

# COLILERT®-MENETELMÄN VALIDOINTI TALOUSVESIEN KOLIFORMEILLE JA E. COLILLE

Jenni Hänninen

Opinnäytetyö  
Joulukuu 2010

Laboratorioala  
Tekniikan ja liikenteen ala





Tekijä(t) HÄNNINEN, Jenni	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 01.12.2010
	Sivumäärä 48	Julkaisun kieli suomi
	Luottamuksellisuus ( ) saakka	Verkkojulkaisulupa myönnetty ( X )
Työn nimi COLILERT® -MENETELMÄN VALIDOINTI TALOUSVESIEN KOLIFORMEILLE JA E.COLILLE		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) LEPPÄ-AHO, Jaakko, lehtori		
Toimeksiantaja(t) Jyväskylän kaupungin ympäristötoimen laboratorio LUOMA, Aija, mikrobiologi		
TIIVISTELMÄ <p>Turvallisen talousveden laatua määriteltäessä lähtökohtana on se, että veden käyttäminen tavanomaisina määrinä ei aiheuta ihmiselle terveydellisiä riskejä. Ulosteperäisen saastumisen havaitseminen ja laajuus ovat tärkeitä tekijöitä arvioitaessa veden laatua ja riskitekijöitä. <i>Escherichia coli</i> – bakteerin ja koliformisten bakteerien läsnäolo, vaikka se ei ole todiste ulosteperäisestä saastumisesta, saattaa osoittaa vedenkäsittelyn tai – jakelun toimimattomuuden.</p> <p>Työn tarkoituksena oli tuottaa tarvittava tieto uuden menetelmän validointiin Jyväskylän kaupungin ympäristötoimen laboratoriossa. Validoinnin tarkoituksena oli osoittaa, että laboratorio on pätevä käyttämään testattua menetelmää talousvesien <i>Escherichia coli</i> – bakteerin ja koliformisten bakteerien määrittämisessä.</p> <p>Referenssimenetelmänä tutkimuksissa käytettiin SFS 3016:2001 – standardin mukaista kalvosuodatusmenetelmää ja testattavana menetelmänä IDEXX:n Colilert® Quanti-Tray. Menetelmän etuna kalvosuodatukseen verrattuna ovat muun muassa huomattavasti lyhyempi inkubointiaika (vain 18 tuntia) ja se, että menetelmä antaa samanaikaisesti sekä koliformisten bakteerien että <i>E. coli</i> – bakteerien lukumäärät.</p> <p>Validointimäärittämisistä saatujen tulosten perusteella laskettiin uusittavuudelle keskihajonnat ja määritettiin menetelmän spesifisyys ja suhteellinen oikeellisuus.</p> <p>Työssä saatujen tulosten perusteella menetelmän todettiin täyttävän laboratorion laatuvaatimukset ja laboratorio osoitti olevansa pätevä käyttämään kyseistä menetelmää. Menetelmä voitiin ottaa käyttöön talousvesimatriisille.</p>		
Avainsanat (asiasanat) mikro-organismit, <i>Escherichia coli</i> , kolibakteerit, vedenlaatu, Colilert® Quanti-Tray		
Muita asioita		



Author(s) HÄNNINEN, Jenni	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 01.12.2010
	Pages 48	Language Finnish
	Confidential ( ) Until	Permission for web publication ( X )
Title VALIDATION OF THE COLILERT METHOD FOR DETECTING COLIFORMS AND E.COLI FROM WATER FOR HOUSEHOLD CONSUMPTION		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) LEPPÄ-AHO, Jaakko, Lecturer		
Assigned by The Laboratory of Environmental Office of Jyväskylä LUOMA, Aija, Microbiologist		
Abstract <p>When defining the quality of drinking safe water, the principle is that the use of water in normal amounts cannot cause health risks to humans. The presence and scale of faecal contamination are important factors when assessing the quality of water and the risk factors. The presence of bacterium <i>Escherichia coli</i> and other coliform bacteria, though it is not proof of faecal contamination, may point out the inoperability of water treatment or distribution.</p> <p>The object of this study was to provide necessary information for the validation of a new method in the Laboratory Environmental Office of Jyväskylä. The purpose of this validation was to prove that the laboratory is qualified to use the tested method in determining bacterium <i>Escherichia coli</i> and other coliform bacteria in water for household consumption.</p> <p>As a reference method membrane filtration in accordance with SFS 3016:2001 –standard was used. The tested method was IDEXX's Colilert® Quanti-Tray. Its benefits compared to membrane filtration include a much shorter incubation time (only 18 hours) and that the method gives the number of <i>Escherichia coli</i> and other coliform bacteria simultaneously.</p> <p>Based on the results obtained from the tests, standard deviations for reproducibility were calculated and the specificity and relative accuracy were determined.</p> <p>As a result, the method was found out to fulfill the laboratory's quality requirements, and the laboratory proved itself to be qualified to use the studied method. The Colilert® Quanti-Tray – method was thus adopted for use in determining the quality of water for household consumption.</p>		
Keywords microorganisms, <i>Escherichia coli</i> , coliforms, water quality, Colilert® Quanti-Tray		
Miscellaneous		

## SISÄLTÖ

1	OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT .....	5
1.1	Opinnäytetyön tavoite.....	5
1.2	Jyväskylän kaupungin ympäristötoimen laboratorio .....	5
2	KOLIFORMIT JA ESCHERICHIA COLI .....	6
2.1	Koliformiset bakteerit.....	6
2.2	Lämpökestoiset koliformit.....	7
2.3	Escherichia coli .....	7
3	TALOUSVESI.....	9
3.1	Talousveden määritelmä ja valmistustavat.....	9
3.2	Talousveden laatu.....	10
3.2.1	Talousveden mikrobiologiset laatuvaatimukset .....	10
3.2.2	Talousveden laadun säännöllinen valvonta .....	11
4	MIKROBIOLOGISEN MENETELMÄN VALIDOINTI.....	12
4.1	Menetelmän validointi .....	12
4.2	Mikrobiologisiin menetelmiin liittyvä epävarmuus.....	13
4.3	Standardi- ja referenssimenetelmä.....	14
4.4	Validointiin liittyviä suureita.....	14
4.4.1	Oikeellisuus .....	14
4.4.2	Täsmällisyys.....	15
4.4.3	Toteamis- ja määrittäysraja.....	15
4.4.4	Spesifisyys ja herkkyys (sensiitivisyys) .....	16
4.4.5	Lineaarisuus.....	16
4.5	Mikrobien ja pitoisuuksien valinta .....	17
4.6	Tulosten arviointi.....	18

	2
5 REFERENSSIMENETELMÄ .....	19
5.1 Periaate.....	19
5.2 Varmistustestit .....	20
6 VALIDOITAVA MENETELMÄ.....	21
6.1 Colilert® Quanti-Tray -menetelmä .....	21
6.1.1 Colilert®-18 -reagenssi .....	21
6.1.2 Quanti-Tray® / Quanti-Tray® 2000 -liuskat.....	22
6.1.3 Quanti-Tray®-sulkijalaite.....	24
6.2 Testin suorittaminen .....	24
6.2.1 Kvalitatiivinen testi.....	24
6.2.2 Kvantitatiivinen testi .....	25
6.2.3 Tulosten tulkinta .....	26
6.2.4 Huomioitavia seikkoja testiä suorittaessa.....	27
6.3 Edut referenssimenetelmään nähden.....	27
6.4 Laadunvarmistus.....	28
7 VALIDOINNIN SUORITTAMINEN .....	28
7.1 Validoinnin suunnittelu .....	28
7.2 Validointimääritykset .....	29
8 TULOKSET JA POHDINTAA .....	30
8.1 Esimääritysten tulokset .....	30
8.2 Matriisin vaikutus .....	31
8.3 Suhteellinen oikeellisuus .....	32
8.4 Uusittavuus.....	33
8.5 Spesifisyys.....	35
8.6 Luonnolliset näytteet.....	36
9 POHDINTA .....	38
9.1 Johtopäätökset työstä ja sen tuloksista .....	38

9.2 Oma kehittyminen opinnäytetyötä tehdessä.....	39
LÄHTEET.....	41
LIITTEET .....	43
Liite 1. 51-Well Quanti-Tray® MPN-taulukko.....	43
Liite 2. Validointitulokset matriiseittain.....	44
Liite 3. Suhteellinen oikeellisuus: interkalibrointitulokset.....	45
Liite 4. Uusittavuus: tulokset ja laskutoimitukset matriiseittain. ....	46

## KUVIOT

KUVIO 1. Koliformit käyttävät $\beta$ -galaktosidaasi-entsyymiään hajottamaan ONPG-substraatin ja muuttavat sen värittömästä keltaiseksi (Colilert® Brochure 2008). ....	22
KUVIO 2. E.coli käyttää $\beta$ -glukuronidaasi-entsyymiään hajottamaan MUG-substraatin ja fluoresoi UV-valossa (Colilert® Brochure 2008). ....	22
KUVIO 3. Quanti-Tray®-liuska (Colilert® Brochure 2010).....	23
KUVIO 4. Quanti-Tray®/2000-liuska (Colilert® Brochure 2010) .....	23
KUVIO 5. Quanti-Tray® Sealer ja ajoliuskat (Quanti-Tray® Brochure). ....	24
KUVIO 6. Reagenssin lisääminen (Colilert® Brochure 2010). ....	25
KUVIO 7. Kaadetaan näyte Quanti- Tray-liuskaan (Colilert® Brochure 2010).....	25
KUVIO 8. Quanti-Tray-liuska suljetaan Quanti-Tray®-sulkijalla ja inkuboidaan $35\pm 0,5$ asteen lämpötilassa 18 tuntia (Colilert® Brochure 2010). ....	26
KUVIO 9. Luetaan Quanti-Tray-liuska ja ilmoitetaan tulokset MPN-taulukon avulla (Colilert® Brochure 2010). ....	26
KUVIO 10. Eri matriisien tulosten keskiarvojen vertailu. ....	31
KUVIO 11. Suhteellinen oikeellisuus, koliformit .....	32
KUVIO 12. Suhteellinen oikeellisuus (E.coli) .....	32
KUVIO 13. Luonnolliset näytteet, koliformit .....	37
KUVIO 14. Luonnolliset näytteet, E.coli .....	38

**TAULUKOT**

TAULUKKO 1. Tunnetut <i>Escherichia coli</i> -kannat .....	8
TAULUKKO 2. Jäteveden alustava mikrobipitoisuus .....	29
TAULUKKO 3. Arviot ympin alustavista mikrobipitoisuuksista .....	30
TAULUKKO 4. Jätevesiympin pitoisuudet.....	30
TAULUKKO 5. Rinnakkaistulokset vesijohtovesimatriisille Colilertilla (koliformit) .....	33
TAULUKKO 6. Rinnakkaistulokset vesijohtomatriisille Colilertilla ( <i>E.coli</i> ).....	33
TAULUKKO 7. Uusittavuus: koliformien ja <i>E.coli</i> -bakteerin tulosten keskihajonnat ..	35
TAULUKKO 8. Luonnolliset näytteet.....	37

# 1 OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT

## 1.1 Opinnäytetyön tavoite

Ulosteperäisen saastumisen läsnäolo ja laajuus ovat tärkeitä tekijöitä arvioitaessa talousveden laatua ja riskitekijöitä. Vesinäytteen ulostusperäinen saastuminen saadaan osoitettua tutkimalla, onko siinä normaalisti ihmisen ja tasalämpöisten eläinten suolistossa elävää *Escherichia coli* – bakteeria. Usein tutkitaan myös koliformisten bakteerien läsnäolo. Koliformisten bakteerien läsnäolo ei ole todiste ulosteperäisestä saastumisesta, koska osa koliformisista bakteereista elää maaperässä ja makeassa pintavedessä eivätkä ne aina ole suolistoperäisiä. Koliformisten bakteerien läsnäolo saattaa kuitenkin osoittaa vedenkäsittelyn tai -jakelun toimimattomuuden. (SFS-EN ISO 9308-1, 2001.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tuottaa tarvittava tieto uuden menetelmän validointiin Jyväskylän kaupungin ympäristötoimen mikrobiologian laboratoriossa. Validoinnin tarkoituksena oli osoittaa, että laboratorio on pätevä käyttämään Colilert® Quanti-Tray -menetelmää talousvesien *Escherichia coli* -bakteerin ja koliformisten bakteerien määrittämisessä. Referenssimenetelmänä käytettiin standardin SFS 3016:2001 mukaista kalvosuodatusmenetelmää. Uimavesille Colilert®-menetelmän validointi oli suoritettu jo aiemmin. Tästä validoinnista saatuja tietoja hyödynnettiin validoitaessa vastaavaa menetelmää talousvesille.

## 1.2 Jyväskylän kaupungin ympäristötoimen laboratorio

Jyväskylän kaupungin ympäristötoimen laboratorion päätehtävänä on tarjota ympäristöterveydenhuollon ja ympäristönsuojelun viranomaisille ja sekä paikalliselle että maakunnan elinkeinoelämälle niiden tarvitsemia laboratoriopalveluita. Laboratorion päätoimiala on talous- ja uimaveden sekä elintarvikkeiden kemiallinen ja mikrobiologinen testaaminen. Lisäksi laboratorio tutkii mm. jäte-, uloste- ja hygienianäytteitä. Ympäristötoimen laboratorion palveluita käyttävät kaupungin omat sekä useiden muiden Keski-Suomen kuntien ja kuntainliittojen terveys- ja

ympäristötarkastajat ja alueella toimivat eläinlääkärit. Laboratorion huomattavan ja taloudellisesti tärkeän asiakasryhmän muodostavat teollisuuden ja kaupan yritykset sekä yksityishenkilöt Jyväskylässä ja maakunnassa. (Laatukäsikirja 2010, 1.)

## 2 KOLIFORMIT JA ESCHERICHIA COLI

### 2.1 Koliformiset bakteerit

Vesien bakteriologiassa koliformit määritellään siten, että ne ovat gramnegatiivisia, itiöttömiä sauvabakteereja, jotka fermentoivat laktoosia tuottaen samalla happoa ja kaasua (laktoosiposiitivinen) 21 tunnin kuluessa 37 °C:n lämpötilassa. Koliformit ovat oksidaasinegatiivisia bakteereita. Koliformien ryhmä sisältää monenlaisia organismeja, joista suurin osa on suolistoperäisiä. Koliformien ryhmään kuuluu yleinen suoliston bakteeri *Escherichia coli* sekä harvemmin suolistossa esiintyvä *Klebsiella pneumoniae*. Määritelmä ottaa mukaan myös *Enterobacter aerogenes* -lajin organismit, joita ei yleisesti yhdistetä suolistoon. Tarkemmin sanottuna koliformisten bakteerien ryhmä koostuu noin 12 suvun lajeista, yleisimpänä jo mainitut *Escherichia*-, *Enterobacter*- ja *Klebsiella*-suvut sekä *Citrobacter*-, *Serratia*- ja *Rahnella*-sukujen lajit. (Madigan & Martinko 2006, 59; Salkinoja-Salonen 2002, 623; SFS 3016 2001, 2.)

Koliformiset bakteerit ovat hyviä veden saastumisen indikaattoreita, sillä ne ovat sekä ihmisillä että tasalämpöisillä eläimillä yleisiä ruuansulatuskanavassa ja niitä esiintyy suurina määrinä suolistossa. Koliformien ryhmään kuuluu kuitenkin myös ei-ihmisperäisiä lämminverisistä eläimistä peräisin olevia bakteereita (*Salmonella*, *Leptospira*), jotka infektoivat myös ihmisiä. Tämän vuoksi on saastumisen osoittamiseksi käytettävä indikaattoria, joka osoittaa sekä ihmis- että eläinperäisen saastumisen. (Madigan ym. 2000, 974.)

## 2.2 Lämpökestoiset koliformit

Lämpökestoiksi koliformisiksi bakteereiksi kutsutaan sellaisia bakteereita, jotka kykenevät tuottamaan laktoosista happoa ja kaasua myös 44,5 °C:n lämpötilassa. Tähän ryhmään kuuluvat lähinnä *E. coli* ja *K. pneumoniae*. Näistä *E. coli* on paras ulosteperäisen saastumisen indikaattori, koska sitä tavataan ihmisten ja eläinten ulosteissa mutta ei juuri muissa ympäristöissä. *K. pneumoniae* -bakteereita tavataan ulosteiden lisäksi myös kasveissa ja mm. puunjalostusteollisuuden jätevesissä. *E. coli* voidaan erottaa *K. pneumoniae* -bakteereista jatkotutkimuksin indolikokeen avulla. (Soveltamisopas talousvesiasetukseen 461/2000 liite 3, 4.)

## 2.3 Escherichia coli

*E. coli* -bakteereilla tarkoitetaan bakteereja, jotka koliformisille bakteereille määriteltyjen ominaisuuksien lisäksi tuottavat laktoosista happoa ja kaasua 44,5 °C lämpötilassa (laktoosiposiivinen) ja tryptofaanista indolia 44,5 °C:ssa 21 tunnin kuluessa (indoliposiivinen). Vaihtoehtoisena *E. colin* tunnusmerkkinä voidaan käyttää  $\beta$ -glukuronidaasi-entsyymien tuottoa, koska tätä entsyymiä tuottavat *E. colin* lisäksi vain harvat enterobakteerit (*Salmonella*, *Shigella*). *Escherichia coli* -bakteeri on noin 1 - 2  $\mu\text{m}$  leveä ja noin 3  $\mu\text{m}$  pitkä. *E. coli* on fakultatiivisesti anaerobinen, eli se kykenee tarpeen mukaan elämään sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa. (Salkinoja-Salonen 2002, 619–623; SFS 3016 2001, 2.)

*Escherichia coli* on ihmisten ja eläinten suolistossa oleva *Enterobacteriaceae* -heimoon kuuluva yleinen ja harmiton bakteeri. *E. coli* jaetaan eri serotyyppeihin soluseinän rakenteesta johtuvien O-antigeenien, flagellaaristen H-antigeenien ja kapselista johtuvien K-antigeenien perusteella. Yleensä kannasta määritetään O- ja H-antigeenit, jolloin O-antigeenit kertovat seroryhmän ja H-antigeenit serotyypin. (Korkeala 2007, 65.)

Ihmisten suolistopatogeeniset *E.coli*-bakteerit jaetaan taudinaiheuttamiskykynsä mukaan kuuteen eri muotoon (ks. taulukko 1), joilla on erilaisia epidemiologisia piirteitä. Myös eri serotyypit saattavat olla näiden erilaisten tautimuotojen aiheuttajia. Suoliston turvallisia kolibakteereita tunnetaan tuhansia erilaisia. Niiden lisäksi on olemassa useita kolibakteeriryhmiä, ns. enterovirulentit kolibakteerit, jotka leviävät elintarvikkeiden välityksellä aiheuttaen ripulitauteja eri mekanismeilla. Leviäminen voi tapahtua minkä tahansa elintarvikkeen välityksellä, koska enterovirulentit kolit ovat yleensä ulosteperäisiä. Suomessa ne eivät kuitenkaan kuulu normaalimikrobistoon. (Korkeala 2007, 65; Salkinoja-Salonen 2002, 619–620.)

**TAULUKKO 1. Tunnetut *Escherichia coli* -kannat**

Nimi	Lyhenne	Oireita, esiintyminen
Enterotoksigeeniset kannat	ETEC	suurin turistiripulien syy, vetinen ripuli
Enterohemorragiset kannat	EHEC	Serotyyppi O157:H7 tarttuvain, tuottaa potilaan suolistossa ns. shigatoksiinia, aiheuttaa veriripulia ja munuaisten toimintahäiriöitä
Enteropatogeeniset kannat	EPEC	vetinen ripuli, esiintyy pikkulapsilla, Suomessa harvinainen
Enteroinvasiiviset kannat	EIEC	verinen ripuli, muistuttaa punatautia
Enteroaggregatiivinen kanta	EAEC	vauvoilla ja pikkulapsilla, lyhyt itämisaika ja pitkä kesto
Diffuusisti adherantti kanta	DAEC	lievä ripuli, 1-5 vuoden iässä
Lisäksi muita <i>E. coli</i> –ripulikantoja, joita esiintyy lasten pitkittyneiden ripuleiden yhteydessä. Ne poikkeavat ominaisuuksiltaan keskenään ja suolistoinfektioita aiheuttavista kolibakteereista.		

## 3 TALOUSVESI

### 3.1 Talousveden määritelmä ja valmistustavat

Talousvedellä tarkoitetaan kaikkea sitä vettä, jota käytetään juomavetenä, elintarvikkeiden käsittelyyn tai elintarvikkeiden kanssa kosketuksiin joutuvien astioiden tai välineiden puhdistamiseen. Lähes 4,7 miljoonaa suomalaista saa talousvetensä vesihuoltolaitoksista, ja noin puoli miljoonaa asukasta on oman kaivoveden varassa. Talousveden valmistukseen käytetään pinta- ja pohjavettä. Noin 42 prosenttia talousvedestä valmistetaan pintavedestä, ja loppu 58 prosenttia valmistetaan joko pohja- tai tekopohjavedestä. Pohjaveden laatu on yleensä parempi kuin pintaveden, joten pohjaveden osuutta pyritään lisäämään. (Hänninen 2007, 380–381.)

Pohjavedellä tarkoitetaan kaikkea maanpinnan alaista vettä. Sitä saadaan parhaiten sora- ja hiekkamuodostumista pohjavesialueilta, joita on Suomessa noin 6600. Näillä alueilla muodostuu noin 6 miljoonaa kuutiota pohjavettä vuorokaudessa. Vesilaitosten jakamasta vedestä noin 60 % on pohjavettä. Haja-asutusalueilla käytetään lähes yksinomaan kaivoista tai lähteistä saatua pohjavettä. Tavallisin tapa on pumpata pohjavettä suoraan maahan kaivetusta kaivosta käyttövedeksi. Kaivot voivat olla joko rengas- tai porakaivoja. Suomen pohjavesi on useimmiten hyvälaatuista, eikä sitä siitä syystä käsitellä muuten kuin kalkilla pH:n nostamiseksi. Joissakin laitoksissa käytetään NaOH:a pH:n nostamiseksi, mutta sen käytöstä pyritään lähiaikoina luopumaan kokonaan. Suurta mangaani- ja rautapitoisuutta vähennetään ilmastamalla, minkä jälkeen vesi suodatetaan hiekkakerroksen läpi. Näin käsiteltyä talousvettä ei yleensä desinfioida, mutta viime vuosina useat pohjavesilaitokset ovat hankkineet UV-laitteiston veden desinfektoimiseksi mikrobiologisen laadun turvaamiseksi. (Hänninen 2007, 381–382.)

Tekopohjavettä muodostetaan imeyttämällä pintavettä maaperään esimerkiksi imeyttämällä tai sadettamalla. Yleisin tekniikka on rantaimetytys, koska järvet sijaitsevat useimmiten hiekkaharjujen välissä. Tekopohjavettä valmistetaan myös

pumppaamalla ja sadettamalla pintavettä harjumuodostuman päälle, josta vesi suodattuu maakerrosten läpi peruskallion päälle pohjavedeksi. Tällä valmistustavalla parannetaan veden laatua ja poistetaan huonolaatuisesta pintavedestä esimerkiksi makua huonontavia aineita. Suodatetulle vedelle tehdään tarvittavat jatkokäsittelyt, kuten desinfektointi. Suomessa on noin 25 tekopohjavesilaitosta, jotka tuottavat noin 12 prosenttia talousvedestä. (Hänninen 2007, 383.)

Talousveden valmistaminen pintavedestä on monivaiheinen prosessi, jossa muun muassa poistetaan haitalliset mikrobit, humus ja muu vedessä oleva orgaaninen aines. Valmistettu vesi käsitellään desinfektiokemikaaleilla sekä pintavesissä esiintyvien taudinaiheuttajien tuhoamiseksi että verkostossa tapahtuvan mikrobien jälkikasvun estämiseksi. Talousveden valmistusmenetelmät vaihtelevat vesilaitoksittain ja yleensä puhdistuksen vaiheet määräytyvät raakaveden laadun mukaan. Ensimmäisen vaiheen siivilöinti poistaa suurimmat roskat. Happamuudensäädössä veden pH-arvo muutetaan sopivaksi saostusta varten. Saostamalla poistetaan humus ja muu orgaaninen aines. Saostamisen jälkeen saostuma erotetaan selkeyttämällä. Suodatusvaiheessa vesi laskeutetaan hiekkasuotimien läpi, jolloin pienimmät partikkelit poistuvat. Desinfektiovaihe on viimeinen vaihe, ennen kuin vesi johdetaan kuluttajille. Desinfektion avulla varmistetaan, ettei vedessä ole taudinaiheuttajia. Veteen joudutaan usein lisäämään klooria, jotta veden laatu säilyisi myös verkostossa. (Hänninen 2007 382–383.)

## **3.2 Talousveden laatu**

### **3.2.1 Talousveden mikrobiologiset laatuvaatimukset**

Yleisimmät vesiperäiset terveyshaitat johtuvat ihmisen ja tasalämpöisten eläinten suolistoperäisten mikrobien leviämisestä veden välityksellä. Koska kaikkien mahdollisten taudinaiheuttajien tutkiminen ei ole mahdollista eikä järkevää, talousveden valvonta perustuu ulosteperäistä saastumista osoittavien indikaattoribakteereiden tutkimiseen. Talousveden mikrobiologiset laatuvaatimukset on laadittu käyttäen indikaattoribakteereina *Escherichia colia* ja enterokokkeja. Talousvesi ei saa sisältää yhtään *E.colia* tai enterokokkia 100 ml:n näytteessä. Talousveden mikrobio-

logiset vaatimukset annetaan sosiaali- ja terveysministeriön asetuksessa 461/2000. (Pönkä 2002, 165.)

*E.colin* esiintymisen talousvedessä katsotaan osoittavan veden ulosteperäistä saastumista. *E.colit* voivat olla peräisin joko ihmisen tai tasalämpöisten eläinten, hyötyeläinten tai luonnonvaraisten, ulosteista. Koliformisten bakteereiden toteaminen talousvedestä ei merkitse ulosteperäistä saastumista, ellei *E. colia* voida osoittaa, koska muita koliformeja esiintyy yleisesti mm. maaperässä tai kasveissa. (Pönkä 2002, 165.)

Yksittäisille talousvesikaivoille ei voida asettaa joka suhteessa yhtä tiukkoja vaatimuksia kuin suurien vesilaitosten toimittamalle talousvedelle. Mikrobiologisista muuttujista on annettu laatusuositus ainoastaan koliformisille bakteereille, 0 pmy/100 ml. Yksittäisten talousvesikaivojen vedelle koliformisten bakteeripitoisuuksien enimmäispitoisuus on alle 100 pmy/100 ml. (Pönkä 2002, 185.)

### **3.2.2 Talousveden laadun säännöllinen valvonta**

Terveysviranomaisen on valvottava säännöllisin tutkimuksin talousvettä. Talousveden laatua valvoo sen kunnan terveydensuojeluviranomainen, jonka alueella vettä käytetään. Säännöllinen valvonta on joko jatkuvaa valvontaa tai jaksoittaista seuranta. Jatkuvan valvonnan muuttajat ovat yleensä yksinkertaisemmin määritettäviä ja niitä analysoidaan tiheämmin kuin jaksottaisessa seurannassa. Jatkuvan valvonnan tarkoituksena on hankkia säännöllisesti tietoa talousveden aistinvaraisesta ja mikrobiologisesta laadusta sekä talousveden käsittelyn tehokkuudesta. Jaksottaisessa seurannassa selvitetään täyttääkö talousvesi kaikki asetuksen laatuvaatimukset ja suositukset. Valvontatiheys riippuu vedenjakelualueelle päivittäin toimitettavan tai tuotettavan veden määrästä. (Pönkä 2002, 174.)

Sosiaali- ja terveysministeriön asetuksessa 401/200 5 §:n ja 6 §:n mukaiset valvonta- ja viranomaisveloitteet koskevat ainoastaan suuria vesilaitoksia. Toisin sanoen terveydensuojeluviranomaisella ei ole velvollisuutta valvoa säännöllisesti omasta aloitteestaan yksittäisten talousvesikaivojen veden laatua. Sen sijaan terveydensuo-

jeluviranomainen voi määrätä yksittäisen kaivon veden tutkittavaksi, jos on syytä epäillä veden aiheuttavan terveyshaittaa. (Pönkä 2002, 188.)

## **4 MIKROBIOLOGISEN MENETELMÄN VALIDOINTI**

### **4.1 Menetelmän validointi**

Validoinnissa on tarkoitus osoittaa menetelmän kelpoisuus siten, että saadaan vertailuarvoja menetelmän luotettavuutta kuvaaville suureille. Mikrobiologisessa validoinnissa näitä suureita ovat suhteellinen oikeellisuus, toistettavuus, uusittavuus, toteamisraja, spesifisyys, herkkyys ja lineaarisuus. Mikrobiologisten menetelmien validoimiseksi ei ole vielä olemassa kansainvälisesti hyväksytyjä ohjeita tai kriteerejä validointitulosten arvioimiseksi. Tästä johtuen validoinnissa tutkitaan menetelmän käyttöön liittyviä epävarmuustekijöitä ja mahdollisesti kuvataan niitä numeerisesti. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 1.)

Validoinnille asetettavat vaatimukset vaihtelevat mm. menetelmän ja sen käyttötarkoituksen mukaan. Yleensä menetelmän kehittäjä (esim. standardisoimisjärjestö) suorittaa laajojen laboratorioden välisten tutkimusten avulla täydellisen validoinnin. Laboratorioissa validointi yleensä tehdään otettaessa käyttöön uusi standardimenetelmä tai muu yleisesti käytössä oleva menetelmä. Tällöin validointi voidaan suorittaa suppeahkona dokumentoituna menettelynä, jossa osoitetaan, että kyseinen laboratorio hallitsee tutkimusmenetelmän. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 1.)

Standardimenetelmien, kansainvälisten menetelmäkokoelmien menetelmien ja virallisten menetelmien validointi edellyttää yleensä referenssimateriaalin (tunnettu mikrobipitoisuus) ja siirrostettujen näytteiden tutkimista tarkoituksenmukaisissa matriiseissa. Kvalitatiivisten menetelmien validointituloksista tulee ilmetä toteamisraja sekä virhepositiiviset ja -negatiiviset tulokset. Kvantitatiivisten menetelmien osalta tuloksissa tulee ilmetä lisätyn ja saadun mikrobipitoisuuden lähekkäisyys ja lisättyjen mikrobipitoisuuksien lineaarisuus. Tutkimuksista tehdään

yhteenveto, josta ilmenevät mm. tutkitut matriisit ja mikrobipitoisuudet, käytetyt referenssimateriaalit, näytteiden lukumäärä sekä tutkimustulokset johtopäätökseen. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 9.)

## 4.2 Mikrobiologisiin menetelmiin liittyvä epävarmuus

Mikrobiologiassa näyte analysoidaan matriisin kanssa, jossa voi olla muita mikrobeja, erilaisia materiaaleja ja häiritseviä taustoja. Analyysin erottelu tapahtuu vasta kasvatusalustalla. Menetelmän spesifisyyteen vaikuttaa kasvatusalustan koostumus ja kasvatusolosuhteet kuten myös tutkittavien mikrobikantojen ominaisuuksien vaihtelu. Näyte joudutaan laimentamaan kvantitatiivista määrittystä varten sellaiselle pitoisuustasolle, että on mahdollista laskea yksittäisten solujen muodostamat pesäkkeet. Jotta laskeminen olisi mahdollista, solumäärän tulee olla enintään muutamia satoja tutkittavassa näytteessä. Tällöin rinnakkaisanalyysien pesäkemäärät voivat vaihdella suuresti ilman virhettä. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 2.)

Oikeellisuuden eli täsmällisesti oikean tuloksen määrittäminen on mikrobiologiassa vaikeaa, koska mikrobit ovat elävää materiaalia, joten niistä ei pystytä tekemään valmisteita, joiden todellinen pitoisuus olisi selvillä ja pysyisi muuttumattomana. Mikrobiologiassa oikeana tuloksena pidetään useiden toistojen keskiarvotulosta ja referenssimateriaaleilla saadun hyväksytyt arvon lähekkäisyyttä. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 3.)

Merkittävimpiä epävarmuustekijöitä on homogeenointi, jonka yhteydessä saattaa tuhoutua mikrobeja eikä niitä välttämättä saada täydellisesti irtaantumaan tutkittavasta materiaalista. Muita analyysitulokseen vaikuttavia epävarmuustekijöitä ovat työntekijäkohtaiset työskentelyerot, kuten pesäkkeiden tulkintaerot. Lisäksi ongelmia saattavat aiheuttaa matriisin ominaisuudet, taustamikrobiston luonne ja muut vaikeasti määriteltävät tekijät. Näiden syiden takia rinnakkaisanalyseissa voi esiintyä huomattavan paljon hajontaa. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 3.)

### 4.3 Standardi- ja referenssimenetelmä

Standardimenetelmä on standardisoimisjärjestön julkaisema menetelmä. Standardisoimisjärjestöjä ovat mm. kansainvälinen International Organization for Standardization (ISO), eurooppalainen European Committee for Standardization (CEN) ja kansallinen Suomen Standardisoimisliitto (SFS). (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 4.)

Referenssimenetelmällä tarkoitetaan menetelmää, jonka ominaisuudet tunnetaan perusteellisesti. Menetelmä on selkeästi ja täsmällisesti kuvattu ja sen on osoitettu antavan oikeita ja toistettavia tuloksia. Menetelmää voidaan käyttää muiden samansuureen tutkimiseen tarkoitettujen menetelmien arvioimiseen ja vertailuaineiden testaukseen. Referenssimenetelmänä voidaan käyttää esimerkiksi standardimenetelmää. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 5.)

### 4.4 Validointiin liittyviä suureita

#### 4.4.1 Oikeellisuus

Menetelmän antamien tulosten oikeellisuuden tutkimiseksi tarvitaan tieto analysoitavan mikrobin todellisesta pitoisuudesta. Mikrobiologiassa analytti on elävää materiaalia, eikä sen todellista pitoisuutta eikä validoitavan menetelmän antamien tulosten oikeellisuutta pystytä määrittämään varmuudella. Oikeellisuus pyritään määrittämään käyttämällä sertifioituja referenssimateriaaleja, joiden ilmoitettua pitoisuutta pidetään oikeana tuloksena. Oikeellisuus joudutaan kuitenkin usein määrittämään käyttämällä sertifioimattomia referenssimateriaaleja tai siirrostettuja näytteitä sertifioitujen referenssimateriaalien rajoitetusta saatavuudesta ja kalleudesta johtuen. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 6-7.)

**Suhteellinen oikeellisuus** tarkoittaa referenssimenetelmän ja validoitavan menetelmän antamien tulosten vastaavuutta/ lähekkäisyyttä tutkittaessa samoja näytteitä (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 7).

**Virhepositiivisuudella** tarkoitetaan, että validoitava menetelmä antaa positiivisen tuloksen silloin, kun referenssimateriaali tai siirrostettu näyte ei sisällä tutkittavaa mikrobia (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 7).

**Virhenegatiivisuudella** tarkoitetaan, että validoitava menetelmä antaa negatiivisen tuloksen silloin, kun näyte sisältää tutkittavaa mikrobia (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 7).

#### 4.4.2 Täsmällisyys

Menetelmän antamien tulosten täsmällisyyttä kuvaavat **toistettavuus ja uusittavuus**. Mikrobiologisten analyysien täsmällisyyteen vaikuttaa tutkittavan näytteen mikrobipitoisuus; mitä pienemmistä pitoisuuksista on kyse, sitä epävarmempi tulos. Täsmällisyyteen vaikuttavat myös mikrobiologisen työskentelyn erityispiirteisiin liittyvät virhelähteet (kpl 4.2). (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 7.)

**Toistettavuus** kuvaa peräkkäisten toistojen antamien tulosten lähekkäisyyttä, kun tutkitaan identtisiä näytteitä samalla menetelmällä, samoissa olosuhteissa ja samojen henkilöiden toimesta (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 7).

**Uusittavuus** kuvaa yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyyttä, kun eri henkilöt tutkivat identtisiä näytteitä samalla menetelmällä joko samassa tai eri laboratorioissa (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 7).

#### 4.4.3 Toteamis- ja määritysraja

**Toteamisraja** on pienin mikrobipitoisuus, joka on mahdollista todeta luotettavasti. Siihen vaikuttavat menetelmän selektiivisyys, spesifisyys, mikrobien ”tila” näytteessä ja tutkittava näytematriisi mikrobistoinen. Toteamisraja tulee määrittää erikseen jokaiselle tutkittavalle matriisille. Mikrobiologiassa on mahdollista määrittää toteamisraja vain kvalitatiiviselle menetelmälle. Menetelmäkuvauksissa ilmoitetaan harvoin toteamisraja, mutta se on määritettävissä tutkimalla referenssimateriaaleja tai niiden puuttuessa siirrostettuja näytteitä. Tällöin pienin mahdollinen referenssi-

materiaaliin tai siirrostetun näytteen mikrobipitoisuus on viisi solua/ tutkittava määrä. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 7-8.)

**Määrittäminen** on alhaisin tietyissä rajoissa vaihteleva mikrobipitoisuus, joka kyetään määrittämään kvantitatiivisesti validoitavalla menetelmällä. Nestemäisiä näytteitä tutkittaessa määrittäminen on yleensä < 1 pmy/ml (maljavalu) tai < 10 pmy/ml (pintalevitys) ja kiinteitä näytteitä tutkittaessa < 10 pmy/ml (maljavalu) tai 100 pmy/ml (pintalevitys). Määrittäminen on mahdollista alentaa lisäämällä tutkittavaa näytemäärää ja rinnakkaisia määrittämiä. Määrittäminen vaikuttavat menetelmän selektiivisyys, spesifisyys, mikrobin "tila" näytteessä ja näytematriisi mikrobistoon. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 8.)

#### 4.4.4 Spesifisyys ja herkkyys (sensitiivisyys)

**Spesifisyys** tarkoittaa menetelmän kykyä löytää tutkittava mikrobi tai tutkittavat mikrobit näytteessä olevien häiritsevien tekijöiden vaikutuksesta huolimatta. Täydellisen spesifinen menetelmä toteaa/määrittää ainoastaan analysoitavan mikrobin. Käytännössä mikrobiologiset menetelmät eivät ole täysin spesifisiä, joten menetelmää validoitaessa on tutkittava ja opittava tunnistamaan tyypilliset pesäkkeet analyysiä häiritsevän mikrobiston joukosta tekemällä varmistustestejä. On otettava myös huomioon, että pesäkkeiden laskeminen ja tunnistaminen on subjektiivista. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 8.)

**Herkkyys** kuvaa menetelmän kykyä todeta vähäiset vaihtelut määritettävien mikrobien pitoisuuksissa tietyissä materiaaleissa. Herkkyys on keskeinen ja tärkeä menetelmän ominaisuus verrattaessa menetelmiä toisiinsa. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 8.)

#### 4.4.5 Lineaarisuus

Lineaarisuus kuvaa kvantitatiivisen menetelmän kykyä antaa tuloksia, jotka ovat suoraan verrannollisia näytteen mikrobipitoisuuteen. Pitoisuuden muutos saa tällöin aikaan suhteellisesti yhtä suuren muutoksen tuloksissa. Mikrobiologiassa pesäkelaskennan yläraja on muutamia satoja pesäkkeitä maljalla. Näytteestä valmistetaan

laimennossarja, jolla pyritään pääsemään laskenta-alueelle. Laskenta-alue ilmoitetaan pienimmän ja suurimman pesäkemäärän avulla, jotka on mahdollista ilmoittaa luotettavasti. Validoitaessa menetelmää on selvitettävä, pystyykö laboratorio suorittamaan pesäkelaskennan menetelmän antamissa rajoissa. Tulos joudutaan usein antamaan laskenta-alueen ulkopuolella olevien pesäkemäärien perusteella, jolloin tulos esitetään arviona. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 8.)

#### **4.5 Mikrobien ja pitoisuuksien valinta**

Mikrobeina käytetään joko tunnetun mikrobipitoisuuden omaavia referenssimateriaaleja tai laboratorion itse tunnetuista kannoista valmistamia mikrobisuspensioita. Referenssimateriaaleja on saatavissa yksittäisinä mikrobeina tai mikrobiseoksina. Mikrobiksi valitaan sellainen mikrobi tai mikrobiryhmä, jota menetelmällä analysoidaan. Häiritseviä bakteereita ei yleensä tarvitse lisätä erikseen, koska elintarvikkeet sisältävät jo valmiiksi mikrobeja. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 9.)

Validoitaessa menetelmiä käytetään tavallisesti kahta mikrobipitoisuutta. Kvalitatiivisten menetelmien validoinnissa valitaan tutkittavaksi yleensä sellaiset mikrobipitoisuudet, joista toinen on lähellä menetelmän toteamisrajaa ja toinen siihen nähden noin kymmenkertainen. Mikäli toteamisrajaa ei tiedetä, kannattaa se selvittää siirrostamalla matriisiin eri mikrobipitoisuuksia. Kvantitatiivisten menetelmien validoinnissa käytetään yleensä pitoisuuksia, joista pienempi on noin 500–1000 pmy/g ja suurempi 10–100 –kertainen. Sekä kvalitatiivisia että kvantitatiivisia menetelmiä validoitaessa tutkitaan lisäksi aina 0-näyte eli siirrostamaton matriisi. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 9-10.)

## 4.6 Tulosten arviointi

Tulosten tulkinnassa käytetään mikrobiologista asiantuntemusta. Kvalitatiivisten menetelmien kohdalla tarkastellaan, todettiiniko tutkittava mikrobi eli antavatko siirrostetut näytteet positiivisen tuloksen ja 0-näyte negatiivisen. Kvantitatiivisten menetelmien osalta tarkastellaan, vastaavatko saadut tulokset lisättyjä mikrobipitoisuuksia. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 10.)

Siirrostettujen näytteiden ja validoitavalla menetelmällä saadun pitoisuuden väliselle sallittavalle erolle ei ole annettu numeerisia arvoja. Eron suuruuteen vaikuttavat esim. matriisi tai tutkittava mikrobi. Edellä mainittujen lisäksi on tarkasteltava, onko mikrobipitoisuudet valittu oikein ottaen huomioon määritettävän menetelmän herkkyys sekä se, kuinka paljon mikrobia yleensä esiintyy tutkittavassa matriisissa. Tuloksia arvioitaessa tarkastellaan myös menetelmän spesifisyyttä, koska on tärkeää tuntea matriisin sisältämä normaalifloora, joka voi häiritä analysoitavan mikrobin tunnistamista aiheuttaen alustavia virhepositiivisia tai virhenegatiivisia tuloksia. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 10–11.)

Validoinnin toteutuksen ja tulosten ollessa käyttötarkoitus huomioon ottaen hyväksyttäviä, menetelmä voidaan ottaa käyttöön. Validointituloksen ollessa ei-hyväksyttävissä ja syynä tähän ei ole mikään tekniseen suorittamiseen liittyvä seikka, on pohdittava matriisin mahdollista merkitystä virhelähteenä ja harkittava mikrobipitoisuuksien tai referenssimateriaalin soveltuvuutta. Validoinnin johtopäätöksenä voi olla myös se, että menetelmää ei hyväksytä käyttöön tai se hyväksytään tietyin rajoituksin, jotka voivat liittyä esim. matriisiin tai herkkyyteen. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 11.)

## 5 REFERENSSIMENETELMÄ

### 5.1 Periaate

Tässä opinnäytetyössä referenssimenetelmänä käytetään standardin SFS 3016:2001 mukaista kalvosuodatusmenetelmää. Menetelmää käytetään selvittäessä raakaveden ja kaivovesien likaantumista sekä arvioitaessa uimarantavesien koliformisten bakteerien määrä (SFS 3016:2001, 1).

Kalvosuodatuksessa vesinäytteen bakteerit kerätään kalvolle, joka asetetaan koliformisia bakteereita suosivalle kasvualustalle. Suodatukseen käytetään ruudutettua, huokoskooltaan 0,45 µm:n kalvoa, joka ei sisällä kasvua kiihdyttäviä tai rajoittavia ominaisuuksia. Suodatettava näytemäärä on 100 ml. Suodatuksen jälkeen kalvo asetetaan LES Endo-agar -kasvualustalle ja inkuboitetaan 36 °C:ssa 21 tunnin ajan. Kasvualusta ei ehkäise täysin vieraiden organismien kasvua, minkä vuoksi alustaan on lisätty pelkistynyttä fuksiinia laktoosista aldehydiä muodostavien koliformisten bakteeripesäkkeiden erottamiseksi muista pesäkkeistä. (SFS 3016:2001, 3.)

Inkuboinnin jälkeen tehdään tyypillisten laktoosi-positiivisten pesäkkeiden biokemiallinen lisäluonnehdinta, mikä johtaa koliformisten bakteereiden ja *E.coli* -bakteerin havaitsemiseen ja lukumäärän laskemiseen 2...3 päivän kuluessa. Tyypilliset pesäkkeet kalvolla lasketaan laktoosi-positiiviksi bakteereiksi. Koliformisten bakteereiden ja *E.coli* -bakteerin havaitsemiseksi tehdään jatkoviljelmä valitsemalla satunnaisia tyypillisiä pesäkkeitä varmistustestejä varten. Laktoosi-positiivisten koliformisten bakteerien ja *E.coli* -mikrobien määrät lasketaan ja tulos ilmoitetaan 100 ml:aa kohti näytettä. (SFS 3016:2001, 3.)

## 5.2 Varmistustestit

Inkuboinnin jälkeen lasketaan tyypilliset tummanpunaiset, metallinkiiltoiset ja selvästi kohollaan olevat pesäkkeet. Luotettavimmin kiillon havaitsee luonnon hajavalossa. Tyypilliset pesäkkeet katsotaan laktoosi-positiivisiksi. (SFS 3016:2001, 4.)

Jatkoviljelyitä varten siirrostetaan edustava määrä luonteenomaisia pesäkkeitä valikoimattomalle agarille ja inkuboitaa  $36\pm 2$  °C:ssa  $21\pm 2$  tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen suoritetaan oksidaasitesti siirrostamalla pesäke kaupallisen oksidaasiliuskan (BD BBL™ DrySlide™) päälle. Jos liuskalle ilmestyy sinisestä purppuranpunaiseen oleva väri 30 s:ssa, sitä pidetään positiivisena reaktiona. (SFS 3016:2001, 4.)

Indolitestissä siirrostetaan soluja joko suoraan LES Endo -agarilla tai valikoimattomalla agarilla kasvavasta pesäkkeestä tryptofaaniliemeen. Siirrostettua putkea inkuboitaa  $44\pm 0,5$  °C:ssa  $21\pm 3$  tunnin ajan ja tutkitaan indolituotanto lisäämällä 0,2...0,3 ml Kovacsin reagenssia. Kirsikanpunaisen värin kehittyminen liemen pinnalle varmistaa indolin tuotannon. (SFS 3016:2001, 4.)

Jos menetelmällä määritetään *Escherichia colia*, tutkitaan indolin tuotannon lisäksi  $\beta$ -glukuronidaasi-entsyymien tuotto Fluorocult Lauryl Sulphate -liemessä  $44\pm 0,5$  °C:ssa. Indoli-positiiviset pesäkkeet, joiden Fluorocult Lauryl Sulphate -liemi fluoresoi UV-valossa (365 nm), katsotaan *Escherichia coliksi*. Fluorocult Lauryl Sulphate -putkeen lisätty Durham-putki osoittaa kaasunmuodostuksen laktoosista  $44\pm 0,5$  °C:ssa  $21\pm 3$  tunnissa (tyypillistä *Escherichia colille*). (Veden koliformisten bakteerien kokonaismäärän ja *Escherichia colin* määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä 2009, 1.)

Kaikki pesäkkeet, jotka antavat negatiivisen oksidaasireaktion, lasketaan koliformeiksi. Kaikki pesäkkeet, jotka antavat negatiivisen oksidaasireaktion ja positiivisen indolireaktion, lasketaan *Escherichia coli* -bakteereiksi. (SFS 3016:2001, 4.)

## 6 VALIDOITAVA MENETELMÄ

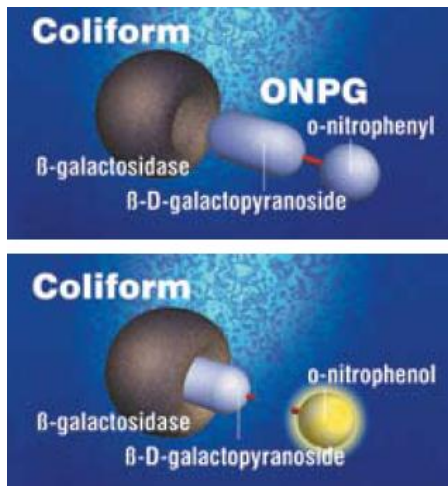
### 6.1 Colilert® Quanti-Tray -menetelmä

Validoitavana menetelmänä tässä opinnäytetyössä oli IDEXX:n Colilert® Quanti-Tray. Reagenssina käytettiin Colilert®-18:sta, joka antaa tuloksen 18 tunnissa.

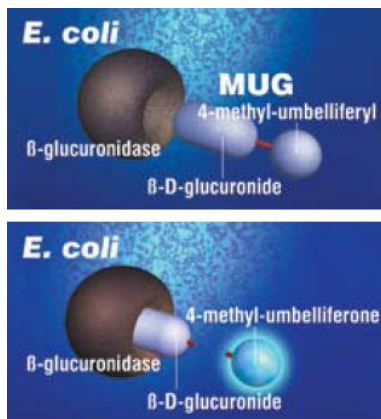
#### 6.1.1 Colilert®-18 -reagenssi

Colilert®-18-reagenssia voidaan käyttää joko osoitusreaktiona näyttämään, onko vesinäytteessä *Escherichia coli* -bakteeria ja koliformisia bakteereita, tai käyttää yhdessä näytteen kanssa Colilert Quanti-Tray®- sekä Quanti-Tray/2000®-liuskoissa, jolloin voidaan määrittää kvantitatiivisesti samanaikaisesti veden koliformisten bakteerien ja *E.coli* – bakteerin pitoisuudet. (Colilert®-18 Brochure 2007.)

Testi perustuu määritettävien bakteerien entsyymiaktiivisuuksien mittaamiseen (ks. kuviot 1 ja 2). Kun koliformit kasvavat Colilertissa®, niiden  $\beta$ -galaktosidaasi-entsyymi hajottaa ONPG-substraatin, jolloin vapautuva yhdiste muuttaa värittömän kasvualustan kirkkaan keltaiseksi. *E.colin* kasvaessa  $\beta$ -glukuronidaasi-entsyymi hajottaa MUG-substraatin, jolloin vapautuu UV-valossa (365 nm) fluoresoiva yhdiste. Muut organismit, joilla ei ole näitä entsyymejä, eivät voi hajottaa näitä substraatteja eivätkä näin ollen saa aikaan väri- ja fluoresenssireaktioita. Colilert®-reagenssi on muille bakteereille niukkaravintainen ja sisältää heterotrofien kasvua estäviä aineita. Tästä syystä muut bakteerit eivät häiritse tutkittavien bakteerien määrittämistä. Colilert®-testin herkkyys on 1 pmy/ 100 ml vettä. Reagenssit säilytetään 4 - 25 asteen lämpötilassa pimeässä, pakkauksessa merkittyyn ajankohtaan saakka. (Colilert® Brochure 2010.)



KUVIO 1. Koliformit käyttävät  $\beta$ -galaktosidaasi-entsyymiään hajottamaan ONPG-substraatin ja muuttavat sen värittömästä keltaiseksi (Colilert® Brochure 2008).



KUVIO 2. E.coli käyttää  $\beta$ -glukuronidaasi-entsyymiään hajottamaan MUG-substraatin ja fluoresoi UV-valossa (Colilert® Brochure 2008).

### 6.1.2 Quanti-Tray® / Quanti-Tray® 2000 -liuskat

Quanti-Tray®-liuska (ks. kuvio 3) käyttää samaa Poissonin jakautumaan perustuvaa tilastollista mallia kuin mihin putkimenetelmä (SFS 4089) perustuu, mutta siinä ei käytetä laimennoksia ja työ on automaattisempaa. Quanti-Tray®-sulkijalaite jakaa näytteen ja reagenssin sekoituksen automaattisesti erillisiin kupliin. Tällöin ei tarvita manuaalista pipetointia, kuten perinteiset menetelmät edellyttävät. Liuskan määrittäminen on 1-200 pmy/ 100 ml. (Quanti-Tray® Brochure 2009.)



**KUVIO 3. Quanti-Tray®-liuska (Colilert® Brochure 2010)**

Quanti-Tray®/2000-liuska (ks. kuvio 4) erikokoisine kuplineen hyödyntää samaa todennäköisyyssmallia kuin MPN-menetelmän (SFS-EN ISO 9308-1) laimennossarja. Suuret kuplat toimivat laimentamattomina näytteinä ja pienet kuplat laimennettuina. Tästä huolimatta minkäänlaista laimennosta ei ole tarpeen tehdä. Liuskan 97 kuplaa antavat suuren määritysalueen ja tarkan 95 %:n luottamusvälin. Putkimenetelmään verrattuna Quanti-Tray®/2000-liuska on nopea, sillä on suuri määritysalue ja kapea 95 %:n luottamusväli. Liuskan määritysalue on 1 - 2419 pmy/ 100 ml. (Quanti-Tray® Brochure 2009.)



**KUVIO 4. Quanti-Tray®/2000-liuska (Colilert® Brochure 2010)**

### 6.1.3 Quanti-Tray®-sulkijalaite

Quanti-Tray®-sulkijalaite on erittäin helppokäyttöinen ja soveltuu sekä oikea- että vasenkätisille. Siinä on vain kaksi painiketta: On/Off ja Peruuta. Valokenno aktivoi automaattisesti rullan liuskan syöttöaukkoon laittamisen jälkeen ja liuska kulkee rullan avulla laitteen läpi. Sulkijalaite on erittäin nopea ja sillä on mahdollista sulkea liuskoja neljän kappaleen minuuttivauhtia. Liuskojen antamalla tuloksilla on 95 %:n luottamusväli ja ne ovat täysin vertailukelpoisia kalvosuodatuksen kanssa. (Quanti-Tray® Brochure 2009.)



KUVIO 5. Quanti-Tray® Sealer ja ajoliuskat (Quanti-Tray® Brochure).

## 6.2 Testin suorittaminen

### 6.2.1 Kvalitatiivinen testi

Kvalitatiivisessa testissä Colilert® -reagenssia lisätään 100 ml:n 33–38 –asteista näytettä steriiliin, läpinäkyvään, fluoresoimattomaan pulloon. Pullo suljetaan ja reagenssin annetaan liueta. Tämän jälkeen näytettä inkuboidaan lämpökaapissa  $35 \pm 0,5$  astetta 18 tunnin ajan. (Colilert®18-Brochure 2007.)

### 6.2.2 Kvantitatiivinen testi

Kvantitatiivisessa testissä Colilert® -18 – reagenssia lisätään huoneenlämpöiseen, steriilissä pullossa olevaan näytteeseen (näytettä 100 ml) (ks. kuvio 6). Lisäksi pulloon lisätään kaksi tippaa vaahdonestoainetta. Pulloa ravistellaan niin kauan, että reagenssi on kokonaan liuennut. Tämän jälkeen näyte kaadetaan Quanti-Tray®- tai Quanti-Tray®/2000-liuskaan, ravistellaan ilmakuplat pois ja suljetaan liuska sulkijalaitteen avulla (ks. kuviot 7 ja 8). Sulkemisen jälkeen liuskat inkuboitaan  $35\pm 0,5$  asteen lämpötilassa 18 tuntia ja lasketaan positiivisten kuplien määrä (ks. kuvio 9): tulokset katsotaan MPN-taulukosta (most probable number, todennäköisin lukumäärä), joka löytyy liitteestä 1. Colilertin® tuloksia tulkittaessa käytetään Quanti-Tray®-kontrolliliuskaa, johon verrataan varsinaisen näytteen värinmuodostusta. Jos näyte on laimennettu, saatu MPN-mikrobipitoisuus kerrotaan laimennuskertoimella. (Colilert®18-Brochure 2007.)



KUVIO 6. Reagenssin lisääminen (Colilert® Brochure 2010).



KUVIO 7. Kaadetaan näyte Quanti- Tray-liuskaan (Colilert® Brochure 2010).



**KUVIO 8. Quanti-Tray-liuska suljetaan Quanti-Tray®-sulkijalla ja inkuboidaan  $35\pm 0,5$  asteen lämpötilassa 18 tuntia (Colilert® Brochure 2010).**



**KUVIO 9. Luetaan Quanti-Tray-liuska ja ilmoitetaan tulokset MPN-taulukon avulla (Colilert® Brochure 2010).**

### 6.2.3 Tulosten tulkinta

Tulos on negatiivinen, jos näyte on väritön tai lievästi keltainen (Colilert®18-Brochure 2007).

Tulos on positiivinen koliformeille, jos näyte on keltaisempi tai yhtä keltainen kuin kontrolli (kvalitatiivisessa testissä vaalean keltainen P/A-pullokontrolli ja kvantitatiivisessa testissä vaalean keltainen Quanti-Tray®-liuskakontrolli). Tulos on positiivinen *E. coli* – bakteerille, jos keltaisuuden lisäksi havaitaan UV-valossa fluoresenssi. (Colilert®18-Brochure 2007.)

Mikäli Quanti-Tray® -liuskoissa on 18 tunnin jälkeen vain erittäin vaaleita kuplia (vaaleampi kuin kontrolli) eikä yhtään voimakkaan keltaista kuplaa, tulee liuskaa jatkoinkuboida maksimissaan 22 tuntia, jonka jälkeen luetaan tulokset. Testiä ei saa tulkita yli 22 tunnin jälkeen, sillä tällöin heterotrofien kasvu saattaa häiritä määrittystä. (Colilert®18-Brochure 2007.)

#### 6.2.4 Huomioitavia seikkoja testiä suorittaessa

Reagenssin lisäämisen jälkeen saattaa esiintyä lievää värillisyyttä, mutta se ei vaikuta testin suorittamiseen. Colilert®-reagenssia ei saa lisätä puskuroituun veteen, koska reagenssi on jo valmiiksi puskuroitu. Jos näyte sisältää paljon humusta tai on itsestään värillinen, kannattaa tehdä kontrollinäyte ilman Colilert®-reagenssia. Kontrollinäyte inkuboidaan normaalisti ja sitä verrataan varsinaiseen näytteeseen. (Colilert®18-Brochure 2007.)

Colilert®-menetelmä ei sovellu esirikastetuille tai konsentroiduille näytteille. Merivesinäytteet tulee laimentaa ennen määrittystä vähintään 1:10 steriiliin veteen. Mikäli vesinäyte sisältää klooria, on se ensin neutraloitava natriumtiosulfaatilla. Jokaisen uuden reagenssierän toiminta tulisi tarkastaa *E.coli*-, *Klebsiella*- ja *Pseudomonas aeruginosa* – kannoilla kvalitatiivisen testin mukaisesti. (Colilert®18-Brochure 2007.)

### 6.3 Edut referenssimenetelmään nähden

Colilert®-menetelmän etuja referenssimenetelmään nähden ovat sen helppous, nopeus ja tarkkuus. Menetelmän käyttäminen ei vaadi reagenssien valmistamista, subjektiivista pesäkelaskua eikä testejä tarvitse toistaa suodattimen tukkeutumisesta tai heterotrofien häirinnästä johtuen. Colilert®-liuskaa käytettäessä ei tarvitse tehdä inkuboinnin jälkeen varmistuskokeita. Käsittelyaika yhdelle liuskalle on noin minuutti ja inkubointiaika 18 tuntia. Menetelmän nopeuteen vaikuttaa myös se, että se antaa samanaikaisesti sekä koliformisten bakteerien että *E.coli*-bakteerien lukumäärät. Menetelmän tarkkuutta kuvaa se, että se estää jopa 2 miljoonan heterotrofin kasvun 100 ml:ssa. (Quanti-Tray® vs. Membrane Filtration 2004.)

## 6.4 Laadunvarmistus

Laboratoriossa bakteerikannat säilytetään valmistajan ohjeiden mukaisesti. Viljelykaappien, pipettien, autoklaavin jne. kontrollit tehdään laboratorion menettelytapaohjetta noudattaen. Colilert®-reagenssien laadunvarmistusta kontrolloi valmistaja, joka lähettää todistukset laboratorioon arkistoitavaksi. LES Endo -maljojen laadunvarmistus tapahtuu samalla tavoin kuin Colilert®-reagenssien.

# 7 VALIDOINNIN SUORITTAMINEN

## 7.1 Validoinnin suunnittelu

Ennen varsinaisten validointimäärittysten aloittamista minun tuli pätevyitä käyttämään SFS 3016 -standardin mukaista referenssimenetelmää. Laboratorion laatuperiaatteita noudattaen jokaisen työntekijän on saatava pätevyys menetelmän itsenäiseen suorittamiseen. Pätevyys saadaan lukemalla työohjeet huolella ja suorittamalla hyväksytysti riittävän monta rinnakkaista määrittystä kokeneemman työparin kanssa. Pätevöidyin käyttämään standardin mukaista kalvosuodatusmenetelmää suodattamalla useita vesinäytteitä toisen laborantin kanssa rinnakkain saavuttaen vertailukelpoisia tuloksia.

Pätevöitymisen aikana laadin validointisuunnitelman, jonka mukaan pyrin validoinnin suorittamaan. Validointisuunnitelman laatimisessa käytin apuna laboratorion muiden laboratorioden kanssa yhteistyössä tekemää Colilert®-menetelmän validointia uimavesille ja mikrobiologisten menetelmien validointiohjetta. Suunnitelmaa tehdessäni otin huomioon myös talusveden laatuvaatimukset. Laatusuosituksen perusteella vedessä ei saisi olla lainkaan *E.coli*-bakteereita 100 ml:ssa ja koliformisille bakteereille raja-arvo on alle 100 pmy/100 ml. Colilert® 51-well-liuskan määrittäminen on 1 - 200 pmy/100 ml, joten raja-arvo kyetään määrittämään tällä liuskalla.

Tutkittaviksi matriiseiksi valittiin vesijohtovesi, kaivovesi ja steriilivesi. Steriiliä vettä käytetään, jotta saataisiin selville vesijohtovesi- tai kaivovesimatriisin Colilert® -menetelmälle aiheuttama epävarmuus. Valittuihin matriiseihin ympätettiin tunnetut pitoisuudet jätevedestä laimennettua ympppiä. Lisäksi tutkittiin laboratorioon saapuneita luonnollisia näytteitä. Ennen varsinaisten määritysten alkamista selvitettiin, ettei matriisina käytetyssä kaivovedessä ollut koliformeja eikä *E. colia*.

## 7.2 Validointimääritykset

Aluksi selvitettiin ymppinä käytettävän jäteveden mikrobipitoisuus valmistamalla laimennossarja peptonisuolaliuokseen. Ensimmäiseen pulloon, jossa oli 90 ml peptonisuolaliuosta, pipetoitiin 10 ml alkuperäistä jätevettä (laimennos  $10^{-1}$ ). Tämän jälkeen laimentamista jatkettiin  $10^{-3}$  asti lisäämällä 90 ml:aan peptonivettä 10 ml edellistä laimennosta. Jokaisesta laimennoksesta suodatettiin 1 ml LES Endo -agarille ja kasvatettiin 1 vrk 37 °C:ssa. Pesäkemäärät on esitetty taulukossa 2.

**TAULUKKO 2. Jäteveden alustava mikrobipitoisuus**

laimennos	pmy/1 ml
$10^{-1}$	60
$10^{-2}$	28
$10^{-3}$	4

Jokaisesta valitusta matriisista (vesijohtovesi, kaivovesi ja steriili vesi) valmistettiin viisi näyte-erää, joista jokaiseen ympätettiin eri määrä jätevesiympppiä. Ympättyjen näytteiden lisäksi tutkittiin nollanäyte jokaisesta matriisista. Kaikki näytteet määritettiin sekä Colilert® 51-well -liuskalla että LES Endo -agarilla. Kaikki määritykset suoritettiin niin, että minun lisäksi yksi laborantti teki samoista näytteistä rinnakkaismääritykset.

Määritykset suoritettiin neljänä päivänä niin, että jokaisena päivänä valmistettiin uusi jätevesiympppi, jonka pitoisuus selvitettiin suodattamalla joko 1 ml tai 10 ml käytettävää laimennosta LES Endo -maljalle. Matriiseista valmistettiin joka päivä uudet 500 ml:n näyte-erät, joihin ympätettiin tunnettu määrä jätevesiympppiä.

Jäteveden alustavan mikrobipitoisuuden (taulukko 2) perusteella päätettiin käyttää laimennosta  $10^{-2}$  näytematriisien ymppäämiseksi. Alustavan mikrobipitoisuuden avulla laskettiin, kuinka paljon jätevesiymppeä tulisi ympätä näytematriiseihin, jotta tulokset olisivat helposti laskettavissa. Alustavat mikrobipitoisuusarviot ympille on esitetty taulukossa 3.

**TAULUKKO 3. Arviot ympin alustavista mikrobipitoisuuksista**

	ymppe pmy/ml	lisätty ymppe (ml)	näytetilavuus (ml)	arvioitu pmy/100 ml
29.9.2010	28	1	500	5,6
30.9.2010	28	10	500	56
4.10.2010	28	10	500	56
5.10.2010	28	10	500	56
5.10.2010	28	10	500	56

## 8 TULOKSET JA POHDINTAA

Kaikki Colilert® -tulokset ilmoitetaan tuloksissa MPN-arvona, joka määritetään käyttämällä MPN-taulukkoa (liite 1). Tuloksista kävi kyseistä taulukkoa tulkittaessa hyvin selkeästi ilmi, miten yhden kuopan ero Colilert® 51-well-liuskassa saattaa aiheuttaa suurenkin eron todennäköisissä pesäkelukumäärissä.

### 8.1 Esimääritysten tulokset

Jätevesiympille oli aiemmin laskettu arvioitu pmy-arvo, mutta määrittäessä havaittiin, että arvioidun laimennoksen  $10^{-2}$  pitoisuus oli paljon pienempi kuin alun perin määritettiin. Saadut oikeat pitoisuudet jätevesiympille on esitetty taulukossa 4.

**TAULUKKO 4. Jätevesiympin pitoisuudet**

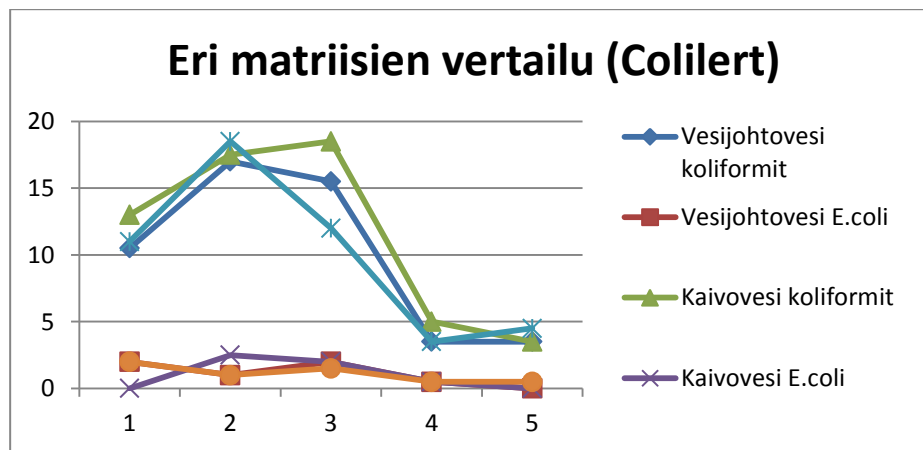
	ymppe pmy/ml	lisätty ymppe (ml)	näytetilavuus (ml)	pmy/100 ml
29.9.2010	12	1	500	2,4
30.9.2010	7,5	10	500	15
4.10.2010	6,1	10	500	12,2
5.10.2010	3,2	10	500	6,4

5.10.2010	3,2	10	500	6,4
-----------	-----	----	-----	-----

Kaivovedelle tehdyssä esimäärityksessä ei havaittu koliformien tai *E. coli* läsnäoloa.

## 8.2 Matriisin vaikutus

Validointia tehdessä tutkittiin kolmea eri matriisia: vesijohto-, kaivo- ja steriiliä vettä. Saadut tulokset ovat matriiseittain koottuna liitteessä 2. Varsinaisen mielenkiinnon kohteena olivat vesijohtovesi- ja kaivovesimatriisit, koska Colilert®-menetelmä on tarkoitettu ottaa käyttöön näillä matriiseilla. Steriili vesi -matriisi otettiin mukaan, jotta saadaan matriiseista mahdollisesti johtuvat ongelmat.

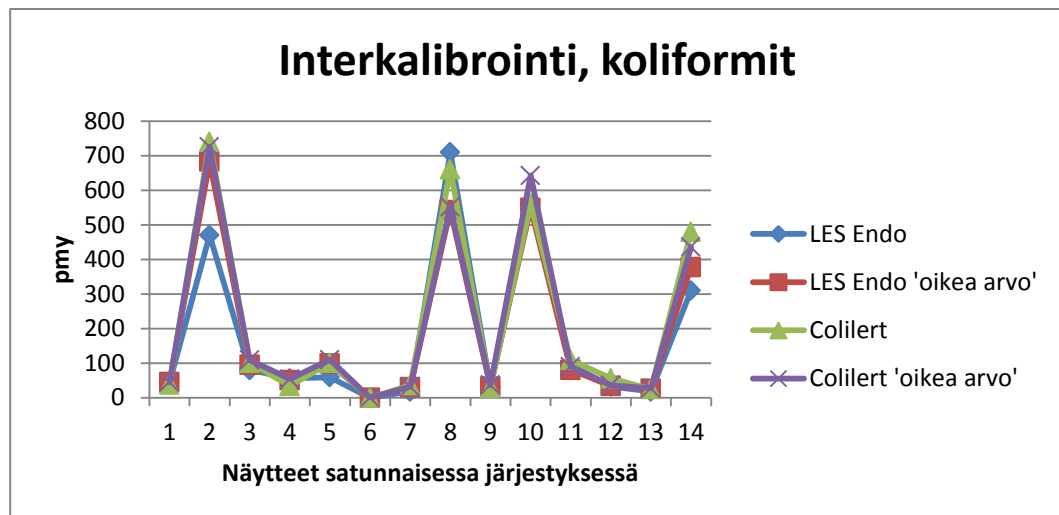


**KUVIO 10. Eri matriisien tulosten keskiarvojen vertailu.**

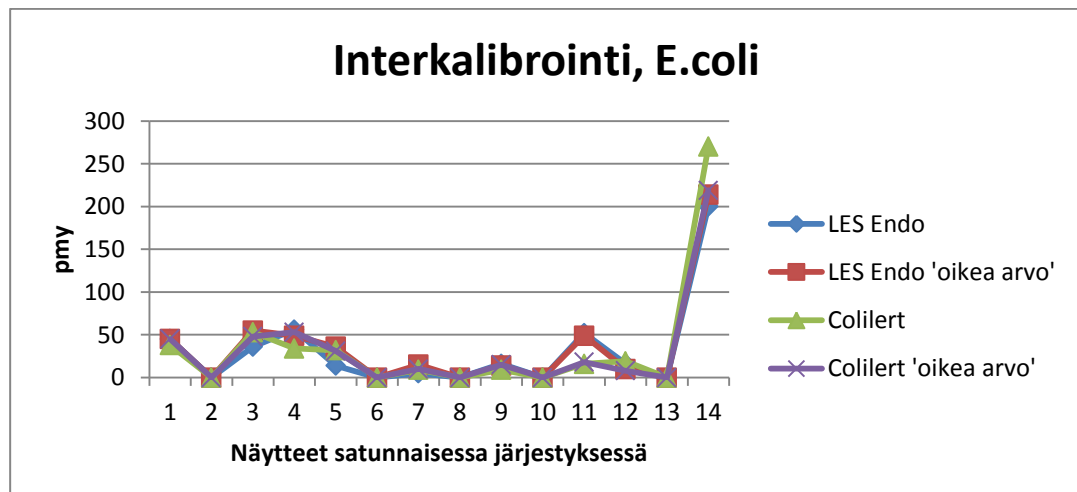
Saatujen tulosten keskiarvojen avulla piirrettiin kuvaaja (ks. kuvio 10), jonka perusteella on mahdollista nähdä matriisien välillä olevia eroja. Kuvaajan perusteella voidaan sanoa, että matriiseilla ei ole havaittavaa vaikutusta Colilert® -menetelmän antamiin tuloksiin. Eri matriisien tulokset eivät eroa toisistaan lähes lainkaan sekä koliformien että *E. coli* ollessa kyseessä.

### 8.3 Suhteellinen oikeellisuus

Tulosten vastaavuutta Colilert® 51-well -liuskan ja LES Endon välillä selvitetiin interkalibrointitulosten avulla. Tulokset on esitetty liitteessä 3, ja niiden perusteella piirrettiin kuvaajat (kuviot 11 ja 12) selventämään saatuja havaintoja.



KUVIO 11. Suhteellinen oikeellisuus, koliformit



KUVIO 12. Suhteellinen oikeellisuus (E.coli)

Interkalibrointitulosten perusteella piirretyistä kuvaajista voidaan päätellä, että molemmilla menetelmillä saatiin toisiaan vastaavia tuloksia. Saadut tulokset eivät eroa juuri lainkaan ns. oikeasta arvosta. Menetelmät antavat oikeellisia tuloksia tutkittaessa sekä koliformeja että *E. coli*a.

Interkalibrointitulosten perusteella on myös huomattavissa se, että Colilert® antaa useimmiten hieman suuremman tuloksen kuin LES Endo. Colilert® -menetelmän antama hieman suurempi tulos selittyy menetelmien toimintaperiaatteiden eroilla. Molemmat menetelmät perustuvat samojen entsyymien havaitsemiseen. Koliformeilla on ONPG-substraattia hajottava  $\beta$ -galaktosidaasi-entsyymi ja *E.coli*lla MUG-substraattia hajottava  $\beta$ -glukuronidaasi-entsyymi. LES Endoa käytettäessä näiden entsyymien on toimittava, mutta Colilert®-menetelmä ei kiinnitä huomiota toimivuuteen, pelkkä entsyymien läsnäolo antaa positiivisen tuloksen.

## 8.4 Uusittavuus

Uusittavuutta tutkittiin määrittämällä sama pitoisuus kahden eri henkilön toimesta. Taulukoissa 5 ja 6 on esitetty esimerkkinä vesijohtovesimatriisin tulokset laskutoimituksineen Colilert® -menetelmällä määritettynä sekä koliformeille että *E. coli*lle. Kaikki taulukot ja laskutoimitukset on esitetty matriiseittain liitteessä 4.

**TAULUKKO 5. Rinnakkaistulokset vesijohtovesimatriisille Colilertilla (koliformit)**

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	9	12	0,954243	1,0791812	-0,12493874
30.9.2010	19	15	1,278754	1,1760913	0,102662342
4.10.2010	16	15	1,20412	1,1760913	0,028028724
5.10.2010	3	4	0,477121	0,60206	-0,12493874
5.10.2010	4	3	0,60206	0,4771213	0,124938737
			summa		0,005752329
			keskiarvo		0,001150466
			s=		0,120569079

**TAULUKKO 6. Rinnakkaistulokset vesijohtomatriisille Colilertilla (*E.coli*)**

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	9	12	0,954243	1,0791812	-0,12493874
30.9.2010	19	15	1,278754	1,1760913	0,102662342
4.10.2010	16	15	1,20412	1,1760913	0,028028724
5.10.2010	3	4	0,477121	0,60206	-0,12493874
5.10.2010	4	3	0,60206	0,4771213	0,124938737
			summa		0,005752329
			keskiarvo		0,001150466
			s=		0,120569079

Edellä esitettyjen ja liitteessä 4 olevien tulosten perusteella laskettiin tekijäparin keskihajonnat. Laskennallisista syistä jätettiin huomioimatta 0- tulokset ja näin olleen kaikissa matriiseissa ollut mahdollista laskea keskihajontaa. Saadut tulokset ovat taulukossa 7.

**TAULUKKO 7. Uusittavuus: koliformien ja *E.coli* -bakteerin tulosten keskihajonnat****Colilert® 51-well**

Tekijäpari	vesijohtovesi		kaivovesi		steriili vesi	
	koliformit	<i>E.coli</i>	koliformit	<i>E.coli</i>	koliformit	<i>E.coli</i>
JH - PI	0,12	0,34	0,13	0,46	0,22	-

**LES Endo**

Tekijäpari	vesijohtovesi		kaivovesi		steriili vesi	
	koliformit	<i>E.coli</i>	koliformit	<i>E.coli</i>	koliformit	<i>E.coli</i>
JH - PI	0,1	-	0,34	-	0,12	-

Tulosten ja kuvaajien perusteella voidaan sanoa, että Colilert® -menetelmän uusittavuus on hyvä, koska tuloksissa ei ole havaittavissa suuria eroja millään matriisilla. Varsinkin *E.colia* määritettäessä eroavuutta on havaittavissa, mutta se on selitettävissä elävällä materiaalilla ja tulkintaeroilla LES Endo -maljoja luettaessa. Jokaiselta LES Endo -maljoilta varmistettiin jatkomäärityksin noin 5 pesäkettä, joiden perusteella saatiin LES Endo -maljoille *E.coli*-määrät.

Ympätyssä jätevedessä oli enemmän koliformeja kuin *E.colia* ja jatkotutkimusten perusteella näytteissä ei ollut kuin muutama *E.coli*-bakteerisol.

**8.5 Spesifisyys**

Näytematriiseina käytettiin todellista vesijohto- ja kaivovesivettä, jolloin näytteet sisälsivät matriiseille tyypillisiä häiritseviä bakteereita. Colilert® -menetelmän voidaan sanoa olevan spesifinen tutkittaville bakteereille, koska menetelmällä saadut tulokset olivat hyväksyttäviä. Tyypilliset pesäkkeet ja Colilert® -kaivot osoitettiin positiivisiksi tutkittaville bakteereille varmistustestien avulla, jotka on selitetty tarkemmin seuraavissa kappaleissa.

Tyypilliset pesäkkeet tunnistettiin LES Endo -maljoilta tekemällä varmistustestejä standardin SFS 3016:2001 mukaan. Jokaiselta pesäkkeelliseltä maljalta siirrostettiin jatkotestausta varten 1 - 5 tyypillisen näköistä pesäkettä TSA-maljalle (valikoimaton

malja), jota inkuboitiin 37 °C:ssa 21 tuntia. Inkuboinnin jälkeen tehtiin oksidaasitesti siirrostamalla osa pesäkkeestä kaupalliselle liuskalle. Jos liuskan väri muuttui siniseksi 30 sekunnissa, tulos tulkittiin positiiviseksi. Koliformiset bakteerit ja *E. coli* -bakteerit ovat oksidaasinegatiivisia, joten värimuutosta siniseksi ei pitäisi ilmetä. Tämän jälkeen tutkittiin Fluorocult Lauryl Sulphate -putkien avulla  $\beta$ -glukuronidaasi-entsyymien tuotanto. Esi-inkuboitua pesäkettä siirrostettiin Fluorocult Lauryl Sulphate -putkiin ja inkuboitiin 44 °C:ssa 21 tuntia. Inkuboinnin jälkeen tulkittiin putket kasvun, kaasunmuodostuksen ja fluoresenssin perusteella. Tuloksin jälkeen putkiin lisättiin Kovacsin reagenssia. Kirsikanpunaisen värin kehittyminen liemen pinnalle osoittaa idolin tuotannon.

Koliformiseksi bakteeriksi tulkittiin kaikki sellaiset pesäkkeet, jotka antoivat negatiivisen oksidaasireaktion.

*Escherichia coli* – bakteeriksi tulkittiin kaikki sellaiset bakteerit, jotka antoivat negatiivisen oksidaasireaktion ja positiivisen indolireaktion. Lisäksi Fluorocult Lauryl Sulphate -putkissa esiintyi kasvua, kaasunmuodostusta ja fluoresenssia.

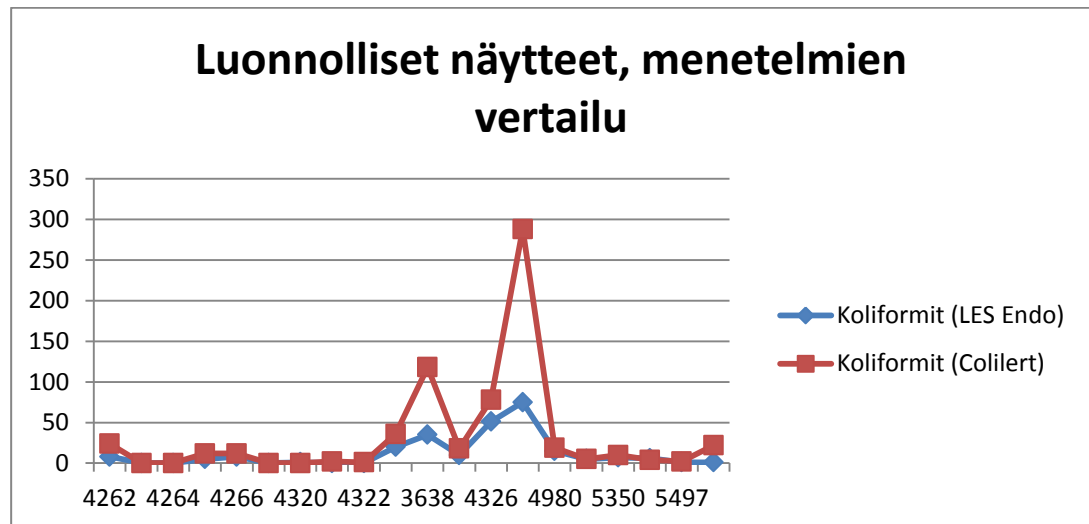
Colilert® -menetelmälle ei varsinaisesti tehty minkäänlaisia varmistuskokeita, mutta muutamasta inkuboidusta liuskasta valittiin satunnaisesti viisi positiivista kaivoa. Injektioneulalla otettiin kaivosta näyte TSA-maljalle jatkotestausta varten. Varmistuskokeet suoritettiin samalla tavoin kuin LES Endo -maljojen ollessa kyseessä. Varmistuskokeet osoittivat, että keltaiset kaivot olivat koliformisia bakteereita ja keltaiset fluoresoivat kaivot *E.coli* -bakteereita.

## 8.6 Luonnolliset näytteet

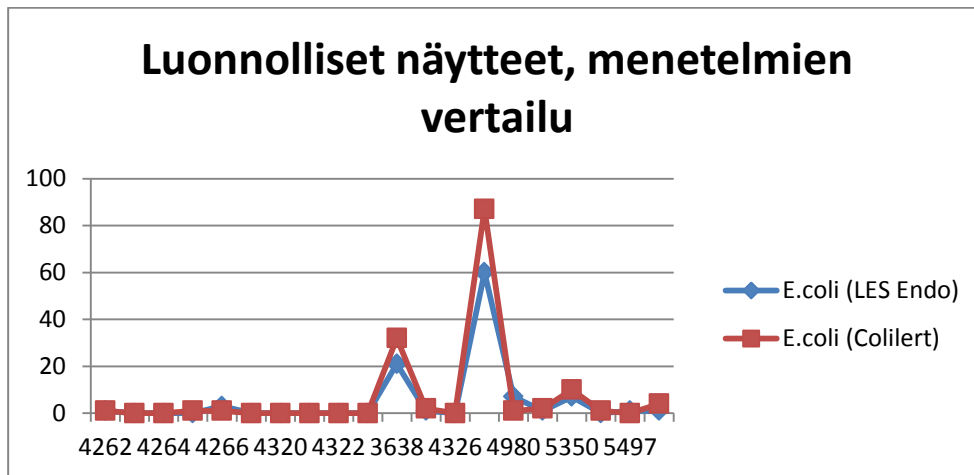
Luonnollisina näytteinä tutkittiin 20 kpl laboratorioon tullutta kaivovesi- tai vesijohtovesinäytettä. Tulokset on esitetty taulukossa 8 ja tulosten perusteella on piirretty kaksi kuvaajaa (kuviot 13–14).

TAULUKKO 8. Luonnolliset näytteet

		L-E		Colilert	
		koliformit	e.coli	koliformit	e.coli
raakavesi	4262	8	1	24	1
raakavesi	4263	0	0	0	0
raakavesi	4264	0	0	0	0
verkosto	4265	5	0	12	1
verkosto	4266	8	3	12	1
verkosto	4319	0	0	0	0
verkosto	4320	1	0	0	0
verkosto	4321	0	0	2	0
verkosto	4322	0	0	1	0
kaivovesi	3430	20	0	36	0
kaivovesi	3638	35	21	118	32
kaivovesi	4185	10	1	18	2
kaivovesi	4326	51	0	78	0
kaivovesi	4979	75	60	288	87
lähde	4980	15	7	19	1
kaivovesi	5255	5	1	5	2
kaivovesi	5350	7	7	10	10
kaivovesi	5360	6	0	4	1
	5497	1	1	2	0
	5578	1	1	22	4



KUVIO 13. Luonnolliset näytteet, koliformit



**KUVIO 14. Luonnolliset näytteet, E.coli**

Luonnollisten näytteiden määritystulokset osoittavat, että molemmilla menetelmillä saadaan vertailukelpoisia tuloksia. Eri menetelmillä saadut tulokset eivät eroa havaittavasti toisistaan. Pientä hajontaa kuitenkin havaittavissa.

## 9 POHDINTA

### 9.1 Johtopäätökset työstä ja sen tuloksista

Validoinnin aikana saatujen tulosten perusteella saatiin määritettyä Colilert®-menetelmälle vertailuarvoja, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Tulosten avulla oli mahdollista määrittää validoitavalle menetelmälle suhteellinen oikeellisuus, uusittavuus ja spesifisyys. Näille vertailuarvoille ei laskettu tilastollisia arvoja, vaan Colilert® -menetelmän luotettavuutta arvioitiin kuvaajien avulla.

Määritettyjen vertailuarvojen perusteella Colilert® -menetelmän voidaan katsoa olevan riittävän luotettava. Lisäksi vertailuarvojen perusteella pystytään osoittamaan, että laboratorio hallitsee validoitavan menetelmän käyttämisen talousvesille pienillä pitoisuuksilla. Kuitenkin jotta laboratorio voisi ottaa menetelmän virallisesti käyttöön, on tehtävä vielä muutamia laajempia koejärjestelyitä, joissa otetaan huomioon suuremmat pitoisuudet ja toistettavuus.

Validointisuunnitelma oli puutteellinen huolellisesta etukäteissuunnittelusta huolimatta. Suunniteltujen koeasetelmien perusteella ei ollut mahdollista määrittää toistettavuutta tai lineaarisuutta. Validoinnissa ei huomioita riittävästi suuria pitoisuuksia. Määritysten perusteella pystytään osoittamaan menetelmän toimivan pienillä pitoisuuksilla, mutta koska suuria pitoisuuksia ei tutkittu, ei sen toimivuutta suurilla pitoisuuksilla pystytä osoittamaan.

## 9.2 Oma kehittyminen opinnäytetyötä tehdessä

Opinnäytetyöprosessin aikana pääsin kehittämään sellaisia taitoja, joita todennäköisesti tulen tarvitsemaan tulevissa työtehtävissä. Validointia suunnitellessani ja suoritettaessani tein yhteistyötä laboratorion mikrobiologin ja työntekijöiden kanssa. Validoinnin aikana pääsin kehittämään yhteistyöhön tarvittavia taitoja. Hyvää kokemusta sain myös työntekijöiden suullisesta ohjeistamisesta, koska validoinnissa oli mukana yksi laboratorion laboranteista.

Validointi oli suunniteltava huolellisesti etukäteen, mikä vaati koko validoinnin katsomista kokonaisuutena. Myös kaikki pienet ongelmat, joita saattaisi tulla vastaan validoinnin suorittamisen aikana vastaan, tuli ottaa huomioon. Samalla ongelmanratkaisukyky kehittyi. Validointia suorittaessa kehittyivät mikrobiologisessa työskentelyssä vaadittavat perustaidot ja alkoivat muuttua rutiinimaisemmiksi. Kirjalliset taidoni kehittyivät opinnäytetyön kirjoitusprosessin aikana, koska siinä oli koottava lähdemateriaalista saatu teoreettinen tieto ja käytännön osuus toimivaksi ja yhtenäiseksi kokonaisuudeksi.

Tämän opinnäytetyön tekemisen jälkeen ymmärrän huomattavasti paremmin mitä mikrobiologisessa validoinnissa on tarkoitus tehdä ja mitä siinä määritetään. Nykyisen tietämykseni perusteella aloittaisin koko validointisuunnitelman tekemisen toisesta näkökulmasta, ja pyrkisin ottamaan enemmän muita työntekijöitä mukaan prosessiin. Suurin osa puutteista tuli eteen vasta tulosten laskemisvaiheessa, eikä siinä vaiheessa ollut enää viisasta aloittaa määrittämiä alusta ottaen huomioon resurssit ja aikataulut. Validointimäärittäykset suoritettiin aikataulun mukaisesti,

mutta ne kaikki oli aikataulutettu liian tiheälle aikavälille, jolloin ei ollut mahdollista korjata puutteita vaan kaikissa määrityksissä esiintyy periaatteessa samoja puutteita.

Validointi ja samalla opinnäytetyö onnistui suunnitelmien mukaisesti muutamaa puutetta lukuun ottamatta. Kaikkia suunniteltuja vertailusuureita ei saatu määritettyä, mutta niiden puuttumisesta huolimatta pystyttiin osoittamaan, että laboratorio hallitsee validoitavan menetelmän käyttämisen. Tulosten tulkinta ja niiden esittäminen selkeästi ja ymmärrettävästi oli haastavaa, mutta mielestäni onnistui pienen pähkäilyn jälkeen ilmaisemaan kaikki saadut tulokset riittävän selkeästi.

## LÄHTEET

Colilert® Brochure. 2010. Esite IDEXX Laboratories Oy:n sivustolla. Viitattu 29.9.2010.  
[Http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en\\_us/water/colilert-brochure.pdf](http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/water/colilert-brochure.pdf).

Colilert®18-Brochure. 2007. Esite IDEXX Laboratories Oy:n sivustolla. Viitattu 29.9.2010.  
[Http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en\\_us/water/0612999\\_c.pdf](http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/water/0612999_c.pdf).

Colilert® 18-Brochure. 2008. Esite IDEXX Laboratories Oy:n sivustolla. Viitattu 29.9.2010.  
[Http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en\\_us/water/096059904.pdf](http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/water/096059904.pdf).

Hänninen, M-L. 2007. Veteen liittyvät mikrobiologiset riskit. Teoksessa Elintarvikehygienia. Toim. Korkeala, H. Helsinki: WSOY.

Korkeala, H. 2007. Bakteerit. Teoksessa Elintarvikehygienia. Toim. Korkeala, H. Helsinki: WSOY.

Laatukäsikirja. 2010. Jyväskylän kaupungin ympäristötoimen laboratorio. Päivitetty 18.3.2010.

Madigan, M. & Martinko, J. 2006. Brock Biology of microorganisms. 11. ed. Upper Saddle River NJ: Prentice-Hall International Editions.

Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. 2000. Brock Biology of microorganisms. 9. ed. Upper Saddle River NJ: Prentice-Hall International Editions.

Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. 1997. Elintarvikeviraston julkaisu Valvonta 13/1997. Helsinki: Elintarvikevirasto.

Pönkä, A. 2002. Terveysturvallisuus. 3. p. Jyväskylä: Suomen Ympäristöterveys.

Salkinoja-Salonen, M. 2002. Mikrobiologian perusteita. 1. p. Jyväskylä: Gummerus.

SFS 3016. 2001. Veden laatu. Koliformisten bakteerien kokonaismäärän määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä. 2 p. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS.

SFS-EN ISO 9308-1. 2001. Veden laatu. *Escherichia coli* ja koliformisten bakteerien toteaminen ja laskeminen. Osa 1: kalvosuodatusmenetelmä. 2 p. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS.

Soveltamisopas talousvesiasetukseen 461/2000. 2000. Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 461/2000 talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista. Vesi- ja viemärlaitosyhdistys. Helsinki: Suomen Kuntaliitto.

Veden koliformisten bakteerien kokonaismäärän ja Escherichia colin määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä. 2009. Jyväskylän kaupungin ympäristötoimen laboratorion oma menetelmäohje.

Quanti-Tray® Brochure. 2009. Esite IDEXX Laboratories Oy:n sivustolla. Viitattu 29.9.2010. [Http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en\\_us/water/0963911.pdf](http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/water/0963911.pdf).

Quanti-Tray® vs. Membrane Filtration. 2004. Esite IDEXX Laboratories Oy:n sivustolla. Viitattu 29.9.2010. [Http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en\\_us/water/096064102.pdf](http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/water/096064102.pdf).

# LIITTEET

## Liite 1. 51-Well Quanti-Tray® MPN-taulukko.

### 51-Well Quanti-Tray\* MPN Table

No. of wells giving positive reaction per 100 mL sample	Most Probable Number (MPN)	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0	<1	0.0	3.7
1	1.0	0.3	5.6
2	2.0	0.6	7.3
3	3.1	1.1	9.0
4	4.2	1.7	10.7
5	5.3	2.3	12.3
6	6.4	3.0	13.9
7	7.5	3.7	15.5
8	8.7	4.5	17.1
9	9.9	5.3	18.8
10	11.1	6.1	20.5
11	12.4	7.0	22.1
12	13.7	7.9	23.9
13	15.0	8.8	25.7
14	16.4	9.8	27.5
15	17.8	10.8	29.4
16	19.2	11.9	31.3
17	20.7	13.0	33.3
18	22.2	14.1	35.2
19	23.8	15.3	37.3
20	25.4	16.5	39.4
21	27.1	17.7	41.6
22	28.8	19.0	43.9
23	30.6	20.4	46.3
24	32.4	21.8	48.7
25	34.4	23.3	51.2
26	36.4	24.7	53.9
27	38.4	26.4	56.6
28	40.6	28.0	59.5
29	42.9	29.7	62.5
30	45.3	31.5	65.6
31	47.8	33.4	69.0
32	50.4	35.4	72.5
33	53.1	37.5	76.2
34	56.0	39.7	80.1
35	59.1	42.0	84.4
36	62.4	44.6	88.8
37	65.9	47.2	93.7
38	69.7	50.0	99.0
39	73.8	53.1	104.8
40	78.2	56.4	111.2
41	83.1	59.9	118.3
42	88.5	63.9	126.2
43	94.5	68.2	135.4
44	101.3	73.1	146.0
45	109.1	78.6	158.7
46	118.4	85.0	174.5
47	129.8	92.7	195.0
48	144.5	102.3	224.1
49	165.2	115.2	272.2
50	200.5	135.8	387.6
51	> 200.5	146.1	infinite

## Liite 2. Validointitulokset matriiseittain

### Matriisi: Vesijohtovesi

	pmy	LES Endo (koliformit)			Colilert (koliformit)		
		JH	PI	k.a.	JH	PI	k.a.
29.9.2010	2,4	6	6	6	9	12	10,5
30.9.2010	15	14	9	11,5	19	15	17
4.10.2010	12,2	17	14	15,5	16	15	15,5
5.10.2010	6,4	1	0	0,5	3	4	3,5
5.10.2010	6,4	1	0	0,5	4	3	3,5

	pmy	LES Endo (e.coli)			Colilert (e.coli)		
		JH	PI	k.a.	JH	PI	k.a.
29.9.2010	2,4	0	0	0	3	1	2
30.9.2010	15	0	0	0	0	2	1
4.10.2010	12,2	2	0	1	2	2	2
5.10.2010	6,4	1	0	0,5	0	1	0,5
5.10.2010	6,4	1	0	0,5	0	0	0

### Matriisi: Kaivovesi

	pmy	LES Endo (koliformit)			Colilert (koliformit)		
		JH	PI	K.a	JH	PI	K.a
29.9.2010	2,4	9	5	7	12	14	13
30.9.2010	15	12	30	21	14	21	17,5
4.10.2010	12,2	15	12	13,5	21	16	18,5
5.10.2010	6,4	3	7	5	5	5	5
5.10.2010	6,4	6	3	4,5	4	3	3,5

	pmy	LES Endo (e.coli)			Colilert (e.coli)		
		JH	PI	K.a	JH	PI	K.a
29.9.2010	2,4	0	0	0	0	0	0
30.9.2010	15	4	1	2,5	3	2	2,5
4.10.2010	12,2	0	0	0	1	3	2
5.10.2010	6,4	0	1	0,5	1	0	0,5
5.10.2010	6,4	0	1	0,5	0	0	0

### Matriisi: Steriili vesi

	pmy	LES Endo (koliformit)			Colilert (koliformit)		
		JH	PI	K.a	JH	PI	K.a
29.9.2010	2,4	7	12	9,5	14	8	11
30.9.2010	15	16	19	17,5	12	25	18,5
4.10.2010	12,2	20	19	19,5	14	10	12
5.10.2010	6,4	4	4	4	3	4	3,5
5.10.2010	6,4	0	6	3	4	5	4,5

	pmy	LES Endo (e.coli)			Colilert (e.coli)		
		JH	PI	K.a	JH	PI	K.a
29.9.2010	2,4	1	0	0,5	3	1	2
30.9.2010	15	1	1	1	0	2	1
4.10.2010	12,2	0	0	0	3	0	1,5
5.10.2010	6,4	0	1	0,5	0	1	0,5
5.10.2010	6,4	0	0	0	1	0	0,5

### Liite 3. Suhteellinen oikeellisuus: interkalibrointitulokset

#### Interkalibrointitulokset

koliformit

	Viljelijä	LesEndo		Colilert	
		Oma tulos	Oikea k.a.	Oma tulos	Oikea k.a.
syyskuu 2007	Anni	45	45	38	45
	Marja	470	683	740	726
	Pirjo	80	95	101	109
maaliskuu 2008	Marja	56	51	34	54
	Anni	59	99	101	110
	Paula	0	0	0	0
syyskuu 2008	Pirjo	18	31	36	32
	Paula	710	543	660	552
maaliskuu 2009	Pirjo	32	32	29	37
	Anni	560	549	560	643
	Paula	94	81	109	90
syyskuu 2009	Pirjo	32	34	56	36
	Pirjo	18	26	25	27
	Paula	310	378	480	436

#### Interkalibrointitulokset

e.coli

	Viljelijä	LesEndo		Colilert	
		Oma tulos	Oikea k.a.	Oma tulos	Oikea k.a.
syyskuu 2007	Anni	45	45	38	45
	Marja	0	0	0	0
	Pirjo	36	55	53	48
maaliskuu 2008	Marja	56	49	34	53
	Anni	14	36	32	31
	Paula	0	0	0	0
syyskuu 2008	Pirjo	5	15	9	10
	Paula	0	0	0	0
maaliskuu 2009	Pirjo	16	14	9	15
	Anni	0	0	0	0
	Paula	52	49	16	18
syyskuu 2009	Pirjo	16	10	19	8
	Pirjo	0	0	0	0
	Paula	200	214	270	219

## Liite 4. Uusittavuus: tulokset ja laskutoimitukset matriiseittain.

### Matriisi: vesijohtovesi

Parittaisten tulosten keskihajonta, LES Endo (koliformit)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	6	6	0,778151	0,7781513	0
30.9.2010	14	9	1,146128	0,9542425	0,191885526
4.10.2010	17	14	1,230449	1,146128	0,084320886
5.10.2010	1	0	0	-	-
5.10.2010	1	0	0	-	-
				summa	0,276206412
				keskiarvo	0,092068804
				s=	0,09617711

Parittaisten tulosten keskihajonta, Colilert (koliformit)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	9	12	0,954243	1,0791812	-0,12493874
30.9.2010	19	15	1,278754	1,1760913	0,102662342
4.10.2010	16	15	1,20412	1,1760913	0,028028724
5.10.2010	3	4	0,477121	0,60206	-0,12493874
5.10.2010	4	3	0,60206	0,4771213	0,124938737
				summa	0,005752329
				keskiarvo	0,001150466
				s=	0,120569079

Parittaisten tulosten keskihajonta, LES Endo (E.coli)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	0	0	-	-	-
30.9.2010	0	0	-	-	-
4.10.2010	2	0	0,30103	-	-
5.10.2010	1	0	0	-	-
5.10.2010	1	0	0	-	-
				summa	-
				keskiarvo	-
				s=	-

Parittaisten tulosten keskihajonta, Colilert (E.coli)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	9	12	0,954243	1,0791812	-0,12493874
30.9.2010	19	15	1,278754	1,1760913	0,102662342
4.10.2010	16	15	1,20412	1,1760913	0,028028724
5.10.2010	3	4	0,477121	0,60206	-0,12493874
5.10.2010	4	3	0,60206	0,4771213	0,124938737
				summa	0,005752329
				keskiarvo	0,001150466
				s=	0,120569079

**Matriisi: kaivovesi**

Parittaisten tulosten keskihajonta, LES Endo (koliformit)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	9	5	0,954243	0,69897	0,25527251
30.9.2010	12	30	1,079181	1,4771213	-0,39794001
4.10.2010	15	12	1,176091	1,0791812	0,09691001
5.10.2010	3	7	0,477121	0,845098	-0,36797679
5.10.2010	6	3	0,778151	0,4771213	0,30103
				summa	-0,11270428
				keskiarvo	-0,02254086
				s=	0,33778594

Parittaisten tulosten keskihajonta, Colilert (koliformit)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	12	14	1,079181	1,146128	-0,06694679
30.9.2010	14	21	1,146128	1,3222193	-0,17609126
4.10.2010	21	16	1,322219	1,20412	0,11809931
5.10.2010	5	5	0,69897	0,69897	0
5.10.2010	4	3	0,60206	0,4771213	0,12493874
				summa	0
				keskiarvo	0
				s=	0,1275217

Parittaisten tulosten keskihajonta, LES Endo (E.coli)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	0	0	-	-	-
30.9.2010	4	1	0,60206	0	0,60205999
4.10.2010	0	0	-	-	-
5.10.2010	0	1	-	0	-
5.10.2010	0	1	-	0	-
				summa	0,60205999
				keskiarvo	0,60205999
				s=	-

Parittaisten tulosten keskihajonta, Colilert (E.coli)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	0	0	-	-	-
30.9.2010	3	2	0,477121	0,30103	0,17609126
4.10.2010	1	3	0	0,4771213	-0,47712125
5.10.2010	1	0	0	-	-
5.10.2010	0	0	-	-	-
				summa	-0,30103
				keskiarvo	-0,150515
				s=	0,461891

**Matriisi: steriili vesi**

Parittaisten tulosten keskihajonta, LES Endo (koliformit)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	7	12	0,845098	1,0791812	-0,234083206
30.9.2010	16	19	1,20412	1,2787536	-0,074633618
4.10.2010	20	19	1,30103	1,2787536	0,022276395
5.10.2010	4	4	0,60206	0,60206	0
5.10.2010	0	6	-	0,7781513	-
				summa	-0,28644043
				keskiarvo	-0,071610107
				s=	0,115973175

Parittaisten tulosten keskihajonta, Colilert (koliformit)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	14	8	1,146128	0,90309	0,243038049
30.9.2010	12	25	1,079181	1,39794	-0,318758763
4.10.2010	14	10	1,146128	1	0,146128036
5.10.2010	3	4	0,477121	0,60206	-0,124938737
5.10.2010	4	5	0,60206	0,69897	-0,096910013
				summa	-0,151441428
				keskiarvo	-0,030288286
				s=	0,224967988

Parittaisten tulosten keskihajonta, LES Endo (E.coli)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	1	0	0	-	-
30.9.2010	1	1	0	0	0
4.10.2010	0	0	-	-	-
5.10.2010	0	1	-	0	-
5.10.2010	0	0	-	-	-
				summa	0
				keskiarvo	0
				s=	-

Parittaisten tulosten keskihajonta, Colilert (E.coli)

	JH (=A)	PI (=B)	logA	logB	logA-logB
29.9.2010	3	1	0,477121	0	0,477121255
30.9.2010	0	2	-	0,30103	-
4.10.2010	3	0	0,477121	-	-
5.10.2010	0	1	-	0	-
5.10.2010	0	0	-	-	-
				summa	0,477121255
				keskiarvo	0,477121255
				s=	-