance*-agarilla, ja tämä oli ratkaiseva ero näiden kahden eri kromogeeniagarin välillä. Liitteenä olevassa yhteenvetotaulukossa (Liite 7) on esitetty yhteenveto *Brilliance Salmonella* ja *CHROMagar Salmonella Plus* -elatusaineista ja niiden ominaisuuksista.

8.3 *BAX-PCR*- ja ISO-menetelmien vertailu

BAX-PCR-menetelmä antoi kaikkien lattiakaivovesi- ja herajauhenäytteiden osalta ISO-menetelmän kanssa yhtenevät tulokset. Täten voidaan todeta, että lattiakaivovesinäytteitä voitaisiin ainakin tämän alustavan validoinnin perusteella analysoida *BAX-PCR*-menetelmällä. Kuitenkin *BAX-PCR*-menetelmän validointi Valio Oy:n lattiakaivovesinäytteille vaatii vielä lisätutkimuksia, joissa saadaan lasketuksi kaikki validointiparametrit suuremmasta otannasta. Tällöin saataisiin luotettavampaa tietoa *BAX-PCR*-menetelmän soveltuvuudesta lattiakaivovesinäytteiden analysointiin.

9 Pohdinta

Kromogeenialustojen ylivertaisuus selektiivialustoihin nähden ISO-menetelmän mukaisessa salmonellatestauksessa antoi aihetta pohtia, olisiko myös *XLD*-agar mahdollista korvata tulevaisuudessa jollakin kromogeenialustalla. Toki *XLD*-agar on vakiinnuttanut paikkansa ISO-menetelmässä, mutta mikäli ISO-menetelmään saataisiin kaksi luotettavaa ja selkeästi luettavaa alustaa, menetelmä nopeutuisi ja helpottuisi huomattavasti. Toki jokaisella kromogeenialustalla on omat heikkoutensa, eivätkä värireaktiot ole jokaisen bakteerin kohdalla kovin selkeät, mutta mikäli kromogeenialustojen kehitystyö jatkuu samanlaisena kuin tähänkin asti, voidaan olettaa, että tulevaisuudessa markkinoille tulee kasvualusta, joka on todella herkkä ja spesifinen.

Toisaalta ISO-viljelymenetelmä on melko vanhanaikainen menetelmä, ja viime vuosien aikana on kehitetty lukuisia salmonellapikamenetelmiä, joilla salmonella voidaan detektoida analysoitavista näytteistä huomattavasti nopeammin. Lisäksi näiden vaihtoehtoisten menetelmien herkkyys ja spesifisyys ovat parantuneet huomattavasti. Vaikka ISO-menetelmä on vakiinnuttanut paikkansa salmonellatestauksen standardina, tulevaisuudessa tämä menetelmä tulee todennäköisesti osittain harvinaistumaan uusien huomattavasti helpompien ja nopeampien salmonellamenetelmien tieltä. ISO-menetelmän etu pikamenetelmiin nähden on se, että viljelymenetelmällä mahdollinen salmonellabakteeri saadaan suhteellisen helposti eristettyä näytteestä tyypitystä ja jatkotestejä varten.

Lähteet

AFNOR Certification. 2002. Validation Certificate for Alternative Analytical Method According to Standard EN ISO 16140:2003 - BAX System PCR Assay *Salmonella spp.* Dadilly cedex, Ranska.

<http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/assets/downloads/AFNOR_Salm_E.pdf>. Luettu 29.12.2013.

AFNOR Certification. 2011. Afnor Certification Validation Study Ibis Method for the Detection of *Salmonella spp.* - Summary Report. Massy, Ranska. <http://www.afnor-validation.com/rapports-synthese/AES%20Chemunex/Synt-AES-10-11-07-11_%28fr%29.pdf>. Luettu 22.11.2013.

Biomerieux. 2007. ChromID Salmonella Agar (SM2), Technical Sheet. Lyon, Ranska. <http://www.biomerieux-usa.com/servlet/srt/bio/usa/dynPage?open=USA_PRD_LST&doc=USA_PRD_LST_G_PRD_USA_23&pubparams.sform=0&lang=en#Salmonella>. Ladattu Biomerieux:n internetsivuilta 11.11.2013.

Brenner, Don J.; Krieg, Noel R.; Staley, James T. 2005. Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition vol. 2, Part B. New York, Yhdysvallat: Springer Science+Business Media.

Cassar, Robert; Cuschieri, Paul. 2003. Comparison of Salmonella Chromogenic Medium with DCLS Agar for Isolation of Salmonella Species from Stool Specimens. Journal of Clinical Microbiology vol. 41: nro. 7, s. 3229 - 3232.

CHROMagar. 2011. CHROMagar Salmonella Plus. Pariisi, Ranska. <http://www.chromagar.com/fichiers/1311161887NT_EXT_024_V8.pdf>. Luettu 31.10.2013.

Cooke, Venitia M.; Miles R. J.; Price R. G.; Richardson A. C. 1999. A Novel Chromogenic Ester Agar Medium for Detection of Salmonellae. Applied and Environmental Microbiology vol. 65: nro. 2, s. 807 - 812.

Corry, Janet E. L.; Curtis, J. D. W.; Baird, R. M. 2003. Handbook of Culture Media for Food Microbiology: progress in industrial microbiology, Second Edition, vol. 37: s. 195 - 205. Amsterdam, Alankomaat: Elsevier Science B. V.

De Beaumont C.; Breuil J.; Dedicova D.; Tran Q. 2006. Evaluation of a new chromogenic medium, CHROMagar Salmonella Plus, for the detection of *Salmonella spp.* including lactose-positive *Salmonella*, *S. typhi* and *S. paratyphi*. ECCMID. Nizza, Ranska. <

http://www.chromagar.com/fichiers/1255963669ECCMID_06_BEAUMONT_SA.pdf>. Luettu 21.11.2013.

Doyle, Michael P.; Beuchat, Larry R. 2007. Food Microbiology: FUNDAMENTALS AND FRONTIERS, Third Edition. Washington D.C., Yhdysvallat: ASM (American Society for Microbiology) Press.

Drago, Lorenzo; Gismondo, Maria Rita; Lombardi, Alessandro; De Haën, Cristoph; Gozzini, Luigia. 1997. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new Lactobacillus isolates of human intestinal origin. FEMS Microbiology Letters vol. 153: nro. 2, s. 455-463.

Evira. 2013. Ruokamyrkytystä aiheuttavia bakteereja: Salmonella. <<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa+elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruoka/myrkytykset/ruokamyrkytysta+aiheuttavia+bakteereja/salmonella>>. Luettu 18.2.2014.

Gaillot, Olivier; Di Camillo, Patrick; Berche, Patrick; Courcol, René; Savage, Colette. 1999. Comparison of CHROMagar Salmonella Medium and Hektoen Enteric Agar for Isolation of Salmonellae from Stool Samples. Journal of Clinical Microbiology vol. 37: nro. 3, s. 762 - 765.

LabM. 2006. Harlequin Salmonella ABC (Freeman Formulation). Lancashire, Iso-Britannia. <http://www.labm.com/data/Product_Downloads/HAL001%20technical%20flyer.pdf>. Luettu 31.10.2013.

LabM. 2006. X.L.D. Agar. <http://www.labm.com/data/Product_Downloads/LAB032_specification.pdf>. Luettu 28.12.2013.

Manafi, M. 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. International Journal of Food Microbiology vol. 60: s. 205 - 218.

Merck Millipore. 2008. BPLS (Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose) Agar Application. Darmstadt, Saksa. <http://www.merckmillipore.com/finland/chemicals/bpls-agar/MDA_CHEM107237/p_m2ab.s1LR1kAAAEWQ.EfVhTI?attachments=APPL>. Ladattu Merck Millipore:n internetsivuilta 7.11.2013.

Merck Millipore. 2008. Rambach Agar Application. Darmstadt, Saksa. <http://www.merckmillipore.com/finland/chemicals/rambach-agar/MDA_CHEM-107500/p_uuid;sid=iGaPmiWMcFeomnczj-rjzY1MD-Wdak8rsEiRzJYhqlx-asCplbsMCO-ynz0CJw71CBWfhiZVdV6mnaxFKuI6cYrGqZKW3ulcu_w3u52VjqtEBE8rsEg6cYrG?attachments=APPL>. Ladattu Merck Millipore:n internetsivuilta 10.11.2013.

Nye K. J.; Fallon D.; Frodsham, D.; Gee, B.; Graham, C.; Howe, S.; Messer, S.; Turner, T.; Warren, R. E. 2002. An evaluation of the performance of XLD, DCA, MLCB, and ABC agars as direct plating media for the isolation of *Salmonella enterica* from faeces. Journal of Clinical Pathology vol. 55: s. 286 - 288.

Odumeru, Joseph A.; León-Velarde, Carlos G. 2012. Kappale 17: Salmonella Detection Methods for Food and Food Ingredients. Teos: Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen. InTech. <<http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen/salmonella-detection-methods-for-food-and-food-ingredients>>. Luettu 28.12.2013.

Oxoid. 2010. Brilliance Salmonella. Hampshire, Iso-Britannia. <http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1092&sec=&org=124&c=UK&lang=EN>. Ladattu Oxoid:n internetsivuilta 10.11.2013.

Perry, John D.; Ford, Michael; Taylor, Jeffrey; Jones, Amanda L.; Freeman, Roger; Gould, Frances K. 1999. ABC Medium, a New Chromogenic Agar for Selective Isolation of *Salmonella* spp. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 37: nro. 3, s. 766 - 768.

Perry, J. D.; Freydière, A. M. 2007. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *Journal of Applied Microbiology* vol. 103: nro. 6, s. 2049 - 2050.

Perry, J. D.; Riley, G.; Gould, F. K.; Perez, J. M.; Boissier, E.; Ouedraogo, R. T.; Freydière, A. M. 2002. Alafosfalin as a Selective Agent for Isolation of *Salmonella* from Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 40: nro. 11, s. 3913 - 3916.

Rambach, Alain. 1990. New Plate Medium for Facilitated Differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and Other Enteric Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 56: nro. 1, s. 301 - 303.

Roberts, T.A. 1996. *Micro-organisms in Foods 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens*, First Edition. London SE1 8HN, the United Kingdom: Chapman & Hall.

Robinson, Richard K. 2002. *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*, Third Edition. New York, the United States of America: John Wiley and Sons Inc.

Ruutu, Petri. 2009. Salmonelloosit. <http://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p_artikkeli=seh00039>. Luettu 30.6.2014.

Szala, Beata; Zbigniew Paluszak, Zbigniew; Motyl, Ilona. 2012. Antagonistic Effect of Lactic Acid Bacteria on *Salmonella* Senftenberg in Mixed Cultures. *Polish Journal of Environmental Studies* vol. 21: nro. 5, s. 1399 - 1403.

THL. 2014. Salmonella. <http://www.thl.fi/fi_FI/web/infektiaudit-fi/salmonella>. Luettu 18.2.2014.

Valio Oy. 2010. BAX-PCR -menetelmäohje. Helsinki, Suomi.

Valio Oy. 2009. BAX-PCR Salmonella -menetelmän verifiointisuunnitelma. Helsinki, Suomi.

Van, Jon. 1987. '85 Salmonella Outbreak Largest Ever, Study Says. *Yhdysvallat: Chicago Tribune News*. <http://articles.chicagotribune.com/1987-12-11/news/8704020074_1_hillfarm-dairy-salmonella-antibiotics>. Luettu 17.2.2014.

ISO 6579:2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 6. versio. 2013. Helsinki, Suomi.

Van Dijk, Saskia; Bruins, Marjan J.; Ruijs; Gijs J. H. M. 2009. Evaluation and Implementation of a Chromogenic Agar Medium for *Salmonella* Detection in Stool in Routine Laboratory Diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 47: nro. 2, s. 456 - 458.

Zoonosikeskus. 2014. Bakterien aiheuttamat taudit: Salmonelloosi.

<http://www.zoonosikeskus.fi/portal/fi/zoonositi/bakterien_aiheuttamat_taudit/salmonella/>. Luettu 18.2.2014.

Alustava maljavertailu (1 ja 2 vuorokauden inkuboinnin jälkeen, 37±1°C)

| Mikrobikanta | XLD | | BPLS | | Rambach | | ChromID | | IBISA | | Brilliance Salmonella | | ABC | | CHROMagar | |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|---------|-------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|-------|-----------|-------|
| | 1 vrk | 2 vrk | 1 vrk | 2 vrk | 1 vrk | 2 vrk | 1 vrk | 2 vrk | 1 vrk | 2 vrk | 1 vrk | 2 vrk | 1 vrk | 2 vrk | 1 vrk | 2 vrk |
| <i>Salmonella</i> Abony | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| <i>Salmonella</i> Infantis | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| <i>Salmonella</i> spp. | O | O | O | O | O | O/X | O | O | O | O | O | O | O | O/X | O | O |
| <i>Salmonella</i> Senftenberg | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| <i>Salmonella</i> Dublin | O | O | O | O | O/X | O/X | X | X | O | O | O/X | O/X | O | O | X | O/X |
| <i>Salmonella</i> Stockholm | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| <i>Salmonella</i> Agona | X | X | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| <i>Salmonella</i> Bovismorbificans | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| <i>Salmonella</i> arizonae | O | O | O | O | X | O/X | O | O | O | O | O | O | X | X | O | O |
| <i>Salmonella</i> diarizonae | O | O | O | O | X | O/X | O | O | O | O | O | O | X | X | O | O |
| <i>Salmonella</i> enterica | X | X | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis | O | O | O | O | O | O/X | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | O | O | X | O/X | X | X | O | O/X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| <i>Citrobacter freundii</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | O/X | O/X | O/X | O/X | X | X |
| <i>Proteus mirabilis</i> | O | O | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| <i>Proteus vulgaris</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | O | O | O | O | O/X | O/X | O | O | O | O | X | O/X | X | X | O/X | O |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | X | X | O/X | O/X | X | X | O/X | O/X | O/X | O/X | O/X | O/X | X | X | X | X |
| <i>Escherichia coli</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | O/X | O/X | X | X |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | O/X | O/X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | O/X | O/X | O/X | X | X |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | X | X | X | X | X | O/X | O/X | O/X | X | X | O/X | O/X | X | X | O/X | O/X |
| <i>Bacillus Cereus</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Serratia marcescens</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | O/X | X | X | X | X |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | O/X | O/X | X | X |
| <i>Citrobacter</i> sp. | O | O | O/X | O/X | O/X | X | X | X | X | X | X | O/X | O/X | O/X | X | X |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | O/X | X | X |
| <i>Citrobacter koseri</i> | X | X | O | O | O/X | X | X | X | X | X | X | X | O/X | O/X | X | X |
| <i>Citrobacter freundii</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | O/X | O/X | O/X | O/X | X | X |
| <i>Morganella morganii</i> | O | O | X | O/X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

Tyypillinen kasvu = O (tyypillisen salmonellapesäkkeen näköinen)

Epätyypillinen kasvu = X (häiritsevän kasvun näköinen)

Varmistettava kasvu/epäselvä kasvu = O/X

Ei kasvua = -

Eniten tyypillisen salmonellapesäkkeen näköisenä eri maljatyypeillä kasvoivat seuraavat häiritsevät bakteerit: *Pseudomonas* sp., *Citrobacter* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Citrobacter koseri*.

XLD ja BPLS, valmistusohjeet

XLD-agar

Perusalusta:

| | |
|------------------------------------|---------|
| <u>Ksyloosi</u> | 3.75 g |
| <u>L-lysiini</u> | 5.0 g |
| <u>Laktoosi</u> | 7.5 g |
| <u>Sakkarooosi</u> | 7.5 g |
| <u>Natriumkloridi</u> | 5.0 g |
| <u>Hiivauute</u> | 3.0 g |
| <u>Fenolipuna</u> | 0.08 g |
| <u>Natrium-desoksikolaatti</u> | 1.0 g |
| <u>Natrium-tiosulfaatti</u> | 6.8 g |
| <u>Ammoniumrauta(III)sitraatti</u> | 0.8 g |
| <u>Agar</u> | 13.0 g |
| <u>Tislattu vesi</u> | 1000 ml |

Steriloidaan kiehattamalla. Annetaan jäähtyä 47 °C:n vesihauhteessa. Alustan pH:n tulee olla steriloinnin jälkeen 7,4±0,2.

BPLS-agar

Perusalusta:

| | |
|-------------------------------|----------|
| <u>Peptoni</u> | 5,0 g |
| <u>Tryptoni</u> | 5,0 g |
| <u>Lihauute</u> | 5,0 g |
| <u>Natriumkloridi</u> | 3,0 g |
| <u>Dinatriumvetyfosfaatti</u> | 2,0 g |
| <u>Laktoosi</u> | 10,0 g |
| <u>Sakkarooosi</u> | 10,0 g |
| <u>Fenolipuna</u> | 0,08 g |
| <u>Brillianttinvihreä</u> | 0,0125 g |
| <u>Agar</u> | 12,0 g |
| <u>Tislattu vesi</u> | 1000 ml |

Steriloidaan autoklavoimalla 15 min 121±1 °C. Alustan pH:n tulee olla steriloinnin jälkeen 6,9±0,2.

ABC ja Rambach, valmistusohjeet

Harlequin Salmonella ABC -agar

Perusalusta:

| | |
|---|----------------|
| <u>Peptoni</u> | <u>5,0 g</u> |
| <u>Lihauute</u> | <u>5,0 g</u> |
| <u>Natriumsitraatti</u> | <u>8,5 g</u> |
| <u>Natriumdesoksikolaatti</u> | <u>5,0 g</u> |
| <u>Ammoniumrauta(III)sitraatti</u> | <u>0,5 g</u> |
| <u>X-α-galaktoosi</u> | <u>0,08 g</u> |
| <u>CHE-galaktoosi</u> | <u>0,3 g</u> |
| <u>IPTG</u> | <u>0,03 g</u> |
| <u>Agar</u> | <u>12,0 g</u> |
| <u>Tislattu vesi</u> | <u>1000 ml</u> |

Steriloidaan kiehattamalla. Annetaan jäähtyä 47 °C:n vesihauteessa. Alustan pH:n tulee olla steriloinnin jälkeen 7,2 \pm 0,2.

Rambach-agar

Perusalusta:

| | |
|-------------------------------|----------------|
| <u>Peptoni</u> | <u>8,0 g</u> |
| <u>Natriumkloridi</u> | <u>5,0 g</u> |
| <u>Natriumdesoksikolaatti</u> | <u>1,0 g</u> |
| <u>Kromogeenisubstraatit</u> | <u>1,5 g</u> |
| <u>Agar</u> | <u>15,0 g</u> |
| <u>Tislattu vesi</u> | <u>1000 ml</u> |

Steriloidaan kiehattamalla. Annetaan jäähtyä 45 - 50 °C:n vesihauteessa. Alustan pH:n tulee olla steriloinnin jälkeen 7,3 \pm 0,2.

Lisäaine: Propyleeniglykoli 10,5 g.

CHROMagar ja TSA, valmistusohjeet

CHROMagar Salmonella Plus -agar

Perusalusta:

| | |
|------------------------------|----------------|
| <u>Peptoni ja hiivauute</u> | <u>8,0 g</u> |
| <u>Suolat</u> | <u>8,5 g</u> |
| <u>Kromogeenisubstraatit</u> | <u>1,3 g</u> |
| <u>Agar</u> | <u>15,0 g</u> |
| <u>Tislattu vesi</u> | <u>1000 ml</u> |

Steriloidaan kiehauttamalla. Annetaan jäähtyä 45 - 50 °C:n vesihauteessa. Alustan pH:n tulee olla steriloinnin jälkeen 7,5±0,2.

Lisäaine: Suplementti SA162(S) 6 g.

TSA-agar

Perusalusta:

| | |
|-----------------------|----------------|
| <u>Tryptoni</u> | <u>15,0 g</u> |
| <u>Soijapeptoni</u> | <u>5,0 g</u> |
| <u>Natriumkloridi</u> | <u>5,0 g</u> |
| <u>Agar</u> | <u>12,0 g</u> |
| <u>Tislattu vesi</u> | <u>1000 ml</u> |

Steriloidaan autoklavoimalla 15 min 121±1 °C. Alustan pH:n tulee olla steriloinnin jälkeen 7,3±0,2.

BHI, PPV ja RVS, valmistusohjeet

Brain Heart Infusion -liemi

Perusalusta:

| | |
|--------------------------------------|----------------|
| <u>Brain Heart Infusion (siasta)</u> | <u>17,5 g</u> |
| <u>Tryptoosi</u> | <u>10,0 g</u> |
| <u>Glukoosi</u> | <u>2,0 g</u> |
| <u>Natriumkloridi</u> | <u>5,0 g</u> |
| <u>Dinatriumvetyfosfaatti</u> | <u>2,5 g</u> |
| <u>Tislattu vesi</u> | <u>1000 ml</u> |

Steriloidaan autoklavoimalla 15 min 121 ± 1 °C. Liemen pH:n tulee olla steriloinnin jälkeen $7,4\pm 0,2$.

Puskuroitu peptonivesi

Perusalusta:

| | |
|---|----------------|
| <u>Peptoni (kaseiini)</u> | <u>10,0 g</u> |
| <u>Natriumkloridi</u> | <u>5,0 g</u> |
| <u>Dinatriumvetyfosfaatti dodekahydraatti</u> | <u>9,0 g</u> |
| <u>Kaliumdivetyfosfaatti</u> | <u>1,5 g</u> |
| <u>Tislattu vesi</u> | <u>1000 ml</u> |

Steriloidaan autoklavoimalla 15 min 121 ± 1 °C. Liemen pH:n tulee olla steriloinnin jälkeen $7,0\pm 0,2$.

Rappaport Vassiliadis Soya -liemi

Perusalusta:

| | |
|-----------------------------------|----------------|
| <u>Soijapeptoni</u> | <u>4,5 g</u> |
| <u>Natriumkloridi</u> | <u>7,2 g</u> |
| <u>Kaliumdivetyfosfaatti</u> | <u>1,26 g</u> |
| <u>Dikaliumvetyfosfaatti</u> | <u>0,18 g</u> |
| <u>Magnesiumkloridi anhydridi</u> | <u>13,58 g</u> |
| <u>Malakiittivihreä</u> | <u>0,033 g</u> |
| <u>Tislattu vesi</u> | <u>1000 ml</u> |

Steriloidaan autoklavoimalla 15 min 115 ± 1 °C. Liemen pH:n tulee olla steriloinnin jälkeen $5,2\pm 0,2$.

TSI ja Urea, valmistusohjeet

Triple Sugar Iron -agar

Perusalusta:

| | |
|-------------------------------|----------------|
| <u>Lihauute</u> | <u>3,0 g</u> |
| <u>Hiivauute</u> | <u>3,0 g</u> |
| <u>Tasapainotettu peptoni</u> | <u>20,0 g</u> |
| <u>Natriumkloridi</u> | <u>5,0 g</u> |
| <u>Laktoosi</u> | <u>10,0 g</u> |
| <u>Sakkaroosi</u> | <u>10,0 g</u> |
| <u>Glukoosi</u> | <u>1,0 g</u> |
| <u>Rauta(III)sitraatti</u> | <u>0,3 g</u> |
| <u>Natrium-tiosulfaatti</u> | <u>0,3 g</u> |
| <u>Fenolipuna</u> | <u>0,025 g</u> |
| <u>Agar</u> | <u>12,0 g</u> |
| <u>Tislattu vesi</u> | <u>1000 ml</u> |

Steriloidaan autoklavoimalla 15 min 121±1 °C. Alustan pH:n tulee olla steriloinnin jälkeen 7,4±0,2.

Urea-agar

Perusalusta:

| | |
|------------------------------|----------------|
| <u>Peptoni</u> | <u>10,0 g</u> |
| <u>Glukoosi</u> | <u>1,0 g</u> |
| <u>Natriumkloridi</u> | <u>5,0 g</u> |
| <u>Dinatriumfosfaatti</u> | <u>1,2 g</u> |
| <u>Kaliumdivetyfosfaatti</u> | <u>0,8 g</u> |
| <u>Fenolipuna</u> | <u>0,012 g</u> |
| <u>Agar</u> | <u>12,0 g</u> |

Seosta liuotetaan 2,1 g 95 ml:aan tislattua vettä. Steriloidaan autoklavoimalla 15 min 121±1 °C. Annetaan jäähtyä 45 - 50 °C:n vesihauteessa, jonka jälkeen lisätään aseptisesti 5 ml urealiuosta. Alustan pH:n tulee olla steriloinnin jälkeen 6,8±0,2.

Yhteenvertotaulukko *Brilliance Salmonella* ja *CHROMagar Salmonella Plus* -kromogeenialustoista

| Alusta | <i>Brilliance Salmonella (Oxoid)</i> | <i>CHROMagar Salmonella Plus (CHROMagar)</i> |
|---|--|---|
| Alustan toimittaja | <i>Fisher Scientific Oy</i> | LABEMA Oy |
| Toimitusmuoto | Valmiit maljat 10 maljaa / pakkaus | Jauhe+suplementti Voidaan valmistaa 250 - 300 maljaa |
| Toimitusaika | 2 - 3 vko. | 1 - 2 vkoa |
| Alustan hinta (netto + alv.) | 12,15 € / 10 maljaa | 11,2 € / 10 maljaa |
| Maljojen käyttöönotto | Maljoja ei tarvitse valmistaa, joten säästetään valmistukseen menevä aika. Maljoja tarvitsee kuivata 15 minuutin ajan tai kauemmin runsaan kondenssiveden määrän vuoksi. | Maljojen valmistukseen menee aikaa kokonaisuudessaan n. 1 h. Maljat on helppo valmistaa. |
| Maljojen ulkomuoto | Maljat ovat valkoisia, eikä niistä näy läpi. | Maljat ovat läpinäkyviä ja värittömiä. |
| Maljojen käyttömukavuus | Maljat on helppo lukea (selkeät värireaktiot ja kasvun inhibointi). Kondenssivettä muodostuu maljojen sisälle runsaasti, ja maljat kuivuvat todella nopeasti (alkavat halkeilla reunoilta jo 1 vrk jälkeen 37°C:ssa). Kondenssiveden muodostuminen aiheuttaa sen, että kansi voi olla tiukasti kiinni maljassa, mikä voi olla kontaminaatoriski maljan kantta avattaessa. | Maljojen kuplat ja röpelöisyys voivat aiheuttaa ongelmia maljoille viljeltäessä ja maljojen lukemisessa. Maljat ovat suhteellisen selkeät lukea (selkeät värireaktiot). Maljojen kansiin muodostuu kondenssivettä, joka voi aiheuttaa kontaminaatorisikin. |
| Maljojen säilyvyys | Maljat säilyvät 1,5 - 3 kuukautta valmistajan antaman viimeisen käyttöpäivämäärän mukaisesti. | Jauhe ja suplementti säilyvät n. 1 vuoden ajan huoneenlämmössä. Valmiit maljat säilyvät 2 vkoa laatikkoon pakattuina kylmiössä. |
| Keinotekoisesti kontaminoituiden tuotenäytteet | Maljoilla ollut salmonellakasvu oli selkeää ja erottui hyvin häiritsevästä kasvusta, jota oli vähän. Salmonella onnistuttiin havaitsemaan ja eristämään molemmista kontaminoiduista tuotenäytteistä. | Maljoilla ollut salmonellakasvu oli selkeää ja erottui hyvin häiritsevästä kasvusta. Salmonella onnistuttiin havaitsemaan ja eristämään molemmista kontaminoiduista tuotenäytteistä. |
| Keinotekoisesti kontaminoituiden ympäristönäytteet | Maljoilla ollut salmonellakasvu oli selkeää ja erottui hyvin. Häiritsevää kasvua ei ollut ollenkaan. Salmonella onnistuttiin havaitsemaan ja eristämään molemmista kontaminoiduista ympäristönäytteistä. | Maljoilla ollut salmonellakasvu oli selkeää ja erottui hyvin. Häiritsevä kasvu oli todella heikkoa, ja paikoitellen sitä ei ollut ollenkaan. Salmonella onnistuttiin havaitsemaan ja eristämään molemmista kontaminoiduista ympäristönäytteistä. Toisesta ympäristönäytteestä kasvoi nollamaljalta lähes salmonellan näköisiä pesäkkeitä, joiden kuitenkin todettiin olevan jotain muuta bakteeria. |
| Muuta | Maljat saattavat olla kosteita pakkauksessaan, ja niitä täytyy kuivata 15 minuuttia ennen käyttöä. Maljat voivat myös olla rikkoontuneita kuljetuksessa. | Elatusaine kuplii melko paljon maljoille valettaessa ja sekoitettaessa, mikä aiheuttaa kuplia ja röpelöisyyttä valmiille maljoille. |
| Yhteenvedo | Erittäin selektiivinen ja toimiva malja ISO-menetelmän mukaiseen salmonellan osoittamiseen ja eristämiseen näytteestä. Soveltuu Valio Oy:n näytematriiseille erinomaisesti. | Toimiva ja melko selektiivinen malja ISO-menetelmän mukaiseen salmonellan osoittamiseen ja eristämiseen näytteestä. Soveltuu Valio Oy:n näytematriiseille hyvin. |