

Sara Ojala

Clostridium perfringens -bakteerin kalvosuodatusmenetelmän käyttöönotto ja verifiointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

8.3.2018

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Sara Ojala <i>Clostridium perfringens</i> -bakteerin kalvosuodatusmenetelmän käyttöönotto ja verifiointi 31 sivua + 2 liitettä 8.3.2018
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko
Koulutusohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Tutkintovastaava Jarmo Palm Laboratoriopäällikkö Satu Henriksson
<p>Opinnäytetyö toteutettiin Länsi-Uudenmaan vesi ja ympäristö ry:n mikrobiologian laboratoriossa. Opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida laboratoriolle uusi menetelmä, jonka avulla laboratorio pystyy määrittämään <i>Clostridium perfringens</i> -bakteerin ja sen itiöiden esiintyvyyttä talousvesissä. Työn tarkoituksena oli tehdä toimiva menetelmäohje, ja testata sen toimivuutta käytännössä. Menetelmä perustuu yleisesti käytössä olevaan standardiin SFS-EN ISO 14189:2016.</p> <p><i>Clostridium perfringens</i> on patogeeninen bakteeri, joka tunnetaan yleisenä ruokamyrkytyksen aiheuttajana. Se on anaerobinen gram-positiivinen bakteeri, joka muodostaa itiöitä levovaiheessaan. <i>C. perfringens</i> -bakteeria esiintyy yleisesti maaperässä ja vesistöissä sekä ihmisten ja eläinten normaalifloorassa. Sosiaali- ja terveysministeriön talousvesiasetuksen 683/2017 mukaan talousvedessä ei saa esiintyä yhtään <i>C. perfringens</i> -bakteeria tai sen itiöitä.</p> <p>Menetelmää testattiin kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti. Kvalitatiivisessa tutkimuksessa todettiin, että menetelmä toimii sille tehdyn ohjeen mukaisesti. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa verifiointisuureina käytettiin toistettavuutta, uusittavuutta, suhteellista oikeellisuutta ja spesifisyyttä. Toistettavuuden ja uusittavuuden tulokset olivat selvästi hyväksymisrajojen sisällä. Suhteellinen oikeellisuus oli hyväksyttävällä tasolla ja menetelmä osoittautui hyvin spesifiseksi.</p> <p><i>Clostridium perfringens</i> -bakteerin kalvosuodatusmenetelmä todettiin toimivaksi. Laboratorio arvioi jatkossa ottaako se menetelmän käyttöön ja tehdäänkö sille akkreditointi. Päättökseen vaikuttaa taloudellisuus, kannattavuus ja tutkimuksen luotettavuus.</p>	
Avainsanat	<i>Clostridium perfringens</i> , kalvosuodatusmenetelmä, verifiointi

Author Title Number of Pages Date	Sara Ojala The Introduction and Verification of the Membrane Filtration Method of <i>Clostridium perfringens</i> 31 pages + 2 appendices 8 March 2018
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jarmo Palm, Head of Degree Programme Satu Henriksson, Laboratory Chief
<p>This study was carried out at the Länsi-Uudenmaan vesi ja ympäristö ry's microbiology laboratory. The aim was to verify the new method which can detect <i>Clostridium perfringens</i> bacteria and its spores from drinking water. Purpose was to create instructions for the method and to test its functionality. Membrane filtration method for <i>Clostridium perfringens</i> is based on standard SFS-EN ISO 14189:2016.</p> <p><i>Clostridium perfringens</i> is pathogenic bacteria, which is one of the most common causes of food poisoning. <i>C. perfringens</i> is an anaerobic, Gram-positive, rod-shaped and spore forming bacteria. The bacteria are widely found in soil and natural water systems. The bacteria are also found from human and animal intestinal and faeces. According to the Finnish Ministry of Social Affairs and Health, no <i>C. perfringens</i> bacteria or its spores is allowed to be found in drinking water.</p> <p>The method was tested both qualitatively and quantitatively. The instruction of the method was proved to be functional in qualitative test. In quantitative test, selected measures for the verification were repeatability, reproducibility, relative trueness and specificity. Results for the measures were acceptable and clearly within the limits.</p> <p>The test results showed that the membrane filtration method for the <i>Clostridium perfringens</i> is effective and the instructions worked well. The laboratory will decide whether to take the method to use and if the accreditation is needed. The decision is affected by the economy, viability and reliability of the analysis.</p>	
Keywords	<i>Clostridium perfringens</i> , membrane filtration, verification

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Klostridit	2
2.1	<i>Clostridium perfringens</i>	2
2.2	<i>C. perfringens</i> -bakteerin patogeenisyys	3
2.3	<i>C. perfringens</i> -bakteeri talousvedessä	4
2.4	<i>C. perfringens</i> kalvosuodatusmenetelmä SFS-EN ISO 14189:2016	6
3	Mikrobiologisen menetelmän validointi ja verifiointi	6
3.1	Validointi	6
3.2	Verifiointi	7
3.3	Mikrobiologisiin menetelmiin liittyvä epävarmuus	8
3.4	Validointiin ja verifiointiin liittyviä suureita	8
3.4.1	Määrittämysraja	9
3.4.2	Toistettavuus	9
3.4.3	Uusittavuus	9
3.4.4	Mittausepävarmuus	9
3.4.5	Suhteellinen oikeellisuus	10
3.4.6	Spesifisyys	10
3.4.7	Lineaarisuus	10
4	Menetelmän käyttöönotto ja suoritus	11
4.1	Testattavien suureiden valinta	11
4.2	Menetelmäohjeen teko laboratoriolle	11
4.3	Työssä käytetyt bakteerit	11
4.4	Kvalitatiivisen näytteen valmistus ja laimennus	12
4.5	Kvantitatiivisten näytteiden laimennussarjat	13
4.6	Suodatus ja inkubointi	16
4.7	Maljojen lukeminen	19
4.8	Varmistus	20
5	Verifiointin tulokset	21
5.1	Kvalitatiivinen tulos	21
5.2	Kvantitatiivinen tulos	21

5.2.1	Toistettavuus	22
5.2.2	Uusittavuus pitkällä aikavälillä	24
5.2.3	Uusittavuus eri tekijöiden kesken	24
5.2.4	Suhteellinen oikeellisuus	25
5.2.5	Spesifisyys	26
6	Johtopäätökset ja pohdinta	28
	Lähteet	30
	Liitteet	
	Liite 1. Verifointisuunnitelma	
	Liite 2. Menetelmäohje	

Lyhenteet

SFS	Suomen Standardisoimisliitto
CEN	European Committee for Standardization, Eurooppalainen standardisoi- misjärjestö
ISO	International Organization for Standardization, Kansainvälinen standardi- soimisjärjestö
IEC	International Electrotechnical Commission, Sähköalan kansainvälinen standardisointijärjestö
FINAS	Finnish Accreditation Service, Suomen kansallinen akkreditointielin
EVIRA	Elintarviketurvallisuusvirasto
SLV	Sveriges Livsmedelsverket, Ruotsin elintarvikevirasto
pmy	Pesäkettä muodostava yksikkö
TSC	tryptosisulfittisykloseriini
CV	Coefficient of variation, variaatiokerroin

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Länsi-Uudenmaan vesi ja ympäristö ry:n mikrobiologian laboratorioille. Suomen Vesiensuojeluyhdistys ry:hyn kuuluva Länsi-Uudenmaan vesi ja ympäristö ry on yhdistys, joka on edistänyt vesiensuojelua toiminta-alueellaan jo yli 40 vuoden ajan. Vesiensuojeluyhdistyksen tehtävänä on edistää vesiensuojelua, ympäristönsuojelua ja ihmisen elinympäristön terveellisyyttä. Yhdistyksen laboratorio tutkii vesinäytteitä, elintarvikenäytteitä, puhtaus- ja sisäilmanäytteitä sekä tuotantotilojen uloste- ja sisäilmanäytteitä. Laboratorion keskeisillä tutkimusmenetelmillä on akkreditointi ja laboratorio on FINAS-akkreditointipalvelun akkreditoima testauslaboratorio T147 (akkreditointivaatimus SFS-EN ISO/IEC 17025:2005). Laboratoriolla on myös Elintarvikeviraston EVI-RA:n hyväksyntä elintarvikelain, terveydensuojelulain sekä eläintautilain mukaisiin tutkimuksiin. [1, s. 2–4.]

Opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida laboratorioille uusi menetelmä, jolla voidaan määrittää *Clostridium perfringens* -bakteerin ja sen itiöiden esiintymistä vesissä. Työ suoritettiin standardia SFS-EN ISO 14189:2016 käyttäen [2]. Opinnäytetyössäni tein menetelmäohjeen standardin pohjalta sekä testasin menetelmän toimivuutta kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti.

Työssä tutkittava bakteeri on *Clostridium perfringens*. Bakteeria ja sen itiöitä tiedetään esiintyvän ulosteperäisen saastumisen seurauksena muun muassa elintarvikkeissa ja vesistöissä. *C. perfringens* -bakteerin tiedetään aiheuttavan ihmiselle infektioita, kuten ruokamyrkytyksiä ja kaasukuoliota [3, s. 233]. Nämä infektiot voivat olla vakavia erityisesti henkilöille, joiden yleistila tai immuniteetti on heikentynyt. Tämän vuoksi on erittäin tärkeää pystyä tutkimaan bakteerin esiintyvyyttä, jotta voidaan ennaltaehkäistä mahdollisia epidemioita.

C. perfringens -bakteerin esiintymisen seuranta on osoittautunut hyväksi ulosteperäisen saastumisen indikaattoriksi vesivarojen laadun arvioinnissa [2, s. 5]. Vedenpuhdistuslaitokset käyttävätkin bakteerin esiintyvyyden tutkimista hyväkseen vedenkäsittelyn eri vaiheiden tarkistuksessa.

Länsi-Uudenmaan vesi ja ympäristö ry:n mikrobiologian laboratorioissa ei ole ollut käytössä *C. perfringens* -bakteerin kalvosuodatusmenetelmää. Tästä johtuen vesinäytteet, joista pyydetään määrittämään *C. perfringens*, joudutaan lähettämään alihankintana toiseen laboratorioon tutkittavaksi.

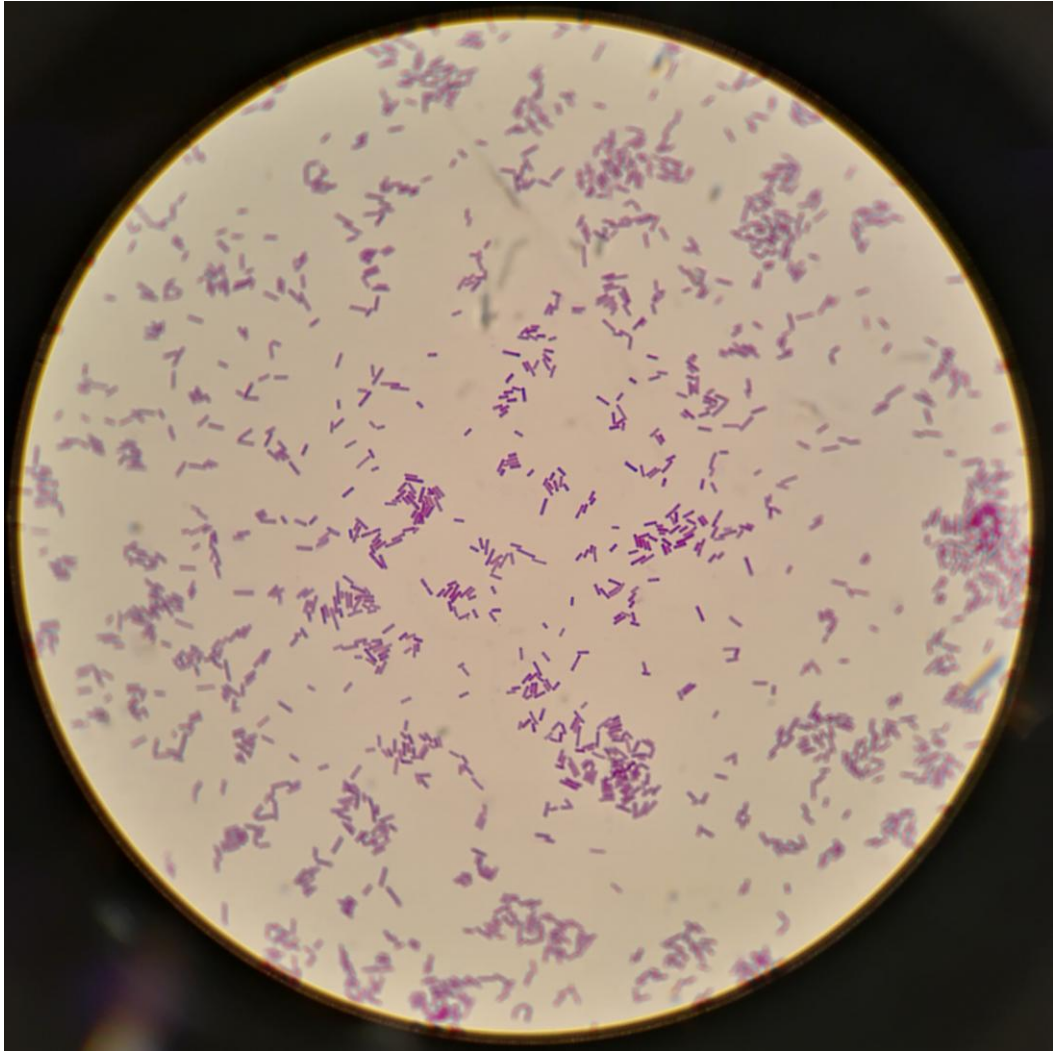
2 Klostridit

Klostridit ovat suuria, gram-positiivisia ja itiöllisiä anaerobisia sauvamaisia bakteereita. Klostridi-bakteereita löytyy yleisesti niin maaperästä kuin merten pohjasta maailmanlaajuisesti [4, s. 652]. Niitä esiintyy myös ihmisten ja eläinten normaalifloorassa. Klostridi-bakteerien aiheuttamat infektiot tarttuvat yleensä ruoan ja ympäristön välityksellä. Tauteja aiheuttavia klostridi-lajeja ovat muun muassa *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium septicum*, *Clostridium perfringens* ja *Clostridium difficile*. [3, s. 228.]

Klostridit muodostavat solunsisäisiä itiöitä eli endosporeja, jotka bakteerin hajottua leviävät ympäristöön. Itiöiden määrä ja happiherkkyydet vaihtelevat suuresti. Klostridien itiöt sietävät happea, kuivuutta, pakastamista sekä korkeita lämpötiloja. Tämän vuoksi ne tunnetaan merkittävänä elintarvikehygienian pilaajina. [4, s. 652.]

2.1 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens on itiöitä muodostava sauvamainen liikkumaton bakteeri, joka ryhmittyy helposti pareittain tai peräkkäin. Ne ovat gram-positiivisia bakteereita, jotka värjäytyvät gram-värjäyksessä tummanvioleteiksi (kuva 1). Sillä on tyypilliset gram-positiivisen bakteerin ominaisuudet, kuten suojaava paksu soluseinä, joka koostuu peptidoglykaanista eli mureenista. *C. perfringens* -bakteerin optimaalinen kasvulämpötila on 43 °C ja suotuisa pH-alue on 6–7. [5.]



Kuva 1. Mikroskooppikuva gram-värjätystä *Clostridium perfringens* -bakteereista

C. perfringens on ehdoton anaerobi, eli se ei kykene käyttämään happea soluhengityksessään. Happi on ehdottomille anaerobisille bakteereille myrkyä, eivätkä ne selviä pitkiä aikoja hapellisissa olosuhteissa. *C. perfringens* ja monet muut suolistoperäiset bakteerit tuottavat hapettomissa olosuhteissa nitraatista ammoniakkia. [4, s. 236–237.]

2.2 *C. perfringens* -bakteerin patogeenisuus

Clostridium perfringens on patogeeninen bakteeri, joka voi aiheuttaa pahoja infektioita ihmisille ja eläimille. *C. perfringens* -bakteeri voidaan luokitella viiteen stereotyyppiin A, B, C, D ja E niiden toksisuuden mukaan. [3, s. 233.]

C. perfringens aiheuttama ruokamyrkytys johtuu yleensä tyypin A erittämästä enterotoksiinista. Ruokamyrkytyksen syynä on usein lihan tai lihatuotteen epätäydellinen kypsentyminen, valmiiden ruokien pitkäkestoinen jäähdytys ja säilytys liian korkeassa lämpötilassa sekä tällaisen ruoan uudelleen lämmittäminen haaleaksi. Tyypilliset ruokamyrkytyksen oireet tulevat 7–15 tunnin kuluessa ruoan syömisestä. Tällaisia oireita voivat olla kovat vatsakivut ja vatsan kouristelu. Ruokamyrkytyksestä toipuminen kestää yleensä 2–3 päivää. *C. perfringens* -bakteeri onkin Suomessa kolmanneksi yleisin ruokamyrkytyksen aiheuttaja. [3, s. 233.]

C. perfringens aiheuttaman infektiot voivat olla vakavia ihmisille, joiden immunitaatti tai yleistila on heikentynyt. Erityisesti laitoshoidossa olevat vanhukset voivat saada pitkittyneen ripulin ruoan tai ympäristön kautta. Itiöt itävät ruoansulatuskanavassa sopivissa olosuhteissa, jolloin bakteerit alkavat tuottaa tyypin A enterotoksiinia. [3, s. 233.]

Vakavaksi pehmytkudosinfektioksi voidaan luokitella *C. perfringens* aiheuttama kivulias kaasukuolio. Se etenee nopeasti ihonalaisiin kudoksiin ja lihaksiin aiheuttaen kuoliota ja kaasun muodostumista. Kaasukuolio tarvitsee kehittyäkseen *C. perfringens* -bakteerin sekä heikentyneen kudoshapetuksen, joka johtuu yleensä verenkierron heikoudesta. Infektio voi johtua pehmytkudosvamman tai kirurgisen toimenpiteen jälkiseurauksena. Kaasukuolio voidaan tunnistaa infektioalueen muuttumisesta pronssinharmaaksi, lihaskudoksen kuoliosta ja kuplista, joihin on muodostunut vetyä ja typpeä. Kaasukuolion diagnostiikassa käytetään hyväksi myös gram-värijäystä. Infektio leviää nopeasti verenkiertoon, jolloin potilaan pelastaminen vaatii nopeita toimenpiteitä. Kriittisimpiä ovat muun muassa kuolleen kudoksen poisto kirurgisesti, antimikrobilääkitys ja ylipainehappihoito. Hoitamattomana tauti voi johtaa kuolemaan jopa muutamassa tunnissa. [6, s. 586.]

2.3 *C. perfringens* -bakteeri talousvedessä

C. perfringens -bakteereita esiintyy yleisesti ympäristössä sekä ihmisten ja tasalämpöisten eläinten suolistossa. Näin ollen bakteerin esiintymistä vedessä pidetään ulosteperäisen saastumisen indikaattorina. *C. perfringens* -bakteerin lepomuodossa esiintyy itiöitä, jotka emosolun hajottua vapautuvat ympäristöön [7, s. 147]. Bakteerin itiöt ovat kokonsa puolesta pieniä ja kestävät hyvin vaativia olosuhteita, kuten kuumuutta,

kemikaaleja, happamuutta ja säteilytystä. Ne voivat kulkeutua vesistöissä merkittävästi kauemmin kuin varsinainen taudinaiheuttaja. [8, s. 8.]

Suurissa kaupungeissa talousveden lähteenä käytettävä raakavesi on usein pintavettä, joka puhdistetaan talousvedeksi vedenpuhdistuslaitoksilla. Esimerkiksi Helsingin seudun talousvesi puhdistetaan Päijänteeltä tulevasta raakavedestä Pitkälän ja Vanhakaupungin vedenpuhdistuslaitoksilla. Näillä laitoksilla puhdistus- ja desinfiointiprosessiin kuuluu kemiallinen saostus, pH:n nosto, otsonointi, hiilidioksidin syöttö, aktiivihiilisuodatus, desinfiointi UV-valon avulla ja klooraus. [9.]

*C. perfringens*in määrittäminen tehdään yleensä vedenpuhdistuslaitokselta lähtevästä eli puhdistetusta talousvedestä tai jakeluverkostosta. *C. perfringens* -bakteerin ja sen itiöiden määrittämisen avulla varmistetaan talousveden puhdistus- ja desinfiointikäsittelyjen riittävä tehokkuus. [8, s. 8.]

Sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen 683/2017 mukaan talousveden laatusuositus *Clostridium perfringens* -bakteerille on 0 pmy/100 ml itiöt mukaan lukien [10]. Tämä tarkoittaa sitä, että 100 ml:ssa talousvesinäytettä ei saa esiintyä yhtään *C. perfringens* -bakteeria tai sen itiöitä. Mikäli tavoitetaso ylittyy, lisäselvitykset aloitetaan välittömästi syyn selvittämiseksi ja poistamiseksi. Verkostoa huuhdellaan ja/tai desinfioidaan ja tarpeen vaatiessa tehdään tehoklooraus. Vedenpuhdistuslaitoksen puhdistus- ja desinfiointiprosessin tehostamista harkitaan, mikäli talousvedestä löytyy *C. perfringens* -bakteereita tai sen itiöitä. [8, s. 8.]

C. perfringens -bakteerin määrittämisessä talousvesinäytteestä käytetään standardimenetelmää tai direktiivissä kuvattua mPC-agar -menetelmää, joissa solut ja itiöt määritetään yhtä aikaa. Tämä tarkoittaa sitä, että bakteeria tai sen itiöitä ei voida erottaa toisistaan pesäkkeiden kasvun perusteella. Itiöt pystyttäisiin erottamaan itse bakteerisolusta kuumakäsittelyn avulla, joka on kuvattu työssä käytettävässä standardissa. Näytteen kuumakäsittelyä ei kuitenkaan käytetä näissä menetelmissä, sillä tuloksen kannalta ei ole merkitystä, onko kasvanut pesäke peräisin vegetatiivisesta solusta vai itiöstä. [8, s. 8.]

2.4 *C. perfringens* kalvosuodatusmenetelmä SFS-EN ISO 14189:2016

Suomen standardisoimisliitto SFS toimii Suomessa standardisoinnin keskusjärjestönä. Standardit on laadittu yhteisten toimintatapojen pohjaksi sekä helpottamaan kuluttajien ja viranomaisten toimintaa. Standardit takaavat sen, että tuotteet, palvelut ja menetelmät sopivat käyttötarkoitukseensa ja toimivat luotettavasti niille tarkoitetuissa olosuhteissa. [11.]

ISO:n (International Organization for Standardization) tekninen komitea on laatinut standardin ISO 14189:2013: "Water quality. Enumeration of *Clostridium perfringens*. Method using membrane filtration". CEN (European Committee for Standardization) on hyväksynyt sen eurooppalaiseksi standardiksi vuonna 2016. Suomen Standardisoimisliitto on kääntänyt standardin suomeksi, ja se on vahvistettu suomalaiseksi kansalliseksi standardiksi. [2, s. 1–3.]

Standardissa kuvataan menetelmän periaate, tarvittavat välineet, kasvualustat ja reagenssit, menetelmän suoritusosio sekä tulosten ilmoittaminen yksityiskohtaisesti. Standardin liitteissä on kuvattu kasvualustojen ja reagenssien valmistusohjeet sekä standardin luomisessa käytetyt parametrit.

3 Mikrobiologisen menetelmän validointi ja verifiointi

3.1 Validointi

Validointi suoritetaan ennen uuden menetelmän käyttöönottoa laboratoriossa. Validoinnin tarkoitus on arvioida menetelmän ja laitteen soveltuvuutta, toimivuutta, luotettavuutta, laatua ja tulosten oikeellisuutta [12, s. 1].

Laboratorioiden tulee käyttää validoituja tutkimusmenetelmiä, jotta voidaan varmistaa, että ne ovat käyttötarkoitukseensa sopivia. Validoinnilla varmennetaan, että testin tulokset täyttävät lain ja säännöksiin vaatimukset. Jos laboratorio kehittää itse uuden menetelmän, se on validoitava ja dokumentoitava täydellisesti. Tutkittava analyysimenetelmä ja sen käyttötarkoitus määrittävät validoinnin laajuuden. Uusi menetelmä tai

laite voidaan ottaa käyttöön vasta sen jälkeen, kun validoinnin tulokset on hyväksytty. [13, s. 7.]

Mikrobiologisten menetelmien validointi perustuu lähinnä epävarmuustekijöiden havainnointiin ja niiden kuvaamiseen numeerisesti. Menetelmää validoitaessa tehdään ennalta suunniteltuja testejä, joilla määritetään valittujen validointiparametrien arvot tapauskohtaisesti. Tilastollisia menetelmiä käyttämällä voidaan löytää menetelmän kohdat, jotka ovat tulosten luotettavuuden kannalta kriittisiä. [12, s. 1.]

Mikrobiologisen menetelmän kelpoisuus osoitetaan suureilla, jotka kuvastavat menetelmän luotettavuutta vertailuarvojen perusteella. Tällaisia suureita ovat muun muassa oikeellisuus, toistettavuus, uusittavuus, määrittämissuure, spesifisyys, herkkyys ja lineaarisuus. [12, s. 1.]

3.2 Verifiointi

Laboratoriossa otetaan yleensä käyttöön valmiiksi standardisoituja ja muita yleisesti käytössä olevia menetelmiä. Suomen Standardisoimisliitto SFS suorittaa usein täydellisen validoinnin, joka edellyttää laajoja laboratorioden välisiä tutkimuksia. Kun laboratorio ottaa valmiiksi standardisoidun menetelmä käyttöön, sen toimivuus osoitetaan käyttökelpoiseksi verifiointilla. Verifiointi on näin ollen suppeampi menettelytapa kuin validointi. Verifiointi tarkoittaa sitä, että laboratorio varmistaa menetelmän sopivuuden ja osoittaa hallitsevansa käyttöönotettavan menetelmän. Laboratorio osoittaa verifiointilla, että menetelmä toimii ohjeen mukaan ja on yhteensopiva muiden laboratorioden kanssa. [12, s. 2; 13, s. 7–8.]

Menetelmää verifioitaessa laboratorio voi testata menetelmän toimivuutta kvalitatiivisesti eli laadullisesti ja kvantitatiivisesti eli määrällisesti. Kvalitatiivisen menetelmän osalta tarkastellaan, todettiinko analysoitava mikrobi. [12, s. 9–10.]

Kvantitatiivisessa menetelmässä tarkastellaan, vastaavatko tulokset ennalta tunnettuja mikrobipitoisuuksia. Menetelmää verifioidessa valitaan testattavat suureet, jotka määritetään tapauskohtaisesti menetelmän luotettavuuden arvioimiseksi. Standardimenetelmien ja virallisten menetelmien verifiointi vaatii yleensä referenssimateriaalin, jossa mikrobipitoisuus on tunnettu sekä matriisiin, jolla suodatettavia näytteitä tutkitaan. Tu-

loksissa tulee ilmetä käytetty referenssimateriaali, matriisit, tutkittu mikrobipitoisuus, näytteiden määrä sekä tutkimustulokset ja johtopäätökset. [12, s. 9–10.]

3.3 Mikrobiologisiin menetelmiin liittyvä epävarmuus

Kemialliset ja mikrobiologiset menetelmät eroavat toisistaan merkittävästi. Kemiallisessa analytiikassa analytti pyritään erottamaan matriisista muun muassa liuottamalla, uuttamalla tai saostamalla. Näin päästään eroon mittausta häiritsevistä tekijöistä. Mikrobiologiassa analyysia häiritsevistä tekijöistä kuten mikrobeista ja materiaaleista ei päästä eroon. Analytti erottuu vasta kasvualustalla, joka määrittelee menetelmän spesifisyyden. Spesifisyyteen vaikuttavia tekijöitä ovat lisäksi kasvualustan koostumus ja kasvatusolosuhteet. [12, s. 2.]

Mikrobiologiassa kvantitatiivista määrittystä varten näyte laimennetaan sellaiselle pitoisuustasolle, jossa yksittäisistä soluista muodostuneet pesäkkeet on vielä mahdollista laskea. Tutkittavassa näytteessä solumäärä tulee olla kymmenistä enintään muutama sataan. Rinnakkaisissa analyyseissa pesäkemäärät voivat vaihdella paljonkin ilman, että sitä voidaan pitää virheenä. Näin ollen täsmällisesti oikean tuloksen eli oikeellisuuden määrittäminen on vaikeaa. Mikrobiologisen menetelmän oikeana tuloksena voidaan pitää usean toiston keskiarvotuloksen ja referenssimateriaalissa ilmoitetun todellisen arvon lähekkäisyyttä. [12, s. 2–3.]

Mikrobiologiassa epävarmuustekijöitä ovat kiinteän näytteen homogointi, joka saattaa tuhota tutkittavat mikrobit näytteestä, työntekijäkohtaiset työskentelyerot, matriisin ominaisuudet, mikrobiston luonne ja muut vaikeasti määriteltävät tekijät. Nämä tekijät aiheuttavat hajontaa samasta näytteestä tehtyihin rinnakkaismäärittäksiin. [12, s. 3.]

3.4 Validointiin ja vefiriointiin liittyviä suureita

Validointiin ja verifiointiin liittyviä testattavia suureita tunnetaan useita ja niistä löytyy hieman toisistaan poikkeavia määritelmiä. [12, 13.]

3.4.1 Määrittäysraja

Määrittäysraja on pienin pitoisuus tutkittavaa bakteeria, joka voidaan luotettavasti todeta. Nestemäisiä näytteitä tutkittaessa määrittäysrajana käytetään yleensä < 1 pmy/ml maljavalutekniikalla tai < 10 pmy/ml pintalevitystekniikalla. Kiinteitä näytteitä tutkittaessa vastaavasti < 10 pmy/g maljavalutekniikalla tai < 100 pmy/g pintalevitystekniikalla. Määrittäysrajaa voidaan tarvittaessa alentaa lisäämällä näytemääriä sekä rinnakkaisia mittauksia. Menetelmän selektiivisyys, spesifisyys ja mikrobin vahvuus vaikuttavat määrittäysrajaan. [12, s. 8.]

3.4.2 Toistettavuus

Toistettavuus on tulosten välistä yhtäläisyyttä, jota voidaan testata kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti. Tulosten toistettavuutta voidaan arvioida, kun määrittäyksessä käytetään samanlaisia olosuhteita, samaa näytettä, samaa menetelmää, tehdään saman henkilön toimesta, samoilla laitteilla, samassa laboratoriossa ja määrätyn aikavälin sisällä. Toistettavuutta testataan yhden laborantin tekemien rinnakkaisnäytteiden avulla. [13, s. 31.]

3.4.3 Uusittavuus

Uusittavuus on tulosten välistä yhtäläisyyttä, kun määrittäyksessä muutetaan yhtä tai useampaa tekijää. Tällaisia tekijöitä voivat olla muun muassa suodatuslaite, suorituspaikka, suorittaja ja määrittäyksen aikaväli. Menetelmän uusittavuutta voidaan arvioida analysoimalla oikeita näytteitä, vertailumateriaaleja tai osallistumalla vertailukokeisiin. Kokonaishajonnalla voidaan kuvata menetelmän uusittavuutta. Laboratorion sisäistä uusittavuutta voidaan testata pitkällä aikavälillä käyttäen vertailumateriaalia tai valvontanäytteitä. Keskihajonta lasketaan rinnakkaisten tulosten erotuksesta. [13, s. 32.]

3.4.4 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus kuvaa koetulosten vaihtelua, ja se määritellään virherajojen avulla. Kaikkiin menetelmiin liittyy epävarmuustekijöitä, jotka johtuvat muun muassa virheistä näytteenotossa, näytteen virheellisestä säilytyksestä, laitteista tai analyysin eri vaiheissa tapahtuvasta epätarkkuudesta. Mikrobiologisessa määrittäyksessä tuloksen mittausepävarmuus riippuu mittauksesta, joten epävarmuus arvioidaan erikseen kunkin

tuloksen osalta. Laboratorion tekninen epävarmuus koostuu tilavuusmittausten, laimennuskertoimen, tulosten laskennan sekä pesäkkeiden varmistuksen virheistä. [13, s. 23–24.]

3.4.5 Suhteellinen oikeellisuus

Menetelmässä saatujen tulosten oikeellisuuden tutkiminen edellyttää tietoja analysoitavan mikrobin todellisesta pitoisuudesta. Oikeellisuutta voidaan määrittää sertifioidujen referenssimateriaalien avulla, joissa ilmoitettua pitoisuutta voidaan pitää oikeana tuloksena. Mikrobiologisessa määrittämisessä tulosten oikeellisuutta ei pystytä varmuudella määrittämään, sillä analyytit ovat elävää materiaalia. Tästä syystä mikrobiologisessa tutkimuksessa käytetään usein suhteellisen oikeellisuuden määritelmää. Se tarkoittaa tulosten lähekkäisyyttä ja vastaavuutta tutkittaessa samoja näytteitä validoitavalla menetelmällä ja referenssimenetelmällä. [12, s. 27.]

3.4.6 Spesifisyys

Spesifisyys tarkoittaa kvalitatiivisen ja kvantitatiivisen menetelmän kykyä löytää tutkittava mikrobi näytteessä olevista häiritsevistä tekijöistä. Jos menetelmä toteaa vain analysoitavan mikrobin, sitä voidaan pitää täydellisen spesifisenä. Käytännössä näin ei kuitenkaan ole, vaan tyypilliset pesäkkeet on opittava tunnistamaan analyysia häiritsevistä pesäkkeistä. Pesäkkeiden tunnistamiseen käytetään varmistustestejä, joilla lopullinen tunnistaminen tapahtuu. [12, s. 8.]

3.4.7 Lineaarisuus

Lineaarisuus tarkoittaa kvantitatiivisen menetelmän antamia tuloksia, jotka ovat suoraan verrannollisia mikrobipitoisuuteen näytteessä. Kun mikrobipitoisuus muuttuu, tulokset muuttuvat samassa suhteessa. Yleensä mikrobiologisessa menetelmässä mainitaan pienin ja suurin pesäkemäärä, jolla tulos voidaan luotettavasti esittää. [12, s. 8.]

4 Menetelmän käyttöönotto ja suoritus

4.1 Testattavien suureiden valinta

Verifiointia varten tehtiin suunnitelma (liite 1), johon valittiin yhdessä laboratorion edustajan kanssa testattavat suureet. Suureiksi valittiin toistettavuus, uusittavuus, suhteellinen oikeellisuus ja spesifisyys. Näillä suureilla verifiointiin katsottiin olevan riittävän laaja yhdistyksen laboratoriolle.

Suureita analysoidaan Sveriges Livsmedelsverketin (SLV:n) järjestämien vertailukokeiden avulla, joissa mukana on *Clostridium perfringens* -bakteeri. Menetelmän verifiointiin käytettiin edellisen vuoden ampulleja, joiden tuloksiin voitiin verrata saatuja tuloksia. Menetelmän verifiointiin osallistui yhdistyksen mikrobiologian laboratorion henkilökunta.

4.2 Menetelmäohjeen teko laboratoriolle

Menetelmän käyttöönoton ensimmäinen vaihe oli menetelmäohjeen luominen standardin SFS-EN ISO 14189:2016 [2] pohjalta. Menetelmäohje (liite 2) käsittelee *Clostridium perfringens* -bakteerin pesäkemäärän määrittämistä kalvosuodatusmenetelmällä talousvedestä otetuista näytteistä. Käytin menetelmäohjeen tekemiseen yhdistyksen laboratorion omaa tiedostopohjaa, jotta ohje vastaisi laboratoriossa vaadittua sisältöä.

Menetelmäohjeessa on kuvattu kalvosuodatusmenetelmän periaate *C. perfringens* -bakteerista. Ohjeessa on kerrottu menetelmässä käytettävistä laitteista ja välineistä, kasvuolosuhteista ja reagensseista sekä näytteenotosta ja säilytyksestä. Suoritus ja tulosten ilmoittaminen on kuvattu ohjeessa tarkasti vaihe vaiheelta.

4.3 Työssä käytetyt bakteerit

Menetelmän toimivuutta testattiin kvalitatiivisesti kylmäkuivatun *Clostridium perfringens* -bakteerikannan avulla ja sen jälkeen kvantitatiivisesti SLV:n ampullien avulla. SLV:n ampulleja oli yhteensä kolme (taulukko 1), joista kahdessa oli sama pitoisuus *C. perfringens* -bakteeria ja yhdessä *Clostridium bifermentans* -bakteeria. *C. perfringens* sisältävät ampullit olivat vuodelta 2016 maaliskuun kierrokselta. *C. bifermentans* -

bakteeria sisältävä ampulli oli 2017 maaliskuun kierrokselta. Ampulleissa tiedettiin olevan myös *E. coli* -bakteereita sekä koliformisia ja heterotrofisia bakteereita.

Ampulli, joka sisälsi *C. bifermentans* -bakteeria, valittiin vertailukohteeksi, sillä se kasvaa TSC-agar-alustalla samalla tavalla kuin *C. perfringens*, mutta antaa negatiivisen tuloksen happaman fosfataasin osoittamassa varmistustestissä.

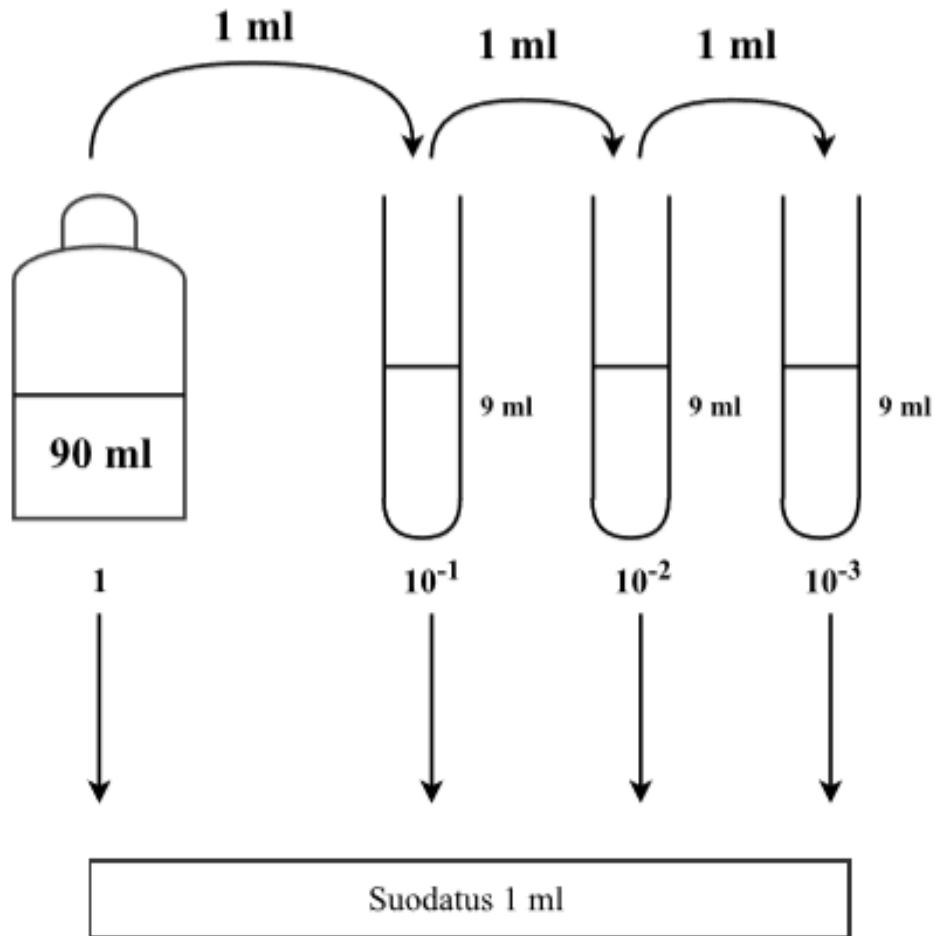
Taulukko 1. SLV:n ampullit

Sisältää	Pitoisuus (pmy/100 ml)	Kierros	Bakteeriseos	Suodatettu (pvm)
<i>C. perfringens</i>	33–610	March 2016	C	15.5.2017
<i>C. perfringens</i>	33–610	March 2016	C	10.1.2018
<i>C. bifermentans</i>	69–5600	March 2017	B	10.1.2018

4.4 Kvalitatiivisen näytteen valmistus ja laimennus

Kvalitatiivinen menetelmän toimivuuden testaus tehtiin kylmäkuivatun *C. perfringens* -bakteerikannan avulla, jossa bakteerin pitoisuutta ei tunneta. Testaus aloitettiin bakteerikannan elvyttämällä ja viljelemällä sitä veriagar-maljalle pintalevitystekniikalla. Malja laitettiin kasvamaan anaerobisiin olosuhteisiin 36 °C:n lämpötilaan 24 tunnin ajaksi.

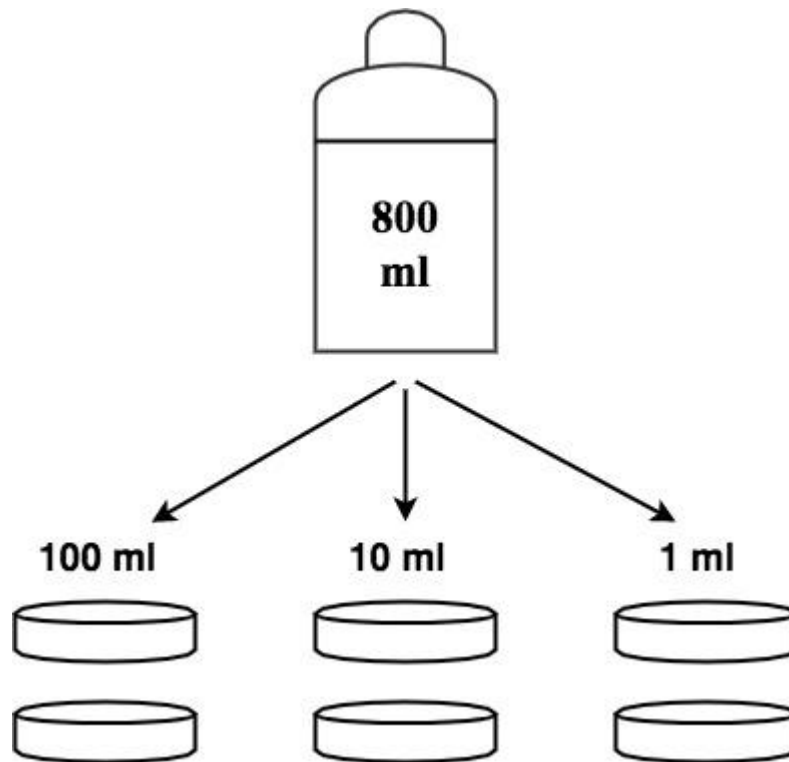
Inkuboinnin jälkeen valmistettiin bakteerisuspensio, johon siirrostettiin 1 µl:n siirrostusilmukalla *C. perfringens* -bakteeria, *E. coli* -bakteeria sekä *B. cereus* -bakteeria. Tällä bakteerisekoituksella haluttiin testata menetelmän spesifisyyttä. Suspensiossa käytettiin 90 ml peptonisuolaliuosta. Laimennussarja 10^{-1} – 10^{-3} tehtiin 9 ml peptonisuolaliuosta sisältäviin steriileihin koeputkiin (kuva 2). Jokaisesta laimennuksesta suodatettiin 1 ml suodatinkalvolle.



Kuva 2. Laimennussarja kylmäkuivatusta bakteerikannasta

4.5 Kvantitatiivisten näytteiden laimennussarjat

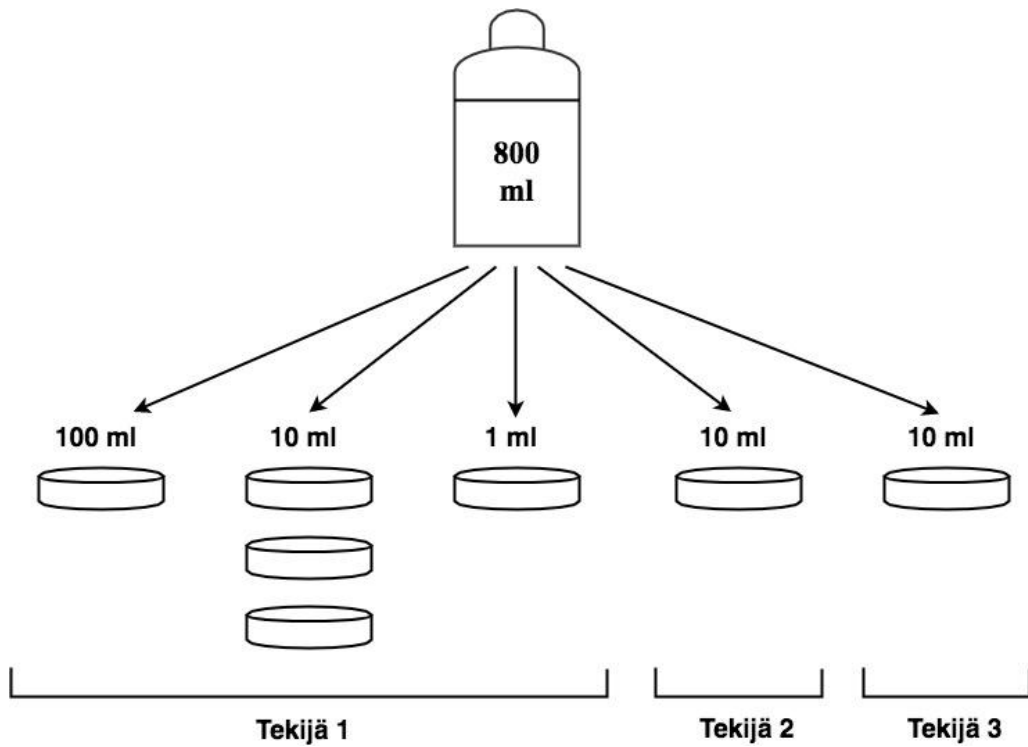
Kvantitatiiviseen menetelmän testaukseen käytettiin kolmea SLV:n ampullia. Ensimmäisen suodatuksen suoritti tekijä 1 toukokuussa 2017 ampullista, joka sisälsi *C. perfringens* -bakteeria. Suodatettavat tilavuudet valittiin vaihteluvälin perusteella, joka oli ilmoitettu olevan 33–610 pmy/100 ml. Ampulli liuotettiin 800 ml:aan peptonisuolaliuosta ohjeiden mukaisesti. Suodatinkalvoille suodatettiin tilavuudet 100 ml, 10 ml ja 1 ml, joista tehtiin myös rinnakkaiset määritykset (kuva 3).



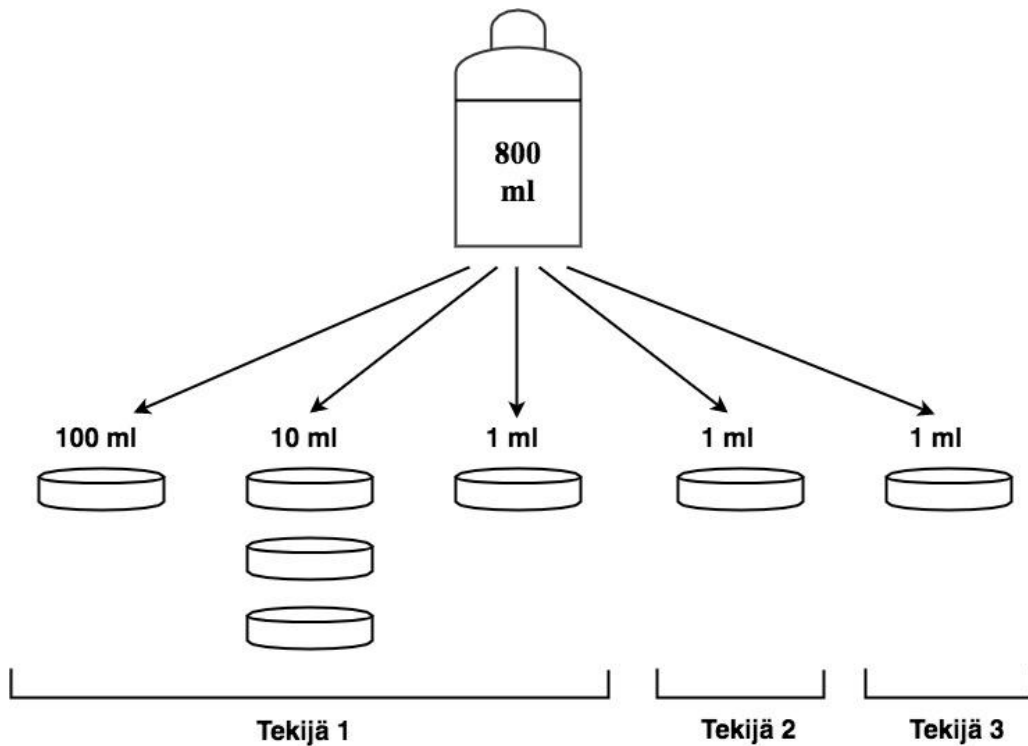
Kuva 3. Laimennussarja ampullista March 2016 C. Suodatuksen on tehnyt tekijä 1 15.5.2017.

Toinen suodatus tehtiin tammikuussa 2018 kahdesta ampullista, jotta saatiin menetelmän spesifisyyteen vertailukelpoisia tuloksia. Ampullit olivat vuoden 2016 ja 2017 maaliskuun kierroksilta.

Vuoden 2016 ampulli sisälsi saman pitoisuuden *C. perfringens* -bakteeria kuin ensimmäisessä suodatuksessa oleva eli 33–610 pmy/100 ml. Vuoden 2017 ampulli piti sisällään 69–5600 pmy/100 ml *C. bifementans* -bakteeria. Ampullit liuotettiin steriileihin 800 ml peptonisuolaliuosta sisältäviin lasipulloihin ohjeiden mukaisesti. Suodatukset tehtiin kolmen tekijän kesken. Vuoden 2016 ampullista suodatetut tilavuudet näkyvät kuvassa 4 ja vuoden 2017 ampullista suodatetut tilavuudet kuvassa 5.



Kuva 4. Laimennussarja ampullista March 2016 C. Suodatukseen osallistui kolme tekijää.



Kuva 5. Laimennussarja ampullista March 2017 B. Suodatukseen osallistui 3 tekijää.

4.6 Suodatus ja inkubointi

Näytteet suodatettiin steriloidulla suodatinsuppilolla suodatinkalvolle, jonka huokoskoko oli 0,45 µm. Mikäli suodatettava tilavuus oli alle 20 ml, suodatinsuppilon pohjalle lisättiin steriiliä peptonisuolaliuosta ennen näytteen lisäämistä, jotta bakteerit jakautuvat tasaisesti kalvolle. Kalvo siirrettiin aseptisesti TSC-agar-maljalle niin, että kalvon alle ei saanut jäädä ilmakuplia. Samasta näytteestä voitiin suodattaa laimeimmasta pitoisuudesta suurimpaan pitoisuuteen samalla suodatinsuppilolla ilman suodatinsuppilon sterilointia näytteiden välissä. Maljat laitettiin inkuboitumaan anaerobisesti 44±1 °C:n lämpötilaan 21±3 tunnin ajaksi.

C. perfringens -bakteeria määrittäessä käytetään tyypillisesti tryptoorisulfiittisykloseriiniagarina eli TSC-agarina, joka luo optimaaliset olosuhteet bakteerin kasvuun. Pe-säkkeet, jotka tuottavat rikkivetyä, muuttuvat maljalla tummiksi sulfiitin pelkistyessä sulfidiksi ja raudan suolojen reagoitessa sulfidien kanssa [14, s. 428]. TSC-agar valmistettiin valmistajan antamien ohjeiden mukaisesti (Perfringens agar base CM0587, Oxoid).

Anaerobiseen inkubointiin käytettiin kahta eri menetelmää, joilla saatiin luotua hapettomat olosuhteet bakteerin kasvua varten. Yhden bakteerimaljan inkuboimiseen käytettiin anaerobipussia (kuva 6) (Microbiology Anaerocult P 113807, Merck), johon laitettiin maljan lisäksi kehitin, 3 ml steriiliä vettä ja inkubointinauha (Mikrobiologie Anaerotest 115112, Merck).



Kuva 6. Puhdasviljelmä veriagar-maljalla inkuboinnin jälkeen anaerobipussissa

Usean maljan inkubointiin käytettiin kaasukammiota, johon laitettiin suurempi kehitin (Microbiology Anaerocult A 113829, Merck), 35 ml steriiliä vettä ja inkubointinauha (kuva 7). Molemmat menetelmät osoittautuivat toimiviksi inkubointinauhan perusteella, jonka sininen pää muuttui valkoiseksi anaerobisten olosuhteiden vallitessa. Inkubointinauhan värieron voi huomata vertaamalla kuvia 6 ja 7, jotka on otettu ennen inkubointia ja sen jälkeen.



Kuva 7. Suodatetut näytteet kaasukammiossa ennen inkubointia

4.7 Maljojen lukeminen

Anaerobisen inkuboinnin jälkeen tarkistettiin, kasvaako TSC-agar-maljalla *C. perfringens* -bakteerille tyypillisiä pesäkkeitä. Pesäkkeet tuli laskea 30 minuutin kuluessa inkuboinnin lopettamisesta, sillä pesäkkeille tyypillinen musta väri haalistuu nopeasti. Maljalta laskettiin kaikki pesäkkeet, jotka olivat värin haaleudesta riippumatta mustia, harmaita tai keltaruskeita (kuva 8).



Kuva 8. *C. perfringens* -pesäkkeitä TSC-agarilla

4.8 Varmistus

Pesäkkeiden varmistus oli kaksivaiheinen, johon kuului jatkoviljely ja hapan fosfataasi -testi. Jatkoviljelyä varten TSC-agar-maljalta otettiin standardin mukaan vähintään 10 satunnaisesti valittua pesäkettä. Mikäli maljalla kasvoi alle 10 pesäkettä, kaikki pesäkkeet oli varmistettava. Valitsin poikkeuksellisesti vain viisi pesäkettä jokaiselta maljalta, jotta laboratorioilta säästyy resursseja myöhempiä tutkimuksia varten. Maljalta pyrittiin valitsemaan kaiken tyyppisiä pesäkkeitä. Pesäkkeistä tehtiin puhdasviljelmä veriagar-maljalle, jota inkuboitiin anaerobisesti 36 ± 2 °C:n lämpötilassa 21 ± 3 tunnin ajan.

Hapan fosfataasi -testi tehtiin veriagar-maljalla kasvaneista pesäkkeistä. Tutkittavaa pesäkettä levitettiin suodatinpaperille ja sen päälle tiputettiin kolme pisaraa happaman fosfataasin osoittavaa reagenssia. Pesäkkeen väri muuttui muutaman minuutin sisällä tummanpunaiseksi, mikä on osoitus positiivisesta reaktiosta. Negatiivisena kontrollina käytin *E.colia*, joka ei muuttanut reaktiossa väriään (kuva 9).



Kuva 9. Hapan fosfataasi -testi suodatinpaperilla

5 Verifioinnin tulokset

5.1 Kvalitatiivinen tulos

Kvalitatiivinen tulos saatiin kylmäkuivatusta *C. perfringens* -bakteerikannasta, jolla halettiin testata menetelmäohjeen toimivuutta. Kvalitatiivisesti tutkittavasta näytteestä laskin TSC-agar-maljalta 189 alustavaa pesäkettä laimeimmasta laimennoksesta 10^{-3} . Valitsin varmistustestiin viisi pesäkettä maljalta, joista kaikki pesäkkeet antoivat positiivisen tuloksen. Laskin tuloksen varmistuneiden pesäkkeiden laskentakaavalla, jolla saatiin laskettua lopullinen tulos.

$$\text{Lopullinen tulos (pmy/100 ml)} = \frac{V}{N} \cdot A \cdot L,$$

jossa V on varmistuneiden pesäkkeiden lukumäärä, N on tutkittujen pesäkkeiden lukumäärä, A on alustava pesäkeluku ja L on laimennuskerroin.

Lopullinen tulos laskettiin sijoittamalla arvot edellä mainittuun kaavaan.

$$\frac{5}{5} \cdot 189 \cdot 100 = 18900 \text{ pmy/100 ml}$$

Lopulliseksi tulokseksi 10^{-3} laimennoksessa tuli 18900 pmy/100 ml, joka osoittaa sen, että menetelmäohjeen mukaan suoritettu menetelmä toimii ja *C. perfringens* -bakteeri pystyttiin toteamaan.

5.2 Kvantitatiivinen tulos

Kvantitatiivisia tuloksia tarkasteltiin toistettavuuden, uusittavuuden, suhteellisen oikeellisuuden ja spesifisyyden avulla. Tutkittavana näytteenä käytettiin kolmea SLV:n ampullia, joiden tuloksia vertailtiin keskenään. Ampullista March 2016 C luotettavimmat tulokset saatiin 10 ml:n laimennoksesta. Taulukossa 2 on listattu tulokset myös 100 ml:n ja 1 ml:n tuloksista. 100 ml:n tuloksia ei pystytty laskemaan maljoilta, sillä pesäkkeiden kasvu oli liian tiheä. 1 ml:n tulosta voidaan pitää epäluotettavana, sillä optimaalinen tulos katsotaan olevan välillä 20–200 pmy. Taulukosta 2 10 ml:n laimennuksista

voidaan laskea keskiarvo, joka on 600 pmy/100 ml. Tulos on hyväksyttävä, sillä ampullissa ilmoitettu hyväksymisraja on 33–610 pmy/100 ml.

Taulukko 2. Kuvan 3 laimennussarjan tulokset.

Suodatettu 15.5.2017			
Ampulli	Tilavuus (ml)	Laskettu (pmy)	Tulos (pmy/100 ml)
SLV March 2016 C	100	Ei laskettavissa	-
	100	Ei laskettavissa	-
	10	68	680
	10	52	520
	1	8	800
	1	5	500

5.2.1 Toistettavuus

Toistettavuutta arvioitiin yhden henkilön tekemistä rinnakkaisista suodatuksista, jotka on tehty samasta näytteestä lyhyen aikavälin sisällä. Toistettavuuden määrittämiseen valittiin ampullit March 2016 C, jonka suodatus tehtiin toukokuussa 2017 (taulukko 3) ja tammikuussa 2018 (taulukko 4) tekijän 1 toimesta. Taulukossa 3 ja 4 suodatettava tilavuus oli rinnakkaisnäytteissä 10 ml, joista varmistetut pesäkkeet on ilmoitettu 100 ml kohden.

Toistettavuutta määritettiin variaatiokertoimella CV % (Coefficient of variation). Variaatiokerroin kuvaa tulosten välistä vaihtelua prosentteina.

$$CV \% = \frac{s}{ka} \cdot 100,$$

jossa s on tulosten keskihajonta ja ka on tulosten keskiarvo.

Taulukko 3. Ampullin March 2016 C suodatuksen tulokset 15.5.2017.

Suodatettu 15.5.2017		
Ampulli	Tilavuus (ml)	Tulos (pmy/100 ml)
SLV	10	680
March 2016 C	10	520

ka	600
s	80
CV %	13

Ampullissa ilmoitettu variaatiokerroin CV % on varmistetulle *Clostridium perfringens* -bakteerille 33 %. Tulos on hyväksyttävä, mikäli CV % on < 33 %.

Toukokuussa suodatetusta näytteestä variaatiokertoimeksi saatiin 13 %, joka on ampullissa ilmoitetun maksimirajan 33 % alapuolella.

Taulukko 4. Ampullin March 2016 C suodatuksen tulokset 10.1.2018.

Suodatettu 10.1.2018		
Ampulli	Tilavuus (ml)	Tulos (pmy/100 ml)
SLV	10	280
March	10	340
2016 C	10	340

ka	320
s	28
CV %	8,8

Tammikuussa suodatetusta näytteestä laskettu CV % on 8,8 %, joka huomattavasti sallitun maksimirajan alapuolella.

Kummankin ampullin osalta toistettavuutta voidaan pitää hyväksyttävänä.

5.2.2 Uusittavuus pitkällä aikavälillä

Uusittavuutta määritettiin kahdella vastaavanlaisella ampullilla, joissa oli *C. perfringens* -bakteeria. Tekijä 1 määritti uusittavuutta pitkällä aikavälillä toukokuussa 2017 (taulukko 3) ja tammikuussa 2018 (taulukko 4).

Uusittavuutta kahden ampullin välillä määritettiin yhdistetyllä variaatiokertoimella, jossa ampullien CV % tuloksista lasketaan keskiarvo. Keskiarvo määritetään taulukoiden 3 ja 4 variaatiokertoimista.

$$\text{Yhdistetty CV \%} = \frac{(13 + 8,8)}{2} = 10,9 \% \approx 11 \%$$

Kahden ampullin yhdistetyksi variaatiokertoimeksi saatiin 11 %. Uusittavuus kahden saman pitoisuuden sisältämän ampullin välillä oli hyväksyttävä, sillä se alitti maksimiarvon 33 %.

5.2.3 Uusittavuus eri tekijöiden kesken

Uusittavuutta määritettiin kolmen eri tekijän kesken samasta näytteestä lyhyellä aikavälillä. Suodatuksessa käytettiin SLV:n March 2016 C -ampullia, josta luotettavimmat tulokset saatiin 10 ml:n laimennuksesta. Eri tekijöiden välistä uusittavuutta tutkitaan variaatiokertoimella CV %. Eri tekijöiden välinen CV % on laskettu taulukossa 5.

Taulukko 5. Ampullista March 2016 C suodatukset kolmen eri tekijän kesken.

Suodatettu 10.1.2018			
Ampulli	Tekijä	Tilavuus (ml)	Tulos (pmy/100 ml)
SLV March 2016 C	1	10	280
	1	10	340
	1	10	340
	2	10	360
	3	10	380

ka	340
s	33
CV %	9,8

Variaatiokertoimeksi saatiin 9,8 %, joka on ampullissa ilmoitetun 33 % alapuolella. Uu-
sittavuutta eri tekijöiden kesken samasta näytteestä voidaan pitää hyvänä.

5.2.4 Suhteellinen oikeellisuus

Suhteellinen oikeellisuus määritettiin vertaamalla laboratorion keskiarvotulosta muiden
laboratorioiden saamiin tuloksiin. Tulokset saatiin tammikuussa suodatetusta March
2016 C -ampullista, jotka on kuvattu taulukossa 5. Laboratorion eri tekijöiden keskiar-
votulos ka on 340 pmy/100 ml.

Oikeellisuutta voidaan mitata z-arvon avulla, jolloin vertailumittaukseen osallistuneiden
laboratorioiden tuloksia verrataan keskenään. Taulukossa 6 esitetään laboratorion tu-
los verrattuna muiden laboratorioiden tuloksiin.

Tutkimuksen onnistumista ja suhteellista oikeellisuutta arvioidaan z-arvojen ja normaali-
liarvojen avulla. Tulos saatiin laskettua sijoittamalla laboratorion keskiarvotulos tauluk-
koon 6, josta laskettiin z-arvo.

$$z = \frac{(x - X)}{s},$$

jossa x on vertailumittauksesta saatu mittaustulos, X on asetettu vertailuarvo ja s on
keskihajonnan tavoitearvo.

Tuloksen katsotaan olevan hyväksyttävä kun $|z| \leq 2$, arveluttava kun $2 < |z| < 3$ ja
hylättävä kun $|z| \geq 3$ [15, s. 72].

Taulukko 6. Laboratorion tulosten vertaaminen muiden laboratorioiden tuloksiin z-arvon avulla.

Matriisi	Tulos (pmy/100 ml)	Tulosten lkm (laboratorioiden osallistumis lkm)	Hyväksy- misrajat	Tulosten mediaani	Tulosten mean	CV %	x	X	s	z
March 2016 C alustava <i>C. perfringens</i>	340	47	33...610	370	313	27	18,44	17,69	4,78	0,16
March 2016 C varmistunut <i>C. perfringens</i>	340	39	33...610	270	254	33	18,44	15,94	5,32	0,47

Laskettu z-arvo alustavalle *C. perfringens* -bakteerin tulokselle on 0,16 ja varmistetulle *C. perfringens* -bakteerille 0,47. Näin ollen suhteellisen oikeellisuuden katsotaan olevan hyväksyttävä sillä $|z| < 2$. Mikäli laboratorio olisi osallistunut näihin vertailumittauksiin, se olisi menestynyt.

5.2.5 Spesifisyys

Menetelmässä käytettävän TSC-agarin selektiivisyyttä *C. perfringens* -bakteerille tutkittiin kvalitatiivisessa kokeessa bakteerisuspensioilla, jossa häiritsevinä kantoina käytettiin *E. coli*- ja *B. cereus* -bakteereita. Inkuboinnin jälkeen maljalla kasvoi vain *C. perfringens* -bakteerille tyypillisiä pesäkkeitä (kuva 8). Varmistustestissä maljalta valittiin kaiken tyyppisiä pesäkkeitä, jotka varmistuivat *C. perfringens* -bakteereiksi. Todettiin, että menetelmä löysi tutkittavat mikrobit näytteen häiritsevistä tekijöistä huolimatta.

Varmistustestissä käytettiin kolmesta ampullista suodatettuja maljoja, joista kahdessa tiedettiin olevan *C. perfringens* -bakteeria ja yhdessä *C. bifermentans* -bakteeria. Nämä klostridit kasvavat TCS-agar maljalla samannäköisinä pesäkkeinä, joten ne voidaan erottaa toisistaan vain happaman fosfataasin osoittavalla testillä. Hapan fosfataasi -testiin valittiin alustavista pesäkkeistä viisi niiltä maljoilta, joissa pesäkemäärä oli 20–200 tulosten luotettavuuden perusteella.

Hapan fosfataasi -testin tuloksista laskettiin lopullinen *C. perfringens* -bakteerin tulos, joka ilmoitettiin 100 ml kohden. Lopullinen tulos laskettiin varmistuneiden pesäkkeiden laskentakaavalla. Tulokset on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Hapan fosfataasi -testin tulokset kolmella eri ampullilla

Pvm	Ampulli	Laimennus (ml)	Alustavat (pmy)	Pesäke nro.	Hapan fosfataasi	Lopullinen tulos (pmy/100 ml)
17.5.2017	March 2016 C	10	52	1	+	520
				2	+	
				3	+	
				4	+	
				5	+	
12.1.2018	March 2016 C	10	34	1	+	340
				2	+	
				3	+	
				4	+	
				5	+	
12.1.2018	March 2017 B	1	26	1	-	0
				2	-	
				3	-	
				4	-	
				5	-	

Hapan fosfataasi -testissä kahdesta ampullista pesäkkeet varmistuivat positiivisiksi ja yhdestä negatiivisiksi. Tulos oli odotettavissa, sillä tiedettiin ennalta, että March 2017 B -ampullissa on *C. bifermentans* -bakteeria. Voidaan todeta, että hapan fosfataasi -testi on täydellisen spesifinen tutkittavalle mikrobille.

6 Johtopäätökset ja pohdinta

Opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida laboratoriolle kalvosuodatusmenetelmä, jolla voidaan määrittää *Clostridium perfringens* -bakteeria talousvesistä. Työhön kuului menetelmäohjeen teko laboratoriolle sopivaksi. Tämä menetelmäohje todettiin toimivaksi useiden määritysten avulla.

Menetelmäohjeen toimivuus osoitettiin kvalitatiivisella testauksella, jossa tutkittavana mikrobina käytettiin kylmäkuivattua *C. perfringens* -bakteerikantaa sekä häiritsevinä tekijöinä *E. coli*- ja *B. cereus* -bakteerikantoja. Testauksen tulos osoitti, että tutkittava bakteeri todettiin ja menetelmä toimii ohjeen mukaisesti.

Menetelmän verifiointiseksi valitut suureet: toistettavuus, uusittavuus, suhteellinen oikeellisuus ja spesifisyys antoivat erinomaisia tuloksia. Näitä suureita tarkasteltiin SLV:n vertailukokeen avulla, jossa analysoidun bakteerin pitoisuus ampulleissa oli ennalta tiedossa. Toistettavuus ja uusittavuus sekä saman tekijän tekemänä eri aikoina että kolmen eri tekijän välillä oli erittäin hyvä, sillä variaatiokerroin jäi selvästi hyväksymisrajan sisälle. Näin ollen menetelmällä saadut tulokset eivät ole riippuvaisia suorituskerasta tai tekijästä. Uusittavuuden osalta kahden ampullin pesäkemäärissä oli lähes kaksinkertainen ero. Mikrobiologiassa tulokset voivat kuitenkin vaihdella suuresti ilman, että sitä pidetään virheenä. Verrattaessa omaa tulosta eri laboratorioden tuloksiin suhteellinen oikeellisuus oli hyväksyttävällä tasolla. Menetelmän spesifisyys osoitettiin varmistustestillä täydellisen spesifiseksi.

Verifiointissa saadut tulokset osoittivat menetelmän toimivaksi, mutta tulosten luotettavuutta olisi voitu lisätä tekemällä enemmän rinnakkaisia suodatuksia ja laskemalla niitä rinnakkain monen eri lukijan kesken. Suunnitteluvaiheessa (Liite 1) olisi voinut tarkemmin kuvata suodatusten määrää ja tulosten esittämistä. Lisäksi määritysraja, mittaus-epävarmuus ja lineaarisuus olisi voitu suunnitella tehtäväksi.

Mittauksen epävarmuustekijöinä voidaan pitää bakteerin anaerobisuutta, näytteenoton ja määrittämisen aikaväliä, pesäkkeiden riittävän nopeaa laskentaa ja kasvualustan säilyvyyttä. *C. perfringens* -bakteerin tiedetään olevan herkkä hapelle, joten näytteenoton ja määrittämisen aikaväli ei saa ylittää 18 tuntia. Menetelmässä kuvattuja käsittelyaikoja tulee noudattaa, jotta tutkimusta voidaan pitää luotettavana.

Menetelmä todettiin toimivaksi, ja verifiointi on valmis laboratorion arvioitavaksi. Laboratorio arvioi jatkossa otetaanko menetelmä käyttöön ja akkreditoidaanko se. Päätökseen vaikuttaa taloudellisuus ja kannattavuus, sillä näytteitä laboratoriolle tulee melko vähän ja menetelmä on melko työläs toteuttaa. Tulosten luotettavuus on tämän hetkessä tilanteessa arveluttava, sillä näytteiden käsittelyyn menee aikaa yli 24 tuntia, kun se lähetetään toiseen laboratorioon tutkittavaksi.

On erittäin tärkeää pystyä toteamaan *C. perfringens* -bakteeri talousvedestä luotettavasti, jotta säästytään mahdollisilta epidemioilta. Yksikin pesäke voi kertoa ulosteperäisestä saastumisesta, ja syy on aina selvitettävä.

Lähteet

- 1 Länsi-Uudenmaan vesi ja ympäristö ry. Länsi-Uudenmaan vesien asiantuntija. Verkkoaineisto. <http://www.esitteemme.fi/luvy/WebView/>. Luettu 3.12.2017.
- 2 Suomen Standardisoimisliitto SFS ry. 2016. SFS-EN ISO 14189:2016. Veden laatu. Clostridium perfringensin pesäkemäärän määrittäminen. Kalvosuodatusmenetelmä. Helsinki.
- 3 Huovinen, Pentti; Meri, Seppo; Peltola, Heikki; Vaara, Martti; Vahteri, Antti; Valtonen, Ville. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. 2005. Helsinki. Kustannus Oy Duodecim.
- 4 Salkinoja-Salonen, Mirja. 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä. Gummerus Kirjapaino Oy.
- 5 ESR Ltd. *Clostridium perfringens*. 2010. Verkkoaineisto. <file:///C:/Users/sarao/Downloads/Clostridium-Perfringens-Associated-With.pdf>. Luettu 26.2.2018.
- 6 Huovinen, Pentti; Meri, Seppo; Peltola, Heikki; Vaara, Martti; Vahteri, Antti; Valtonen, Ville. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja 2. 2007. Helsinki. Kustannus Oy Duodecim.
- 7 Salkinoja-Salonen Mirka. Mikrobiologian perusteita. 2002. Jyväskylä. Gummerus Kirjapaino Oy.
- 8 Valvira. Ohje 12/2016. Talusvesiasetuksen soveltamisohje. Osa III. Enimmäisarvojen perusteet. Helsinki. Verkkoaineisto. https://www.valvira.fi/documents/14444/261239/Talusvesiasetuksen_soveltamisohje_osa_III.pdf/81b18002-f37d-4be1-9ac7-f1d10fb43fc6. Luettu 4.1.2018.
- 9 Helsingin seudun ympäristöpalvelut –kuntayhtymä HSY. Vedenpuhdistuslaitokset. Pitkälampi ja Vanhakaupunki. Verkkoaineisto. <https://www.hsy.fi/fi/asiantuntijalle/vesihuolto/vedenpuhdistuslaitokset/Sivut/Pitkälampi-ja-Vanhakaupunki.aspx>. Viimeksi muokattu 3.11.2015. Luettu 3.12.2017.
- 10 Finlex. 683/2017. Sosiaali- ja terveysministeriön asetustalousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista annetun sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen muuttamisesta. Helsinki 6.10.2017. Verkkoaineisto. <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2017/20170683>. Luettu 1.4.2018.
- 11 Suomen standardisoimisliitto SFS. Standardien laadinta. Verkkoaineisto. https://www.sfs.fi/standardien_laadinta. Luettu 5.12.2017

- 12 Valvonta 13/1997. Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Helsinki.
- 13 Hägg, Margareta. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Espoo: Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy
- 14 Merck. Microbiology Manual 12th Edition. Verkkoaineisto. https://www.analytics-shop.com/media/Hersteller/Kataloge/millipore-de/Merck_Microbiology_Manual_12th_edition.pdf. Luettu 11.12.2017.
- 15 Hiltunen, Erkki; Linko, Linnéa; Hemminki, Sari; Hägg, Margareta; Järvenpää, Eila; Saarinen, Pertti; Simonen, Seppo; Kärhä, Petri. Julkaisu J4/2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. Espoo. Metrologian neuvottelukunta ja Mittatekniikan keskus. MIKES. Verkkoaineisto. www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2011-J4.pdf. Luettu 22.2.2018.

VERIFIOINTISUUNNITELMA,

CLOSTRIDIUM PERFRINGENSIN MÄÄRITTÄMINEN KVANTITATIIVISESTI, SFS-EN ISO 14189:2016

Tarkoituksena on validoida laboratoriolle uusi menetelmä, jolla voidaan määrittää *Clostridium perfringens* -bakteerin esiintymistä vesissä. Menetelmäohje luodaan standardin SFS-EN ISO 14189:2016 pohjalta.

Menetelmää varten tilataan uusia reagensseja ja tarvikkeita ammattilaisen toimesta. Työn suoritus voidaan aloittaa vasta tarvikkeiden saavuttua. Menetelmässä käytetään muuten tavanomaisia mikrobiologian välineitä.

Työn suoritus aloitetaan TSC-agarin (tryptosisulfiittisykloseriiniagar) valmistamisesta ja *Clostridium perfringens* -bakteerin elvyttämisestä. Pesäkkeestä tehdään laimennos-sarja, josta suodatetaan haluttu tilavuus kalvolle kalvosuodatusmenetelmällä. Kalvoa inkuboidaan valikoivan agarkasvualustan (TSC:n) päällä anaerobisesti (44 ± 1) °C:n lämpötilassa (21 ± 3) tunnin ajan. *C. perfringens* muodostaa yleensä mustia, harmaita tai keltaruskeita pesäkkeitä sulfiitin pelkistyessä sulfidiksi, joka reagoi kasvualustassa olevan rautapitoisen suolan kanssa. Tyypilliset pesäkkeet lasketaan, minkä jälkeen tehdään varmistustestit.

Menetelmä voidaan osoittaa toimivaksi tilattavan ampullin avulla, jossa bakteerin pitoisuus tunnetaan.

Mikäli aikatauluun sopii, tehdään SLV:n vertailukoe, johon osallistuu kolme eri henkilöä.

Testattavat suureet:

Toistettavuutta testataan rinnakkaisnäytteiden avulla (saman henkilön rinnakkaiset näytteet).

Uusittavuutta testataan eri laboranttien suorittamien analyysien yhteensopivuudella.

Oikeellisuutta tutkitaan tulosten keskiarvon yhtäpitävyydellä todellisen tai hyväksytyn arvon kanssa (onnistuminen vertailukokeissa).

Spesifisyyttä tutkitaan elatusaineen ja varmistustestin osalta.

Veden laatu. *Clostridium perfringens*in pesäkemäärän määrittäminen. Kalvosuodatusmenetelmä.

1 YLEISTÄ

Clostridium perfringens tiedetään yleisesti tärkeäksi ulosteperäisen saastumisen indikaattoriksi. Nämä gram-positiiviset bakteerit muodostavat eläinten ja ihmisten suolistokanavassa itiöitä, jotka kestävät kuumennusta paremmin kuin kasvulliset solut. *C. perfringens* esiintyy suolistossa sekä itiöinä, että kasvullisina soluina. Itiöitä havaitaan myös ympäristönäytteissä. *C. perfringens* -itiöt säilyvät vedessä kuukausia eli paljon kauemmin kuin kasvulliset ulosteperäiset indikaattoribakteerit, joten itiöiden esiintyminen voi ilmentää kaukaista tai ajoittaista ulosteperäistä saastumista. *C. perfringens*in esiintymisen seuranta on osoittautunut hyödylliseksi vesivarojen laadun arvioinnissa ja vedenkäsittelyn vaiheiden tarkistuksessa, kun arvioidaan käsittelylaitoksen toimintaa. Tavanomaiset desinfiointimenettelyt (esim. klooraus) eivät aina inaktivoi näitä itiöitä.

1.1 Soveltamisala

Tässä menetelmäohjeessa määritellään kalvosuodatusmenetelmä, jolla määritetään *Clostridium perfringens*in kasvullisten solujen ja itiöiden lukumäärä talousvedestä otetuista näytteistä. Menetelmää voidaan soveltaa kaikentyyppisiin vesinäytteisiin, paitsi sellaisiin, jotka sisältävät suodatusta haittaavia hiukkasia tai kolloidista ainetta.

1.2 Velvoittavat viittaukset

Tässä asiakirjassa viitataan seuraaviin asiakirjoihin tai niiden osiin, jotka ovat välttämättömiä, jotta tätä asiakirjaa voidaan käyttää. Jos viittaus on päivätty, tätä asiakirjaa koskee vain siinä mainittu painos. Jos viittaus on päiväämätön, sovelletaan sen viimeisintä painosta sekä muutoksia.

ISO 8199¹), Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture.

ISO/TS 11133-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.

ISO 194582), Water quality — Sampling for microbiological analysis.

ISO/IEC Guide 2:2004, Standardization and related activities — General vocabulary.

1.3 Termit ja määritelmät

Alustavat Clostridium perfringensit ovat bakteereja, jotka tuottavat vaihtelevan sävyisiä mustia, harmaita tai keltaruskeita pesäkkeitä tryptosisulfiittisykloseriiniagarilla, kun niitä inkuboidaan (44 ± 1) °C:ssa (21 ± 3) tunnin ajan.

HUOM. Toisin kuin suoraan agaralustalla kasvavat pesäkkeet, kalvolla kasvavat pesäkkeet eivät aina mustu selvästi, joten myös vaaleansävyiset pesäkkeet otetaan huomioon laskennassa.

Varmistetut Clostridium perfringensit ovat bakteereja, jotka tuottavat tyypillisiä pesäkkeitä tryptosisulfiittisykloseriiniagarissa ja joilla on hapan fosfataasientsyymi.

1.4 Periaate

Mitattu näytetilavuus tai näytteen laimennos suodatetaan kalvolle, jonka huokoskoko (0,45 µm) on riittävä pidättämään klostridi-itiöitä. Kalvoa inkuboidaan valikoivan tai erottelevan agar-kasvualustan (tryptosisulfiittisykloseriiniagar) päällä **anaerobisesti** (44 ± 1) °C:n lämpötilassa (21 ± 3) tunnin ajan. *C. perfringens* muodostaa yleensä mustia, harmaita tai keltaruskeita pesäkkeitä sulfiitin pelkistyessä sulfidiksi, joka reagoi kasvualustassa olevan rautapitoisen suolan kanssa. Tyypilliset pesäkkeet lasketaan, minkä jälkeen tehdään varmistustestit. Tulos lasketaan pesäkkeiden lukumääränä näytteen tilavuutta kohti.

HUOM. 1. Kasvualusta sisältää sykloseriiniä valikoivana aineena, joka estää *Bacillus*-suvun lajien kasvun.

HUOM. 2. Inkubointi 44 °C:ssa parantaa testauksen selektiivisyyttä *C. perfringensin* suhteen.

2 LAITTEET JA VÄLINEET

Välineet steriloidaan standardin ISO 8199 mukaisesti, paitsi jos kyseessä ovat steriileinä toimitetut kertakäyttöiset lasi- tai muoviastiat. Käytetään tavanomaisia mikrobiologian välineitä ja erityisesti seuraavia välineitä:

1. Kalvosuodatuslaitteisto, joka on standardin ISO 8199 mukainen.
2. Steriilejä suodatussuppiloita. Laitteisto, jossa on kolme suppiloa. Suppiloissa on merkit 100 ja 50 ml kohdissa. Metalliset suppilot liekitetään ennen käyttöä ja näytteiden välillä.
3. Steriilejä kalvosuodattimia, joiden ilmoitettu huokoskoko on 0,45 µm. Kalvosuodattimien laatu saattaa vaihdella eri merkkien välillä ja jopa erästä toiseen. Tämän vuoksi on suositeltavaa tarkistaa niiden laatu säännöllisesti.
4. Lämpökaapit, jonka lämpötilaksi voidaan asettaa $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ja $(44 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
5. Autoklaavi, jonka lämpötilaksi voidaan asettaa $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$.
6. Steriilit pinsetit.
7. Anaerobisia astioita tai vastaavia välineitä.
8. Anaerobinen kaasugeneraattori, jolla tuotetaan kaasuseos, joka sisältää noin 90 % vetyä ja 10 % hiilidioksidia.

3 KASVUALUSTAT JA REAGENSIT

Elatusaine valmistetaan elatusainerekisterissä annettujen ohjeiden mukaisesti.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kaupallisesti saatavilla olevia valmiita kuivatettuja kasvualustoja ja reagensseja, jotka valmistetaan ja joita käytetään valmistajan ohjeiden mukaisesti. Muita kemikaalilaatuja voidaan käyttää, mikäli niiden voidaan osoittaa antavan samoja tuloksia.

3.1 Tryptoosisulfiittisykloseriiniagar (TSC-agar)

3.2 Veriagar tai muu sopiva ravintoagar esimerkiksi tryptonisoija-agar

3.3 Happaman fosfataasin osoittava reagenssi

HUOM. 1. Reagenssi on myrkyllistä ja voi aiheuttaa syöpää.

4 NÄYTTEIDEN OTTO JA SÄILYTYS

4.1 Näytteenotto

Näytteenotto-ohjeet mikrobiologista tutkimusta varten on esitetty standardissa ISO 19458.

HUOM. 1. Jos tutkittava **vesi on kloorattua**, jäljelle jäänyt vapaa tai sitoutunut kloori inaktivoidaan lisäämällä natriumtiosulfaattiliuosta (3.3) näytepulloihin ennen sterilointia. 500 millilitran näytepulloon lisätään 0,5 millilitraa natriumtiosulfaattiliuosta, joka inaktivoi vähintään 5 mg klooria.

HUOM. 2. Täytä näytepullo piripintaan, niin että sinne ei jää yhtään ilmaa.

4.2 Näytteiden kuljetus ja säilytys

Tutkimus aloitetaan mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Kuljetuksen ajaksi näytteet olisi mieluiten jäähdytettävä (5 ± 3) °C:seen. Kasvullisten bakteerien pisin suositeltava säilytysaika on 12 tuntia. Säilytysaika kuljetus mukaan luettuna ei saa ylittää yli 18 tuntia.

5 SUORITUS

5.1 Suodatus

1. Pinsetit steriloidaan kastamalla etanoliin ja polttamalla niihin jäänyt etanoli liekissä. Suodatinkalvo asetetaan jäähdytetyillä pinseteillä steriloidun suodatinlaitteen huokoiselle levyille.
2. Näyte sekoitetaan ravistamalla pulloa voimakkaasti. Tarvittaessa näyte laimennetaan menettelytapaohjeen MTO 302, *Vesien mikrobiologiset määrittelyt: näytteiden laimentaminen ja tulosten laskeminen* mukaan.
3. Tutkittavan näytteen määrä riippuu oletetusta bakteeritiheydestä. Yleensä talousvedet tutkitaan 100 tai 50 ml:n erät.
4. 100 ja 50 millilitran tilavuus katsotaan suodatinsuppilon sisäpuolen viivoista. 10 ja 1 millilitran määrä pipetoidaan.
5. Mikäli suodatettava näytetilavuus on alle 20 millilitraa, suodatinsuppilon pohjalle lisätään steriiliä laimennusvettä ennen näytteen pipetointia, jotta bakteerit jakautuvat tasaisesti koko kalvolle.
6. Vesi saadaan virtaamaan kalvon läpi imun avulla. Kun kaikki vesi on läpäissyt kalvon, kalvo siirretään steriileillä pinseteillä kasvualustalle (3.1) sama puoli ylöspäin kuin suodatuksen aikana. Kalvon alle ei saa jäädä ilmakuplia.
7. Suodatussuppilo steriloidaan näytteiden välillä polttamalla siinä etanolia 20–30 sekuntia. Suppilo jäähdytetään suodattamalla sen läpi steriiliä vettä.

5.2 Laadunvarmistus

Tryptonisulfiittisykloseriiniagarin (TSC-agar) testaus positiivisen kontrollin avulla. Positiivisena kontrollina käytetään *C. perfringens* -suspensiota. Suodatettava tilavuus valitaan siten, että se sisältää 10–80 pmy (pesäkettä muodostavaa yksikköä) ja kontrollinäyte käsitellään kuin näyte. Tulosta verrataan valikoimattomalla agarilla, esimerkiksi veriagarilla, saatuun tulokseen. *C. perfringensin* suspension sijaan voidaan myös käyttää vertailumateriaaleja.

Jokaiseen analyysierään on sisällytettävä nollakoe. Suodatetaan 100 ml steriiliä vettä tai muuta sopivaa standardin ISO 8199 mukaista laimennusliuosta ja jatketaan sen käsittelyä samalla tavoin kuin näytettä käsiteltäessä, mutta pastöroimatta sitä. Inkuboinnin jälkeen ei saisi olla pesäkkeitä.

Oikeat anaerobiset olosuhteet tarkistetaan kontrollimenetelmällä (esim. anaerobisella indikaattorinauhalla) aina, kun tehdään anaerobinen inkubointi (anaerobisessa astiassa tai inkubaattorissa).

Viljele kerran viikossa vähintään yhdestä näytteestä rinnakkaisnäyte. Rinnakkaismäärittämiä tehdään satunnaisesti kaikista vesityypeistä (talousvesi, vesistö, jätevesi).

5.3 Inkubointi

Suodatinkalvon TSC-agarille asettamisen ja inkuboinnin aloittamisen välisen ajan olisi oltava mahdollisimman lyhyt, eikä tämä aika saa olla yli tunnin pituinen.

Maljoja inkuboidaan **anaerobisesti** (44 ± 1) °C:n lämpötilassa (21 ± 3) tunnin ajan ylösalaisin käännettyinä, jotta tiivistyvä vesi ei aiheuta häiriötä.

5.4 Pesäkkeiden laskeminen

Kasvatuksen jälkeen määritetään alustava *C. perfringens* -määrä laskemalla kaikki pesäkkeet, joissa näkyy värin haaleudesta riippumatta mustaa, harmaata tai keltaruskeaa TSC-kasvualustan värjäytymistä, kun sitä tarkastellaan joko kalvosuodattimen ylä- tai alapuolelta.

HUOM. Maljat täytyy laskea 30 minuutin kuluessa anaerobisen inkuboinnin lopettamisesta, sillä pesäkkeiden musta väri haalistuu nopeasti.

5.5 Varmistus

5.5.1 Jatkoviljely

Varmistusta varten jatkoviljellään kaikki pesäkkeet (jos niiden lukumäärä on 1–10) tai vähintään 10 satunnaisesti otettua pesäkettä **veriagarmaljoille**. Jos tämä ei ole käytännössä mahdollista, olisi tarkastettava jokainen tyypillinen pesäke suodatinkalvon osa-alueelta. Positiivisena kontrollina käytettävää *C. perfringens* -kanta viljellään veriagarmaljalle tässä vaiheessa.

Maljoja inkuboidaan anaerobisesti (36 ± 2) °C:n lämpötilassa (21 ± 3) tunnin ajan.

5.5.2 Hapan fosfataasi -testissä käytettävät kontrollit

Varmistustestissä käytetään positiivisena kontrollina *Clostridium perfringens* ATCC 13124 -kanta. Negatiivisena kontrollina on käytettävä kanta *Escherichia coli* ATCC 25922.

5.5.3 Hapan fosfataasi -testi

Anaerobisesti veri- tai ravintoagarmaljoilla kasvatettuja pesäkkeitä levitetään suodatinpaperille ja pesäkkeille tiputetaan 2–3 pisaraa happaman fosfataasin osoittavaa reagenssia. Purppuranpunaisen värin kehittyminen 3–4 minuutin kuluessa katsotaan positiiviseksi reaktioksi.

6 TULOKSET

Tulokset lasketaan menettelytapaohjeen MTO 302, *Vesien mikrobiologiset määritykset: Näytteiden laimentaminen ja tulosten laskeminen* mukaan.

Varmistetuiksi *Clostridium perfringens* pesäkkeiksi voidaan tulkita väriltään mustat, harmaat, keltaruskeat ja hailakanväriset pesäkkeet TSC-agarissa ja sillä täytyy olla hapan fosfataasi -entsyymi.

Tulokset ovat luotettavimmillaan, kun tyypillisten pesäkkeiden määrä kalvoa kohti on 10–100 pesäkettä.

Pesäkkeiden kokonaismäärästä ja varmistettujen pesäkkeiden lukumäärästä lasketaan alustavien *C. perfringens* -pesäkkeiden ja *C. perfringens* -pesäkkeiden lukumäärä suodatettua 100 ml:aa kohden standardin ISO 8199 mukaisesti.

Tarvittaessa koetulosten hajonta olisi arvioitava standardin ISO 29201 mukaisesti.

Tulos ilmoitetaan 100 millilitraa kohti (pmy/100 ml). Tuloksen yhteydessä ilmoitetaan inkubointilämpötila ja -aika. Mineraalivedelle, lähdevedelle ja muille pakatuille vesille tulos ilmoitetaan 250 ml kohti (pmy/250 ml).

Ilmoitustarkkuus

Tulokset ilmoitetaan seuraavasti:

pesäkkeiden lukumäärä pmy

0

1-99

>100

ilmoitustarkkuus

0

kokonaislukuna

kahdella merkitsevällä numerolla

(esim. 120, 1100)