

The logo for STADIA, consisting of the word "STADIA" in white, uppercase letters on a dark green rectangular background.

HELSINGIN AMMATTIKORKEAKOULU

---

# Kromogeenisten maljojen käyttö virtsaviiljelyssä

Maljoja vertaileva tutkimus

Bioanalytiikan koulutusohjelma,  
Bioanalyttikko  
Opinnäytetyö  
07.11.2007

---

Heini Ek  
Mervi Kanerva  
Tiia Laakkonen



Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Heini Ek, Mervi Kanerva ja Tiia Laakkonen			
Työn nimi			
Kromogeenisten maljojen käyttö virtsaviiljelyssä. Maljoja vertaileva tutkimus			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Syky 2007	30 + 1 liite	
<p><b>TIIVISTELMÄ</b></p> <p>Virtsatieinfektion aiheuttaa tavallisesti potilaan suolistosta peräisin oleva gramnegatiivinen sauvabakteeri ja joskus grampositiivinen kokkibakteeri. Virtsatieinfektioiden tavanomaisin aiheuttaja on E.coli. Virtsaviiljelyn avulla saadaan selville infektion aiheuttanut bakteeri ja sille antibioottiherkkyudet.</p> <p>Kromogeenisella maljalla tarkoitetaan elatusainetta, joka sisältää väriä muodostavia yhdisteitä eli kromogeeniä. Värimuodostus perustuu spesifiseen entsyymi-substraatti-reaktioon, jonka seurauksena syntyy värillinen bakteeripesäke. Tutkimuksemme vertailemme eri valmistajien chromagareita toisiinsa sekä HUSLAB klinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osaston virtsaviiljelydiagnostiikkaan. 53 näytettä viljeltiin kahdeksalle eri kromogeeniselle maljalle ja CLED-maljalle. Kasvun määrää ja pesäkemorfologiaa tarkasteltiin maljoilta silmämääräisesti. Maljojen spesifisyyttä tutkittiin vertailemalla maljoilta saatuja tuloksia toisiinsa. Sensitiivisyyttä tutkittiin laimennossarjan avulla. Kromogeenisilta maljoilta saatujen tulosten vastaavuutta vertailtiin HUSLAB bakteriologian osaston virtsaviiljelydiagnostiikkaan.</p> <p>Tutkimuksemme perusteella pesäkemorfologiassa ja kasvun määrässä ei ollut havaittavissa suuria eroja kromogeenisten maljojen välillä. Värireaktiot toimivat odotetulla tavalla ja bakteerikasvu oli maljoilla lähes yhtä runsasta. Kromogeenisten maljojen spesifisyydessä ei ollut havaittavissa suuria eroavaisuuksia, sillä maljat löysivät virtsatieinfektioiden aiheuttajat lähes yhtä hyvin. Sensitiivisyyttä tutkittaessa laimennossarjalla chromagareiden välille syntyi pieniä eroja. Pääasiassa kromogeenisilta maljoilta saadut tulokset vastasivat hyvin virtsaviiljelydiagnostiikasta saatuja tuloksia.</p> <p>Tutkimuksemme perusteella voidaan todeta, että kromogeenisista maljoista on apua virtsaviiljelydiagnostiikassa ja niiden käyttö voisi nopeuttaa vastauksen saamista potilaalle. Chromagareiden käyttöönotto vaatisi kuitenkin hyvää perehdytystä henkilökunnalle HUSLAB bakteriologian osastolla, sekä terveysasemilla ja sairaaloissa, joissa maljan ensimmäinen tarkastelu tapahtuu.</p>			
Avainsanat			
virtsatieinfektio, virtsaviiljely, kromogeeninen malja, chromagar			



Degree Programme in		Degree	
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care Services	
Author/Authors			
Heini Ek, Mervi Kanerva and Tiia Laakkonen			
Title			
Evaluation of Chromogenic Media in a Urine Culture			
Type of Work	Date	Pages	
Final Project	Autumn 2007	30 + 1 appendix	
<p>ABSTRACT</p> <p>Urinary tract infection is usually caused by gram-negative bacilli or sometimes gram-positive cocci and it is generally caused by patient's own intestinal bacteria. E.coli is the most common bacterium causing a urinary tract infection. The name of the bacteria and its antibiotic sensitivity is determined by using a urine culture.</p> <p>A chromogenic medium is agar which contains colour producing compounds called chromogenes. A coloured bacterium colony is formed by a specific enzyme-substrate-reaction. The objective of our study was to compare chromagars produced by different manufacturers. Chromagars were compared to one another and to the Department of Bacteriology, Section of Clinical Microbiology HUSLAB urine culture diagnostics. We cultured 53 urine samples in eight different chromagars and in CLED-agar. The amount of bacterium growth and colony morphology were observed and the specificity was examined by comparing the results from chromagars to one another. The sensitivity was examined by using a dilution series. The correlation of results from chromagars were compared to the Department of Bacteriology HUSLAB urine culture diagnostics.</p> <p>The results showed that there were no big differences in colony morphology and in the amount of bacterium growth between chromagars. Colour reactions functioned as was expected and the bacterium growth was almost as rich in every chromagar. Big differences in the specificity of chromagars were not noticed and all chromagars found urinary tract infection pathogenes almost equally well. By studying the sensitivity by using the dilution series small differences were discovered. Mainly the results from chromagars correlated well with the results of the urine culture diagnostics.</p> <p>The study showed that the chromogenic media were useful in the urine culture diagnostics and the use of chromagars may speed up having the results to the patient. The inauguration of chromagars requires good familiarisation with the personnel of the Department of Bacteriology HUSLAB and also in health care centers and hospitals where the first examination of the medium is performed.</p>			
Keywords			
urinary tract infection, urine culture, chromogenic medium, chromagar			

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	VIRTSAVILJELYDIAGNOSTIIKKA	2
2.1	Virtsan bakteeriviljely	2
2.2	Nykyiset bakteerien tunnistusmenetelmät HUSLABissa	3
2.2.1	Gram-negatiivisten sauvojen tunnistus	4
2.2.2	Gram-positiivisten kokkien tunnistus	5
3	ESBL	5
3.1	Kliininen merkitys	6
3.2	Infektioiden torjunta	7
4	KROMOGEENISTEN MALJOJEN PERIAATE JA TAUSTA	7
5	TUTKIMUKSESSA KÄYTETTÄVÄT MALJAT	9
5.1	CLED-malja	9
5.2	Chromogenic UTI medium (Clarity ja Opal)	9
5.3	CHROMagar orientation	11
5.4	CPS ID3	12
5.5	UriSelect 4	13
5.6	Harlequin CLED	14
5.7	chromID ESBL	15
6	AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET	15
7	TUTKIMUSONGELMAT	16
8	TUTKIMUKSEN SUORITUS	17
9	TULOKSET	18
9.1	Bakteerikasvu ja pesäkemorfologia chromagareilla ja CLED-maljalla	18
9.2	Chromagareiden spesifisyys	20
9.3	Chromagareiden sensitiivisyys	23
9.4	Chromagareiden tulosten vastaavuus virtsaviiljelydiagnostiikan tuloksiin	24
9.5	Tulosten luotettavuuden arviointia	25
10	POHDINTA	26
11	LÄHTEET	29
	LIITTEET	

## 1 JOHDANTO

Tarkoituksenamme on tutkia, kuinka hyvin kromogeeniset maljat toimivat virtsaviiljelyssä verrattuna CLED-maljaan ja HUSLAB kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osaston virtsaviiljelydiagnostiikkaan. Vertailemme eri valmistajien chromagareita ja tarkastelemme ESBL-maljan toimivuutta. Käytämme sekä valmismaljoja että bakteriologian osaston elatusaineyksikössä jauheesta valmistettuja maljoja. Käytösämme on viisi jauheesta valmistettua maljaa ja kolme valmismaljaa. Työ tehdään HUSLAB kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolle. HUSLAB haluaa tietää, olisiko hyödyllistä ottaa chromagarit käyttöön. Toivottavaa olisi, että mahdollisesti käyttöön tulevan maljan voisi tehdä omassa elatusaineyksikössä. Chromagarien käyttöönotto saattaisi laskea kustannuksia, vähentää työvoiman tarvetta ja säästää aikaa.

Tällä hetkellä virtsaviiljelyissä yleisesti käytetty CLED-malja sisältää laktoosia, jota esimerkiksi *E.coli* hajottaa happamiksi aineenvaihduntatuotteiksi, jotka muuttavat pH-indikaattorin värin pesäkkeen ympärillä keltaiseksi (Carlson – Koskela 2005). Kromogeenisella maljalla bakteerit muodostavat värillisiä pesäkkeitä, mikä taas perustuu spesifiseen entsyymi-substraatti-reaktioon (Kärpänoja 2007).

Tutkimuksessamme selvitämme kromogeenisten maljojen ja CLED-maljan välisiä eroja kasvun määrässä ja pesäkemorfologiassa. Selvitämme myös, onko chromagareiden spesifisyydessä ja sensitiivisyydessä eroja ja vertaamme löytävätkö kromogeeniset maljat samoja patogeeneja näytteistä kuin virtsaviiljelydiagnostiikka.

Tutkimuksessamme käytettäviä jauheesta valmistettuja maljoja ovat: Chromogenic UTI medium opal (OxOp), Chromogenic UTI medium clarity (OxCl), CHROMagar orientation (LaCo), Harlequin CLED (HaCl) ja Uriselect 4 (UriS). Valmismaljoja ovat: CHROMagar orientation (ORI), CPS ID3 (CPS) ja chromID ESBL (ESBL). Suluissa olevia lyhenteitä käytämme tulosten tulkinnassa. Tutkimuksessamme käytettävät maljat on valinnut sairaalamikrobiologi Ritvaleena Puohiniemi.

## 2 VIRTSAVILJELYDIAGNOSTIIKKA

Virtsatieinfektio on bakteeri-infektio, jonka aiheuttaa tavallisesti potilaan suolistosta peräisin oleva gram-negatiivinen sauvabakteeri ja joskus gram-positiivinen kokkibakteeri (Duodecim terveyskirjasto 2007). Vuodessa hoidetaan noin 250 000 virtsatietulehdusta avohoidossa ja kyseessä onkin toiseksi yleisin lääkärin vastaanotolle johtava infektio hengitystietulehdusten jälkeen. Noin 50 % naisista sairastaa vähintään yhden virtsatieinfektion elämänsä aikana. (Marttila 2007.)

Virtsatieinfektioiden tavanomaisia aiheuttajia ovat *Escherichia coli* (noin 80 % avohoidon- ja noin 50 % sairaalainfektioista), muut koliformit (tavallisimmin *Klebsiella*- ja *Enterobacter*-lajit), *Staphylococcus saprophyticus*, enterokokit, *Pseudomonas*-lajit, *Proteus*-lajit, Beetahemolyyttiset streptokokit, *Staphylococcus aureus* sekä *Candida*-lajit (tavallisimmin *Candida Albicans*). (Kouri 1999: 11.)

### 2.1 Virtsan bakteeriviljely

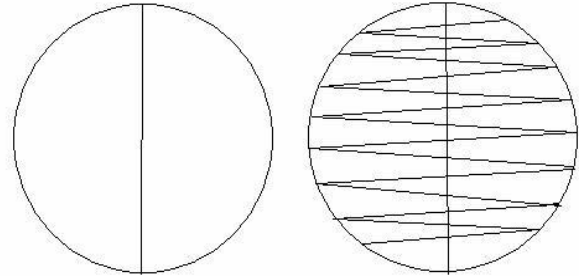
Virtsaviljely on ainoa tapa nimetä virtsatieinfektion aiheuttanut bakteeri ja määrittää sille mikrobilääkeherkkyys. Lääkäri pyytää virtsan bakteeriviljelyn potilaan oireiden perusteella. Avohoidon akuuttia virtsatieinfektiota sairastavien naispotilaiden näytteistä ei yleensä tehdä virtsaviljelyä, ellei heillä ole perussairautta, johon voisi liittyä riskitekijöitä. Niiden potilaiden, jotka kuuluvat tiettyyn riskiryhmään esimerkiksi raskaana olevat potilaat, lapsipotilaat tai ne potilaat, joiden hoitovaste on huono, virtsanäytteistä tehdään puolestaan aina virtsan bakteeriviljely. (Kouri 1999: 6.)

Virtsaviljelyllä haetaan virtsatieinfektioita aiheuttavia bakteereja eli uropatogeneja. Viljelyn alustava vastaus saadaan 18–24 tunnin kuluessa näytteen viljelystä. Oikea mikrobilääkehoito voidaan määrätä bakteerin alustavan nimen ja potilaan tilan perusteella jo vuorokauden kuluessa. Herkkyysmääritys ja bakteerin nimen varmistaminen ovat yleensä valmiina noin kahden vuorokauden kuluttua viljelystä. (Kouri 1999: 19.)

Virtsanäytteet viljellään yleensä kvantitatiivisesti silmukan avulla. Maljaviljely tehdään 1 µl:n silmukalla. Silmukkaviljelyn tarkoitus on siirtää viljelymaljalle niin pieni määrä näytettä, että infektion aiheuttavat bakteerit kasvaisivat maljalle erillisinä pesäkkeinä.

Erillisinä kasvavista pesäkkeistä on helppo suorittaa tarvittavat bakteerintunnistuskokeet ja herkkyysmääritys mikrobilääkkeille. (Kouri 1999: 19.)

Silmukka viedään näytteeseen pystysä juuri pinnan alapuolelle ja silmukallinen virtsaa siirrostetaan kasvatusalustalleen. Silmukalla vedetään viiva edestakaisin maljan poikki ja viljellään vedetyn viivan yli maljan toiselta puolelta toiselle (kuvio 1). Viljelmää kasvatetaan lämpökaapissa yön yli. (Kouri 1999: 19.)



KUVIO 1. Virtsaviljely (Ek 2007).

## 2.2 Nykyiset bakteerien tunnistusmenetelmät HUSLABissa

Seulotulle virtsan bakteeriviljelynäytteelle tehdään merkittävien bakteerikantojen tunnistus ja antibioottiherkkyksien määrittäminen. Alustalla kasvava bakteeri tunnistetaan biokemiallisilla testeillä laji- tai sukutasolle ja sen herkkyys määritetään antibiooteille, jotka johtavat infektion parantumiseen. Kasvualustaa tarkastellaan huolellisesti arvioiden bakteerikasvun määrää. (Tarkka 2005.)

Jos näytteessä kasvaa vain yhtä bakteerilajia tai sen kanssa kasvaa vain vähän normaali-flooraa, tehdään tunnistustestit ja herkkyysmääritys suoraan primäärimaljalta kiertäen normaaliflooraa. Mikäli näytteessä kasvaa lähes yhtä paljon kahta eri bakteerilajia, tunnistustestit ja herkkyysmääritys tehdään kummastakin, tarvittaessa puhtasviljelmien kautta. Jos näytteessä kasvaa useampaa kuin kahta bakteerilajia suunnilleen yhtä paljon, se tulkitaan sekaflooraksi. Jos joku laji on selvästi valtakasvuna, siitä tehdään tunnistustestit ja herkkyysmääritys. (Tarkka 2005.)

Bakteerit voidaan alustavasti tunnistaa pesäkkeen ulkonäön, laktoosireaktion (CLED-maljalla), hajun ja kasvuominaisuuksien perusteella. Kun epäillä poikkeavaa taudinaiheuttajaa tai kun maljalla kasvavat pesäkkeet ovat epätyypillisiä, tehdään aina gramvärjäys. Tavallisten uropatogeenien tyypillisistä pesäkkeistä gramvärjäys voidaan jättää tekemättä. Gramvärjäyksen tulos (gram-negatiivinen tai gram-positiivinen) perustuu eroihin bakteerin soluseinän rakenteessa. Tarvittaessa tehdään lisäksi oksidaasi- ja

katalaasitestit. Harvinaisten bakteerien kohdalla riittää tunnistus ryhmä- tai sukutasolle ja herkkyysmääritys. (Tarkka 2005.)

### 2.2.1 Gram-negatiivisten sauvojen tunnistus

Gram-negatiiviset sauvat kasvavat CLED-maljalla rehevinä pesäkkeinä. Alustavasti bakteerien ryhmittely perustuu niiden laktoosinkäyttöön CLED-maljalla sekä oksidaasitestin tulokseen. Tyypillinen *E.coli*, joka on laktoosipositiivinen voidaan tunnistaa  $\beta$ -glukuronidaasimaljalla (BGA-malja).  $\beta$ -glukuronidaasikokeella todetaan, tuottaako tutkittava bakteeri  $\beta$ -glukuronidaasientsyymiä. (Tarkka 2005.) Nykyään ollaan kuitenkin HUSLAB bakteriologian osastolla siirretty käyttämään *E.colin* tunnistamisessa BGA-maljan sijaan kromogeenista CPS-maljaa. Tunnistus perustuu edelleen  $\beta$ -glukuronidaasin tuottoon, mutta CPS-maljan on todettu olevan herkempi eli se tunnistaa enemmän *E.coleja*, kuin BGA-malja. CPS-maljalla *E.coli* kasvaa viininpunaisina pesäkkeinä ja värireaktio säilyy pitkään. BGA-maljalla värireaktio levisi maljalla nopeasti jättäen alleen negatiivisiakin tuloksia. Tämä vaikeutti maljan tulkintaa etenkin viikonloppun jälkeen. Herkkyysmääritys tehdään virtsan sauvaherkkyyskiekoin (Tarkka 2005).

CPS-maljalla negatiivisiksi jääneille gram-negatiivisille sauvoille, jotka ovat oksidaasi negatiivisia tehdään lyhyt sokerisarja, johon kuuluvat mannitoli-, SIM-, urea- ja sitraatitiputki. Puhdasviljelmä tehdään CLED-maljalle suoraan sokerisarjasta jatkaen. Herkkyysmääritys tehdään virtsan sauvaherkkyyskiekoin. (Tarkka 2005.)

Oksidaasitestillä todetaan, tuottaako tutkittava bakteeri sytokromioksidaasia (Kouri 1999:48). Oksidaasipositiivisista sauvoista erotetaan *P.aeruginosa* tyypillisen hajun ja pesäkkeen perusteella sekä pseudomonasherkkyyssmaljalle laitettavalla C390-kiekolla. Muut oksidaasipositiiviset sauvat tunnistetaan API 20NE:llä ja niille tehdään virtsan sauvaherkkyysmääritys. Oksidaasinegatiiviset sauvat, joita ei pystytä nimeämään, tunnistetaan pitkällä sokerisarjalla (mannitoli, ONPG, SIM, urea, glukoosi, arabinoosi, sitraatti ja arginiini). Tarvittaessa tehdään API 20E. (Tarkka 2005.)

ESBL-epäilyistä esimerkiksi *E.coli*, Klebsiella tai *P.mirabilis*, joilla on herkkyysmaljalla niin sanotut pöllön silmät antibioottikiekkojen ympärillä tai joiden herkkyys kefuroksiimille on alentunut, tehdään jatkoselvittelyksi API20E ja ESBL-kiekot. Tarvittaessa tehdään MIC-määritykset. (Tarkka 2005.) MIC-arvo (minimal inhibitory concentration)



on pienin lääkeainepitoisuus, joka kykenee estämään bakteerin kasvun (Huovinen ym. 2003: 26).

### 2.2.2 Gram-positiivisten kokkien tunnistus

Gram-positiiviset kokit kasvavat CLED-maljalla pieninä pesäkkeinä. Jatkotestejä ei tehdä, jos maljalla kasvaa vain 1–2 kokkipesäkettä. Jako enterokokkeihin ja stafylokokkeihin tehdään katalaasitestin perusteella. (Tarkka 2005.) Katalaasitestillä todetaan, tuottaako tutkittava bakteeri katalaasientsyymiä. Stafylokokit tuottavat katalaasientsyymiä, enterokokit eivät.

Katalaasiposiitivisille kokeille tehdään seuraavat tunnistustestit: DNA-malja, mannitolimalja, trehaloosimalja, ureaputki ja puhdasviljelmä verimaljalle. Lisäksi tehdään herkkyysmääritys stafylokokkeille tarkoitettuun antibioottikiekoin. Herkkyysmaljalle lisätään myös diagnostinen novobiosiinikiekko, jota käytetään *S.saprophyticuksen* tunnistukseen. (Tarkka 2005.)

Katalaasinegatiivisille kokeille tehdään seuraavat tunnistustestit: BEM-malja, arabinoosimalja ja puhdasviljelmä verimaljalle. Lisäksi tehdään herkkyysmääritys enterokokeille tarkoitettuun antibioottikiekoin.  $\beta$ -hemolyyttisistä streptokokeista tehdään agglutinaatio ja streptokokki herkkyyskiekot. Hiiva tunnistetaan chromagarin perusteella ja siitä ei yleensä tehdä herkkyysmääritystä. (Tarkka 2005.)

## 3 ESBL

ESBL-kannat (Extended Spectrum Beta-Lactamase) ovat plasmidivälitteisten betalaktamaasientsyymien avulla kykeneviä hajottamaan kolmannen polven kefalosporiineja. Monet ESBL-kannat ovat resistenttejä myös esimerkiksi fluorokinoloneille, sulfatrimetopriimille ja aminoglykosideille. ESBL-kantojen resistenssigeenit ovat rengasmaisia DNA-molekyylejä eli plasmideja, jotka sijaitsevat varsinaisen bakteerigenomin ulkopuolella. Nämä resistenssigeenit voivat siirtyä kannoista toisiin ja bakteerilajien välillä. Tällainen resistenttiys voi levitä nopeammin ja tehokkaammin kuin kromosomaalinen. (Meurman 2005: 71, Vaara 2004: 4467.)

ESBL-entsyymejä tunnetaan nykyään jo yli kaksisataa. Suomessa tähän mennessä tyypitetyistä valtaosa on ollut CTX-M-entsyymejä (83 %). Muita ESBL-entsyymiperheitä on TEM ja SHV. ”ESBL-kanta voi olla jokin paristakymmenestä bakteerilajista, jolla on jokin paristasadasta erilaisesta plasmidivälitteisestä ESBL-entsyymistä”. (Meurman 2005: 71.)

ESBL-kannat ovat useimmiten olleet *Escherichia coli* tai *Klebsiella pneumoniae* bakteereissa. ESBL:ää on löydetty myös muilta gram-negatiivisilta enterobakteereilta, kuten *Morganella morganii*, *Proteus sp.* ja akinetobakteereilta ja *Pseudomonas aeruginosalta*. Aktiivisesti ESBL-kantoja haetaan *E.colista*, *K.pneumoniaesta* ja *P.mirabiliksesta*. (Meurman 2005: 71, Vaara 2004: 4467.)

Ensimmäiset ESBL-kannat löydettiin vuonna 1982 Keski-Euroopasta. Tämän jälkeen ne ovat levinneet ja yleistyneet kaikissa maanosissa viimeisten vuosien aikana ja nykyään niitä löytyy jo avohoidon puolelta ja täysin terveiltä henkilöiltä. Suomessa eniten kantoja löytyy Helsingistä. (Meurman 2005: 72.)

### 3.1 Kliininen merkitys

ESBL-positiivisten *E.coli*- ja *K.pneumoniae*-kantojen aiheuttamien infektioiden hoito on kalliimpaa, pidempiaikaisempaa ja hoitovasteeltaan huonompaa, kuin ESBL-negatiivisten. ESBL-kantojen vaikutusta on tutkittu lähinnä vain vaikeissa infektioiden tapauksissa. ESBL-kantoihin kuolleisuus riippuu infektiosta, mutta esimerkiksi ESBL-kannan aiheuttamassa lasten sepsiksessä kuolleisuus on suurentunut verrattuna herkkiin bakteerikantoihin. (Meurman 2005: 73.)

Nykyisten laboratoriorien ohjeiden mukaan kaikki ESBL-kannat vastataan resistenteiksi penisilliineille ja kefalosporiineille MIC-arvosta riippumatta. Parhaimmat hoitovasteet tällä hetkellä saadaan karbapeneemeillä. Uhkana ovat uudet plasmidivälitteiset karbapenemaasit, jotka tekevät nämäkin lääkkeet tehottomiksi. Niiden leviämisen estäminen on tällä hetkellä hyvin tärkeää, jotta ESBL-kantoja voidaan jatkossakin hoitaa karbapeneemeillä. (Meurman 2005: 73.)

### 3.2 Infektioiden torjunta

Tartuntojen torjunnassa tärkeää on tehokas käsihygienia ja tiukka kosketuseristys. ESBL-kantajat on suositeltavaa sairaaloissa hoitaa yhden hengen huoneissa tai kohortoituina muiden kantajien kanssa. Tällä hetkellä ei tarkkaan tiedetä, kuinka kauan ESBL-kantajuus säilyy, mutta sen arvellaan säilyvän kuukausia tai jopa vuosia. ESBL-kannat vaikeuttavat oikean antibioottihoidon valintaa, huonontavat hoitotuloksia ja lisäävät myös kustannuksia. ESBL:stä on muodostumassa jopa MRSA:n kaltainen resistenssiuhka. (Meurman 2005: 73–77.)

## 4 KROMOGEENISTEN MALJOJEN PERIAATE JA TAUSTA

Kromogeenisella maljalla tarkoitetaan elatusainetta, joka sisältää väriä muodostavia yhdisteitä eli kromogeeneja. Värinmuodostus perustuu spesifiseen entsyymi-substraatti-reaktioon, jossa muodostuu värillinen lopputuote. Kromogeeni on liitetty substraattiin ja bakteerin kasvaessa se tuottaa entsyymiä, jolloin kromogeeni vapautuu ja muodostuu väriä. Jos värinmuodostus perustuu johonkin muuhun tekijään kuten esimerkiksi pH:n muutokseen, niin tällaiset agarit eivät ole kromogeenisia. Kromogeenista maljaa voidaan käyttää selektiivisenä kasvualustana valitsemalla malja, joka sisältää haluttuun tarkoitukseen sopivan substraatin sekä jonkin selektiivisen tekijän, kuten esimerkiksi antibiootin. Kromogeenisella maljalla kasvava bakteeripesäke värjäytyy lajille tyypilliseen tapaan ja se voidaan näin tunnistaa (kuvio 2). Kromogeenisten elatusaineiden koostumus on yleensä liikesalaisuus, mutta usein ilmoitetaan kuitenkin selektiivinen tekijä ja entsyymi, joihin bakteerin tunnistus perustuu. Kromogeeniset maljat ovat ensimmäisen ja toisen polven maljoja. Ensimmäisen polven agarit sisältävät yhtä kromogeenista substraattia ja toisen polven agarit useampia kromogeenisia substraatteja. (Kärpänoja 2007: 39.)



KUVIO 2. Kromogeeninen CPS-malja (Ek – Laakkonen 2007).

Kromogeenisiä maljoja voidaan käyttää näytteiden primaariviljelyyn, jolloin voidaan tehdä mikrobien alustavaa tai lopullista tunnistusta tai niitä voidaan käyttää jatkotunnistustesteinä. Kromogeenisten maljojen käytössä on monia etuja. Eniten chromagareita on Suomessa käytetty virtsaviiljelyissä, jolloin bakteerien tunnistus ei välttämättä vaadi erillisiä tunnistustestejä. Esimerkiksi *E.coli* ja enterokokki voidaan tunnistaa suoraan monien valmistajien primääriviljelymaljalta. Vertailututkimuksissa on osoitettu, että bakteerien kasvu kromogeenisilla maljoilla on samaa tasoa kuin CLED-maljalla, ja tästä syystä ne riittävät virtsaviiljelyn ainoaksi elatusalustaksi lukuun ottamatta erityispotilaita. Myös mikrobien alustava tunnistus on chromagareilta tarkempaa kuin esimerkiksi CLED-maljalla. Lisäksi sekaflooran tunnistaminen chromagareilta on helpompaa. (Kärpänoja 2007: 39–40.)

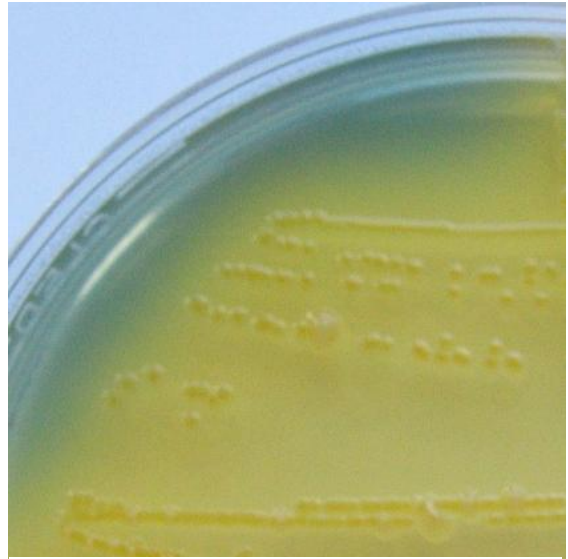
Chromagareiden käyttäminen erityisesti virtsaviiljelydiagnostiikassa tulisi vähentämään työmäärää ja tuloksia saataisiin nopeammin, koska tunnistustestejä tarvitsisi tehdä vähemmän. Kromogeeniset maljat ovat tuoneet helpotusta myös MRSA ja ESBL diagnostiikkaan. Monissa tutkimuksissa on jo todettu, että kromogeenisten maljojen herkkyys ja spesifisyys ovat paremmat verrattuna aiempiin menetelmiin. Myös antibioottiherkkyysmääritykset voidaan tehdä suoraan kromogeenisella maljalla kasvaneesta pesäkkeestä eikä erillisiä puhtasviljelyitä tarvitse tehdä. Kromogeenisten maljojen ongelmiksi voidaan katsoa, että jotkin kromogeeniset virtsaviiljelymaljat eivät erottele enterokokkia ja koliformisia sauvoja toisistaan värin perusteella ja joillakin maljoilla myös *S.aureus* kasvaa huonosti (The Biomedical Scientist 2007: 169). Kromogeenisiä maljoja on saatavilla sekä jauheena että valmiina maljoina useilta eri toimittajilta. (Meurman 2007: 41–42; Kärpänoja 2007: 39–40.)

Ensimmäiset kromogeeniset elatusalustat otettiin käyttöön 1990-luvun alussa. Virtsaviiljelyssä ensimmäisiä kromogeenisiä elatusalustoja oli Orion Diagnostican Uricult Trio, jolta *E.coli* voidaan tunnistaa  $\beta$ -glukuronidaasiaktiivisuutensa perusteella. Chromagareita on Suomessa tähän asti ollut käytössä vasta aika vähän, mikä johtuu erityisesti agariden kalleudesta. Viime vuosina eräiden maljatyyppeiden hinnat ovat kuitenkin alkaneet laskea, mikä taas on lisännyt kiinnostusta kromogeenisten maljojen käyttöön. TYKS-LAB on jo ottanut käyttöön kaikissa toimipisteissään virtsan primaariviljelymaljaksi CHROMagar Orientation-maljan. (Meurman 2007: 41; Kärpänoja 2007: 39–40.)

## 5 TUTKIMUKSESSA KÄYTETTÄVÄT MALJAT

### 5.1 CLED-malja

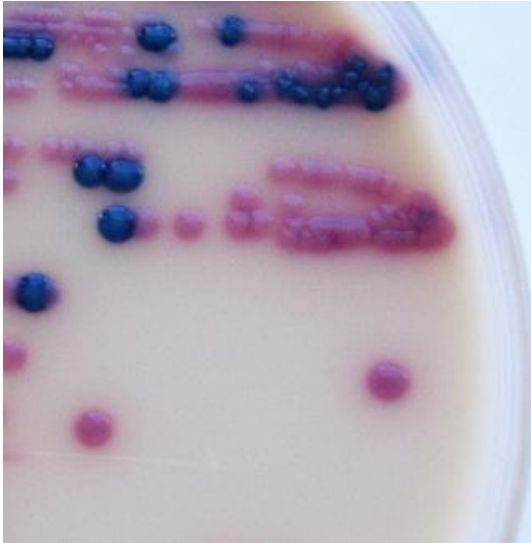
Tällä hetkellä virtsanäytteet viljellään Suomessa yleisimmin CLED-maljalle (*cystine-lactose-electrolyte-deficient*). Maljan sisältämä kystiini sallii kääpiöpesäkkeisten (*dwarf colony*) koliformien kasvamisen. Maljan elektrolyytit hillitsevät proteusten hunnuttamista. Bromithymoli sininen toimii pH indikaattorina, joka erottaa laktoosia fermentoivat bakteerit ei fermentoivista. Organismit, jotka fermentoivat laktoosia, alentavat maljan pH:ta muuttaen sen värin vihreästä keltaiseksi (kuvio 3). CLED-maljalta voidaan arvioida myös pesäkkeen kokoa, joka antaa suuntaa jatkotunnistukseen. Sekaflooran erottaminen maljalta voi aiheuttaa bakteerien tunnistuksessa ongelmia. (BD 2006, Huovinen ym. 2003: 24.)



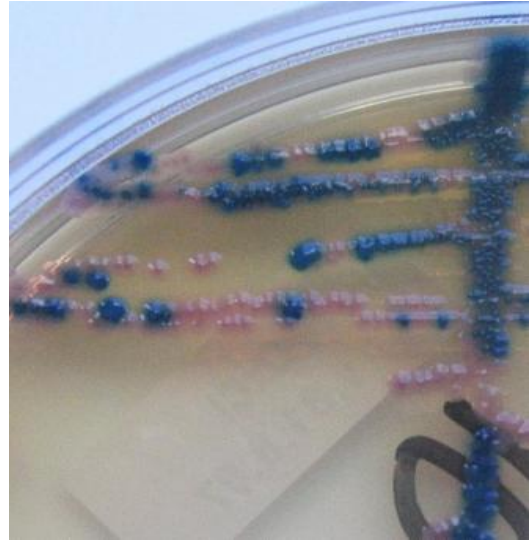
KUVIO 3. CLED-malja (Ek – Laakkonen 2007.)

### 5.2 Chromogenic UTI medium (Clarity ja Opal)

Valmistajan (Oxoid) mukaan maljalta voidaan tunnistaa ja erottaa kaikki virtsatieinfektion yleisimmät aiheuttajabakteerit. Sekä Opal että Clarity toimivat saman periaatteen mukaisesti eli sisältävät kaksi kromogeenia ( $\alpha$ -glukosidin ja red-galaktosidin). Clarity on kehitellympi versio, jolta on valmistajan mukaan helpompi tunnistaa *Proteus*-, *Morganella*- ja *Providencia*-lajit herkemmän TDA-reaktio takia. Opal-maljan tausta on maitomainen, kun taas Clarity-malja on kirkastaustainen (kuvio 4 ja 5). (Oxoid 2007.)



KUVIO 4. OxOp-maljalla *E.colia* ja klebsiellaa (Ek – Laakkonen 2007).



KUVIO 5. OxCl-maljalla *E.colia* ja klebsiellaa (Ek – Laakkonen 2007).

Maljalla olevat kromogeenit ja bakteerien tuottamat entsyymit reagoivat keskenään ja saavat aikaan entsyymi-substraatti-reaktion, jonka tuloksena kromogeeni vapautuu ja muodostuu värillinen pesäke. Enterokokkien tuottama  $\beta$ -glukosidaasi tarttuu maljan kromogeeni x-glukosidiin tuottaen vihertäviä pesäkkeitä, kun taas *E.colin* tuottama  $\beta$ -galaktosidaasi tarttuu maljan toiseen kromogeeniin red-galaktosidiin tuottaen pinkkejä pesäkkeitä. Muut koliformit (Klebsiellat, Enterobakteeri, Serratiat ja Citrobakteerit) tuottavat sekä  $\beta$ -galaktosidaasia ja  $\beta$ -glukosidaasia, jotka tarttuvat maljan molempiin kromogeeneihin tuottaen maljalla tummansinisiä pesäkkeitä. Elatusaineessa on lisäksi tryptofaania, jonka avulla saadaan selville bakteerien TDA-aktiivisuus (Tryptofaani deaminaasi aktiivisuus). Tämä näkyy kehänä *Proteus*-, *Morganella*- ja *Providencia*-lajien pesäkkeiden ympärillä. Stafylokokit kasvavat maljalla valkoisina, kellertävinä (lähinnä *S.aureus*) tai haalean punaisina (lähinnä *S. saprophyticus*). *Pseudomonas*-lajit ovat maljalla rusehtavia tai vihertäviä. (Oxoid 2007.)

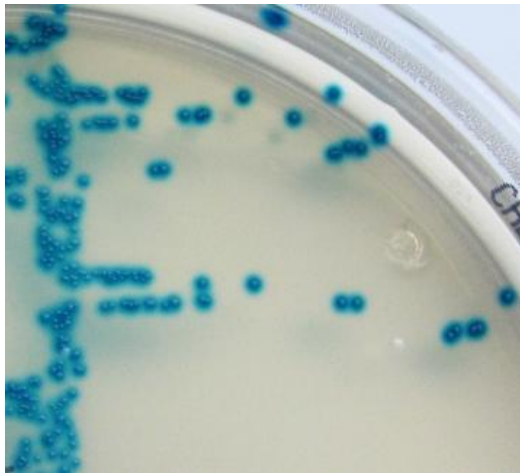
Jotkut bakteerit voivat aiheuttaa maljalla poikkeavia reaktioita. Valmistajan testeissä lähes joka toinen *Enterobacter cloacae* tuotti maljalla vaaleanpunaisia pesäkkeitä, joita ei voitu silmämääräisesti erottaa *E.colin* tuottamista pesäkkeistä. Bakteerit voidaan erottaa toisistaan indolitestillä, mutta ei Kovac's reagenssia käyttäen, sillä sen tulkinta voi olla hankalaa johtuen siitä, että *E.colin* pesäke kasvaa maljalla pinkkinä (indoliposi-

tiivinen tulos on punainen). Testiä ei saa tehdä suoraan maljalla, vaan se tehdään suodatinpaperin päällä. Testillä voidaan erottaa *E.coli* ja *Enterobacter*-lajit sekä *P.mirabilis* ja muut Proteukset toisistaan. (Oxoid 2007.)

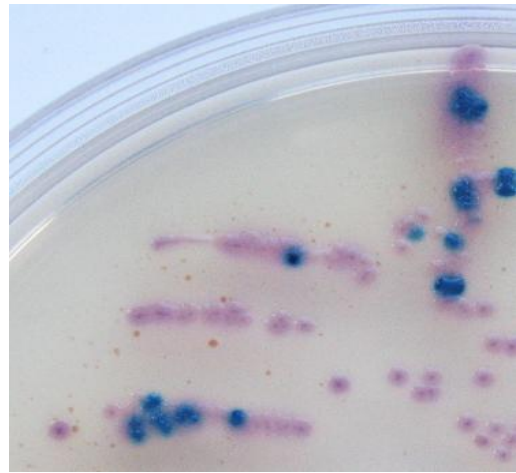
### 5.3 CHROMagar orientation

Valmistajan (CHROMagar microbiology) mukaan malja omaa suuren määrän värejä, joiden pohjalta on helpompaa tunnistaa yhä enemmän bakteerilajeja. Bakteerit ovat sen mukaan siis täysin tunnistettavissa suurimmassa osassa tapauksista. Maljalta löytää helposti pienetkin bakteeripopulaatiot pesäkkeen värin perusteella. CHROMagar orientationin kehittäjä on tohtori Alain Rambach. (CHROMagar microbiology 2006.)

D'Souza, Campbell ja Baron (2003) toteavat tutkimuksessaan, että *E.coli* tuotti vaaleanpunaisia tai punaisia pesäkkeitä perustuen sen  $\beta$ -galaktosidaasin tuottoon. *P.mirabilis* ja *P.vulgaris* olivat hyvin tunnistettavissa maljalla ja ne kasvoivat rusehtavan oransseina pesäkkeinä, joita ympäröi ruskea kehä. Enterokokit, jotka tuottavat  $\beta$ -glukosidaasia, kasvoivat maljalla turkoosin sinisinä. (D'Souza ym. 2003.)



KUVIO 6. ORI-maljalla enterokokkia (Ek – Laakkonen 2007).



KUVIO 7. LaCo-maljalla *E.colia* ja klebsiellaa (Ek – Laakkonen 2007).

*Klebsiella*-, *Enterobacter*- ja *Citrobacter*-lajit tuottivat kaikki maljalla tummansinisiä pesäkkeitä. Tämän vuoksi niitä ei voitu erottaa toisistaan. *Pseudomonas aeruginosa* tuotti maljalla vaaleita, metallinhohtoisia, joskus vihertäviä pesäkkeitä. *S.aureus* ja *S.epidermidis* kasvoivat valkoisina tai kellertävinä pesäkkeinä, kun taas *S.saprophyticus* kasvoi vaaleanpunaisina pesäkkeinä. Streptokokeja ei pystytty maljalla erottamaan

toisistaan eli ne kaikki kasvoivat haaleina sinisinä pesäkkeinä. Myös niiden erottaminen enterokokeista tuotti vaikeuksia etenkin silloin, kun streptokokkipesäkkeet olivat nuoria. Hiivat kasvoivat maljalla valkoisina. (D'Souza ym. 2003.)

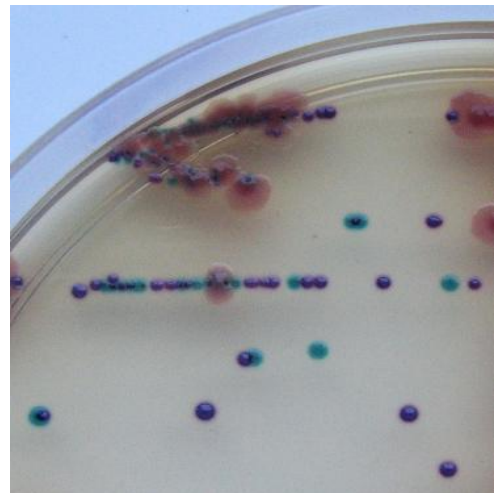
Tutkimuksessamme käytämme kahta CHROMagar orientation-maljaa. Toinen on BD:n valmismalja ja toinen tilattu Labemalta jauheena ja itse valmistettu HUSLAB bakteriologian osaston elatusaineyksikössä (kuvio 6 ja 7).

#### 5.4 CPS ID3

CPS ID3 on bioMérieux'n valmistama kirkastaustainen kromogeeninen kasvatusalusta. CPS ID3-maljalta voidaan valmistajan mukaan suoraan tunnistaa *E.coli*, proteus ja enterokokki. Maljalla pesäkkeet eriytyvät hyvin ja ne on helppo tunnistaa erottelevien värien perusteella. Maljan tausta on väritön, mikä helpottaa pesäkkeiden laskemista (kuvio 8). CPS ID3 sisältää spesifisiä substraatteja, joiden avulla bakteerien entsymaattista aktiivisuutta voidaan havaita värinmuodostuksena. (bioMérieux 2007.)

*E.colin* suora tunnistaminen maljalta perustuu  $\beta$ -glukuronidaasin tuottoon. Proteus tunnistetaan reaktion perusteella, jossa deaminaasi hajottaa TDA:ta. Enterokokki tunnistetaan maljalta  $\beta$ -glukosidaasin tuoton perusteella. (bioMérieux 2007.)

Uudessa CPS ID3 sukupolvessa on lisätty ravintoainekapasiteettia pääasiassa stafylokokille ja hiivoille sekä tunnistusherkkyyttä ja värjäytymisen spesifisyyttä yleisimmille virtsatiepatogeneille. Myös KESC-ryhmän bakteerien (klebsiellan, enterobakteerien, serratian ja citrobakteerien) tunnistaminen on parantunut paremman värin intensiteetin ansiosta, mikä johtuu kasvaneesta  $\beta$ -glukosidaasi aktiivisuudesta. Lisäksi orientaatio *S.agalactiaen* tunnistusta kohti on kasvanut. (bioMérieux 2007.)



KUVIO 8. *E.colia*, enterokokkia ja streptokokkia CPS-maljalla (Ek – Laakkonen 2007).



*E.coli* pesäkkeet, jotka ovat  $\beta$ -glukuronidaasi-positiivisia ja  $\beta$ -glukosidaasi-negatiivisia, värjäytyvät pinkeiksi tai punaviinin värisiksi. Proteuspesäkkeet ovat taas deaminaasi-positiivisia,  $\beta$ -glukuronidaasi-negatiivisia ja  $\beta$ -glukosidaasi-negatiivisia. Niiden väri voi vaihdella vaalean ruskeasta tumman ruskeaan ja pesäkkeen ympärys värjäättyy rusehtavaksi. Indolitestillä saadaan tehtyä tarkempi lajinmääritys. Indoliposiivisia ovat *P. vulgaris*, *Morganella morganii* ja *Providencia*. *P.mirabilis* on indolinegatiivinen. Enterokokkipesäkkeet, jotka ovat  $\beta$ -glukuronidaasi-negatiivisia ja  $\beta$ -glukosidaasi-positiivisia, värjäytyvät turkoosin värisiksi. (bioMérieux 2007.)

Myös muutamat muut bakteerit värjäytyvät lajille tyypilliseen tapaan CPS ID3-maljalla mutta niitä ei kuitenkaan voida suoraan tunnistaa maljalta värin perusteella, vaan niille täytyy tehdä muita jatkotunnistustestejä. *K.pneumoniae* värjäytyy vihreistä ruskeanvihreisiin pesäkkeisiin ja *P.aeruginosa* pesäkkeet voivat olla pigmentillisiä tai metallinhoitoisia. *S.aureus* pesäkkeet ovat yleensä keltaisia ja *S.agalactiae* värjäytyy yleensä violetiksi. *C.albicans* pesäkkeet kasvavat maljalla valkoisina. (bioMérieux 2007.)

## 5.5 UriSelect 4

UriSelect 4 on Bio-Radin valmistama kromogeeninen kasvualusta (kuvio 9). Se on tarkoitettu kaikkien yleisimpien virtsatiepatogeenien eristämiseen ja niiden suoraan tai alustavaan tunnistamiseen. UriSelect 4 on rikas kasvualusta. Se sisältää kahta kromogeenistä substraattia, joiden avulla saadaan selville  $\beta$ -galaktosidaasin ja  $\beta$ -glukosidaasin tuotto sekä tryptofaania, jolla saadaan selville tryptofaani aktiivisuus (indolin tuotto) ja tryptofaani deaminaasi aktiivisuus (TDA). (Bio-Rad 2007.)

Maljalta voidaan valmistajan mukaan suoraan tunnistaa *E.coli*, proteus ja enterokokki. Pesäkkeiden värin ja morfologian perusteella voidaan myös tehdä alustavaa tunnistusta K.E.S.-ryhmän bakteereille (klebsiella, enterobakteeri ja serratia), mutta tällöin vaaditaan tarkempia jatkotunnistustestejä.



KUVIO 9. UriS-maljalla stafylokokkia (Ek – Laakkonen 2007).

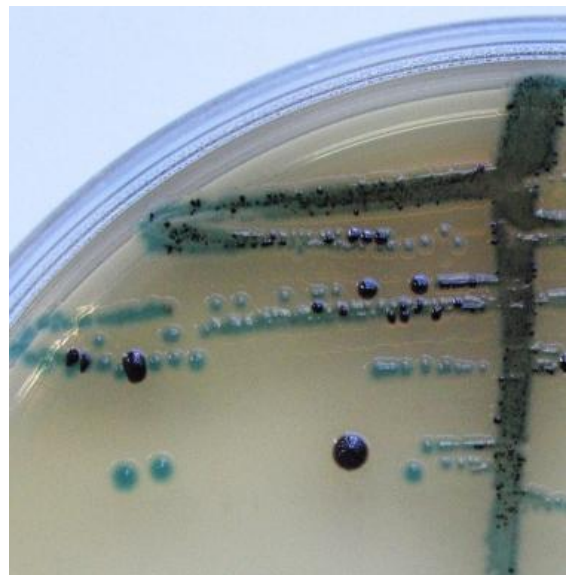
Tunnistaminen perustuu tälläkin maljalla entsyymiaktiivisuuden aiheuttamiin värireaktioihin. *E.coli* tunnistaminen perustuu kahden entsyymin aktiivisuuteen,  $\beta$ -galaktosidaasiin ja tryptofanaasiin.

$\beta$ -galaktosidaasi halkaisee kromogeenisen substraatin, jota malja sisältää, aiheuttaen pesäkkeiden pinkin värin. *Proteus* tunnistetaan tryptofaani deaminaasi aktiivisuuden perusteella rusehtavasta kehästä pesäkeen ympärillä ja *Proteus*-lajit voidaan erottaa indolitestillä. Enterokokki tuottaa  $\beta$ -glukosidaasia (eskulinaasia), joka halkaisee alustan sisältämän kromogeenisen substraatin ja saa näin aikaan pesäkkeiden turkoosin sinisen värin. (Bio-Rad 2007.)

## 5.6 Harlequin CLED

Harlequin CLED on kromogeeninen kasvatusalusta virtsateiden patogeenien erotteluun ja tunnistukseen. Tavallista CLED-maljaa paremmat kasvuolosuhteet helpottavat herkkien taudinaiheuttajabakteerien tunnistamista näytteistä, joissa voi olla myös sekaflooraa häiritsemässä tunnistusta. (Lab M 2007.)

Tavallisessa CLED-maljassa bakteerien tunnistus perustuu laktoosin käyttöön, Harlequin CLED:llä laktoosi on poistettu ja tilalla on kromogeeniä. Kromogeenit ovat x-glukuronidi ja CHE-glukosidi. X-glukuronidi tuottaa *E.colin*  $\beta$ -glukuronidaasin kanssa vihreitä pesäkkeitä.  $\beta$ -glukosidaasia tuottavat bakteerit, kuten enterokokit tai klebsiellat, näkyvät maljalla mustina CHE-glukosidin vaikuttamana (kuvio 10). Maljaan on lisätty myös fenyylialaniinia, joka auttaa proteusten tunnistamisessa. Ne näkyvät maljalla ruskeina ja niiden ympärille voi muodostua kehä. Muut taudinaiheuttajabakteerit kasvavat yleensä maljalla värittöminä tai valkoisina. (Lab M 2007.)



KUVIO 10. *E.colia* ja klebsiellaa HaCl-maljalla (Ek – Laakkonen 2007).

## 5.7 chromID ESBL

bioMérieux'n chromID ESBL-malja on kromogeeninen kasvatusalusta, joka on erityisesti kehitetty ESBL-kantojen tunnistukseen. Maljan toiminta perustuu värinmuodotukseen ja antibioottiseokseen. Antibiootit estävät herkkien bakteerien kasvun maljalla, joten valmistaja lupaa, että maljalla kasvavat vain ESBL-kannat. Elatusaineeseen on lisätty muun muassa kefpodoksiimi nimistä antibioottia, joka on valittu tämän tyyppisen resistenttiyden markkeriksi. (bioMérieux 2007.)

ESBL-maljalle viljellään näyte kuten muillekin maljoille ja inkubaatioaika on sama 18-24 tuntia. bioMérieux lupaa erittäin helppoa maljan luentaa ja värinmuodostus on samanlainen kuin muillakin chromagareilla. *Escherichia coli* -bakteerin pesäkkeet, jotka tuottavat  $\beta$ -glukuronidaasia, kasvavat maljalla vaaleanpunaisena tai viininpunaisena. Klebsiella-, enterobakteeri-, serratia- ja citrobakteeri- (KESC) pesäkkeet näkyvät sinisenä, vihreinä tai ruskean vihertävinä. Värinmuodostus perustuu bakteerien  $\beta$ -glukosidaasin tuottamiseen. *Proteus*-lajit näkyvät ESBL-maljalla tummina tai vaalean ruskeina, mikä johtuu deaminaasin tuotannosta. (bioMérieux 2007.)

## 6 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET

Kromogeenisiä maljoja on tutkittu maailmalla vertailemalla niitä keskenään. Esimerkiksi Italialaisessa tutkimuksessa vertailtiin kahta kaupallista chromagaria 3000 virtsanäytteellä. Tutkimuksessa käytetyt maljat olivat BD:n CHROMagar orientation ja bioMérieux'n CPS ID2. *E.colin* tässä tutkimuksessa tunnisti CHROMagar orientation 99 % ja CPS ID2 90 % verrattuna heidän virtsaviiljelydiagnostiikkaansa. KESC-ryhmän bakteerit sekä proteus-, morganela- ja providencia-ryhmät olivat helposti tunnistettavissa molemmilta maljoilta, mutta lajitasolle ne saatiin tunnistettua biokemiallisin testein. Tutkimuksen mukaan enterokokit tunnistettiin kummaltakin maljalta helposti ja niitä ei ollut vaikeaa erottaa streptokokkipesäkkeistä. Tutkimuksessa todettiin, että kromogeenisten maljojen käyttöönotto vähentäisi merkittävästi työn määrää virtsaviiljelydiagnostiikassa ja säästäisi paljon aikaa. (Scarparo ym. 2002.)

Ranskalaisessa tutkimuksessa vertailtiin viittä eri chromagaria, jotka olivat bioMérieux'n CPS ID2, BD:n CHROMagar orientation, Sanofi Diagnostics Pasteurin UriSelect3 medium, Biolog'in Rainbow Agar UTI medium ja Oxoidin Chromogenic UTI medium. Tutkimus suoritettiin 443 virtsanäytteellä ja *E.colin* tunnistusherkyys oli edellä mainituilla maljoilla 88,5 %, 93,8 %, 86,1 % ja 82,2 %. Oxoidin Chromogenic UTI medium-maljalle ei indolireaktiota voida soveltaa. CHROMagar orientation ja CPS ID2 tunnistivat patogeenit tutkimuksessa yhtä hyvin. UriSelect3, Rainbow Agar UTI ja Chromogenic UTI kaipasivat tämän tutkimuksen mukaan vielä lisää kehittelyä. (Carricajo ym. 1999.)

Tutkimuksessa, joka tehtiin Englannissa vertailtiin kolmea kaupallista kromogeenista maljaa. Tutkimuksessa käytetyt maljat olivat bioMérieux:n CPS ID2, BD:n CHROMagar orientation ja Oxoidin Chromogenic UTI medium, joita vertailtiin virtsaviljelydiagnostiikkaan ja tulos varmistettiin VITEK 1-laitteella. *E.colin* tunnistuksessa maljat osoittautuivat nopeiksi, luotettaviksi ja taloudellisiksi. Chromogenic UTI-maljan taustan sameus kuitenkin haittasi maljan tarkastelua, mutta värireaktiot olivat vahvat ja selkeät. CPS ID2-maljalla värireaktiot olivat vahvemmat kuin CHROMagar orientation-maljalla. (Miles ym. 2005.)

## 7 TUTKIMUSONGELMAT

1. Millaisia eroja eri valmistajien chromagareiden ja CLED-maljan välille syntyy, kun vertaillaan pesäkemorfologiaa ja kasvun määrää?
2. Millaisia eroja eri valmistajien chromagareissa on spesifisyyden suhteen?
3. Millaisia eroja eri valmistajien chromagareissa on sensitiivisyyden suhteen?
4. Miten chromagareilta saatu tulos vastaa HUSLAB bakteriologian osaston virtsaviljelydiagnostiikasta saatua tulosta?

Chromagarien ja CLED-maljan välisiä eroja pesäkemorfologiassa ja kasvun määrässä tutkimme vertailemalla viljeltyjä maljoja silmämääräisesti toisiinsa ja kirjaamalla ylös niiden välisiä eroavaisuuksia. Kromogeenisten maljojen spesifisyyttä selvitimme vertai-

lemalla löytävätkö eri maljat samoja patogeeneja samoista näytteistä. Chromagareiden sensitiivisyyttä tutkimme laimennossarjan avulla. Lopuksi vertasimme chromagareilta saamiamme tuloksia virtsaviiljelydiagnostiikasta saatuihin tuloksiin.

## 8 TUTKIMUKSEN SUORITUS

Aloitimme tutkimuksen selvittämällä kromogeenisten maljojen periaatetta ja taustaa. Selvitimme jokaisen tutkimuksessamme käytettävän maljan toimintaperiaatteen, mutta esimerkiksi elatusaineiden koostumuksia emme voi työssämme tarkasti selvittää, koska ne ovat liikesalaisuuksia. Virtsanäytteet tutkimukseemme olemme saaneet Laakson ja Meilahden sairaaloista. Tarkoituksenamme oli saada näytteitä myös Marian sairaalasta, mutta niitä oli saatavilla liian vähän.

Tarvittavat välineet tutkimukseemme saimme HUSLAB bakteriologian osastolta. Tutkimuksessamme käytettävät virtsanäytteet olivat päivän vanhoja näytteitä, jotka oli todettu kasvaviksi. Näytteet otettiin säilöntäaineellisiin bakteeriviljelyputkiin. Putket sisälsivät biologista jätettä ja potilaiden henkilötietoja, joten ne hävitettiin asianmukaisesti. Potilaiden henkilötietoja ei tuoda ilmi missään vaiheessa tutkimusta. Asiantuntijoinamme toimivat sairaalamikrobiologi Ritvaleena Puohiniemi ja laboratoriohoitaja Pasi Ollila.

Aloitimme tutkimuksen valmistelun hyvissä ajoin varmistamalla, että tarvitsemamme maljat saadaan oikeana ajankohtana käyttöömmme. Olimme jo keväällä yhteydessä sairaaloihin, joista aioimme hakea virtsanäytteet tutkimukseemme. Syksyllä saimme kuitenkin tiedon, että Marian sairaalasta näytteitä olisi saatavilla hyvin vähän. Päädyimme hakemaan virtsanäytteitä Laakson ja Meilahden sairaaloista. Lisää ongelmia syntyi, kun Meilahden sairaalastakin saatava näytemäärä jäi vähäiseksi. Päätimme ratkaista ongelman hakemalla suurimman osan tutkimukseemme näytteistä Laakson sairaalasta, koska sieltä niitä oli runsaasti saatavissa. Laakson sairaalasta saimme tutkimukseemme 42 näytettä ja Meilahden sairaalasta 11 näytettä.

53 näytettä viljeltiin kuudelle erilaiselle kromogeeniselle maljalle ja CLED-maljalle. ESBL-maljoja saimme käyttöömmme 26 ja HaCl-maljoja 34. Liitteestä 1. selviää mistä

näytteistä on viljelty myös ESBL- ja/tai HaCl-maljat. Viljely suoritettiin huoneenlämpöisille majoille vetokaapissa 1 µl:n silmukalla vaihtaen silmukkaa jokaisen maljan välillä. Näytteet sekoitettiin hyvin ennen jokaista maljalle viljelyä. Viljely tehtiin HUSLABilla käytössä olevan virtsaviljelyohjeen mukaisesti. Maljoja kasvatettiin lämpökaapissa ohjeiden mukaisesti 18–24 tuntia.

Seuraavana päivänä luimme maljat näyte kerrallaan arvioiden niiltä bakteerikasvun määrää, pesäkemorfologiaa ja maljojen spesifisyyttä. Tarkastelimme kaikki maljat yhdessä niin, että jokainen sai rauhassa katsoa kaikki maljat läpi. Tämän jälkeen meistä jokainen sai antaa oman mielipiteensä maljalta saadusta tuloksesta ja päädyimme yhteiseen lopputulokseen. CLED-malja toimi tutkimuksessamme apuna, josta saimme tukea pesäkemorfologian ja bakteerikasvun määrän arvioimiseen. Kirjoitimme chromagareilta saadut tulokset muistiin, jonka jälkeen selvitimme HUSLAB bakteriologian osaston virtsaviljelydiagnostiikasta saadut tulokset ja vertailimme niitä keskenään.

Maljojen sensitiivisyyttä tutkimme laimennossarjan avulla. Teimme neljä eri laimennosta (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) *E.colin* ATCC 25922 T-9112 kontrollikannasta, joista ensimmäinen tehtiin 1,0 McFarlandin vahvuiseksi yhteen millilitraan fysiologista natriumkloridia. Ensimmäisen laimennoksen vahvuus varmistettiin BioMérieux'n densimattilaitteella. Seuraavat laimennokset tehtiin 1:10, jolloin 900 µl:aan fysiologista natriumkloridia lisättiin 100 µl edellisestä laimennoksesta.

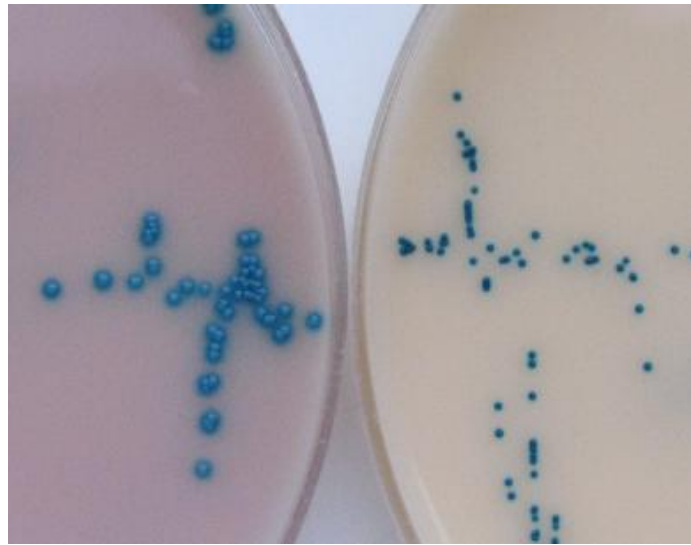
Laimennosputkista viljeltiin HUSLABin virtsaviljelyohjeen mukaisesti 1 µl:n silmukalla kromogeenisille maljoille. Silmukka vaihdettiin jokaisen maljan välissä ja laimennosputkia sekoitettiin Vortexilla huolellisesti ennen jokaista viljelyä. Maljoja kasvatettiin 18–24 tuntia lämpökaapissa. Tulokset tulkittiin viljelyä seuraavana päivänä.

## 9 TULOKSET

### 9.1 Bakteerikasvu ja pesäkemorfologia chromagareilla ja CLED-maljalla

Pesäkemorfologiassa ja kasvun määrässä ei ollut havaittavissa suuria eroja chromagareiden välillä, koska värireaktiot toimivat valmistajien lupaamalla tavalla ja bakteeri-

kasvu oli maljoilla lähes yhtä runsasta. Kasvun määrässä ei ollut havaittavissa merkittäviä eroja chromagarien ja CLED-maljan välillä. *E.colilla*, enterokokeilla ja KESC-ryhmällä värireaktiot toimivat parhaiten. Mielestämme *E.coli* oli kuitenkin pesäkemorfologialtaan erilainen CLED-maljalla kuin chromagareilla, koska ilman värireaktioita pesäkkeen voisi tunnistaa chromagareilta vain sauvaksi. Joissakin tapauksissa myös enterokokkipesäke saattoi olla sauvamainen, esimerkiksi UriS-maljalla väri levisi myös pesäkkeen ulkopuolelle (kuvio 11). Enterokokki saattoi kasvaa hyvin pienenäkin pesäkkeenä esimerkiksi HaCl-maljalla. Samankaltaisin pesäkemorfologia chromagareilla ja CLED-maljalla oli mielestämme *Klebsiella*-lajeilla.



KUVIO 11. UriS- ja OxOp-maljat, joilla enterokokkia. UriS-maljalla värireaktio leviää (Ek – Laakkonen 2007).

Niukasti pseudomonasta kasvavista näytteistä pesäkkeen morfologia ja värireaktio eivät olleet helppoja tulkita chromagareilla. Poikkeuksena ORI-malja, jolla pseudomonas oli puolestaan tyypillisen näköinen niukoissakin näytteissä ja siksi helpommin tunnistettavissa siltä kuin CLED-maljalta. Pesäkkeet jäivät niukoissa näytteissä pieniksi ja värittömiksi. Runsas kasvuisissa näytteissä *P.aeruginosalle* tyypillinen tuoksu tuli hyvin esille ja pesäkkeen morfologia oli kaikilla chromagareilla selkeämpi. Samanlaisia ongelmia oli myös proteuksen tunnistuksessa. Niukasti proteusta kasvavissa näytteissä pesäkkeen ympärille ei aina muodostunut selkeää ruskeaa kehää, joten sen tunnistaminen saattoi chromagareilta olla vaikeaa. Toisaalta CLED-maljalta tunnistaminen oli mielestämme tällaisessa tilanteessa yhtä vaikeaa. Pääasiallisesti proteuksen tunnistus oli meille kuitenkin selkeämpää chromagareilta.

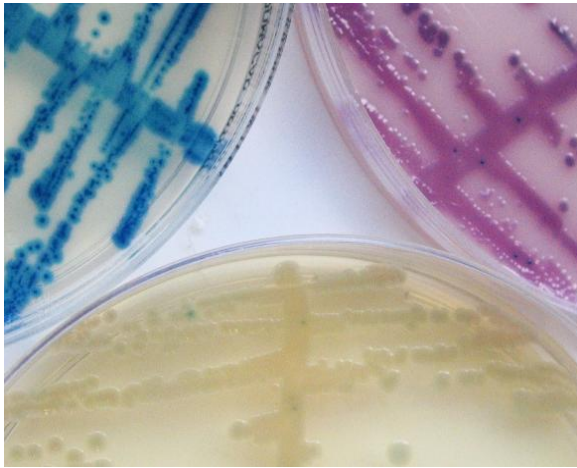
Stafylokokin tunnistuksessa ongelmia tuli sen erottamisessa hiivakasvusta, koska molemmat kasvoivat chromagareilla valkoisina pieninä pesäkkeinä. Streptokokki pesäkkeen värireaktio oli erilainen riippuen maljasta. Streptokokkipesäke saattoi kasvaa sinisenä, värittömänä tai haaleana enterokokkimaisena. CLED-maljalta pystyimme yleensä erottamaan enterokokin, stafylokokin ja hiivan toisistaan. CLED-maljan tulkin-ta ei kenellekään meistä ollut helppoa, koska meillä ei ole vielä kovin paljon kokemusta sen tarkastelusta. Kokeneemmalle lukijalle pesäkemorfologian erojen vertailu chroma-gareiden ja CLED-maljan välillä olisi voinut olla helpompaa. Toisaalta me pystyimme olemaan tutkimuksessamme puolueettomia kaikkia maljoja kohtaan.

## 9.2 Chromagareiden spesifisyys

Chromagareiden spesifisyydessä ei ollut havaittavissa suuria eroavaisuuksia, sillä maljat löysivät patogeenit virtsanäytteistä lähes yhtä hyvin. Taulukosta 1. nähdään miten eri maljat ovat löytäneet patogeenit näytteistä. HaCl-maljan olemme jättäneet pois taulu-kosta, koska maljoja ei valmistettu meille tarvittavaa määrää, eikä se siksi ole kyseises-sä taulukossa vertailukelpoinen muihin maljoihin. Käsittelemme HaCl-maljan tulokset omassa kappaleessaan.

Chromagarit löysivät *E.colin* virtsanäytteistä hyvin. *E.colia* CPS, OxOp ja ORI löysivät 22 näytteestä. OxCl ja LaCo löysivät 23, UriS puolestaan 24 *E.colia* (taulukko 1). Eroa-vaisuudet johtuvat muun muassa siitä, että osalla maljoista *E.colin* tunnistus perustuu sen  $\beta$ -glukuronidaasin tuottoon ja osalla  $\beta$ -galaktosidaasin tuottoon. Tästä johtuen  $\beta$ -glukuronidaasin tuottoon perustuvilla maljoilla  $\beta$ -glukuronidaasinegatiiviset *E.coli* pesäkkeet jäävät värittömiksi (kuvio 13). Näytteessä 35 (ks. liite 1) UriS näytti kasva-tuksen jälkeen *E.colia*, vaikka muut maljat näyttivät KESC-ryhmäistä (kuvio 12). Teimme kyseisestä näytteestä varmennukseksi sokerisarjan, josta saimme tulokseksi citrobakteerin. Tämän kaltainen maljojen välinen ero on merkittävä. Tällaisissa ongel-matilanteissa käännyimme ohjaajamme sairaalamikrobiologi Ritvaleena Puohiniemen puoleen.





KUVIO 12. Citrobakteeri (Ek – Laakkonen 2007).



KUVIO 13.  $\beta$ -glukuronidaasinegatiivinen *E. coli* (Ek – Laakkonen 2007).

Enterokokkien tunnistus chromogareilta ei tuottanut ongelmia ja niiden värireaktiot toimivat odotetulla tavalla. Enterokokin tunnistuksessa LaCo löysi sen 13 näytteestä. CPS, OxOp, OxCl ja ORI löysivät enterokokkeja 14 ja UriS 15 näytteestä. OxCl löysi enterokokin 14 näytteestä, mutta se ei löytänyt enterokokkia kahdessa tapauksessa samoin kuin muut maljat. Näytteestä numero 16 OxCl ei löytänyt enterokokkia, mutta muut löysivät (liite 1). Näytteestä numero 4 se ja UriS löysivät enterokokin, kun muut eivät löytäneet (liite 1). LaCo-malja löysi 13 enterokokkia, mikä voi johtua siitä, että yhdessä näytteessä enterokokki kasvu oli niukkaa ja tässä näytteessä sitä ei kasvanut LaCo-maljalla. (Taulukko 1.)

Kaikki muut maljat paitsi UriS, löysivät yhdeksän KESC-ryhmäistä näytteistä. UriS löysi kahdeksan KESC-ryhmäistä, koska yhden se tulkitsi *E. coliksi*. Proteuksen ORI-malja löysi kolmesta näytteestä kun muut löysivät sen kahdesta (kuvio 14). Pseudomonaksen ORI-malja löysi neljästä näytteestä ja muut löysivät sen kahdesta. ORI-malja tunnisti parhaiten pseudomonaksen. Niukoissakin näytteissä pesäke oli tyyppillisen näköinen. Pseudomonas epäilyistä teimme kuitenkin aina varmistukseksi oxidaasitestin (kuvio 15). (Taulukko 1.)

Stafylokokin tunnistuksessa ei ollut maljojen välillä mitään eroa. Kaikki maljat löysivät stafylokokin neljästä näytteestä. Streptokokkia eivät näytteistä tunnistanee OxOp, OxCl ja LaCo. UriS ja ORI löysivät sen yhdestä näytteestä ja CPS kahdesta. (Taulukko 1.)

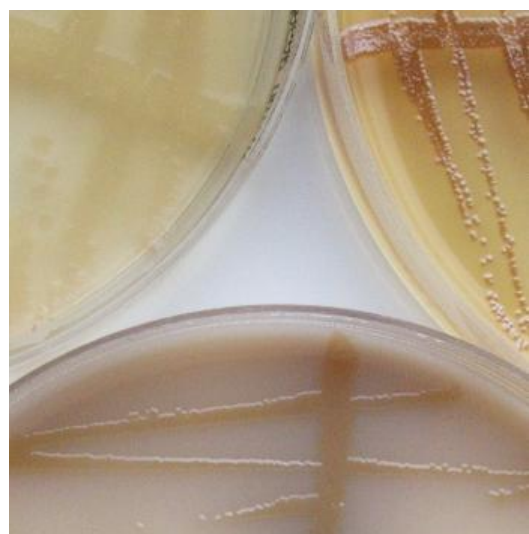
Kaikkien bakteereiden kohdalla eroja on voinut tulla myös sen takia, että osa näytteistä oli sekaflooraa. Riippui maljasta minkälaisena sekafloora kasvoi. Eroja syntyi esimerkiksi siitä, että UriS ja OxOp ovat ravintorikkaampia, kuin muut tutkimuksessa käytetyt kromogeeniset maljat. Taulukon 1. tarkoituksena on osoittaa mitä eri bakteereja kromogeenisilla maljoilla kasvoi ja siksi sekafloorat ovat myös mukana tutkimuksessa. Näin voidaan tulkita maljojen välisiä spesifisyyseroja.

TAULUKKO 1. Bakteerilöydösten määrä kromogeenisilla maljoilla.

	CPS	OxOp	OxCl	UriS	ORI	LaCo
E. COLI	22	22	23	24	22	23
ENTEROKOKKI	14	14	14	15	14	13
KESC	9	9	9	8	9	9
PROTEUS	2	2	2	2	3	2
PSEUDOMONAS	2	2	2	2	4	2
STAFYLOKOKKI	4	4	4	4	4	4
STREPTOKOKKI	2	0	0	1	1	0



KUVIO 14. Proteusta ja enterokokkia ORI-maljalla (Ek – Laakkonen 2007).



KUVIO 15. Pseudomonasta ORI-, OxCl- ja UriS-maljoilla (Ek – Laakkonen 2007).

HaCl-maljalla etenkin niukoissa näytteissä enterokokki, stafylokokki, streptokokki ja hiiva kasvoivat heikosti tai eivät ollenkaan. Näytteissä, joissa oli *E.colia* tai runsaasti enterokokkibakteeria, tulokset olivat muihin maljoihin verrattaessa samankaltaisia. KESC-ryhmän bakteerit kasvoivat pääasiallisesti hyvin, mutta esimerkiksi näytteessä, joissa oli kahta KESC-ryhmäistä, HaCl-maljalta oli erotettavissa vain yksi KESC-ryhmäinen. Proteuksen tunnistuksessa HaCl-malja toimi valmistajan lupaamalla tavalla. Runsaasti pseudomonasta kasvavassa näytteessä pseudomonaskin oli löydettävissä tuoksun ja pesäkemorfologian perusteella.

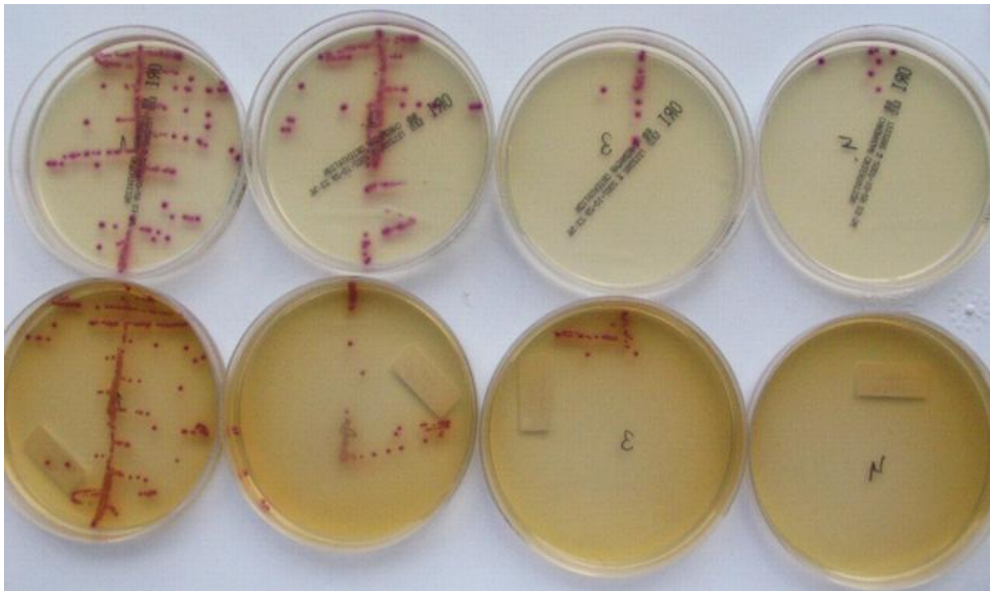
ESBL-maljan toimivuutta emme pystyneet arvioimaan, koska niissä näytteissä, joissa malja oli viljelty ei ESBL:ää löytynyt. Kahdelta ESBL-maljalta löytyi väritön pesäke, joilla ei kuitenkaan ollut sairaalamikrobiologimme mukaan kliinistä merkitystä, koska ne olivat pseudomonasta. Maljat loppuivat kesken tutkimuksen, eikä valmistaja pystynyt toimittamaan niitä enää lisää tutkimuksemme aikana.

### 9.3 Chromagareiden sensitiivisyys

Chromagareiden sensitiivisyyttä tutkittiin laimennossarjan avulla. Laimennossarjan tekeminen onnistui hyvin ja tulokset olivat odotustenmukaisia. Bakteerikasvun määrä väheni maljoilla loogisesti vahvimmasta seoksesta laimeimpaan ja maljoja oli helppo tulkita. Useimpien maljojen välillä ei ollut merkittäviä eroja kasvun suhteen (taulukko 2). Ensimmäisessä laimennoksessa kaikilla maljoilla kasvua oli runsaasti, mutta seuraavissa laimennoksissa eroja oli jo havaittavissa. Laimennossarjan mukaan herkimmäksi maljaksi osoittautui ORI-malja, koska sillä kasvua oli eniten myös viimeisellä maljalla (kuvio 16). OxCl-maljoilla 1-3 kasvu oli odotustenmukaista, mutta viimeisellä maljalla (4) kasvua ei ollut. HaCl-malja osoittautui tutkimuksessamme mielenkiintoisimmaksi, koska maljoilla 1 ja 2 kasvua oli runsaasti, maljalla 3 ei ollut kasvua ja maljalla 4 kasvua oli kaksi pesäkettä. Laimennossarjan perusteella OxCl- ja HaCl-maljat osoittautuivat herkkyydeltään heikoimmiksi.

TAULUKKO 2. Laimennossarjan tulokset.

	<b>1. laimennos 1:1</b>	<b>2. laimennos 1:10</b>	<b>3. laimennos 1:100</b>	<b>4. laimennos 1:1000</b>
UriS	>10E5	10E3-4	10E3-4	4 pesäkettä
OxOp	>10E5	10E4-5	10E3-4	3 pesäkettä
OxCl	>10E5	10E4-5	10E3-4	Ei kasvua
CPS	>10E5	>10E5	10E4-5	3 pesäkettä
HaCl	>10E5	10E4-5	Ei kasvua	2 pesäkettä
ORI	>10E5	>10E5	10E3-4	8 pesäkettä
LaCo	>10E5	10E4-5	10E3-4	4 pesäkettä



KUVIO 16. Laimennossarja ORI- ja OxCl-maljoilla (Ek – Laakkonen 2007).

#### 9.4 Chromagareiden tulosten vastaavuus virtsaviiljelydiagnostiikan tuloksiin

Pääasiassa chromagareilta saadut tulokset vastasivat hyvin virtsaviiljelydiagnostiikasta saatuja tuloksia, mutta muutamia poikkeuksiaakin löytyi (liite 1). Joissakin tapauksissa vastaus tuli rutiinista vasta parin kolmen päivän kuluttua näytteen saapumisesta. Chromagareilta tulos saatiin yhden päivän kuluttua paitsi yhdessä tapauksessa, josta tunnistus ei onnistunut ilman sokerisarjaa. Sekafloorat osoittautuivat välillä virtsaviiljelydiagnostiikan tuloksista poikkeaviksi, koska chromagarit pystyivät antamaan tarkemman tunnistuksen tutkittavan näytteen bakteerikasvusta. Yhdessä näytteessä *E.colia* kasvoi

kromogeenisilla maljoilla noin kymmenen pesäkettä, mutta virtsaviljelydiagnostiikassa se oli kuitenkin vastattu sekaflooraksi. Lisäksi kyseisessä näytteessä kasvoi myös enterokokkia, joten se näytti sotkuiselta CLED-maljalla.

Virtsaviljelydiagnostiikan avulla pystyttiin kuitenkin nimeämään nykyisillä bakteerien tunnistusmenetelmillä näytteiden patogeeneja tarkemmin kuin kromogeenisilla maljoilla. Chromagareilta ei pystytä suoraan nimeämään patogeeneja lajitasolle esimerkiksi enterokokeista ei pystytä erottamaan *E.faecalista* ja *E.faecumista*. Poikkeuksena *E.coli*, joka voidaan chromagareilta nimetä lajitasolle. (Liite 1.)

## 9.5 Tulosten luotettavuuden arviointia

Tutustuimme jo kesällä kromogeenisten maljojen käyttöön tekemällä eri virtsatieinfektion aiheuttajien kontrollikannoista viljelyitä CPS-maljalle. Teimme erilaisia bakteerisuspensioita kahteen millilitraan fysiologista natriumkloridia ja viljelimme ne maljoille. Näin pystyimme tutustumaan jo yhden kromogeenisen maljan toimintaan etukäteen. Tämä helpotti syksyllä tutkimuksen tekemistä ja maljojen tarkastelua.

Jauheesta valmistetuista maljoista tehtiin steriliateetikontrollit. Jokaisesta maljaerästä elatusaineyksikössä laitettiin yksi malja kasvamaan lämpökaappiin. Näin voitiin varmistua siitä, että maljat ovat puhtaita. Valmismaljojen puhtaudesta vastaa valmistaja.

Päädyimme suorittamaan virtsanäytteiden viljelyt maljoille niin, että jokainen meistä viljelee saman verran näytteitä. Mielestämme tämä ei ole tutkimustulosten kannalta merkittävää, koska työelämässäkkin virtsaviljelyjä suorittavat eri ihmiset. Maljoja tarkastellessa huomasimme, ettei viljelijän käsialalla ole merkitystä, kun viljely on suoritettu virtsaviljelyohjeen mukaisesti.

Tutkimuksessa täytyy ottaa huomioon se, että vaikka näytteet ovat aina hyvin sekoitettu, niin ei voida kuitenkaan taata, että jokainen silmukallinen on samanlainen varsinkaan silloin, kun kyseessä on hyvin pieni bakteerimäärä. Jokaiseen silmukalliseen voi sattuman vaikutuksesta osua eri määrä bakteereita. Tästä johtuen hyvin pieniä eroja maljojen kasvun määrissä ei voitu ottaa huomioon.

Ohjaajamme sairaalamikrobiologi Ritvaleena Puohiniemi oli apunamme aina, kun häntä tarvitsimme. Hän auttoi maljojen tulkinnassa ongelmallisissa tilanteissa, jotta saimme luotettavia tuloksia. CLED-maljan käyttö tutkimuksessamme paransi tulosten luotettavuutta, koska pystyimme tukeutumaan siihen varsinkin pesäkemorfologian suhteen. Tutkimuksen luotettavuutta parantaa se, että luimme maljat ja tulkitsimme tulokset kaikki yhdessä.

Perehdyimme tutkimuksessamme käytettävien kromogeenisten maljojen periaatteisiin perusteellisesti ennen empiirisen osuuden aloittamista. Hyödynsimme teoriatietoja arvioidessamme maljojen värireaktioita, sillä ne saattoivat poiketa toisistaan maljakohdaisesti. Esimerkiksi *E.coli* kasvaa HaCl-maljalla vihreänä, kun taas CPS-maljalla se kasvaa viininpunaisena. Ilman chromagareiden toimintaperiaatteisiin perehtymistä voisi maljoja tulkita virheellisesti.

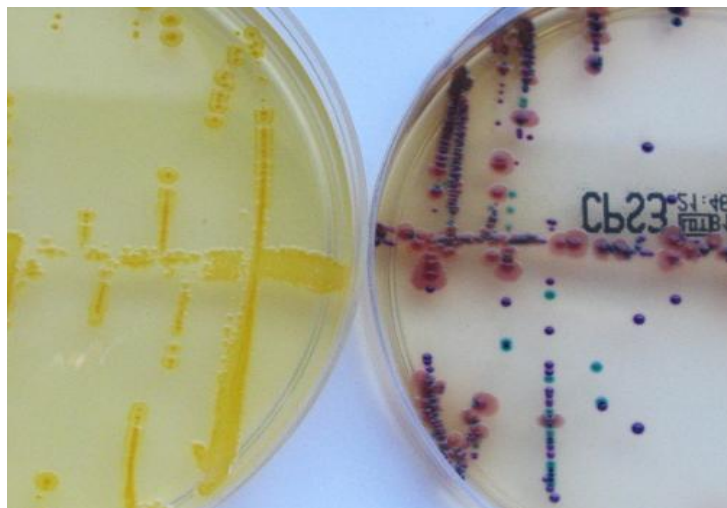
Laimennossarjan tulokset ovat luotettavia, koska se suoritettiin vakioiduin menetelmin. Tulosten tulkinnassa tulee kuitenkin ottaa huomioon se, että ne ovat vain suuntaa antavia. Tekemämme laimennossarja on yksittäinen, eikä sille tehty rinnakkaissarjaa. Kasvun määrä maljoilla on tulkittu silmämääräisesti, joten tulokset eivät ole täysin tarkkoja.

Tulosten luotettavuutta olisi saattanut parantaa se, että näytemäärämme olisi ollut suurempi. Mielestämme näytemäärämme oli kuitenkin riittävä otettaessa huomioon, että kyseessä on opinnäytetyö. Saimme tälläkin näytemäärällä tuloksia, jotka ovat käyttökelpoisia.

## 10 POHDINTA

Työmme tarkoituksena oli selvittää, miten hyvin kromogeeniset maljat toimivat virtsaviiljelydiagnostiikassa. Tutkimuksemme perusteella voidaan todeta, että chromagareista on apua virtsaviiljelydiagnostiikassa ja niiden käyttö säästää aikaa. Parhaimmassa tapauksessa ne nopeuttavat vastauksen saamista potilaalle esimerkiksi *E.colin* kohdalla, koska seulova laboratorio pystyisi antamaan alustavan vastauksen värin perusteella. Jos chromagar olisi korvaamassa CLED-maljaa primääriviljelyssä, voitaisiin *E.coli* vastata suoraan siltä (kuvio 17). Chromagareiden käyttöönotto voisi olla myös taloudellisesti

kannattavaa, koska jatkotunnistusmenetelmien tekeminen vähenisi. *E.coli* aiheuttaa suurimman osan virtsatieinfektioista ja chromagareiden käytöstä paras hyöty saadaan *E.colin* tunnistuksessa. Tämä on todettu myös aikaisemmissa chromagareita koskevissa tutkimuksissa (Scarparo ym. 2002; Carricajo ym. 1999; Miles ym. 2005).



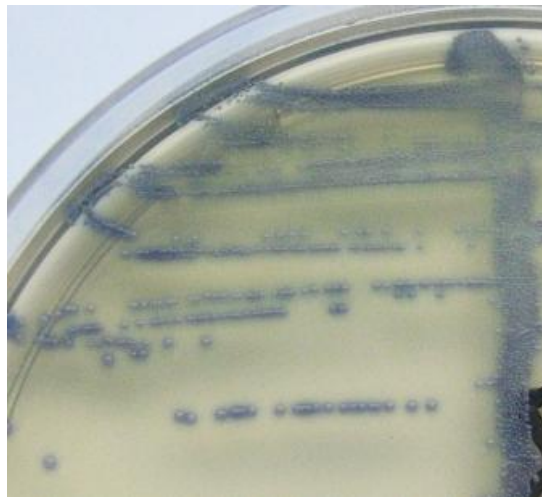
KUVIO 17. CLED-malja ja CPS-malja (Ek – Laakonen 2007).

Kromogeenista maljaa tulkittaessa ei voi kuitenkaan liikaa luottaa värireaktioihin, vaan lukijan on tunnettava bakteerien pesäkemorfologiaa ja osattava kyseenalaistaa näiden maljojen toimivuutta. Chromagareiden käyttöönotto vaatisi hyvää perehdytystä henkilökunnalle HUSLAB bakteriologian osastolla, sekä terveysasemilla ja sairaaloissa, joissa maljan ensimmäinen tarkastelu tapahtuu. Kromogeeniset maljat saattavat lisätä sekaflooranäytteiden turhaa tutkimista, koska värilliset pesäkkeet voivat hämätä riittämättömän perehdytyksen saanutta lukijaa.

Omien kokemustemme mukaan valmismaljojen saamisessa voi tulla vaikeuksia, kun valmistaja ei niitä yhtäkkiä pystykään toimittamaan. Tällaisessa tilanteessa laboratorioissa tulisi olla varamenetelmä, esimerkiksi malja, jonka pystyy itse valmistamaan. Valmismaljojen huonona puolena oli myös maljojen kansien liukkaus. Kun maljat oli pinottu päällekkäin, ne saattoivat helposti kaatua esimerkiksi pinoja siirrettäessä lämpökaappiin. Tutkimuksessamme testasimme myös maljoja, jotka olivat jauheesta valmistettuja HUSLABin omassa elatusaineyksikössä. Näin ollen HUSLABille voisi olla jauheesta valmistettava chromagar hyvä vaihtoehto.

Tutkimustamme tehdessämme totesimme, että LaCo-maljan tulkintaa vaikeutti sen sotkuinen tausta. Agar oli tällä maljalla rakeinen ja tämä häiritsi erityisesti värittömien pesäkkeiden tulkintaa niukoissa näytteissä. LaCo-malja oli valmistettu jauheesta elatusaineyksikössä, joten emme tiedä oliko kyseessä valmistuksesta johtuva asia vai ei.

Tutkimuksessamme tuli ilmi, että kromogeeniset virtsamaljat eivät ole luotettava tunnistumenetelmä streptokokeille tai stafylokokeille. Normaalifloora saattaa kromogeenisilla maljoilla tuottaa sinisiä streptokokkimaisia pesäkkeitä. Stafylokokkien erottaminen hiivasta tuotti vaikeuksia, koska ne kummatkin kasvoivat pieninä valkoisina pesäkkeinä. Streptokokki- ja stafylokokkilajien erottaminen toisistaan ei onnistu suoraan kromogeenisilta maljoilta, koska niiden värireaktiot ovat niin samankaltaisia esimerkiksi B- ja G-ryhmän streptokokit kasvavat kummatkin sinertävinä (kuvio 18). Mielestämme ei vielä tulisi siirtyä käyttämään chromagareita, koska ne eivät ole riittävän spesifisiä korvaamaan HUSLAB bakteriologian osaston nykyistä virtsaviljelydiagnostiikkaa.



KUVIO 18. Streptokokkia CPS-maljalla (Ek – Laakkonen 2007).

Jatkossa voitaisiin tutkia onko  $\beta$ -galaktosidaasin tuottoon perustuva *E.colin* tunnistus parempi kuin  $\beta$ -glukuronidaasiin perustuva tunnistus. Esimerkiksi näihin eri tunnistusmenetelmiin perustuvia chromagareita voitaisiin vertailla keskenään suuremmilla näytemäärillä. Tutkimuksemme tulosten perusteella emme voi sanoa kumpi on parempi, koska näytemäärämme oli tällaista tutkimusta varten liian pieni. Kokkien kohdalla jatkotutkimuksia voitaisiin tehdä stafylokokeille ja streptokokeille. Tutkimuksessamme löytyi stafylokokkeja ja streptokokkeja niin vähän, että emme voineet todeta esimerkiksi sitä onko *S.aureus* helppo erottaa *S.saprophyticuksesta*. Tätä voitaisiin myös tutkia jatkossa lisää.



## 11 LÄHTEET

- BD 2006. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.5.2006.  
<[www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/CLED\\_Agar.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/CLED_Agar.pdf)> Luettu 23.5.2007.
- bioMérieux 2007. Verkkodokumentti. Päivitetty 4.5.2007. <<http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics>>. Luettu 9.5.2007.
- Bio-Rad 2007. Verkkodokumentti. <<http://www.bio-rad.com>>. Luettu 9.5.2007.
- Carlson, Petteri – Koskela, Markku 2005: Bakteriologinen diagnostiikka. Verkkodokumentti. Päivitetty 20.6.2005.  
<[www.terveysportti.fi/terveysportti/ekirjat\\_tmp.Naytaartikkeli?p\\_artikkeli=mbi00368](http://www.terveysportti.fi/terveysportti/ekirjat_tmp.Naytaartikkeli?p_artikkeli=mbi00368)>. Luettu 16.10.2007.
- Carricajo, A. – Boiste, S. – Thore, J. – Aubert, G. – Gille, Y. – Freydière, AM. 1999: Comparative evaluation of five chromogenic media for detection, enumeration and identification of urinary tract pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18 (11). 796–803.
- CHROMagar microbiology 2006. Verkkodokumentti. Päivitetty 21.8.2006.  
<<http://www.chromagar.com/products/orientation.html>>. Luettu 21.4.2007.
- D'Souza, Holly A. – Campbell, Mary – Baron, Ellen Jo 2003: Practical bench comparison of BBL CHROMagar orientation and standard two-plate media for urine cultures. *Journal of clinical microbiology* 42/2004. 60–64.
- Duodecim terveyskirjasto 2007: Lääketieteen sanasto. Verkkodokumentti. Päivitetty 2007. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_haku=virtsatieinfektio&p\\_artikkeli=ltt03757](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_haku=virtsatieinfektio&p_artikkeli=ltt03757)>. Luettu 21.5.2007.
- Ek, Heini 2007: Virtsaviljelykuva.
- Ek, Heini – Laakkonen, Tiia 2007: Maljakuvat.
- Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville toim. 2003: *Mikrobiologia ja infektiosairaudet II*. Helsinki: Duodecim.
- The Biomedical Scientist 2007: Improved differentiation of UTI pathogens. 51 (3). 169.
- Kouri, Timo – Anttinen, Jorma – Icen, Arto – Ikäheimo, Risto – Irjala, Kerttu – Kontiainen, Sirkka – Koskimies, Olli – Lipponen, Pertti – Penttilä, Ilkka – Siitonen, Anja – Siukola, Aino toim. 1999: Suositus virtsan perustutkimuksia ja bakteeriviljelyä varten. *Labquality. Moodi, erillisjulkaisu* (7). 6, 19.
- Kärpänoja, Pauliina 2007: Kromogeeniset maljat - Periaate ja tausta. *Moodi* (1). 39–40.

- Marttila, Jussipekka 2007: Virtsatietulehdus. Verkkodokumentti. Päivitetty 3.7.2006. <<http://www.poliklinikka.fi/?id=2374458&page=8507060>>. Luettu 21.5.2007.
- Meurman, Olli 2005: ESBL. Suomen lääkirilehti 23/2005. 71–79.
- Meurman, Olli 2007: Kromogeeniset maljat - Kokemuksia kromogeenisten maljojen käytöstä virtsaviiljelyssä. Moodi (1). 41–42.
- Miles, KI – Wren, MW 2005: Evaluation of three commercial agar preparations for the presumptive identification of significant urinary isolates. Br J Biomed Sci. 62 (4). 179–81.
- Oxoid 2007. Verkkodokumentti. Päivitetty 2/2007. <[http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1050&org=&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1050&org=&c=UK&lang=EN)>. Luettu 21.4.2007.
- Scarparo, C – Piccoli, P – Ricordi, P – Scagnelli, M 2002: Comparative evaluation of two commercial chromogenic media for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 21 (4). 283–9.
- Tarkka, Eveliina 2005: Virtsan bakteeriviljely. Menetelmäohjeet. HUSLAB Kliinisen mikrobiologian vastuualue. Bakteriologian osasto.
- Vaara, Martti 2004: ESBL-kannat leviämässä avohoitoon? Pääkirjoitus. Suomen lääkirilehti. 46/2004. 4467.

Näyte	UriS	OxOp	OxCl	LaCo
1	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
2	Stafylokokki	Stafylokokki	Stafylokokki	Stafylokokki
3	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
4	E.coli, enterokokki	E.coli	E.coli, enterokokki	E.coli
5	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella
6	Enterokokki, stafylokokki	Enterokokki, stafylokokki	Enterokokki, stafylokokki	Enterokokki, stafylokokki
7	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa
8	Klebsiella, KESC	Klebsiella, KESC	Klebsiella, KESC	Klebsiella, KESC
9	Klebsiella, E.coli	Klebsiella, E.coli	Klebsiella, E.coli	Klebsiella, E.coli
10	E.coli, klebsiella	E.coli, klebsiella	E.coli, klebsiella	E.coli, klebsiella
11	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa
12	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella
13	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
14	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
15	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
16	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli	E.coli, enterokokki
17	Stafylokokki/hiiva	Stafylokokki/hiiva	Stafylokokki/hiiva	Stafylokokki/hiiva
18	Enterokokki	Enterokokki	Enterokokki	Enterokokki
19	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki
20	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
21	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa
22	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa
23	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli
24	Proteus	Proteus	Proteus	Proteus
25	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
26	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa
27	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
28	Streptokokki	Värittömiä pesäkkeitä	Värittömiä pesäkkeitä	Värittömiä pesäkkeitä
29	Proteus, enterokokki	Proteus, enterokokki	Proteus, enterokokki	Proteus, enterokokki
30	Enterokokki, E.coli	Enterokokki, E.coli	Enterokokki, E.coli	Enterokokki, E.coli
31	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki
32	Värittömiä pesäkkeitä	Värittömiä pesäkkeitä	Värittömiä pesäkkeitä	Värittömiä pesäkkeitä
33	Sini/vihreä pesäke	Sini/vihreä pesäke	Sini/vihreä pesäke	Sini/vihreä pesäke
34	Stafylokokki	Stafylokokki	Stafylokokki	Stafylokokki
35	E.coli	KESC	KESC	KESC
36	Pseudomonas	Pseudomonas	Pseudomonas	Pseudomonas
37	Enterokokki	Enterokokki	Enterokokki	Enterokokki
38	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella
39	Erilaisia sauvoja	Erilaisia sauvoja	Erilaisia sauvoja	Erilaisia sauvoja
40	Enterokokki	Enterokokki	Enterokokki	Enterokokki
41	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella
42	Pseudomonas	Pseudomonas	Pseudomonas	Pseudomonas
43	Niukka kasvu	Niukka kasvu	Niukka kasvu	Niukka kasvu
44	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki
45	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella
46	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa
47	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
48	Enterokokki	Enterokokki	Enterokokki	Enterokokki
49	Erittäin niukka kasvu	Erittäin niukka kasvu	Erittäin niukka kasvu	Erittäin niukka kasvu
50	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
51	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
52	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli
53	Erittäin niukka kasvu	Erittäin niukka kasvu	Erittäin niukka kasvu	Erittäin niukka kasvu

Näyte	ORI	CPS	HaCI
1	E.coli	E.coli	E.coli
2	Stafylokokki	Stafylokokki	Stafylokokki
3	E.coli	E.coli	E.coli
4	E.coli	E.coli	E.coli
5	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella
6	Enterokokki, stafylokokki	Enterokokki, stafylokokki	Enterokokki, stafylokokki
7	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa
8	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella
9	Klebsiella, E.coli	Klebsiella, E.coli	Klebsiella, E.coli
10	E.coli, klebsiella	E.coli, klebsiella	E.coli, klebsiella
11	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa
12	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella
13	E.coli	E.coli	E.coli
14	E.coli	E.coli	E.coli
15	E.coli	E.coli	E.coli
16	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki
17	Stafylokokki/hiiva	Stafylokokki/hiiva	Ei kasvua
18	Enterokokki	Enterokokki	Enterokokki
19	E.coli, enterokokki	Enterokokki, väritön sauva	Enterokokki, väritön sauva
20	E.coli	E.coli	E.coli
21	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa
22	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa
23	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli
24	Proteus	Proteus	Proteus
25	E.coli	E.coli	E.coli
26	Sekaflooraa	Sekaflooraa, streptokki	Sekaflooraa
27	E.coli	E.coli	E.coli
28	Streptokokki	Streptokokki	Ei kasvua
29	Proteus, enterokokki	Proteus, enterokokki	Proteus, enterokokki
30	Enterokokki, E.coli	Enterokokki, E.coli	Enterokokki, E.coli
31	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	—
32	Pseudomonas?	Värittömiä pesäkkeitä	—
33	Sini/vihreä pesäke	Sini/vihreä pesäke	—
34	Stafylokokki	Stafylokokki	—
35	KESC	KESC	—
36	Pseudomonas	Pseudomonas	Pseudomonas
37	Enterokokki	Enterokokki	—
38	Klebsiella	Klebsiella	—
39	Erilaisia sauvoja	Erilaisia sauvoja	—
40	Enterokokki	Enterokokki	—
41	Klebsiella	Klebsiella	—
42	Pseudomonas	Pseudomonas	Pseudomonas
43	Niukka kasvu	Niukka kasvu	Ei kasvua
44	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki	E.coli, enterokokki
45	Klebsiella	Klebsiella	Klebsiella
46	Sekaflooraa	Sekaflooraa	Sekaflooraa
47	E.coli	E.coli	E.coli
48	Enterokokki	Enterokokki	Enterokokki
49	Erittäin niukka kasvu	Erittäin niukka kasvu	—
50	E.coli	E.coli	—
51	E.coli	E.coli	—
52	E.coli	E.coli	—
53	Erittäin niukka kasvu	Erittäin niukka kasvu	—

Näyte	ESBL	Virtsaviljely	Huomioitavaa
1	Ei kasvua	E.coli	
2	Ei kasvua	Stafylokokki	
3	Ei kasvua	E.coli	
4	Ei kasvua	Sekafloora	Niukka kasvu
5	Ei kasvua	K.pneumoni	
6	Ei kasvua	Kokkisekaflooraa	
7	Ei kasvua	Kokkisekaflooraa	
8	Ei kasvua	K.pneumoni, K.oxytoca	
9	Ei kasvua	K.oxytoca	
10	Ei kasvua	E.coli, koliformisauva -> K.pneumoni	
11	Ei kasvua	Sekafloora	
12	Väritön pesäke	K.pneumoni	
13	Ei kasvua	E.coli	
14	Ei kasvua	E.coli	
15	Ei kasvua	E.coli	Niukka kasvu
16	Ei kasvua	E.coli	
17	Ei kasvua	Hiiva, kokkisekaflooraa	
18	Ei kasvua	E.faecalis	
19	Ei kasvua	Koliformi sauva -> E.coli	
20	Ei kasvua	E.coli	
21	Ei kasvua	Sekafloora	
22	Ei kasvua	Sekafloora	
23	Ei kasvua	E.coli	Enterokokkia niukasti
24	Ei kasvua	Koliformisauva	Niukka kasvu
25	Ei kasvua	E.coli	
26	Väritön pesäke	Sekafloora	
27	—	E.coli	
28	—	S.agalactiae	
29	—	P.mirabilis, enterokokki	
30	—	Sekaflooraa	
31	—	E.coli, E.faecalis	
32	—	Pseudomonas epäily	Ox +
33	—	Gram.pos kokki	
34	—	Kokkisekaflooraa	
35	—	Citrobacter -laji	
36	—	P.aeruginosa	Ox +
37	—	E.faecalis	
38	—	K.oxytoca	
39	—	Koliformisia sauvoja	Valtakasvu E.coli
40	—	E.faecalis	
41	—	K.pneumoni	
42	—	P.aeruginosa	
43	—	Erittäin niukka kasvu, tuskin merkitystä	
44	—	E.coli	
45	—	K.pneumoni	
46	—	Sekaflooraa	
47	—	Koliformisauva -> E.coli	
48	—	E.faecalis	
49	—	Erittäin niukka kasvu	
50	—	E.coli	
51	—	E.coli	
52	—	E.coli	
53	—	Kokkisekaflooraa	