

SeAMK 



**KROMOGEENISEN JA XLD-
MALJAN VERTAILU
SALMONELLA VILJELYSSÄ**

Miska Kaurisalo

Rosita Nivukoski

Opinnäytetyö
Tammikuu 2015
Bioanalytiikka
Bioanalyttikko (AMK)

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Seinäjoen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Bioanalyttikko (AMK)

MISKA KAURISALO & ROSITA NIVUKOSKI
Kromogeenisen ja XLD-maljan vertailu salmonellaviljelyssä

Opinnäytetyö 41 sivua, joista liitteitä 6 sivua
Tammikuu 2015

Opinnäytetyön aihe saatiin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian toimintayksiköltä. Tavoitteena oli selvittää, voisiko kromogeeninen malja olla parempi kuin tällä hetkellä salmonellan viljelyssä käytettävä XLD-malja. Haluttiin etenkin tietää, voisiko kromogeeninen malja helpottaa työskentelyä ja nopeuttaa salmonellojen diagnostiikkaa. Tutkimuksessa analysoitiin yhteensä 45 ulostenäytettä.

Opinnäytetyössä vertailtiin kahta salmonellan ulosteviljelyssä käytettävää viljelymaljaa. Maljat, joita tutkimuksessa vertailtiin, olivat laboratorion itse valmistama XLD-malja sekä BioMérieuxin valmistama kromogeeninen chromID® Salmonella-malja. Tutkimuksessa selvitettiin, onko salmonelloja helpompi tunnistaa kromogeeniseltä maljalta kuin XLD-maljalta. Tarkasteltiin myös eroavaisuuksia salmonella- ja normaalifloorapesäkkeiden kasvussa maljojen välillä.

Tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että tällä hetkellä käytössä olevaa XLD-maljaa ei kannata vaihtaa kromogeeniseen ChromID® Salmonella-maljaan. Vertailtaessa näitä kahta maljaa keskenään huomattiin, että salmonellat kasvavat XLD-maljalla paljon paremmin, sekä ovat selkeämmin tunnistettavissa kuin ChromID® Salmonella-maljalta. Normaalifloora kasvoi runsaana molemmilla maljoilla. ChromID® Salmonella-maljalla se vaikeutti salmonella-bakteerin pesäkkeiden tunnistamista ja hajotusviljelmän tekemistä.

Asiasanat: Kromogeeninen malja, XLD-malja, salmonella, maljavertailu.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Seinäjoen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Seinäjoki University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Sciences

MISKA KAURISALO & ROSITA NIVUKOSKI

Comparison of Chromogenic Media and XLD Agar for Identification of *Salmonella* Strains

Bachelor's thesis 41 pages, appendices 6 pages
January 2015

In this thesis two culture media that are used for isolation of *Salmonella* species from stool samples were compared. The two culture media were XLD agar that is made in the laboratory, and chromogenic ChromID® *Salmonella*-agar made by Biomérieux. The objective was to find out if it is easier to recognize *Salmonella* from the chromogenic media and what differences there are between the two media.

The purpose of this study was to find out if the chromogenic agar is better than XLD agar. XLD agar is used at the moment in the microbiological laboratory of Seinäjoki Central Hospital. We especially wanted to find out whether the chromogenic media could reduce the workload and speed up diagnosis. A total of 45 stool samples were investigated.

On the basis of these results, there is no reason to change XLD agar into chromogenic ChromID® *Salmonella*-agar. XLD can be recommended for the isolation of *Salmonella* species from stool samples in preference to ChromID® *Salmonella*-agar. When comparing these two media, it was clear that *Salmonella* colonies were easier to distinct and they grew better in XLD agar. There was a lot of competing flora in both media but it was more disturbing in ChromID® *Salmonella*-agar.

Key words: Chromogenic media, XLD agar, salmonella.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	SALMONELLA	7
3	SALMONELLAN LABORATORIOTUTKIMUKSET	10
	3.1 Ulosteviljely.....	10
	3.2 Muut tutkimukset.....	12
4	TUTKIMUKSESSA VERTAILTAVAT MALJAT	14
	4.1 XLD-malja	14
	4.2 ChromID® Salmonella-malja.....	15
5	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT	18
6	TUTKIMUSMENETELMÄ	19
7	MALJAVERTAILUN SUORITUS	20
	7.1 Aineiston kerääminen	20
	7.2 Tutkimuksen suoritus.....	21
8	TUTKIMUSTULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	23
	8.1 Normaaliflooran kasvu vertailussa olevilla maljoilla	23
	8.2 Salmonellan kasvu vertailussa olevilla maljoilla.....	25
9	POHDINTA.....	29
	LÄHTEET.....	33
	LIITTEET	36
	Liite 1. Taulukko salmonellan kaltaisesta pesäkekasvusta yhden ja kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen	36
	Liite 2. Taulukko normaaliflooran pesäkekasvusta yhden ja kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen	39

1 JOHDANTO

Opinnäytetyönä tehtiin salmonellan viljelymaljojen vertailu Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian toimintayksikölle. Opinnäytetyönä tehtävä maljavertailu on hyödyllinen mikrobiologian laboriolle, sillä tutkimuksen avulla saadaan selville kromogeenisen maljan ja XLD-maljan eroja salmonellan etsimisessä. Maljavertailun tekeminen vie aikaa, eikä henkilökunta ehdi tekemään tutkimusta normaalin laboratorio-työn ohella. Tavoitteena on tuottaa luotettavaa tietoa, jonka avulla mikrobiologian laboratorio voi päättää, kannattaako nykyistä salmonellan viljelyssä käytettävää maljaa vaihtaa. Tarkoitus on vertailla kahta bakteeriviljelymaljaa ja selvittää, voisiko BioMérieuxin valmistama kromogeeninen chromID® Salmonella-malja olla parempi salmonellan etsimisessä kuin nyt käytössä oleva XLD-malja. XLD-maljan vaihtamista kromogeeniseen maljaan on harkittu, sillä kromogeenisen maljan käyttö on yleistymässä ja sen bakteerien tunnistamisominaisuuksia pidetään parempina. Toisaalta perinteiset viljelymaljat ovat edullisempia, ja niiden käyttöön on olemassa ammattitaito. Viljelymaljatyypin vaihto kalliimpaan kromogeeniseen maljaan vaatii perusteltua ja tutkittua näyttöä siitä, että maljatyypin vaihtamisesta koituu selkeää etua.

Aihe valittiin, koska se on mielenkiintoinen ja siitä on käytännön hyötyä laboriolle. Lisäksi aiheesta ei ole tehty aikaisempaa opinnäytetyötä Suomessa. Kromogeenistä ja tavallista maljaa on vertailtu suomalaisissa opinnäytetöissä, mutta ne on tehty virtsaviljelystä tai bio- ja elintarviketekniikan alalta. Kortelaisen ja Ylisen (2013) opinnäytetyössä vertailtiin kolmen eri valmistajan kromogeenistä virtsanviljelymaljaa ja todettiin, ettei niiden välillä ollut suuria eroja pesäkemorfologiassa ja pesäkemäärässä. Myös värireaktiot vastasivat valmistajan esitteitä.

Ulosteen bakteeriviljelyä käytetään ripulitautien diagnosointiin ja seurantaan. Yleisimpiä taudinaiheuttajia Suomessa ovat kamylobakteeri ja salmonelat. XLD-maljalla voidaan eristää ulostenäytteestä salmonelloja ja shigelloja. Salmonellojen kasvu maljalla perustuu niiden biokemiallisiin ominaisuuksiin, eli kykyyn käyttää maljalla olevia hiilihydraatteja ja aminohappoja hyväkseen. Kromogeeninen malja mahdollistaa salmonellojen tunnistamisen maljan sisältämien kromogeenisten eli väriä muodostavien yhdisteiden ansiosta. Kromogeeninen malja sisältää substraatteja, jolloin kyseistä substraattia käyttävät bakteerit muodostavat tietyn värisiä pesäkkeitä. Sopivia substraatteja valitse-

malla pystytään yhdellä maljalla tunnistamaan yhtä tai useampia bakteereja tai bakteeriryhmiä. (Meurman 2011, 108.)

Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian toimintayksikön henkilökuntaan kuuluu 20 työntekijää, joista 12 on laboratorionhoitajaa. Lisäksi yksikössä työskentelee ylilääkäri, sairaalamikrobiologi, mikrobiologi, osastonhoitaja, apulaisosastonhoitaja, kaksi osastonsihteerä ja välinehuoltaja. Toimintayksikössä tutkitaan vuosittain noin 100 000 näytettä. Tutkimusvalikoimaan kuuluu bakteeriviljelyt erilaisista näytemateriaaleista; nielu-, virtsa-, uloste- ja sieniviljelyt. Lisäksi mikrobiologian laboratoriossa tehdään tuberkuloosiviljelyitä, serologisia tutkimuksia sekä erilaisia nukleiinihappo-osoituksia. Tutkimuksen tekoaikana ulosteen bakteeriviljelyiden määrä vaihteli päivittäin 5-18 kappaleen välillä. Vuonna 2013 kliinisen mikrobiologian toimintayksikössä tehtiin 1764 ulosteen bakteeriviljelyä (F-BaktVi1) ja 1418 ulosteen salmonellaviljelyä (F-SalmVi). (Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri: Kliinisen mikrobiologian toimintayksikkö 2014.)

2 SALMONELLA

Salmonellasukuiset bakteerit kuuluvat *Enterobacteriaceae* -heimoon. Salmonella on gramnegatiivinen fakultatiivinen sauvabakteeri. Fakultatiiviset bakteerit voivat kasvaa ja elää sekä hapellisissa, että hapettomissa olosuhteissa. Salmonellabakteereilla on värekarvoja, eli fimbrioita, joiden avulla ne voivat kiinnittyä kohteeseensa. Niillä on myös flagella, jonka avulla bakteeri pystyy liikkumaan. Vaikka salmonella voi elää monen eri lajin elimistössä, niin ne ovat patogeenejä vain varsinaiselle isäntälajilleen, muille ne eivät aiheuta sairauksia. Salmonellaa on löydetty ihmisistä ja eläimistä, eivätkä ne kuulu ihmisen eivätkä tasalämpöisten eläinten suoliston normaaliflooraan. Varsinkin linnut, matelijat ja nisäkkäät voivat olla oireettomia salmonellan kantajia, jotka levittävät tautia ulosteidensa välityksellä. Vaihtolämpöisiltä eläimiltä, esimerkiksi kilpikonnilta, on löydetty niiden normaaliflooraan kuuluvia salmonellan serotyyppejä. (Heikkilä & Meurman 2005, 43; Siitonen & Vaara 2010, 184–186; Nataro ym. 2011, 617.)

Salmonellat jaetaan kahteen lajiin; *Salmonella enterica* ja *Salmonella bongori*. Molempiin kuuluu useita lajeja, joiden serotyyppejä on löydetty jo noin 2500 kappaletta. Serotyyppijako tehdään bakteerin pinta-antigeenien O- ja H-perusteella. *Salmonella enterica* -lajin serotyypeistä *Salmonella typhi* aiheuttaa vaarallista lavantautia ja *Salmonella paratyphi* pikkulavantautia. *S. typhi* ja *S. paratyphi* ovat vain ihmisillä tavattavia tautia aiheuttavia serotyyppejä ja ne eroavat muista salmonelloista siten, että ne pystyvät lävistämään suolen seinämän ja etenemään siitä muualle elimistöön. Kehitysmaissa nämä taudit ovat edelleen yleisiä, kehittyneistä maista lavantauti ja pikkulavantauti ovat hävinneet miltei kokonaan hyvästä hygieniasta johtuen. Kyseisiä tauteja on Suomessa noin 20 tapausta vuodessa, ja niiden tartunnat on saatu ulkomailta. Maailmanlaajuisesti tartuntoja on yhteensä noin 26 miljoonaa. Molempien oirekuva on samankaltainen, tauti alkaa kuumeilulla joka jatkuu kolmesta seitsemään päivää. Sen lisäksi on päänsärkyä, lihaskipuja, ylävatsakipuja, ummetusta tai ripulia. Ihottuma on mahdollinen. Yleistila heikkenee ja potilas saattaa olla sekava. (Jalava ym. 2013; Heikkilä & Meurman 2005, 43; Nataro ym. 2011, 616; Kantele 2013.)

Salmonella- bakteerin virulenssi eli kyky aiheuttaa tautia perustuu sen värekarvoihin eli fimbrioihin ja toksiiniin muodostukseen. Toksiinin erityys perustuu bakteeria ympäröivään polysakkaridikapseliin, jollainen on esimerkiksi *S. typhi* -kannalla. Ihmisten salmonellainfektiot voidaan jakaa kahteen päätyyppiin; hengenvaarallisiin, ja suolen sei-

nämään rajoittuviin ripulitauteihin eli salmonellaenteriiitteihin. Salmonellatartunnan oireet ovat ripuli, vatsakipu ja kuumeilu. Salmonella ei ole vaarallinen perusterveelle ihmiselle, jos bakteeri pysyy suolen seinämässä eikä pääse verenkiertoon. Se saattaa aiheuttaa suolenulkoisia tulehduksia kuten bakteremiaa (bakteerien esiintymistä veressä), virtsatieulehdusta tai luuydintulehdusta. Vaikka salmonella ei aiheuttaisi ripulia, se saattaa silti aiheuttaa bakteremian. 5-8 prosentilla salmonelloosiin sairastuneista bakteeri leviää verenkiertoon. Ihmisten saamat salmonellatartunnat tulevat yleensä ulosteen saastuttamista elintarvikkeista. Kotimaiset elintarvikkeet ovat pääosin puhtaita, ja Suomessa olleet epidemiat liittyvät yleensä joukkoruokailuun. Ruokien säilyttäminen pitkään huoneenlämpötilassa tai huonosti kylmennettynä edistää mahdollisen salmonella-kontaminaation lisääntymistä elintarvikkeessa. Salmonellabakteeri tuhoutuu jos ruoka kuumennetaan yli +75 asteeseen. Se tarttuu kaikenikäisiin, mutta sitä esiintyy eniten vauvoilla ja pikkulapsilla. Salmonellaa erittyy paranemisen jälkeenkin keskimäärin viiden viikon ajan, pisimmillään sitä voi kuitenkin erittyä jopa vuoden ajan. Sairauteen ei synny immuniteettia, vaan salmonellatartunnan voi saada monta kertaa uudelleenkin. (Heikkilä & Meurman 2005, 43; Siitonen & Vaara 2010, 187; Järvinen & Mattila 2011, 480; Nataro ym. 2011, 617; Evira 2013.)

Suomessa Salmonella kuuluu yleisvaarallisiin tartuntatauteihin. Tartunnoista ilmoitetaan Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) suolistoinfektioyksikköön, joka valvoo ihmisperäisten salmonellojen diagnosointia ja epidemiologiaa Suomessa. THL:n laboratorioon lähetetyistä positiivisista salmonellanäytteistä tehdään lajinvarmistus, serotyypitys, faagityypitys ja DNA:n XbaI-pulssikenttäelektroforeesi. Epidemiologian selvittämiseksi tuloksia vertaillaan maailmanlaajuisesti. Koska kyseessä on tartuntatauti, infektion saanut henkilö voidaan tarvittaessa pidättää työtehtävistään niin kauan kun hän erittää salmonellaa. Lavantautia vastaan on olemassa suun kautta otettava elävä rokote ja injektoitava rokote. Suun kautta otettava rokote suojaa osittain salmonellalta noin kolmen vuoden ajan. Injektoitava rokote ei sekään anna täydellistä suojaa salmonellaa vastaan. THL pitää yllä tilastoja, joista voi tarkistaa eri salmonella serotyypien aiheuttamat tartunnat Suomen eri sairaanhoitopiireissä vuosittain. (Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos 2014b, Siitonen & Vaara 2010, 187–190; Kantele 2013.)

Vuonna 2013 salmonellatapausten ilmaantuvuus oli suurin Lapin sairaanhoitopiirissä ja pienin Ahvenanmaalla. Salmonellatapauksia oli koko maassa yhteensä 1987 kappaletta, mikä on 200 vähemmän kuin vuonna 2012. Eniten tartuntoja todettiin 20–24-vuotiailla. Kaikista tartunnoista vain 19 % oli kotimaista alkuperää, yleisimpiä niistä *S. typhimuri-*

um (94 kappaletta), *S. enteritidis* (46 kappaletta) ja ryhmä B (38 kappaletta). Kotimaisissa tartunnoissa oli 60 eri serotyyppiä, ulkomailta saaduissa tartunnoissa havaittiin 112 eri serotyyppiä. Euroopasta ja sen lähialueilta saatiin yleisimmin *S. enteritidis* (479 kappaletta), ryhmä B (158 kappaletta), *S. stanley* (74 kappaletta) ja *S. typhimurium* (60 kappaletta). *S. typhi* todettiin yhdeksällä ja *S. paratyphi* kolmella. Kahta lukuun ottamatta kaikki olivat matkustelleet ulkomailla ennen tartunnan saamista. WHO-euromaiden ulkopuolelta tuotiin suunnilleen yhtä paljon *S. enteritidis*- ja ryhmä B-kantoja, molempia noin 16 %. Moniresistenttien kantojen osuus on noussut edellisvuodesta kaikissa tartuntamaissa. THL:n tartuntatautirekisterin mukaan EPSHP:n alueella löytyi vuonna 2013 yhteensä 78 salmonella-tapausta ja vuonna 2014 42 tartuntaa. Kaikki Etelä-Pohjanmaan tautitapaukset oli luokiteltu kohtaan ”salmonella, muut”, eli kyseessä on jokin muu salmonellalaji kuin *Salmonella typhi* tai *S. paratyphi*. Lavantautia aiheuttavaa *S. typhi* -bakteerin tai pikkulavantautia aiheuttavaa *S. paratyphi* -bakteerin aiheuttamia tautitapauksia ei Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirissä ole lainkaan. (Terveystieteiden tutkimuskeskus ja Hyvinvoinnin tutkimuskeskus 2012; Evira 2013; Jaakola ym.2014.)

3 SALMONELLAN LABORATORIOTUTKIMUKSET

3.1 Ulosteviljely

Salmonellojen diagnosointi perustuu bakteeriviljelyyn, joka tehdään yleensä ulosteesta. Salmonella voi löytyä myös verestä yleisinfektioissa, märkäeritteistä ja joskus virtsasta. Salmonellaa ei voi erottaa muista gramnegatiivisista sauvabakteereista mikroskoipoimalla. Salmonellat säilyvät ulostenäytteessä suhteellisen hyvin ja ripulin aikana niitä erittyy ulosteeseen yleensä runsaasti. Muina aikoina salmonellan erittyminen ulosteeseen voi olla ajoittaista, ja tämän takia seurantanäytteitä otetaan useampia muutaman päivän välein. Ulostenäytettä rikastetaan seleniittiliemessä vuorokauden ajan ennen viljelemistä, jotta ulosteessa esiintyvien normaaliflooran bakteerien kasvu estyisi, ja saataisiin mahdollisimman paljon salmonellaa kasvamaan viljelyä varten. Monet erottelevat elatusaineet ovat käyttökelpoisia salmonellan erottamiseen ulostenäytteestä. Useat laboratoriot käyttävät XLD-(xylose-lysine-deoxycholate agar) tai HE-maljoja (hektoen enteric agar), koska niillä voidaan erottaa salmonella ja shigella. Lopulliseen tunnistamiseen käytetään biokemiallisia ja serologisia määrittämenetelmiä. (Heikkilä & Meurman 2005, 43; Nataro ym. 2011, 618; Saha 2014.)

Bakteerin aiheuttamaa ripulia epäiltäessä oireiselta potilaalta suositellaan pyytämään ulosteviljely 1 (F-BaktVi1), joka sisältää salmonella-, kampylo-, shigella- ja yersiniabakteerin viljelyt. Oireettomalta potilaalta, joka on esimerkiksi hakeutumassa töihin alalle, jossa tartunnan leviämiskäsi on suuri, voidaan pyytää pelkkä salmonellaviljely (F-SalmVi). Tutkimusnimikkeeseen vaikuttaa oireiden lisäksi henkilön viime aikoina tekemät ulkomaanmatkat. (Kuusi, Jalava, Siitonen & Ruutu 2007.)

Ulostenäyte otetaan yleensä kotona, asiakas saa näytteenottovälineet laboratorion. Tarvittavia näytteenottovälineitä ovat bakteerien kuljetusputki, kaarimalja ja näytepurkki, jonka korkissa on kiinni näytteenottolusikka. Ulostenäyte otetaan puhtaalle kaarimaljalle tai vastaavalle. Uloste ei saa olla kosketuksissa wc-altaan veden tai virtsan kanssa. Ulostetta tarvitaan noin puoli purkkia. Purkin lisäksi näytettä otetaan kunnon nokare bakteerien kuljetusputkeen. Jos ulosteessa on limaa, verta tai muuta huomioitavaa, niin näyte pyritään ottamaan sellaisesta kohdasta. Purkki tulee merkitä asiakkaan tunnist-

tiedoilla, tarrat tulevat näytteenottovälineiden mukana. (Matikainen, Miettinen & Wasström 2010, 104–105; Saarinen 2012.)

Laboratoriossa näytettä käsitellään siten, että nokare ulostetta sekoitetaan seleniittirikastusliemeen huolellisesti, jonka jälkeen seleniittiliettä inkuboidaan vuorokausi +36 asteessa tavallisessa lämpökaapissa. Seuraavana päivänä tehdään maljahajotus 10 µl silmukalla XLD-maljalle. Maljaa inkuboidaan vuorokausi +36 asteessa normaaliatmosfäärissä. Jos maljalla kasvaa salmonellalle tyypillisiä pesäkkeitä, ne tunnistetaan biokemiallisia testejä käyttäen. (Saarinen 2012.)

Tutkimusta tehdessä opittiin, että jos XLD-maljalla näkyy salmonella-pesäkkeille tyypillistä kasvua, eli punertavia, läpikuultavia pesäkkeitä, joissa on musta keskusta, tai keltaisia pesäkkeitä, joissa on musta keskusta, tehdään oksidaasitesti. Oksidaasitestin ollessa positiivinen, kyseessä ei ole salmonella. Oksidaasitestin tuloksen ollessa negatiivinen tehdään bakteeritunnistuksen varmistamiseksi puhdasviljelmät XLD- ja Brolacin-maljoille. Puhdasviljelmän tekemiseen tarvitaan yksittäinen erillinen puhdas pesäke, jossa kasvaa vain yhtä bakteeria. Tällaisesta pesäkkeestä saadaan bakteeri tunnistettua luotettavasti. Jos maljalla ei ole yksittäisiä pesäkkeitä, joudutaan tekemään ensin hajotusviljelmiä. Sillä pyritään saamaan esiin yksittäisiä bakteeripesäkkeitä, eikä se aina onnistu. Viljelyn inkubointiaika on vuorokausi, joten jos joudutaan tekemään useampia viljelyitä, bakteerin tunnistamiseen kuluva aika pitenee huomattavasti.

Bakteerikannan tunnistus voidaan tehdä myös API®20E-testiliuskalla tai VITEK-analysaattorilla. Menetelmät pystyvät tunnistamaan bakteerin, jos puhtaita pesäkkeitä on riittävästi. Tarvittaessa voidaan tehdä puhdasviljelmiä. Vitek ID-GN-tunnistuskortilla pystyy tunnistamaan 135 merkittävintä gramnegatiivista fermentoivaa ja ei-fermentoivaa bakteeria. Fermentoinnilla tarkoitetaan bakteerin kykyä pilkkoa agarin sisältämää hiilihydraattia. Tunnistettavan bakteerin esitunnistus on tärkeää, että osataan valita oikea tunnistuskortti. Vitek ID-GN-tunnistusta varten bakteerista tehdään koeputkeen suspensio, jonka McFarland-arvo on 0,50–0,63. McFarland-arvo kertoo bakteerisuspension vahvuuden, joka 0,50–0,63 lukemilla on noin 10^8 bakteeria/ml. Kortin viivakoodi luetaan laitteelle, ja näytteelle annetaan tunnistenumero. Putket ja kortit laiteetaan telineeseen, ja teline Vitek-analysaattoriin. Analysaattorin tekemä tutkimus perustuu metabolisiin reaktioihin ja tulosliuskaan merkitään biokemialliset yksityiskohdat. (Pincus 2007.)

API®20E on enterobakteerien ja muiden gramnegatiivisten sauvabakteerien tunnistukseen tarkoitettu testiliuska. API®20E-testiliuskassa on 20 näytekaivoa, joissa jokaisessa tapahtuu biokemiallinen reaktio, joiden tulosten avulla bakteeri voidaan tunnistaa. Tutkittavasta bakteerista tehdään suspensio 0,9 % NaCl-liuokseen. Tutkittavaa näytesuspensiota pipetoidaan näytekaivoihin. API®20E-liuskaa inkuboidaan +36 asteessa 18–24 tuntia. Tässä vaiheessa tiputetaan tiettyjä reagensseja API®20E-liuskaan, jonka jälkeen tulos luetaan näytekaivoissa tapahtuneen reaktion mukaan tulosta värikarttaan verraten. Saatu seitsenmerkkinen tunnistusrivi kirjoitetaan tietokoneella olevaan ohjelmaan, joka antaa bakteerin nimen, sekä prosenttiluvun bakteeritunnistuksen luotettavuudesta. (BioMérieux 2002.)

Positiivinen salmonellatulos ilmoitetaan aina näytteen pyytäneelle yksikölle tai potilasta hoitavalle osastolle. Näytteelle tehdään herkkyysmääritys tutkimuksen tehneessä laboratoriossa ja kanta lähetetään THL:een tyypitystä varten. (Kuusi ym. 2007.)

Terveyden- ja hyvinvoinnin laitoksen laboratoriossa salmonella -bakteerin lajinvarmistus tehdään biokemiallisin testein ja tarvittaessa PCR-tekniikkaa käyttäen. *S. enteritidis*-, *S. typhimurium*-, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi var Java* -kannoille tehdään myös faagityypitys. Salmonella-kannoista määritetään myös epidemiologinen mikrobilääkeherkkyys. Kotimaisille kannoille ja epidemiaa epäiltäessä tehdään pulssikenttägeelelektroforeesi (PFGE), jonka avulla saadaan eroteltua salmonella-kannat toisistaan bakteerin pilkotun DNA:n koon perusteella. B-ryhmään kuuluvista monofaasisista *S. typhimurium* -kannoista valtaosa on moniresistenttejä. (Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos 2014a.)

3.2 Muut tutkimukset

Mikäli potilas on alle vuoden ikäinen, vanhus tai immuunipuutteinen, on salmonelloosin aiheuttaman yleisinfektion ja bakteremian riski suurempi. Jos potilaalla on kuumetta ja yleisinfektio, pitäisi häneltä ottaa veriviljely taudin alkuvaiheessa. Mitä pitempään tautia on sairastettu, sitä pienemmäksi käy veriviljelyn mahdollisuus taudin toteamiseen. *S. typhi* ja *S. paratyphi A, B ja C* -bakteereja tutkitaan uloste- ja veriviljelyllä, joka voi jäädä negatiiviseksi yleisinfektion aikana. Luuydinnäytteestä bakteeri voidaan tunnistaa 90 % varmuudella, mutta se ei kuulu rutiinidiagnostiikkaan. Veriviljelyt tulisi ottaa ennen

mikrobilääkityksen aloitusta. Jos henkilön todetaan sairastavan *S. typhi*- tai *S. paratyphi* aiheuttamaa salmonellaa, hänestä otetaan seurantanäytteitä, joilla varmistetaan potilaan selvinneen infektiosta. Seurantanäytteet otetaan ulosteesta ja niiden ottaminen voidaan aloittaa vasta viikon kuluttua mikrobilääkityksen lopettamisesta. Oireiden päätymisestä tulee olla kulunut kuukausi. Seurantanäytteet otetaan vähintään viikon välein ja vasta kun negatiivisia näytteitä saadaan kolme peräkkäin, potilaan katsotaan olevan selvinnyt infektiosta. Jos potilas tekee riskityötä, hän saa palata töihin vasta kun infektio on todettu hävinneeksi. Potilaan lähikontaktilta otetaan myös näytteitä, joilla varmistetaan, ettei tauti ole tarttunut. Lähikontakti katsotaan terveeksi, kun häneltä on otettu kolme negatiivista näytettä. Oireettoman lähikontaktin näytteet voidaan ottaa kahden päivän välein. (Jalava ym. 2013; Järvinen & Mattila 2011, 480.)

4 TUTKIMUKSESSA VERTAILTAVAT MALJAT

Tässä tutkimuksessa vertaillaan keskenään kahta eri maljaa – XLD-maljaa sekä kromogeenistä chromID® Salmonella-maljaa. XLD-malja on tämänhetkinen käytössä oleva viljelymalja salmonellojen kasvatukseen Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian toimintayksikössä. XLD-maljat valmistetaan itse mikrobiologian elatusainetyö-
pisteessä. BioMérieuxin valmistamaa chromID® Salmonella-viljelymaljaa ei ole käytetty Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian toimintayksikössä aikaisemmin, ja se on käyttövalmiina ostettava viljelymalja.

4.1 XLD-malja

XLD (xylose-lysine-natriumdeoxycholate) -malja on selektiivinen elatusaine, jolla eristetään salmonelloja ja shigelloja ulostenäytteistä sekä elintarvikkeista. Alun perin malja on kehitetty shigellojen eristämiseen ja tunnistamiseen ulostenäytteistä. Sittemmin huomattiin, että maljaa voi käyttää myös salmonellojen tunnistamiseen. Salmonelat voivat kasvaa XLD-maljalla kirkkaina, punaisina tai punaisina mustakeskustaisina pesäkkeinä. Yleensä maljalla kasvaa myös keltaisena pesäkkeenä *Escherichia coli* -bakteeria ja toisinaan myös limaista ja keltaista *Klebsiella* -bakteeria. *Citrobakter* -lajit muistuttavat salmonella -bakteerin kasvutapaa maljalla, ja aiheuttavat usein turhia jatko-tutkimuksia. Myös jotkut *Proteus*- ja *Pseudomonas* -lajit voivat kasvaa erehdyttävästi punaisina pesäkkeinä maljalla. (Bridson 2006, 393.)

XLD-malja sisältää erilaisia ainesosia, joista tärkeimmät ovat ksyloosi, lysiini ja natriumdeoksikolaatti. Maljan pH on 7,4. XLD-maljan punainen väri johtuu fenolipunasta, joka on yksi maljan ainesosista. Ksyloosin sisältyminen maljaan on tärkeää sen takia, että shigella -lajit tunnistetaan maljalta niiden negatiivisen käymis- eli fermentaatioreaktion avulla. *Salmonella* -lajit taas pystyvät fermentoimaan ksyloosia nopeasti. Koska ulostenäyte sisältää aina myös ei-patogeenisiä ksyloosin fermentoijia, tarvitaan lysiiniä erottamaan ne patogeenisistä enterobakteereista. Salmonella dekarboksyloi lysiiniä eli hajottaa sen karboksyyli-ryhmiä (-COOH) hiilidioksidiksi (CO₂). Tämä aiheuttaa maljan pH:n muuttumisen emäksiseksi, jolloin reaktio alkaa muistuttaa shigella -lajien reaktiota. Lopullisesti salmonella -lajit erotetaan shigelloista rikkivetyindikaattorilla. Rikkive-

tyindikaattori aiheuttaa *Salmonella* -bakteeripesäkkeiden mustumisen käymisreaktion tapahtuessa. Kuvassa 1 nähdään tyypillinen salmonella -pesäkekasvu. Natriumdeoksiko-laattia käytetään maljassa inhibiittorina, joka estää koliformisten sauvojen kasvun. (Saha 2007; Bridson 2006, 393.)



KUVA 1. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 kontrollikanta XLD-maljalla. (Kuva: Miska Kaurisalo & Rosita Nivukoski 2014)

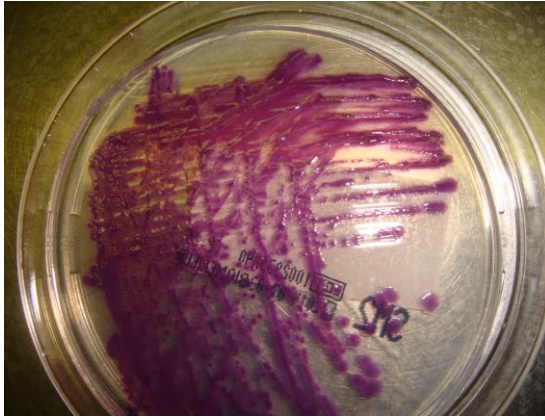
4.2 ChromID® Salmonella-malja

Kromogeenisten maljojen avulla pystytään tunnistamaan haluttuja bakteereita maljan sisältämien kromogeenisten eli väriä muodostavien yhdisteiden ansiosta. Kromogeenisiin maljoihin lisätään myös jokin selektiivinen aineosa, joka rajoittaa ei-haluttujen mikrobien kasvua. Usein selektion aiheuttaa esim. antibioottilisä. Kromogeeniset maljat koostuvat tavallisesta elatusaineesta sekä yhdestä tai useammasta kromogeenisestä substraatista. Substraatit ovat yhdisteitä, joita bakteerit käyttävät omassa aineenvaihdunnassaan. Kun bakteerin käyttämään substraattiin on liitetty väriaine eli kromogeeni, syntyy värillinen lopputuote, joka havaitaan maljalla tietyn värillisenä pesäkkeenä. Se, kuinka bakteeripesäkkeiden värit näkyvät maljalla, vaihtelee valmistajan mukaan. Mikäli värimuutos johtuu pH:n vaihtelusta, malja ei ole kromogeeninen. Substraatteja ja selektiivisiä aineita oikein valitsemalla pystytään samalta maljalta tunnistamaan monia erilaisia bakteereita tai bakteeriryhmiä. Kromogeenisen maljan tarkempi tuoteseloste on salainen. (Kärpänoja 2007, 39; Meurman 2011, 108.)

Kromogeenisten maljojen suurin hyöty saadaan siitä, että puhdasviljelyitä ei välttämättä tarvita. Herkkyysmääritykset on tällöin mahdollista tehdä suoraan kromogeeniseltä mal-

jalta. Parhaassa tapauksessa mikrobeja voidaan tunnistaa jo primaari- eli ensimmäiseltä maljalta. Se nopeuttaa laboratoriotyötä ja diagnostiikkaa. Kliinisessä käytössä kromogeeniset maljat eivät ole vielä saaneet suurta suosiota, sillä ne ovat melko kalliita. Suomessa niitä käytetään eniten virtsaviljelyssä, koska niillä pystytään viemään *E. coli* -bakteerin ja enterokokkien tunnistus suku- ja jopa lajitasolle asti primaarimaljalta. Värimaljat ovat nopeuttaneet virtsaviljelyn lukua ja vähentäneet työmäärää. (Meurman 2011, 110; Kärpänoja 2007, 39–40.)

Vertailututkimuksessa käytetty ChromID® Salmonella-malja on salmonellojen selektiiviseen eristykseen ja erotukseen tarkoitettu viljelymalja. Malja on tarkoitettu kliiniseen sekä elintarviketeollisuuden käyttöön. ChromID® Salmonella-malja sisältää kolmea erilaista kromogeenistä substraattia, jotka mahdollistavat *Salmonella typhin*, *Salmonella paratyphin* ja laktoosipositiivisten salmonella-kantojen kasvun ja erottumisen maljalla. Jotkin gramnegatiiviset sauvat, kuten esimerkiksi *Pseudomonas aeruginosa* kasvaa maljalla kuten salmonella. Myös jotkin salmonellat, kuten esimerkiksi *Salmonella dublin*, kasvavat ChromID® Salmonella-maljalla epätyypillisen näköisinä, kirkkaina pesäkkeinä. Normaalifloora kasvaa ChromID® Salmonella-maljalla kirkkaina tai turkoosinvärisinä pesäkkeinä. Grampositiivisten bakteerien sekä hiivojen kasvu on estetty. Maljan sisältämää kolmea substraattia ei kerrota BioMérieuxin tuoteselosteessa. Tyypillisesti salmonellapesäkkeet värjäytyvät maljalla 18–24 tunnin kuluessa vaaleanpunaisiksi tai malvan värisiksi (kuva 2). Muut bakteerit värjäytyvät selkeästi erivärisiksi. Malja tulee säilyttää pakkauslaatikossaan +2-8 asteessa valolta suojattuna pakkaukseen merkittyyn käyttöpäivämäärään saakka. Ilman laatikkoa säilyvyys +2-8 asteessa valolta suojattuna on kaksi viikkoa. Maljaa voidaan käyttää salmonellan tutkimiseen uloste- ja peräsuolinäytteistä, sekä elintarvikkeista. Viljely tehdään maljalle näytteestä, jota on ensin rikastettu yön yli seleniittiliemessä +36 asteessa. (BioMérieux 2010, BioMérieux 2014b; Niinimäki 2014.)



KUVA 2. *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 kontrollikanta ChromID® Salmonella-maljalla. (Kuva: Miska Kaurisalo & Rosita Nivukoski 2014)

5 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT

Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa luotettavaa tietoa, jonka avulla kliinisen mikrobiologian laboratorio voi päättää, kannattaako salmonellan viljelyyn käytettyä maljaa vaihtaa. Kun opinnäytetyö on julkaistu, tutkimustulokset ovat myös muiden käytettävissä. Oma tavoitteemme on saada kokemusta bakteeriviljelystä, erilaisista viljelymaljoista sekä pesäkemorfologian tarkastelusta.

Opinnäytetyön tarkoitus on vertailla kahta erilaista bakteeriviljelymaljaa. Selvitämme tutkimuksen avulla, onko kromogeeninen malja parempi salmonellojen tunnistamiseen ulostenäytteistä kuin tällä hetkellä käytössä oleva XLD-malja. Vertailututkimus tehdään Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian toimintayksikön pyynnöstä. Tutkimuksella halutaan selvittää, nopeuttaako kromogeeninen malja salmonellojen diagnostiikkaa.

Opinnäytetyön tutkimusongelmia ovat:

1. Millaisia eroja kromogeenisen ja XLD-maljan välillä on salmonella- ja ulosteen normaaliflooraan kuuluvien pesäkkeiden kasvussa?
2. Onko salmonella helpompi tunnistaa kromogeeniselta maljalta?

6 TUTKIMUSMENETELMÄ

Tutkimusmenetelmät ovat erilaisia tapoja, joilla kerätään tietoa. Tietojen keräämisen ja ongelmanratkaisun kautta yritetään saada selville tutkittavan kohteen toimintaperiaatteita. Tutkimus voi olla teoreettista tutkimusta, joka pohjautuu jo olemassa olevaan tietoon, tai empiiristä tutkimusta joka perustuu havainnointiin. Empiiriseen tutkimukseen tarvitaan kuitenkin myös teoretista tietoa, jotta tuloksia voidaan käsitellä ja analysoida. Empiirinen tutkimus jaetaan kvantitatiiviseen eli määrälliseen ja kvalitatiiviseen eli laadulliseen tutkimukseen. Kaikille tutkimusmenetelmille yhteistä on se, että niiden avulla pyritään saamaan vastaus asetettuihin hypoteeseihin tai tutkimusongelmiin. (Heikkilä 2008, 13–14.)

Opinnäytetyössä käytetään kvantitatiivista eli määrällistä vertailututkimusta, johon saadaan aineistoa kokeellisen tutkimuksen avulla. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa käytetään tilastollisia menetelmiä, jossa aineiston avulla pyritään ymmärtämään erilaisten ilmiöiden syy-seuraus-suhdetta. Tutkimusaineiston eli otannan täytyy olla riittävän suuri ja edustava, jotta tutkimuksesta voitaisiin tehdä luotettavia johtopäätöksiä. Otos voidaan hankkia tilastoista, rekistereistä, tietokannoista tai itse keräämällä. Tietojen keräämiseen käytetään yleensä satunnaisotantamenetelmää. (Heikkilä 2008, 16, 21.)

Kokeellinen tutkimus sijoittuu laboratorio- tai todelliseen tilanteeseen, jonka avulla testataan tietyn olettamuksen paikkansapitävyyttä. Perustavana kysymyksenä on usein se, että onko jollain tekijällä vaikutusta tutkittavaan asiaan. Tyypillistä kokeelliselle tutkimukselle on myös se, että vakioidaan kaikki muut tekijät ja tutkitaan vain yhtä muuttujaa. Tässä opinnäytetyössä muuttuva tekijä on viljelymalja. Johtopäätökset kuvaavat tutkimushetkellä vallitsevaa tilannetta, jonka syy jää yleensä selvittämättä. Tulokset havainnollistetaan sanallisesti tai kuvien ja taulukoiden avulla. Vertailututkimuksen avulla selvitetään maljojen välisiä eroja ja yhtäläisyyksiä. (Heikkilä 2008, 33–35; Niskanen 2008, 52; Taanila 2013.)

7 MALJAVERTAILUN SUORITUS

7.1 Aineiston kerääminen

Tutkimusaineisto saatiin Seinäjoen Keskussairaalan kliinisen mikrobiologian toimintayksiköstä, jonne saapui tutkimuksen aikana 5-18 ulostenäytettä päivässä. Näytteitä kerättiin 20.5–25.5.2014 välisenä aikana, eli yhteensä viitenä päivänä. Näytteiden käsittely ja tutkimusprosessi tehtiin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian toimintayksikön tiloissa, kun kaikki päivän näytteet olivat saapuneet.

Tutkimusaineisto kerättiin potilailta saaduista ulostenäytteistä, pakastetuista positiivisista salmonellanäytteistä sekä tunnetuista kontrollikannoista. Laboratorioon tulevissa potilasnäytteissä oli potilaiden tunnistetiedot, jotka ovat salassa pidettäviä. Näytteiden sisäänkirjaamisvaiheessa näytepurkkeihin merkittiin juokseva näytenumero jonka avulla näyte tunnistettiin tutkimuksen aikana. Näytenumeroa käytettäessä näytteet eivät olleet suoraan identifioitavissa, mikä lisäsi työn eettisyyttä. Maljoista otetuissa valokuvissa näkyvät vain näytenumerot. Kontrollikannat olivat laboratorion oma *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ja *Escherichia coli* -bakteerin ATCC 25922 kontrollikannat. Kontrollikantojen elvytyksen jälkeen ne siirrostettiin samaan Selenite-F-rikastusliemiputkeen. On tärkeää tutkia, pystyykö salmonella kasvamaan ja erottumaan ulosteen normaaliflooran joukossa. Sen vuoksi *E. coli* -bakteeria viljeltiin salmonellan kanssa samalle maljalle, että pystyttiin tarkkailemaan *S. typhimurium* -bakteerin pesäkekasvun näkymistä *E. coli* -bakteerin alta. Viljelymaljoja oli tilattu tutkimusta varten yhteensä 60 kappaletta. Muutama kromogeeninen- ja XLD-malja käytettiin viljelytekniikan harjoitteluun, koska viljelytekniikan harjoittelu on tulosten luotettavuuden kannalta tärkeää.

Otokseen saimme yhteensä 45 potilasnäytettä ja seitsemän pakastettua positiivista salmonellanäytettä. Potilasnäytteet tulivat mikrobiologian yksikköön joko ulosteviljely- (F – BaktVi1) tai salmonellaviljelypyyntöinä (F – SalmVi). Potilasnäytteet kerättiin päivän aikana laboratorioon saapuneiden näytteiden joukosta. Tutkimukseen otettujen näytteiden antajilta ei kysytty lupaa, sillä tutkimusmaljat viljeltiin rinnakkain normaalisti käytössä olevan maljan kanssa, lisäksi kliinisen mikrobiologian laboratorion on jatkuvasti voimassa oleva tutkimuslupa työmenetelmien kehittämistä varten.

7.2 Tutkimuksen suoritus

Käytettävissä oli seitsemän pakastettua näytettä, joissa oli viittä eri salmonellakantaa; *Salmonella sp.*, *Salmonella mikawasima*, *Salmonella singapore*, *Salmonella infantis* ja *Salmonella enteritidis*. Kontrollikannat olivat *Escherichia coli* ATCC 25922 ja *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Niiden lisäksi viljeltiin 45 potilasnäytettä. Pakastetut salmonellakannat sekä kontrollinäytteet esikäsiteltiin eri tavalla kuin potilasnäytteet. Potilasnäytteiden esikäsitelyssä ulostetta rikastettiin Selenite-F-rikastusliemiputkessa inkuboimalla yön yli +36 asteessa ennen viljelyä. Kontrollikantojen ja pakastettujen näytteiden esikäsitelyt ennen viljelyä sisälsivät useampia vaiheita.

Pakastettuja positiivisia salmonellakantoja elvytettiin viljelemällä ne XLD-maljalle ja inkuboimalla niitä lämpökaapissa +36 asteessa yön yli. Seuraavana päivänä niistä tehtiin vielä puhtasviljelmät uusille XLD-maljoille. *Escherichia coli* ATCC 25922 ja *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 kontrollikannoista tehtiin puhtasviljelmät brofacin-maljoille. Seuraavana päivänä brofacin-maljoilla kasvaneista kontrollikannoista ja pakastetuista positiivisista salmonellakannoista tehtiin 0,5 McFarlandin vahvuinen suspensio 1ml:aan steriiliä lihalientä. Niitä kasvatettiin seuraavaan päivään lämpökaapissa +36 asteessa.

Lihaliemessä kasvatettua *Salmonella typhimurium* -kontrollikantaa laimennettiin sekoittamalla 10µl salmonellaviljelmää, sekä 1 ml steriiliä NaCl-liuosta puhtaaseen koeputkeen. 1µl laimennettua salmonellaviljelmää ja 1ml *E. coli* -viljelmää pipetoitiin samaan Selenite-F-rikastusliemiputkeen. Myös pakastetut positiiviset salmonellakannat pipetoitiin Selenite-F-rikastusliemiputkiin. Rikastusliemiputkia inkuboitettiin yön yli +36 asteessa. Inkuboinnin jälkeen kannat olivat valmiita viljeltäviksi tutkimuksessa käytettäville maljoille.

Potilasnäytteitä inkuboitettiin lämpökaapissa +36 asteessa yön yli Selenite-F-rikastusliemiputkissa. Seleniittiliemessä rikastetuista näytteistä tehtiin viljelyt 10µl:n silmukalla molemmille vertailussa oleville maljoille. Viljelyssä käytetty XLD-malja oli samalla myös laboratorion normaali salmonellatutkimus. Maljat luettiin ja kuvattiin yhden ja kahden päivän kuluttua viljelystä. Tulkintaa varten tehtiin taulukko, jossa tyyppillisten pesäkkeiden määrää merkittiin seuraavalla tavalla: runsaasti (+++), kohtalais-

ti (++)), muutama pesäke (+). Taulukot ovat nähtävissä opinnäytetyön liitteessä 1-2. Kuvien avulla voitiin tehdä luotettavaa vertailua maljojen välillä myöhemminkin. Negatiivisista salmonellaviljelymaljoista saatiin vertailututkimusta normaaliflooran kasvusta maljoilla. Muutamalla maljalla kasvoi salmonellan kaltaisia pesäkkeitä, joista tehtiin hajotus- ja puhdasviljelmiä. Kahdesta tehtiin Vitek-tunnistus. Kumpikaan ei ollut salmonellaa.

Tutkimuksen suorittamiseen kului yhteensä kuusi arkipäivää. Kaikkia tutkimusprosessin vaiheita tehtiin päivittäin. Huolehdimme viljelyiden vertailukelpoisuudesta siten, että sama ihminen viljeli näytteen molemmille maljoille. Näin vältimme erilaisen viljelytekniikan aiheuttamat vaikutukset. Viljelimme vuoropäivinä, joten saimme runsaasti kokemusta ulostenäytteiden viljelystä. Luimme maljoja yhdessä ohjaajan avustuksella päivittäin. Viimeiseksi viljelypäiväksi osui perjantai. Viikonlopun työntekijä nosti maljat lauantaina huoneenlämpöön. Maljat luettiin ja kuvattiin vasta maanantaina, joten emme voi varmasti tietää sitä, millainen kasvu oli vuorokauden inkuboinnin jälkeen.

8 TUTKIMUSTULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

8.1 Normaaliflooran kasvu vertailussa olevilla maljoilla

Ihmisen suoliston normaalifloorassa on pääosin obligatorisia anaerobibakteereja. Obligatorinen eli ehdoton anaerobibakteeri kasvaa vain hapettomissa olosuhteissa. Koska kyseiset bakteerit vaativat hapettomat elinolosuhteet, monet niistä eivät kasva elatusmaljoilla. Suoliston normaaliflooran koostumus vaihtelee suoliston eri osissa. Erilaisia bakteereita elää eniten paksusuoleessa, joten niitä erittyy runsaasti myös ulosteeseen. Erot normaaliflooran bakteerikasvustossa eri ihmisten välillä ovat suuria. Ulosteen bakteeriviljelyllä voidaan osoittaa suolistossa elävät fakultatiiviset bakteerit, kuten salmonellat, yersiniat ja shigella. (Jalava 2010, 79; Siitonen & Vaara 2010, 177; Vesikari 2003.)

XLD-maljalla kasvava ulosteen normaalifloora haittaa salmonellan löytymistä, joten diagnoosin varmistamiseksi joudutaan usein tekemään hajotus- ja puhdasviljelmiä. Jos kromogeeninen malja olisi selektiivisempi, saataisiin positiiviset näytteet selville nopeammin. Tutkimuksen aikana huomattiin, että normaalifloora kasvoi runsaampana ChromID® Salmonella-maljalla kuin XLD-maljalla.

Lähes kaikissa näytteissä kasvoi runsaasti normaaliflooraa, vain muutamassa näytteessä ei ollut lainkaan kasvua kummallakaan maljalla. Normaaliflooran kasvun puuttuminen maljalta voidaan selittää esimerkiksi sillä, että potilaalla on ennen näytteenottoa ollut antibioottikuuri, joka on tuhonnut suoliston normaalia bakteerikasvustoa. Toinen vaihtoehto voi olla viljelyn epäonnistuminen tai bakteerikannan tuhoutuminen ennen viljelyä. ChromID® Salmonella-maljalla pesäkekasvu oli lähes aina ensimmäisen viljelyvuorokauden jälkeen väritöntä, vaaleansinistä tai sinivihreää (kuva 3). Kahden vuorokauden kuluttua kasvu oli tummunut ja muuttunut osin lilaksi lähes kaikilla ChromID® Salmonella-maljoilla. Kuvassa 8 nähdään selkeästi normaaliflooran kasvun tummuminen kahden päivän inkuboinnin jälkeen. Tämä ominaisuus vaikuttaa siihen, milloin ChromID® Salmonella-maljalle kannattaa viljellä. Malja pitäisi ehdottomasti lukea vuorokauden inkuboinnin jälkeen.



KUVA 3. Normaaliflooran kasvu ChromID® Salmonella-maljalla. (Kuva: Miska Kaurisalo & Rosita Nivukoski 2014)

XLD-maljalla normaaliflooran pesäkekasvu oli keltaista ja toisinaan limaista (kuva 4). XLD-maljalla salmonellan kaltainen kasvu erottui yleensä selkeästi erillisinä pesäkkeinä. Jos ulostenäytteessä on *Klebsiella* -bakteeria, se kasvaa XLD-maljalla limaisina pesäkkeinä. *Klebsiella* on gramnegatiivinen sauvabakteeri, jonka kasvu ei näyttänyt ChromID® Salmonella-maljalla salmonellan kaltaiselta kasvustolta. *Pseudomonas aeruginosa* on myös gramnegatiivinen sauvabakteeri, jonka pesäkekasvu ChromID® Salmonella-maljalla on salmonellan kaltainen. *P. aeruginosa* voi kolonisoida terveitä limakalvoja, mutta ei yleensä aiheuta infektiota perusterveille ihmisille. XLD- maljan pH on 7,4 ja agar on normaaliväritään punaista. Jos kasvava bakteeri aiheuttaa pH:n muuttumisen emäksiseksi fermentoimalla agarin hiilihydraatteja, maljan väri muuttuu keltaiseksi. (Tissari & Anttila 2010, 196, 200.)

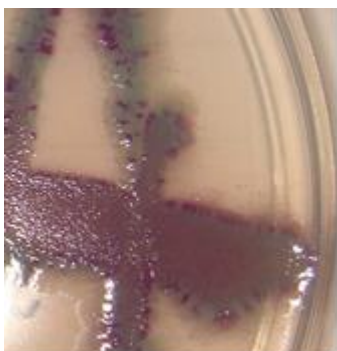


KUVA 4. Normaaliflooran kasvu XLD-maljalla. (Kuva: Miska Kaurisalo & Rosita Nivukoski 2014)

8.2 Salmonellan kasvu vertailussa olevilla maljoilla

Tutkimuksen suoritusajana ei tullut yhtään positiivista potilasnäytettä. Monella maljalla oli salmonellalle tyypillistä pesäkekasvua, mutta ainoat todelliset positiiviset tulokset olivat pakastetut salmonellakannat sekä kontrollikanta. Salmonella kasvoi selkeämmin erottuvina pesäkkeinä XLD-maljalla. Erityisen huolestuttavalta vaikutti se, ettei yhdistetyllä *S. typhimurium* ATCC 14028 ja *E. coli* ATCC 25922 - kontrollikantamaljalla kasvanut ensimmäisen vuorokauden jälkeen salmonellalle tyypillistä kasvua ChromID® Salmonella-maljalla lainkaan. Maljalla oli vain vaaleaa normaaliflooran näköistä kasvua eli *E. coli* -pesäkkeitä. Toisen kasvatuspäivän jälkeen ChromID® Salmonella-maljalla oli muutamia salmonellalle tyypillisiä pesäkkeitä. XLD-maljalla kasvoi vain *S. typhimurium* -bakteeripesäkkeitä jo ensimmäisen kasvatusvuorokauden jälkeen, eikä lainkaan *E. coli* -bakteeria.

Tutkimusaikana muutamalla maljalla oli salmonellan kaltaista pesäkekasvua molemmilla maljoilla. ChromID® Salmonella-maljalla salmonellan tyyppiset pesäkkeet kasvoivat usein normaaliflooran joukossa ja alla (kuva 5), joten puhtasviljelmän saaminen oli useimmiten mahdotonta. Maljoista tehtiin oksidaasitesti, joka oli positiivinen. Salmonella on oksidaasinegatiivinen bakteeri, joten kyseessä oli joku muu bakteeri kuin salmonella.



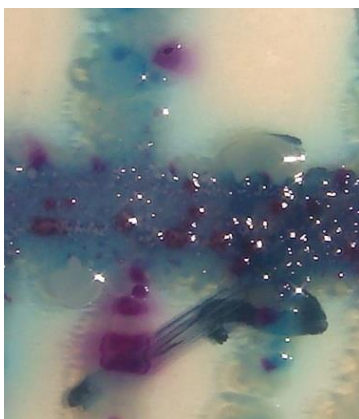
KUVA 5. Salmonellan kaltainen pesäkekasvu normaaliflooran seassa ChromID®- Salmonella-maljalla. (Kuva: Miska Kaurisalo & Rosita Nivukoski 2014)

Salmonellat kasvoivat XLD-maljalla mustakeskustaisina pesäkkeinä (kuva 6). Pseudomonakset voivat kasvaa mustina pesäkkeinä XLD-maljalla. Tutkimuksen aikana ChromID® Salmonella-maljalta löytnyt *Pseudomonas aeruginosa* ei erottunut kasvutapansa perusteella XLD-maljalta.



KUVA 6. Salmonella -bakteerin pesäkekasvu XLD-maljalla. (Kuva: Miska Kaurisalo & Rosita Nivukoski 2014)

Muutamasta ChromID® Salmonella-maljalla salmonellan kaltaisena kasvavasta pesäkkeestä tehtiin hajotus- tai puhdasviljelmä XLD-maljalle. Tarkoitus oli saada selville, mikä bakteeri kasvaa ChromID® Salmonella-maljalla kuten salmonella. Kyseiset pesäkkeet kasvoivat XLD-maljoilla normaaliflooran kaltaisena kasvuna. Kromogeenisiä maljoja ei käytetty hajotus- tai puhdasviljelyihin, koska haluttiin säästää niitä potilasnäytteitä varten. Jälkeenpäin ajateltuna olisi ollut tutkimuksen kannalta parempi tehdä hajotus- ja puhdasviljelmät kromogeenisille maljoille pesäkekasvun värin ja kasvutavan tunnistamiseksi. Kahdesta ChromID® Salmonella-maljan salmonellan kaltaisesta pesäkekasvusta tehtiin jatkotutkimuksena Vitek GN-tunnistus. Vitek GN-tunnistus ehdotti molemmille näytteille vain yhtä bakteeria. Toinen osoittautui *Pseudomonas stutzeri*-bakteeriksi 91 % todennäköisyydellä ja toinen oli *Pseudomonas aeruginosa* 95 % todennäköisyydellä (kuva 7).

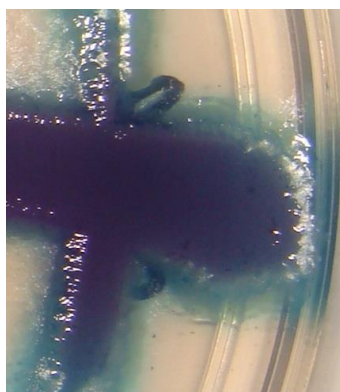


KUVA 7. *Pseudomonas aeruginosa* ChromID® Salmonella-maljalla. (Kuva: Miska Kaurisalo & Rosita Nivukoski 2014)

Pincuksen (2007) mukaan Vitek-tunnistus ei ole täysin luotettava, jos varmuus jää alle 95 %. Tunnistusprosenttien sanalliset kuvaukset ovat: erinomainen 96–99%, erittäin hyvä 93–95%, hyvä 89–92% ja hyväksyttävä 85–88%. Jos Vitek laite antaa kolme bakteerivaihtoehtoa, tunnistuksen erottelukyky on huono. Jos vaihtoehtoja ei ole lainkaan tai niitä on enemmän kuin kolme, Vitek ei tunnista bakteeria lainkaan. (Pincus 2007.)

Jos Vitek-tunnistuksella saadaan riittämätön tunnistusprosentti, syy voi olla siinä, että näytteessä on useampaa kuin yhtä bakteeria. Näytteen puhtaus varmistetaan aina tekemällä perämalja XLD-maljalle, jolta pesäkekasvu tarkistetaan vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Tutkimistamme näytteistä tehdyt perämaljat osoittivat, että Vitek-laitteella tunnistetut näytteet sisälsivät vain yhtä bakteeria. Kummallakaan perämaljalla ei näkynyt salmonellalle tyypillistä pesäkekasvua.

Johtopäätöksenä voidaan todeta, että vertailussa käytetty ChromID® Salmonella-malja ei vastannut odotuksia. Maljaesitteessä luvattiin ChromID® Salmonella-maljan olevan selektiivinen ja muiden bakteerien kasvua estävä. Myös aiemmin tehdyissä kromogeenisen maljan vertailututkimuksissa tulokset olivat lupaavia, ja kromogeeninen malja oli osoittautunut paremmaksi kuin muut maljat. Salmonellapesäkkeiden olisi pitänyt erottua selkeästi erivärisinä kuin muiden bakteereiden pesäkekasvu. ChromID® Salmonella-maljalla kasvoi normaaliflooraa runsaammin kuin XLD-maljalla. ChromID® Salmonella-maljalla normaaliflooran kasvu tummui inkubaatioajan pidentyessä lähes aina (kuva 8). Jos tummuneen pesäkekasvun alla olisi salmonellapesäkkeitä, ei niitä voisi kasvun alta huomata.



KUVA 8. Normaaliflooran kasvu ChromID® Salmonella-maljalla kahden päivän kuluttua viljelystä. (Kuva: Miska Kaurisalo & Rosita Nivukoski 2014)

Ulosteen normaalifloora kasvoi XLD-maljalla yleensä keltaisena, josta mustat salmonella- ja salmonellan kaltaiset pesäkkeet erottuivat selkeästi. ChromID® Salmonella-maljalla salmonella- ja salmonellan kaltainen kasvu jäi usein normaaliflooran alle tai ei kasvanut lainkaan. ChromID® Salmonella-maljalta ei olisi saanut tehtyä suoraan puhdasviljelmää, vaan olisi pitänyt tehdä ensin hajotusviljelmä. Koska hajotusviljelmää pitää inkuboida vuorokausi ennen pesäkekasvun näkymistä, useamman viljelyn tekeminen vie aikaa ja hidastaa bakteerin tunnistamista ja diagnoosin tekemistä.

Pakastettu positiivinen salmonellanäyte muodosti vuorokauden inkuboinnin jälkeen ChromID®-maljalla samankaltaisia pesäkkeitä kuin Vitek GN-menetelmällä tunnistettu *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeri. Pesäkkeiden erottaminen kasvutavan tai värin perusteella ei olisi ollut mahdollista ChromID® Salmonella-maljalta. XLD-maljalla sama näyte muodosti mustia pesäkkeitä, mutta muutti agarin värin keltaiseksi. Salmonella ei muuta agarin väriä XLD-maljalla.

Tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että nyt käytössä olevaa XLD-maljaa ei kannata vaihtaa kromogeeniseen ChromID® Salmonella-maljaan. Salmonella oli helpompi tunnistaa XLD-maljalta kuin kromogeeniseltä maljalta. Salmonella erottui paremmin erillisinä pesäkkeinä nyt käytössä olevalta XLD-maljalta, eikä normaalifloora häirinnyt salmonellan tunnistamista tai jatkotutkimuksia. ChromID® Salmonella-maljalla salmonellan kaltaisten pesäkkeiden erottaminen oli hankalampaa, ja pesäkekasvu oli usein runsaana kasvavan normaaliflooran seassa ja alla. Yksittäisten pesäkkeiden puuttuminen hankaloitti jatkotutkimusten tekemistä ja pidensi vastauksen saamiseen kuluva aikaa. Ilmeisesti kromogeeniseen maljaan on oltu tyytymättömiä myös muualla, sillä BioMérieuxin ChromID® Salmonella-malja on poistettu kliinisestä käytöstä. Nykyään ChromID® Salmonella-maljaa käytetään enää elintarviketeollisuudessa salmonellan tunnistamiseen. Kliiniseen käyttöön on tuotu markkinoille uusi ChromID® Salmonella ELITE-malja. (BioMérieux 2014a.)

9 POHDINTA

Opinnäytetyön tekeminen oli mielenkiintoista ja haastavaa. Aihe oli molempien mielestä kiinnostava ja ajankohtainen. Ennen opinnäytetyön tekemistä kummallakaan ei ollut aikaisempaa kokemusta ulosteviljelyprosessista. Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian toimintayksikön henkilökunta ohjasi ja tuki opinnäytetyömme tekemistä aina tarvittaessa. Saimme tukea ja neuvoja ulostenäytteen tutkimusprosessiin liittyen sekä kirjallisen tuotoksen tekemisessä. Ammatillinen osaamisemme kehittyi huomattavasti opinnäytetyöprosessin aikana.

Kromogeenisistä maljoista löytyi melko huonosti suomenkielistä kirjallisuutta, ja suurin osa suomalaisista tutkimuksista koski virtsaviljelyä. Englanninkielistä materiaalia ja tutkimustietoa löytyi hyvin etenkin internetistä. Suurin osa kromogeenisten maljojen vertailututkimuksista oli tehty 2000-luvun alussa. Internetlähteitä valittaessa kiinnitettiin erityistä huomiota niiden luotettavuuteen. Salmonellasta oli tarjolla paljon tietoa myös suomeksi.

Opinnäytetyötämme varten teimme ensin suunnitelman, jossa hahmottelimme tulevan opinnäytetyön sisältöä ja aikataulutusta. Tiedonkeruuvaiheessa etsimme yhdessä aineistoa ja arvioimme sen luotettavuutta. Pyrimme tekemään opinnäytetyöstämme mahdollisimman luotettavan käsittelemällä ja raportoimalla tiedot huolellisesti ja luottamuksellisesti salassapitovelvollisuuden huomioiden. Aikataulua suunnitellessa varasimme eniten aikaa kirjallisen tuotoksen tekemiseen. Itse tutkimuksen suoritus kesti noin viikon. Maljoista otettuja valokuvia kertyi satoja, joiden läpikäyminen ja tulosten tulkinta vei yllättävän paljon aikaa, vaikka kirjasimme tietoja lomakkeille käsin päivittäin.

Kliinisen mikrobiologian laboratorio tarjosi meille mahdollisuutta vertailla kahta kromogeenistä maljaa XLD-maljan rinnalla. Tutkimuksen kannalta tämä olisi ollut kannattavaa, mutta se olisi vaatinut huomattavasti enemmän aikaa tutkimuksen tekemiseen. Nyt olemme tyytyväisiä tekemäämme ratkaisuun, sillä jo kahden maljan vertailu oli työlästä ja aikaavievää. Maljojen viljely ei vienyt paljon aikaa, kun viljelytekniikka tuli tutuksi. Haasteellisinta ja vaativinta oli maljojen lukeminen, valokuvaaminen sekä havaintojen kirjaaminen lomakkeille. Kummallakaan opinnäytetyön tekijöistä ei ollut aikaisempaa kokemusta bakteeriviljelyjen suorittamisesta tai pesäkekasvun vertailusta. Sen takia oli hankalaa miettiä, miten vertailisimme pesäkkeitä ja niiden kasvua eri mal-

joilla. Pohdimme, vertailemmeko pesäkkeitä niiden määrän vai ulkonäön (salmonellalle tyypillinen kasvu) perusteella. Pesäkkeiden määrän numeerinen arviointi osoittautui lähes mahdottomaksi, koska ChromID® Salmonella-maljalla pesäkkeet kasvoivat myös normaaliflooran alla. Salmonellalle tyypillinen kasvu erottui selkeästi vain XLD-maljalta. Lopulta päädyimme luokittelemaan pesäkekasvun salmonella-bakteerille tyypillisten pesäkkeiden määrän seuraavalla tavalla (liite 1. ja 2.): runsaasti (+++), kohtalaisesti (++), muutama pesäke (+). Esimerkiksi *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin pesäkekasvu ChromID® Salmonella-maljalla on kohtalaista kasvua kuvassa 7, ja normaaliflooran kasvu ChromID® Salmonella-maljalla on runsasta kuvassa 8.

Tutkimuksen alussa oli tiedossa, ettei positiivisia näytteitä välttämättä tule, koska salmonellatapauksia on vuoden aikana reilusti alle sata. Terveysten- ja hyvinvoinnin laitoksen tartuntatautirekisterin mukaan Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin (EPSHP) alueella oli vuonna 2013 tartuntoja 78 kappaletta. Viimeisten 10 vuoden aikana EPSHP:n alueella salmonellatartuntoja on ollut keskimäärin 72 tapausta vuodessa. Vuonna 2014 tartuntoja todettiin 42 kappaletta, eli huomattavasti vähemmän kuin aikaisempina vuosina. (Terveysten- ja hyvinvoinnin laitos 2014.)

Tutkimusta varten kliinisen mikrobiologian henkilökunta oli kerännyt meille pakastimeen seitsemän positiivista potilasnäytettä. Pakastettujen näytteiden lisäksi käytössämme oli kontrollikanta *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Määrä oli pieni kattavan tutkimuksen tekemiseen, toisaalta taas kaikilla kromogeenisillä maljoilla kasvoi runsaasti normaaliflooraa, joista muutama salmonellan kaltaisena. Pienestä positiivisesta otoksesta huolimatta ChromID® Salmonella-maljan erottelukyky osoittautui selvästi XLD-maljaa huonommaksi. Kaikki potilasnäytteet oli merkitty tunnistenumeroilla, joten potilastiedot pysyivät suojattuina. Koska näytteitä ei otettu tutkimusta varten, meidän ei tarvinnut erikseen pyytää potilaiden lupaa tutkimuksen tekemiseen. Lisäksi kyseessä oli tutkimusmenetelmän kehittämistyö, jolle kliinisen mikrobiologian laboratorion on jatkuva lupa.

Tutkimusta tehdessä huomattiin, että lähes jokaisella maljalla kasvoi runsaasti normaaliflooraa. Muutamalla potilasnäytteestä tehdyllä maljaparilla (sekä XLD että ChromID® Salmonella) ei ollut lainkaan kasvua. Meitä ohjannut laboratoriohoitaja kertoi, että jotain kasvua pitäisi aina olla, koska uloste sisältää normaalisti runsaasti bakteereja. Kasvun puuttuminen voi johtua mm. siitä, että henkilön suoliston normaaliflooran tila on

heikentynyt mikrobilääkityksen takia. Toinen mahdollisuus on se, että näytteessä olleet bakteerit ovat kuolleet jonkin prosessissa tapahtuneen virheen takia. Esimerkiksi näytteenoton jälkeinen säilytys on yksi kriittinen vaihe bakteerien hengissä säilymisen kannalta. Luulemme ongelman olleen näytteessä, sillä muut päivän viljelyt onnistuivat hyvin. Kaikki pakastetut salmonella-positiiviset näytteet kasvoivat XLD-maljalla selkeästi erottuvina pesäkkeinä, joten näytteissä olleet bakteerit olivat elinkelpoisia. Positiivinen kontrolli sisälsi *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ja *Escherichia coli* ATCC 25922 – bakteerikantoja. Yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen kasvu ChromID® Salmonella-maljalla oli kirkaspesäkkeistä, joten se tulkittiin normaaliflooraksi. Seuraavana päivänä maljalla kasvoi myös muutamia salmonellalle tyypillisiä pesäkkeitä

Ulkomailla tehtyjen maljavertailujen tutkimustulokset olivat lupaavia, joten odotukset kromogeenisen maljan toimivuudesta olivat korkealla. Jo vuonna 2002 tehdyssä maljojen vertailututkimuksessa Maddocks, Olma ja Chen totesivat kromogeenisen maljan olevan herkempi ja tarkempi kuin XLD-malja salmonellan osoittamiseen ulostenäytteestä. Kromogeenisen maljan käyttö vähensi kustannuksia ja lyhensi tutkimukseen käytettyä aikaa. Roope Niinimäen (2014) insinööriyö bio- ja elintarviketekniikan alalta käsitteli salmonellakromogeenialustoja. Hän vertaili salmonellan kasvua kuudella kromogeenisellä maljalla ja poisti vertailusta herkkyydeltään ja spesifisyydeltään huonoimmaksi toteamansa alustat. Tutkimuksessaan hän totesi, että *Salmonella dublin* – bakteeri kasvoi ChromID® Salmonella-maljalla värittöminä ja läpikuultavina pesäkkeinä, joiden värireaktio tuli lievänä esiin vasta kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Poistetuksi joutui neljä maljaa, joista yksi oli ChromID® Salmonella-malja. Tutkimukseen mukaan jääneet kaksi kromogeenistä maljaa osoittautuivat herkemmiiksi ja spesifisemmiksi kuin käytetyt XLD- ja BPLS (briljantinvihreä-fenolipuna-laktoosi-sakkaroosi) -maljat. (Niinimäki 2014; Maddocks, Olma & Chen 2002.)

ChromID® Salmonella-malja ei siis toiminut myöskään elintarviketeollisuuden käytössä. Viimeisin tieto kyseisestä maljasta on, että BioMérieuxin ChromID® Salmonella-malja on poistettu kliinisestä käytöstä. Sen tilalle on tullut uusi ChromID® Salmonella ELITE-malja.

Vastaavaa maljavertailua tehdessä tulisi huomioida alusta saakka se, että hajotus- ja puhdasviljelmät kannattaa tehdä sille maljatyypille, jolla kasvu oli salmonellan kaltaista. Esimerkiksi ChromID® Salmonella-maljalla salmonellan kaltaisena kasvaneet pesäk-

keet olisi pitänyt jatkoviljellä ChromID® Salmonella-maljalle, eikä XLD-maljalle. Näissä tapauksissa pesäkekasvu oli XLD-maljalla normaaliflooran kaltainen jo primaariviljelyssä. Jatkoviljelyn tekeminen ChromID® Salmonella-maljalle olisi auttanut löytämään primaarimaljalla kasvaneen salmonellan kaltaisen bakteerikasvun, ja bakteeri olisi voitu tunnistaa.

Viljelyt tulisi tehdä vain sellaisina päivinä, että maljat voidaan lukea vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Tutkimuksen suorittamiseen kannattaisi varata pitempi aika kuin viikko. Jatkotutkimuksena ehdotamme samankaltaisen tutkimuksen tekemistä esimerkiksi ChromID® Salmonella ELITE-maljan, jonkun toisen valmistajan kromogeenisen maljan ja XLD-maljan välillä. Varmoja positiivisia kontrollinäytteitä voisi olla enemmän, ja tutkimuksen ajoittaminen lomakauden jälkeiseen aikaan lisäisi mahdollisuutta saada positiivisia potilasnäytteitä.

LÄHTEET

BioMérieux. 2002. API® 20E Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods. Luettu 12.12.2014.

<http://www2.fiu.edu/~makemson/MCB3020Lab/API20eInstructions.pdf>

BioMérieux S.A. 2010. ChromID, Salmonella for the selective isolation and differentiation of *Salmonella*. Maljaesite.

BioMérieux S.A. 2014a. bioMérieux launches chromID® Salmonella Elite, the new generation of culture media for earlier detection of Salmonella strains in clinical fecal samples. Luettu 9.12.2014.

<http://www.biomerieux.com/en/biomerieux-launches-chromidr-salmonella-elite-new-generation-culture-media-earlier-detection>

BioMérieux S.A. 2014b. Products. Luettu 13.10.2014.

http://www.biomerieux.com.au/servlet/srt/bio/australia/dynPage?open=AST_CLN_PRD&doc=AST_CLN_PRD_G_PRD_CLN_104&pubparams.sform=6&lang=au

Bridson, E.Y. 2006. The Oxoid manual. 9.Painos. Englanti: Oxoid Ltd.

Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Kliinisen mikrobiologian toimintayksikkö. Yksikön esittely. Luettu 10.11.2014.

http://www.epshp.fi/1/yksikoiden_sivut/sairaanhoidolliset_palvelut/kliininen_mikrobiologia

Evira 2013. Hygieniaosaaminen. Luettu 10.12.2014.

<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/elintarvikkeiden+riski-+ja+vaaratekijat/mikrobiologiset+vaaratekijat/ruokamyrkytyksia+aiheuttavia+bakteereja/salmonellat>

Heikkilä, R. & Meurman, O. 2005. Bakteriologia. Teoksessa Heikkilä, R., Hellstén, S., Koukila-Kähkölä, P., Kurkinen, T., Meurman, O., Nummelin, R., Pastila, S., Richardson, M. & Ylönen, H. (toim) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. Painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 31–52.

Heikkilä, T. 2008. Tilastollinen tutkimus. Helsinki: Edita Prima.

Jaakola, S., Lyytikäinen, O., Rimhanen-Finne, R., Salmenlinna, S., Savolainen-Kopra, C., Pirhonen, J., Vuopio, J., Jalava, J., Toropainen, M., Nohynek, H., Toikkanen, H., Löflund, J-E., Kuusi, M. & Salminen, M. (toim.) 2013. Tartuntataudit Suomessa 2013. Raportti 16/2014. Luettu 12.12.2014. <http://www.julkari.fi/handle/10024/116198>

Jalava, J. 2010. Ihmisen normaali mikrobisto ja sen merkitys. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S., & Vaara, M. (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1-2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 76–82.

Jalava, K., Vuorela, M., Kotilainen, H., Nohynek, H., Siitonen, A. Kantele, A & Kuusi, M. 2013 Toimenpideohje Salmonella Typhi ja Salmonella Paratyphi- tartuntojen ehkäisemiseksi. THL. Luettu 17.11.2014. <http://www.julkari.fi/handle/10024/104485>

Järvinen, A. & Mattila, L. 2011. Maha-suolikanavan infektiot ja ripulitaudit. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S., & Vaara, M. (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 3. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 475–503.

Kantele, A. 2013. Mikrobieen aiheuttamat ripulitaudit. Lääkärin käsikirja. Terveysportti. Luettu 17.11.2014. http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/koti?p_haku=mikrobieen%20aiheuttamat%20ripulitaudit

Kortelainen, S. & Ylinen, J. 2013. Kromogeenisten virtsaviiljelymaljojen vertailututkimus. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Tampereen ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Kuusi, M., Jalava, K., Siitonen, A. & Ruutu, P. 2007. Toimenpideohje salmonellatartuntojen ehkäisemiseksi. KTL. Luettu 17.11.2014. <http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/103048/salmonellaohje.pdf?sequence=1>

Kärpänoja, P. 2007. Kromogeeniset maljat - Periaate ja tausta. Labquality-päivien esitelmäyhennelmät. Moodi 1, 39.

Maddocks, S., Olma, T. & Chen, S. 2002. Comparison of CHROMagar Salmonella medium and xylose-lysine-desoxycholate and Salmonella-Shigella agars for isolation of Salmonella strains from stool samples. Journal Of Clinical Microbiology. Luettu 17.11.2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149365>

Matikainen, A-M., Miettinen, M. & Wasström, K. 2010. Näytteenottajan käsikirja. Helsinki: Edita Prima Oy.

Meurman, O. 2011. Kromogeeniset maljat primaariviljelyssä. Moodi 4,108.

Nataro, J.P., Bopp, C.A., Fields, P.I., Kaper, J. B & Strockbine, N.A 2011. *Escheria, Shigella, and Salmonella*. Teoksessa Versalovic, J., Carroll, K.C., Funke, G., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Warnock, D.W. (toim.) 10Th Edition Manual Of Clinical Microbiology Vol.1. Washington DC: ASM Press, 603–626.

Niinimäki, R. 2014. Salmonellakromogeenialustojen vertailututkimus. Bio-ja elintarviketekniikka. Metropolia ammattikorkeakoulu. Insinööriyö.

Niskanen, V. 2008. Kohti tutkivaa työtapaa. Helsingin Yliopisto. Luettu 2.4.2014. https://www.avoin.helsinki.fi/Kurssit/momukasva05ktt/kotutapa_niskanen08.pdf

Pincus, D.H. 2007 Microbial Identification Using the Biomérieux Vitek®2 System. Luettu 17.11.2014. https://store.pda.org/TableOfContents/ERMM_V2_Ch01.pdf

Saarinen, A. 2012. F-Salm-Vi, TU-2608-7. SeKS Mikrobiologian laboratorio. Työohje.

Saha, K. 2007. XLD, EL-0026. SeKS Mikrobiologian laboratorio. Elatusaineohje.

Saha, K. 2011. Salmonella, viljely ulosteesta. SeKS Mikrobiologian laboratorio. Ohje.

Saha, K. Sairaalamikrobiologi. 2014. Opinnäytetyön ohjaus. Sähköpostiviesti. kerttu.saha@epshp.fi Luettu 16.12.2014.

Siitonen, A. & Vaara, M. 2011. Escherichia, Salmonella, Shigella ja Yersinia. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S., & Vaara, M. (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1-2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 177–195.

Taanila, A. 2013. Kokeellinen tutkimus. Luettu 30.11.2014.
<http://tilastoapu.wordpress.com/2012/09/27/kokeellinen-tutkimus/>

Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos. 2014a. Infektiotaudit. Salmonella. Luettu 11.12.2014
http://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/laboratoriotoiminta/laboratoriotutkimukset/salmonellan_laboratoriotutkimukset

Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos. 2014b. Tartuntatautirekisteritilastokanta. Luettu 17.11.2014. <http://www.thl.fi/ttr/gen/rpt/tilastot.html>

Tissari, P. & Anttila, V-J., 2010. Muu *enterobacteriaceae*- heimo. Teoksessa Hedman K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri S. & Vaara, M. (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1-2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 196–199.

Tissari, P. & Anttila, V-J., 2010. Pseudomonakset, pseudomonaksen kaltaiset sauvat ja akinetobakteerit. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1-2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 200–205.

Vesikari, T., 2003. Maha-suolikanavan infektiot ja ripulitaudit. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri A. & Valtonen, V. (toim) Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja II. 1. Painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 401–416.

LIITTEET

Liite 1. Taulukko salmonellan kaltaisesta pesäkekasvusta yhden ja kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen

näyte nro	ChromID®- Salmonella 1 vrk	ChromID® Salmonella 2 vrk	XLD salmonella 1 vrk	XLD salmonella 2 vrk	Huomioitavaa
1	+	+	+++	+++	ChromID® muutamia lila pesäke, joista Vittek-tunnistus
2	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	
4	-	+	-	-	ChromID® pieniä tummansinisiä pesäkeitä norm.flooran alla
5	-	-	-	-	ei kasvua
6	-	-	-	-	ei kasvua
7	-	-	-	-	
8	+/-	+	-	+++	PV XLD-maljalle (näyttenro 49, hajotus nro 50)
9	-	-	+	++	XLD 15 pientä mustaa pesäkettä
10	-	+	-	-	Hajotus XLD- maljalle (näyttenro 48)
11	-	++	+	+	XLD 1 musta pesäke, oksidaasi +, PV (hajotus näyttenro 53)
12	-	-	-	-	
13	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	
16	-	+	++	++	XLD hentoja, mustia pesäkeitä, oksidaasi + (hajotus näyttenro 51m PV näyttenro 52)
17	-	-	-	-	
18	-	+/-	++	++	Hajotus näyttenro 54
19	-	-	-	-	
20	-	-	-	-	

21	-	-	-	-	
22	-	++	-	-	ChromID® tumman lila pesäkekasvu
23	-	-	+	+	XLD yksi musta pesäke, PV
24	-	-	-	++	
25	-	-	-	-	
26	-	+	-	-	
27	-	-	-	-	
28	+	+	-	-	oksidaasi pos., hajotus ChromID®:llä selkeästi salmonellalle tyypillinen kasvu
29	-	-	-	-	
30	-	-	-	-	ei kasvua
31	-	-	-	-	
32	-	++	-	-	ChromID® limainen kasvu
33	-	-	+	+	
34	-	-	-	-	ei kasvua
35	-	-	-	-	ei kasvua
36	+	++	+	+	XLD kaksi mustaa pesäkettä
37	-	-	-	-	ei kasvua
38	-	+++	+	+	XLD 1 musta pesäke. Vitek-tunnistus. ChromID® runsas salmonellan tyyppinen kasvu
39	-	+++	++	+++	Positiivinen kontrolli <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 ja <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 – bakteerikantoja. XLD-maljalla selkeämpi kasvu ja erillisiä pesäkkeitä
40	+	+	++	++	ChromID® -maljalla 42 salmonella pesäkettä/XLD-maljalla yli 100 <i>Salmonella infantis</i>

41	++	+++	+++	+++	<i>Salmonella enteritidis</i>
42	+++	+++	+++	+++	XLD-maljalla irto- pesäkkeitä puhtasvil- jelyyn/ ChromID®:llä pesäkkeet normaali- flooran alla <i>Salmonella sp.</i>
43	+++	+++	+++	+++	<i>Salmonella mika- wasima</i>
44	+++	+++	++	++	<i>Salmonella singapore</i>
45	+++	+++	++	++	<i>Salmonella infantis</i>
46	++	++	++	++	<i>Salmonella sp.</i>
47			+++	+++	PV XLD-maljan mus- tasta pesäkkeestä näyt- teestä nro 9
48			-	-	Hajotus näytteestä nro 10
49			-	-	PV XLD-maljan mus- tasta pesäkkeestä näyt- teestä nro 8
50			-	-	Hajotus ChromID® - maljalta näytteestä nro 8
51			-	-	Hajotus näytteestä nro 16
52			-	-	PV näytteestä nro 16
53			-	-	Hajotus näytteestä nro 11
54			+	++	Hajotus näytteestä nro 18

Liite 2. Taulukko normaaliflooran pesäkekasvusta yhden ja kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen

näyte nro	ChromID® Salmonella-malja 1 vrk	ChromID® Salmonella-malja 2 vrk	XLD-malja 1 vrk	XLD-malja 2 vrk	Huomioitavaa
1	++	+++	+	+	
2	+++	+++	+++	+++	
3	+++	+++	+++	+++	
4	+++	+++	+++	+++	XLD limainen
5	-	-	-	-	ei kasvua
6	-	-	-	-	ei kasvua
7	+++	+++	+++	+++	
8	+++	+++	+++	+++	
9	+++	+++	+++	+++	
10	+++	+++	+++	+++	ChromID® vaaleita pesäkkeitä, osin turkoosia
11	+++	+++	+++	+++	
12	+++	+++	+++	+++	
13	+++	+++	++	+++	
14	++	+++	++	++	
15	+	+++	+++	+++	
16	+++	+++	+++	+++	
17	++	+++	+	+	
18	++	++	++	++	
19	+++	+++	++	++	
20	++	++	++	++	
21	+++	+++	++	++	
22	+++	+++	++	++	
23	++	++	+	++	
24	++	++	++	+++	
25	++	+++	+	+	
26	+++	+++	+++	+++	ChromID®:llä 2 vrk:n jälkeen tummaa lilaa kasvua, XLD:llä

					limainen kasvu
27	-	-	-	-	ei kasvua
28	++	++	-	+++	Oksidaasi pos, ei salmonellaa, ChromID®-maljalla selkeä salmonellalle tyypillinen kasvu
29	++	+++	+	+++	
30	-	-	-	-	ei kasvua
31	+++	+++	+	+++	XLD:llä limainen
32	+++	+++	++	+++	XLD:llä limainen
33	++	+++	++	+++	
34	-	-	-	-	ei kasvua
35	-	-	-	-	ei kasvua
36	+++	+++	+	+++	2 mustaa pesäkettä XLD-maljalla, limainen kasvu
37	-	-	-	-	ei kasvua
38	+++	+++	+	+++	1 musta pesäke XLD-maljalla, tehty VITEK-tunnistus, ei salmonellaa , ChromID®-maljalla runsas salmonellan tyypinen kasvu
39	+++	+++	++	+++	Positiivinen kontrolli <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 ja <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 – bakteerikantoja. ,
40	+++	+++	+++	+++	<i>Salmonella infantis</i>
41	+++	+++	+++	+++	<i>Salmonella enteritidis</i>
42	+++	+++	+++	+++	<i>Salmonella sp.</i>
43	++	++	+++	+++	<i>Salmonella mikawasima</i>
44	+++	+++	+++	+++	<i>Salmonella singapore</i>
45	++	++	+++	+++	<i>Salmonella infantis</i>
46	++	+++	+++	+++	<i>Salmonella sp.</i>
47			+++	+++	PV XLD:n mustasta pesäkkeestä näytteestä nro 9
48			+++	+++	Hajotus näytteestä nro 10
49			+++	+++	PV XLD-maljan mustasta pesäkkeestä näytteestä nro 8
50			+++	+++	Hajotus ChromID® -maljalta näytteestä nro 8

51			+++	+++	Hajotus näytteestä nro 16
52			+++	+++	PV näytteestä nro 16
53			+++	+++	Hajotus näytteestä nro 11
54			+++	+++	Hajotus näytteestä nro 18