

Tiina Kolehmainen

Koagulaasipositiivisten stafylokokkien pitoisuusmäärittämissä menetelmien validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko (AMK)
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
4.9.2012

Alkulause

Tämä opinnäytetyö tehtiin Valio Oy:n Tutkimus- ja tuotekehitystoiminnossa Mikrobiologinen laatu -laboratoriossa. Aluksi haluan kiittää laboratoriopäällikkö Anu Surakkaa mahdollisuudesta suorittaa opinnäytetyö hänen erittäin ammattitaitoisessa tiimissään. Erityisen suuret kiitokset valtavasta tuesta, kannustuksesta sekä ohjauksesta, jonka sain varsinkin opinnäytetyöni kirjoitusvaiheessa. Tukesi oli korvaamatonta.

Haluan kiittää lämpimästi myös tutkija Anna Holmia opastuksesta opinnäytetyöni alkuun pääsemisessä ja suuresta tuesta työni aikana sekä esittää kiitokset kannustuksesta myös elintarviketurvallisuuspäällikkö Anna-Maija Taimistolle. Erityiskiitokset ansaitsevat tutkimusassistentit Pirjo Antikainen, Leena Marttila-Lahtiranta, Anniina Vikman sekä Heidi Gustafsson-Räntilä arvokkaista käytännön neuvoista ja avustanne työni aikana. Kiitos teille kaikille uskomattomasta tsempestä, tuestanne ja positiivisuudestanne, jota sain työskennellessäni kanssanne. Yhdistetyt työ- ja koulupäivät tummenevassa syksyssä tuntuivat huomattavasti kevyemmiltä tukenne ansiosta.

Haluan kiittää myös ensimmäistä esimiestäni, kehitysvastaava Riitta Perälää, joka esimerkillään inspiroi minua jatkamaan ainaista uuden oppimista ja kulkemaan jälleen opintojen tielle. Kiitokset myös henkilöstövastaava Marja Nevalaiselle mahdollisuudesta jäädä opintovapaalle.

Lisäksi haluan kiittää lehtori Jarmo Palmia kärsivällisyydestä ja kannustuksesta niin muiden opintojeni kuin opinnäytetyöni osalta.

Kiitokset perheelleni ja ystäväilleni, joilta olen saanut suuresti kannustusta ja tukea.

Helsingissä 4.9.2012

Tiina Kolehmainen

Tekijä Otsikko	Tiina Kolehmainen Koagulaasipositiivisten stafylokokkien pitoisuusmäärittämissel- telmän validointi
Sivumäärä Aika	48 sivua + 5 liitettä 4.9.2012
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	Laboratoriopäällikkö, MMM Anu Surakka Tutkija, ETM Anna Holm Lehtori, FM Jarmo Palm
<p>Opinnäytetyön tavoitteena oli ottaa Valio Oy:n käyttöön vaihtoehtoinen menetelmä, jonka avulla saataisiin tehtyä koagulaasipositiivisten stafylokokkien pitoisuusmäärittäykset nopeammin ja vähemmällä työajalla verrattaessa käytössä olevaan ISO 6888-1: 1999 -referenssimenetelmään. Samalla arvioitiin saataisiinko alustaa vaihtamalla aikaiseksi säästöjä. Validoinnin suureina olivat menetelmien suhteellinen oikeellisuus, lineaarisuus, täsmällisyys sekä spesifisyys.</p> <p>Vaihtoehtoisiksi menetelmiksi valittiin Brilliance Staph 24 - sekä ISO 6888-2: 1999 (RPF) -määrittämisselmenetelmät, joita verrattiin käytössä olevaan referenssimenetelmään. Menetelmien tulosten oikeellisuutta tutkittiin meijeriteollisuuden tuotenäytteillä, jotka keino- tekoisesti kontaminoitiin <i>Staphylococcus aureus</i> -kannalla kolmella eri pitoisuudella. Lisäksi lineaarisuutta tutkittiin yhdellä matriisilla, viidellä eri pitoisuudella. Menetelmien täsmällisyys ja spesifisyys määritettiin käyttämällä referenssimateriaalia, jonka <i>S. aureus</i> -pitoisuus oli valmistajan toimesta varmennettu 95 %:n luottamustasolla. Menetelmien spesifisyyttä tutkittiin myös siirrostamalla alustoille <i>S. aureus</i> -bakteerin lähisukuisia mikrobikantoja sekä tutkimalla normaalinäytteitä.</p> <p>Vertailtavien menetelmien keskiarvojen välillä ei havaittu merkittäviä eroja 95 %:n luottamustasolla. Menetelmien korrelaatio referenssimenetelmään oli molemmilla vertailtavilla menetelmillä korkea ($r > 0,99$). Menetelmien täsmällisyys ja uusittavuus olivat hyväksyttävällä tasolla. Spesifisyyttä tutkittaessa voitiin todeta, että käytössä olevalla Baird-Parker -alustalla kasvoi suuressa osassa näytteitä muuta häiritsevää kasvua kohde-organismien lisäksi. Varmistustestit lisäsivät menetelmän käyttökustannuksia huomattavasti.</p> <p>Vertailun perusteella Brilliance Staph 24 valittiin käyttöön. Brilliance Staph 24 -alustan voitiin todeta antavan yhtenevät pitoisuustulokset, verrattuna ISO 6888-1: 1999 -menetelmään, mutta se oli erittäin paljon spesifisempi, jolloin varmistustestien määrä oli pienempi.</p> <p>Brilliance Staph 24 -alusta on tällä hetkellä FINAS-akkreditoitu ja käytössä Valiolla Mikrobiologinen laatu -laboratoriossa ja Lapinlahden aluelaboratoriossa.</p>	
Avainsanat	koagulaasipositiivinen, validointi, <i>Staphylococcus aureus</i>

Author Title	Tiina Kolehmainen Method validation – Enumeration of coagulase-positive staphylococci
Number of Pages Date	48 pages + 5 appendices 4th September 2012
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Anu Surakka, M. Sc. Anna Holm, M. Sc. Jarmo Palm, Senior lecturer
<p>This Bachelor's thesis was carried out for the Laboratory of Microbiology Quality of Valio R&D. The purpose of this thesis was to introduce an alternative method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci which gives the final results quicker and is more cost-effective than the current ISO 6888-1: 1999 -reference method. The specifications of the validation were relative accuracy, linearity, precision and specificity.</p> <p>The alternative methods, which were compared to the reference method, were chosen to be Brilliance Staph 24 and ISO 6888-2: 1999 (RPF) -techniques. The relative accuracy of the methods was studied with dairy products, which were artificially contaminated with three different contamination levels of <i>Staphylococcus aureus</i> -strain. The linearity of the methods was compared with one matrix and five different contamination levels. Certified reference material was used to determine the precision and specificity of the methods. The specificity of the methods was determined by inoculating closely related <i>S. aureus</i> -strains to the compared mediums and by examining normal matrix.</p> <p>No significant differences were observed between the mean counts obtained in all of the alternative methods. Alternative methods had high ($r > 0,99$) correlation indices between the reference method. The accuracy and reproducibility of the alternative methods were acceptable level. The specificity of ISO 6888-1: 1999 -reference method gave some over-estimations of coagulase-positive staphylococci due to overgrowth with competing flora. This added the need of tube coagulase tests and increased operating expenses of the method.</p> <p>On the basis of the results of this thesis Brilliance Staph 24 was chosen to be taken into use at Valio. Brilliance Staph 24 showed a good degree of equivalence to the ISO 6888-1: 1999 -reference method for the enumeration of coagulase positive staphylococci. Brilliance Staph 24 was highly more specific compared to the current reference method, which allows lower numbers of confirmation tests.</p> <p>Brilliance Staph 24 -medium is now FINAS-accredited and in use at Valio in Laboratory of Microbiology Quality and Lapinlahti Regional Laboratory.</p>	
Keywords	coagulase-positive, validation, <i>Staphylococcus aureus</i>

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	3
2.1	Koagulaasipositiiviset stafylokokit	3
2.1.1	Määritelmä	3
2.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i> ja enterotoksiinit	4
2.1.3	Ominaisuudet, kasvuolosuhteet ja esiintyvyys	4
2.1.4	Esiintyvyys elintarvikkeissa	6
2.1.5	Lainsäädäntö	7
2.2	Koagulaasipositiivisten stafylokokkien pitoisuusmäärittymenetelmät	9
2.2.1	ISO 6888-1: 1999 (Baird-Parker -agar)	9
2.2.2	Brilliance Staph 24	10
2.2.3	ISO 6888-2: 1999 (Rabbit plasma fibrinogen -agar)	11
2.3	Mikrobiologisen menetelmän validointi	13
2.3.1	Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus	13
2.3.2	Menetelmien määritelmät	13
2.3.3	Matriisien, mikrobien ja mikrobipitoisuuksien valinta	14
2.3.4	Matriisin keinotekoinen kontaminointi	15
2.3.5	Referenssimateriaali	15
2.3.6	Normaalinäytteet	16
2.4	Validoinnin suureet	16
2.4.1	Suhteellinen oikeellisuus	16
2.4.2	Lineaarisuus	16
2.4.3	Täsmällisyys	17
2.4.4	Spesifisyys	18
3	Materiaalit ja menetelmät	19
3.1	Kasvualustat ja laimennosliuokset	19
3.2	Näytematriisit ja kontaminointitasot	19
3.3	Keinotekoiseen kontaminointiin käytetyn kannan elvytys	20
3.4	Liemiviljelmän valmistus ja matriisien keinotekoinen kontaminointi	21
3.5	Varmistustestit	25

3.6	Referenssimateriaali	26
3.7	Normaalinäytteet	30
3.8	Kasvualustojen testaus häiritsevilla mikrobikannoilla	30
3.9	Kustannusten vertailu	31
4	Tulokset ja tulosten tarkastelu	32
4.1	Suhteellinen oikeellisuus ja lineaarisuus	32
4.2	Täsmällisyys	35
4.2.1	Uusittavuus	35
4.2.2	Toistettavuus	37
4.3	Spesifisyys	39
4.3.1	Normaalinäytteet	39
4.3.2	Kasvualustojen spesifisyyden testaus häiritsevilla mikrobikannoilla	39
4.4	Kustannusten vertailu	40
4.6	Käytännön työskentely	42
5	Päätelmät	44
	Lähteet	46
	Liitteet	
	Liite 1. Kasvualustojen ja laimennosliuosten koostumus	
	Liite 2. Suhteellinen oikeellisuus	
	Liite 3. Uusittavuus	
	Liite 4. Toistettavuus	
	Liite 5. Kasvualustojen spesifisyyden testaus häiritsevilla mikrobikannoilla	

Lyhenteet

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> . Ei-valikoiva kasvuliemi.
CRM	<i>Certified Reference Material</i> . Varmennetun referenssimateriaalin ominaisuudet on varmennettu useissa laboratorioissa, useilla menetelmillä sekä tiedot on dokumentoitu jäljitettävästi. Referenssimateriaalin avulla voidaan arvioida laboratorion suorituskykyä tai pätevyyttä.
DIK	Dikaliumvetyfosfaatti. Juustonäytteissä käytettävä laimennosliuos.
RPF	<i>Rabbit Plasma Fibrinogen</i> . Kaninplasma-fibronogeeni. Baird-Parker -agariin lisättävä lisäaine, joka lisää alustan kykyä määrittää koagulaasipositiivisia <i>Staphylococcus aureus</i> -bakteereita elintarvikkeista.
TSA	<i>Tryptone Soy Agar</i> . Tryptoni-soija -agar on ei-valikoiva kasvualusta.

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Valio Oy:n Tutkimus- ja tuotekehitystoiminnon Mikrobiologinen laatu -laboratoriossa syksyllä 2010. Valiolla on tuotantolaitoksia Suomessa kaikkiaan 15. Osa tuotantolaitosten omavalvontanäytteistä tutkitaan Elintarviketurvallisuusviraston hyväksymässä ja FINAS-akkreditoidussa Mikrobiologinen laatu -laboratoriossa.

Koagulaasiposiitiiviset stafylokokit luokitellaan ruokamyrkytyksiä aiheuttaviin bakteereihin. Ne eroavat elintarvikeinfektioita aiheuttavista bakteereista enterotoksiinituotannon perusteella. Koagulaasiposiitiivisista stafylokokkilajeista 50–70 % tuottaa lisääntyessään myrkyllistä enterotoksiinia, joka elimistöön joutuessaan jo hyvin pieninä pitoisuuksina aiheuttaa ruokamyrkytyksen. Koagulaasiposiitiivisiä stafylokokkeja tutkitaan elintarvikkeista pääosin seuraamalla tuotannon prosessihygieniaa omavalvontanäytteillä.

Elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista annetaan säännökset Mikrobikriteeriasetuksessa (Euroopan yhteisön asetus 2073/2005), jossa myös määritellään jokaiselle mikrobiologiselle vaatimukselle asetettu referenssimenetelmä. Asetuksen kunkin vaatimuksen raja-arvo on kytketty referenssimenetelmään, jolla saatua tulosta voidaan pitää oikeana. Omavalvontanäytteitä voidaan tutkia myös vaihtoehtoisella menetelmällä. Käytettäessä vaihtoehtoisia analyysimenetelmiä, toimijan on osoitettava toimivaltaiselle viranomaiselle, että niillä voidaan taata vähintään yhtä hyvä elintarviketurvallisuustaso, kuin referenssimenetelmää käytettäessä.

Valiolla käytössä olevassa referenssimenetelmässä koagulaasiposiitivisten stafylokokkien pitoisuusmäärittäykseen (ISO 6888-1: 1999) käytetään valikoivaa Baird-Parker -alustaa. Alustalla kasvaa kuitenkin paljon häiritsevää mikrobistoa, minkä vuoksi joudutaan tekemään runsaasti varmistustestejä. Tämä viivästyttää tulosten valmistumista sekä aiheuttaa ylimääräisiä kustannuksia työkustannuksina ja reagenssikuluina.

Työn tavoitteena oli ottaa Valion käyttöön vaihtoehtoinen menetelmä, jonka avulla saataisiin tehtyä koagulaasiposiitivisten stafylokokkien pitoisuusmäärittäykset nopeammin ja vähemmällä käytetyllä työajalla. Samalla arvioitiin saataisiinko alustaa vaihtamalla aikaiseksi säästöjä, huomioiden kustannuksissa reagenssien hinta sekä työhön käytetty aika. Vaihtoehtoisiksi menetelmiksi valittiin Brilliance Staph 24 - sekä ISO 6888-2: 1999

(RPF) -määritysmenetelmät, joita verrattiin käytössä olevaan ISO 6888-1: 1999 -referenssimenetelmään. Brilliance Staph 24 -määritysmenetelmällä pitoisuusmäärityksen tulokset saadaan valmiiksi 24 tuntia aikaisemmin, kuin käytössä olevalla referenssimenetelmällä. ISO 6888-2: 1999 (RPF) -menetelmässä Baird-Parker -kasvualustaan lisätävän lisäaineen ansiosta pesäkkeiden varmistustestejä ei tarvitse suorittaa erikseen. Näytteinä käytettiin maitoteollisuuden tuotenäytteitä, jotka keinotekoisesti kontaminoitiin *Staphylococcus aureus* -kannalla. Validoinnin suureina olivat menetelmien suhteellinen oikeellisuus, lineaarisuus, täsmällisyys sekä spesifisyys.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Koagulaasipositiiviset stafylokokit

2.1.1 Määritelmä

Koagulaasipositiiviset stafylokokit kuuluvat *Staphylococcus*-sukuun, *Staphylococcaceae*-heimoon ja *Bacillales*-lahkoon. Ne ovat läheistä sukua *Macrococcus*- ja *Salinococcus*-suvun bakteereille. Koagulaasipositiivisiin lajeihin kuuluvat *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi* sekä *Staphylococcus hyicus*. [1, s. 11–59.]

Staphylococcus-sukuun kuuluu 36 lajia ja useita alalajeja. Lajit voidaan jakaa kahteen ryhmään koagulaasientsyymien tuotantonsa perusteella: koagulaasipositiivisiin ja koagulaasinegatiivisiin stafylokokkeihin. Koagulaasipositiiviset stafylokokit voivat tuottaa elintarvikkeissa lisääntyessään enterotoksiineja, jotka haitallisina pitoisuuksina aiheuttavat ruokamyrkytyksiä. *S. aureus* -lajin enterotoksiinintuottokyky on suurin, ja sitä voidaankin pitää yleisimpänä enterotoksigeenisistä lajeista, jotka aiheuttavat ruokamyrkytyksiä. Myös osa koagulaasinegatiivisista lajeista voi tuottaa enterotoksiineja, mutta niiden ei ole kuitenkaan raportoitu aiheuttaneen elintarvikkeiden välitteisiä ruokamyrkytyksiä. [1, s. 13–14; 2, s. 62; 3, s. 83.]

Koagulaasipositiivisten stafylokokkien tuottama koagulaasi on bakteerin entsyymi, joka koaguloi veren fibrinogeenia. Fibrinogeeni, joka on maksan tuottama plasmaproteiini, muuntuu koagulaasin avulla fibriiniksi, joka edelleen säiemäisenä aiheuttaa veren hyytymisen. Fibriinihiyytymä voi suojella bakteeria fagosytoosilta ja eristää sen myös muilta isäntäsolun puolustusmekanismeilta. [4, s. 432.]

Koska vain koagulaasipositiiviset stafylokokit, erityisesti *S. aureus*, on yhdistetty ruokamyrkytyksiin, elintarviketeollisuudessa määritetään näytteistä koagulaasipositiiviset stafylokokit. Määrityksen on todettu toimivan tehokkaana indikaattorina erityisesti ihmislähtöisten kontaminaatioiden osoittamisessa. [5, s. 222.] Elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista annetaan säännökset Mikrobikriteeriasetuksessa (Euroopan yhteisön asetus 2073/2005). Maidolle ja maitopohjaisille tuotteille annetaan koagu-

laasipositiivisten stafylokokkien osalta valmistusta ja laatua koskevat prosessin hygieniavaatimukset.

2.1.2 *Staphylococcus aureus* ja enterotoksiinit

Yksi *S. aureus* -bakteerin tunnetuimmista piirteistä on sen kyky tuottaa elintarvikkeissa lisääntyessään ruokamyrkytystä aiheuttavia enterotoksiineja. *S. aureus* -kannoista 50–70 % tuottaa enterotoksiineja, joita tiedetään olevan 18 erilaista tyyppiä. [3, s. 84.]

Enterotoksiinit ovat voimakkaita hermomyrkkijä, ja ne vaikuttavat suolistossa oleviin hermoresptoreihin. Vagushermon ärsytyksen kautta aivojen oksennuskeskus aktivoituu ja aiheuttaa oksentelua. Jo alle 1 µg enterotoksiinia voi aiheuttaa ruokamyrkytysoireita. *S. aureus* -bakteerin populaation pitoisuus ruokamyrkytyksen aiheuttajana on tällöin yleensä $\geq 10^5$ pmy/g. Bakteerien tuottamat enterotoksiinit sietävät hyvin kuumuutta ja kestävät jopa 30 minuutin keittämisen. Kun toksini on kerran päässyt muodostumaan, se ei tuhoutu uudelleen kuumentamassa, vaikkakin bakteerit kuolisivat. [3, s. 84; 4, s. 711; 6, s. 256.]

2.1.3 Ominaisuudet, kasvuolosuhteet ja esiintyvyys

Stafylokokit esiintyvät tyypillisesti rypälemäisinä rykelminä. Riippuen bakteeriviljelmän kunnosta, solujen koko vaihtelee ollen 0,5–1,5 µm. *S. aureus* -kannat ovat mesofiilisiä, gram- ja katalaasipositiivisiä kemo-organotrofeja, joiden DNA:n GC-koostumus on 30–40 %. Ne ovat tyypillisiä grampositiivisiä kokkibakteereja, joiden soluseinän pääraakeneaineita ovat teikkohapot ja peptidoglykaani. [7, s. 353–354.]

S. aureus -kannat ovat fakultatiivisesti anaerobisia, eli ne pystyvät kasvamaan sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa. Ne sietävät myös poikkeuksellisen korkeita suolapitoisuuksia ja kuivia olosuhteita sekä pystyvät lisääntymään ja tuottamaan enterotoksiineja laajalla pH- ja lämpötila-alueella (taulukko 1). Vastaavat olosuhteet inhiboivat useiden muiden kilpailevien organismien kasvua. [8, s. 32.]

Taulukko 1. *S. aureus*-bakteerin kasvuolosuhteet [8, s. 32].

Olosuhteet	Optimi	Vaihteluväli
Lämpötila °C	37	7–47
O ₂	aerobinen	aerobinen–anaerobinen
NaCl %	0–4	0–20
Vesiaktiivisuus	> 0,99	0,83- > 0,99
pH	6–7	4,6–10

Koagulaasipositiivisia stafylokokkeja esiintyy yleisesti ympäristössä, eläimissä ja ihmisissä. Ainakin 30 %:lla ihmisistä *S. aureus* esiintyy nenän limakalvoilla, jossa sierainten uloimmat osat ovat bakteerin pääasiallisin kasvualue. Nenän kautta bakteeri saastuttaa helposti kädet. *S. aureus* voi esiintyä sekä terveellä että vaurioituneella iholla. Erityisesti vaurioituneella ja tulehtuneella iholla bakteeripitoisuudet ovat suuria, jolloin myös bakteerin leviäminen on todennäköisempää. *S. aureus* leviää ihmisten keskuudessa ja ihmisistä ruokaan joko suorassa tai epäsuorassa kontaktissa ihon kautta sekä hengityselinten tuottamien pisaroiden välityksellä esimerkiksi yskimällä. Ruokamyrkytyksiä aiheuttavat stafylokokit ovat usein peräisin elintarviketta käsittelevästä bakteeria kantavasta ihmisestä, joka saastuttaa sillä käsittelemänsä elintarvikkeen. [4, s. 711; 7, s. 362.]

Eläimissä bakteerit esiintyvät usein suurina pitoisuuksina. Bakteerien leviäminen alkutuotannossa tuotantoeläinten keskuudessa tai eläintuotteiden prosessoinnin yhteydessä aiheuttaa suuria haasteita. *S. aureus* -bakteeria esiintyy raa'assa sian-, siipikarjan- ja naudanlihassa sekä pastörimattomassa maidossa ja siitä valmistetuissa tuotteissa. Esimerkki yhdestä alkutuotannossa esiintyvistä vakavasta ongelmasta on *S. aureus* -bakteerin aiheuttama naudan utaretulehdus, joka aiheuttaa maidontuottajille mittavia menetyksiä ja kustannuksia. Meijeriteollisuudessa *S. aureus* voi päätyä jälkikontaminoimaan maitotuotteita, joko kesken prosessin tai sen jälkeen. [3, s. 84; 7, s. 362.]

2.1.4 Esiintyvyys elintarvikkeissa

Elintarvikkeiden tuotantoketjussa raaka-aine tai elintarvike voi saastua bakteereilla alkutuotannon, teurastuksen, prosessoinnin ja pakkaamisen aikana. Bakteerin lisääntyminen tuotteessa voi tapahtua varastoinnin ja kuljetuksen aikana, jos esimerkiksi säilytyslämpötila nousee liian korkeaksi. Elintarvikkeen tai raaka-aineen vähittäismyynti ja ruoanvalmistus ovat väyliä saastumiselle ja bakteerin lisääntymiselle, mikäli käsittely- ja valmistushygieniaan sekä kuumennus-, jäähdytys- ja säilytyslämpötiloihin ei kiinnitetä tarvittavasti huomiota. [3, s. 85–86.]

Koagulaasipositiiviset stafylokokit sietävät varsin hyvin ympäristön aiheuttamaa stressiä. Ne ovat huonoja kilpailijoita ja voivat lisääntyä erityisesti silloin, kun muiden kilpailevien organismien kasvu elintarvikkeissa estyy. Korkean osmoottisen paineen sietäminen auttaa stafylokokkeja kasvamaan elintarvikkeissa, joissa suolan tai sokerin aiheuttama osmoottinen paine inhiboi muiden kilpailevien organismien kasvua. Tällaisia elintarvikkeita ovat esimerkiksi suolattu liha ja leipomotuotteet. Koagulaasipositiiviset stafylokokit kestävät myös muita itiöttömiä bakteereja paremmin kuumuutta: solut saattavat selvitä puolikin tuntia 60 °C:ssa. Maitokiisseli ja leipomotuotteet ovat esimerkkejä korkean riskin elintarvikkeista, joista kilpailevat mikrobit on minimoitu sokerin aiheuttaman korkean osmoottisen paineen vuoksi tai kypsentämällä. [4, s. 711.]

Ruokamyrkytykset liittyvät yleensä elintarvikkeiden käsittelyvirheisiin. Koska ihmisten aiheuttamaa stafylokokkikontaminaatiota ei voida aina kokonaan estää, on tärkeää jäädyttää ja kylmäsäilyttää elintarvike asianmukaisesti, jolloin estetään bakteerin lisääntyminen ja enterotoksiinien muodostuminen. [4, s. 711; 7, s. 362.]

Suomessa *S. aureus* aiheuttaa harvoin ruokamyrkytyksiä. Zoonosikeskuksen mukaan vuosina 2000–2010 ruokamyrkytysepidemiarekisteriin ilmoitettuja elintarvikevälitteisiä *S. aureus* -epidemian aiheuttajia oli kaikkiaan yhdeksän kappaletta. Kuudessa ruokamyrkytystapauksista kyseessä olivat liha ja lihavalmisteet. Kasvikset ja kasvisvalmisteet sekä kala ja kalavalmisteet olivat osallisina yhteensä kahdessa tapauksista. Yhdessä tapauksessa epidemian lähdettä ei pystytty selvittämään [9.]

2.1.5 Lainsäädäntö

Suomen kansallinen lainsäädäntö sekä Euroopan yhteisön lainsäädäntö säätelevät yhdessä elintarvikkeiden tuotantoa ja valvontaa, jolloin kumpaakin lakia noudatetaan samanaikaisesti. Euroopan yhteisön säädökset voivat olla joko päätöksiä, asetuksia tai direktiivejä, ja ne pannaan toimeen kansallisella lainsäädännöllä. Asetukset ovat voimassa sellaisenaan kaikissa unionin jäsenmaissa. Direktiivit eivät heti ole sitovia, vaan ne on ensin otettava kansalliseen lainsäädäntöön. [2, s. 474.]

Kansallisen lainsäädännön keskeisimpiä elintarvikevalvontaa koskevia säädöksiä ovat elintarvikelaki (23/2006) ja sen nojalla annetut alemman asteen säädökset. Elintarvikelakia muutettiin lailla elintarvikelain muuttamisesta (352/2011), jonka muutokset astuivat voimaan 1.9.2011. Alemman asteen säädökset ovat muun muassa valtioneuvoston asetus elintarvikevalvonnasta (420/2011), maa- ja metsätalousministeriön asetus laitosten elintarvikehygieniasta (1369/2011) sekä asetus lihantarkastuksesta (1470/2011). [10.]

Elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista annetaan säännökset Mikrobikriteeriasetuksessa (Euroopan yhteisön asetus 2073/2005). Mikrobiologisella vaatimuksella tarkoitetaan vaatimusta, jolla määritetään tuotteen, elintarvike-erän tai prosessin hyväksyttävyys. Vaatimus perustuu mikro-organismien puuttumiseen, esiintymiseen tai määrään sekä joko niiden toksiinien tai metaboliittien määrään paino- tai tilavuusyksikköä kohden. [11, s. 7.]

Mikrobikriteeriasetus voidaan jakaa kahteen osaan: valmistusprosessin aikaiseen hygieniaan ja elintarvikkeen turvallisuutta koskeviin vaatimuksiin. Prosessin hygieniaa koskevalla vaatimuksella tarkoitetaan vaatimusta, joka osoittaa tuotantoprosessin hyväksyttävän toimivuuden. Kontaminaatioarvot ovat viitteellisiä ja ylittyessään ne vaativat korjaavia toimia, joilla varmistetaan prosessin hygieniatason säilyminen elintarvikelainsäädännön mukaisena. Elintarvikkeen turvallisuutta koskevilla vaatimuksilla tarkoitetaan vaatimusta, jolla määritetään elintarvike-erän tai tuotteen hyväksyttävyys ja jota sovelletaan markkinoille saatettuihin tuotteisiin. [11, s. 7–8.]

Maidolle ja maitopohjaisille tuotteille annetaan koagulaasipositiivisten stafylokokkien osalta valmistusta ja laatua koskevat prosessin hygieniavaatimukset, jotka ovat taulukossa 2.

Taulukko 2. Maidon ja maitopohjaisten tuotteiden prosessihygieniavaatimukset. [11, s. 24–26.]

Tuote	Osanäytteiden lukumäärä		Laatuvaatimus pmy/ml		Sovel-tamis-mis-vaihe	Toiminta raja-arvon ylityksessä
	n	c	m	M		
Juustot (raakamaidosta)	5	2	10 ⁴	10 ⁵	A	D
Pastörintia heikommin lämpökäsitellystä maidosta valmistetut juustot sekä pastöroidusta tai voimakkaammin lämpökäsitellystä maidosta tai herasta valmistetut kypsennetyt juustot	5	2	100	1000	A	D
Pastöroidusta tai voimakkaammin lämpökäsitellystä maidosta tai herasta valmistetut kypsyttämättömät pehmeät juustot (tuorejuustot)	5	2	10	100	B	D
Maitojauhe ja herajauhe	5	2	10	100	B	D
n = osanäytteiden lukumäärä c = osanäytteiden lukumäärä, joiden bakteerimäärien voidaan sallia ylittävän normin alemman raja-arvon m = normin alempi raja-arvo M = normin ylempi raja-arvo, jota yksikään osanäyte ei saa ylittää A = valmistusprosessin vaihe, jossa stafylokokkien määrän oletetaan olevan suurimmillaan B = valmistusprosessin loppu D = näytteistä tutkittava stafylokokkienterotoksiinit						

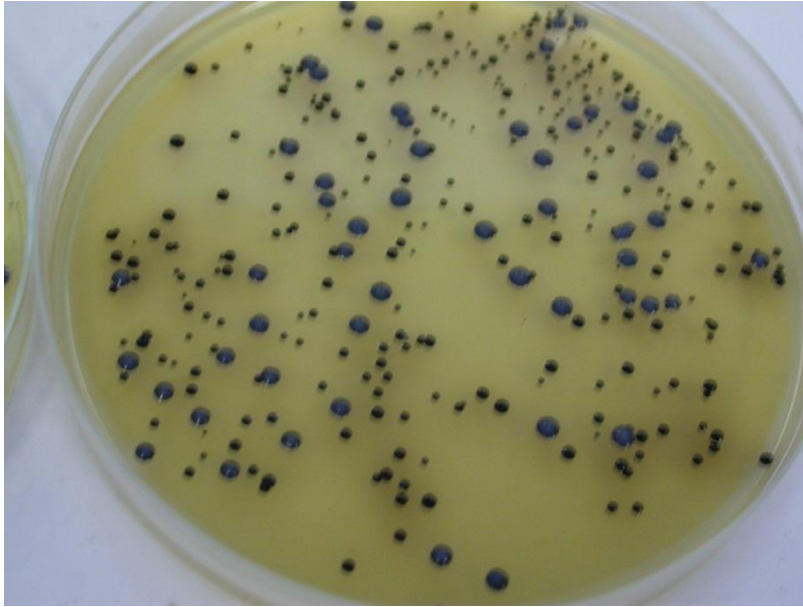
Eräille juustoille sekä maito- ja herajauheelle on asetettu stafylokokkienterotoksiinivaatimus. Mikäli koagulaasipositiivisten stafylokokkien pitoisuus on yli 10⁵ pmy/g:ssa, on näytteistä tutkittava stafylokokkienterotoksiinit. Pitoisuuksien ollessa valmistusprosessin aikana kyseisellä tasolla, on vaarana, että tuotteeseen on muodostunut stafylokokkienterotoksiineja. [12, s. 53.]

2.2 Koagulaasipositiivisten stafylokokkien pitoisuusmäärittäminen

2.2.1 ISO 6888-1: 1999 (Baird-Parker -agar)

ISO 6888-1: 1999 -menetelmässä käytetään valikoivana kasvualustana Baird-Parker -alustaa. Siirrostus alustalle tehdään pintaviljelynä. Maljoja inkuboidaan aerobisesti 35 °C:ssa tai 37 °C:ssa ja maljat luetaan 24 tunnin ja 48 tunnin inkuboinnin jälkeen. Tyypilliset ja ei-tyypilliset pesäkkeet varmistetaan erillisellä koagulaasikokeella ja tulos ilmoitetaan koagulaasipositiivisten stafylokokkien pesäkemääränä joko millilitraa tai grammaa kohden näytteessä. Tämän menetelmän kasvualustaan viitattaessa käytetään jatkossa nimitystä Baird-Parker. [13, s. 6.]

Baird-Parker -alusta on koagulaasipositiivisten stafylokokkien kasvatukseen kehitetty valikoiva kasvualusta, jossa on stafylokokkien kasvua edistäviä ja toisaalta häiritsevän mikrobiston kasvua estäviä yhdisteitä. Natriumpyruvaatti suojaa vioittuneita soluja ja edesauttaa niiden elpymistä. Glysiini, litium sekä telluriitti heikentävät häiritsevän bakteeriston kasvua. Koagulaasipositiiviset stafylokokit pelkistävät telluriittia ja muodostavat mustia/harmaita pesäkkeitä. Koagulaasipositiivisten stafylokokkien aiheuttamat tyypilliset reaktiot havaitaan lisäämällä alustaan munankeltuaisemulsiota, mikä tekee alustasta kellertävän ja läpinäkymättömän (kuva 1). 48 tunnin inkuboinnin jälkeen pesäkkeiden ulkopuolelle muodostuu yleensä kirkas alue munankeltuaisemulsion proteolyysin johdosta. Useimmat koagulaasipositiiviset stafylokokit muodostavat myös läpinäkymättömän kehän pesäkkeen ulkopuolelle todennäköisesti lipaasin vaikutuksesta. Toisaalta myös jotkin koagulaasinegatiiviset lajit (esim. *Staphylococcus saprophyticus*) saattavat muodostaa sekä kirkkaan alueen että läpinäkymättömän kehän pesäkkeen ulkopuolelle. [13, s. 11; 14.]



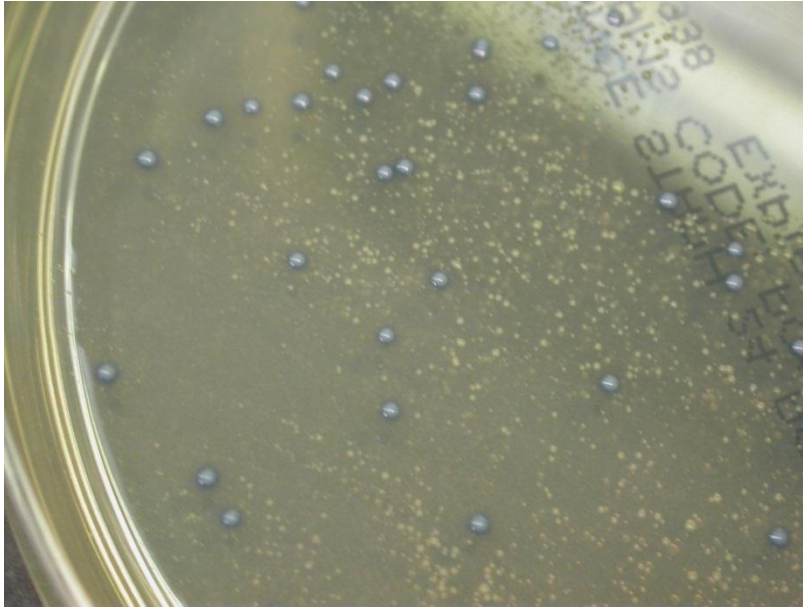
Kuva 1. Baird-Parker -kasvualusta, jolla kasvaa tyypillisiä ja ei-tyypillisiä koagulaasipositiivisia stafylokokkeja.

Kaikki koagulaasipositiiviset stafylokokkikannat eivät kuitenkaan muodosta kehää pesäkkeen ympärille, minkä vuoksi myös kehättömät tyypilliset pesäkkeet pitää varmistaa. Baird-Parker -alustalla voi kasvaa tyypillisinä, mutta kehättöminä pesäkkeinä myös monia muita mikrobeja kuin stafylokokkeja. Häiritsevä kasvusto saattaa peittää alleen koagulaasipositiivisten pesäkkeiden koagulaasireaktion. Erityisesti juustoissa tällaista häiritsevää kasvustoa on paljon ja nämä pesäkkeet on varmistettava koagulaasikokeella. [13, s. 11; 14.]

2.2.2 Brilliance Staph 24

Brilliance Staph 24 -agar on valikoiva kromogeeninen alusta koagulaasipositiivisten stafylokokkien määrittämiseen. Siirrostus alustalle tehdään pintaviljelynä ja maljoja inkuboidaan aerobisesti 24 tuntia 37 °C:ssa. Tyypilliset pesäkkeet varmistetaan koagulaasikokeella, kuten ISO 6888-1: 1999 -menetelmässä. [15.]

Valikoiva alusta estää gramnegatiivisen mikrobiston sekä ei-kohteena olevia grampositiivisten organismien kasvua. Natriumpyruvaatti edesauttaa stressaantuneiden solujen toipumista, peptoni ja kasvutekijät puolestaan takaavat kohdeorganismien nopean kasvun. Kromogeeni aktivoituu koagulaasipositiivisten stafylokokkien vaikutuksesta ja värjää positiiviset pesäkkeet tummansinisiksi estäen samalla koagulaasinegatiivisten stafylokokkien kasvun kokonaan tai jättämällä ne värittömiksi (kuva 2). [15.]



Kuva 2. Brilliance Staph 24 -kasvualustalla tyypillisiä sinisiä koagulaasipositiivisia stafylokokkipesäkkeitä.

Brilliance Staph 24 -alusta on validoitu ISO 16140 -standardin mukaisesti referenssimenetelmää vastaan Microval-validointiorganisaation toimesta. Validoinnissa testattiin 36 koagulaasipositiivista stafylokokkikantaa, joista 36/36 kasvoi tyypillisinä pesäkkeinä Brilliance Staph 24 -alustalla. Kaikki koagulaasinegatiiviset stafylokokit ($n = 28$) kasvoivat ei-tyypillisinä pesäkkeinä. Validoinnissa referenssimenetelmänä käytetyllä ISO 6888-1: 1999 -menetelmällä jouduttiin varmistamaan 13/28 kantaa, jotka varmistustestien jälkeen antoivat negatiivisen tuloksen. Tutkimuksen perusteella Brilliance Staph 24 -alustan voitiin todeta antavan yhteneväiset tulokset verrattaessa sitä ISO 6888-1: 1999 -menetelmään, mutta se oli erittäin paljon spesifisempi. [16.]

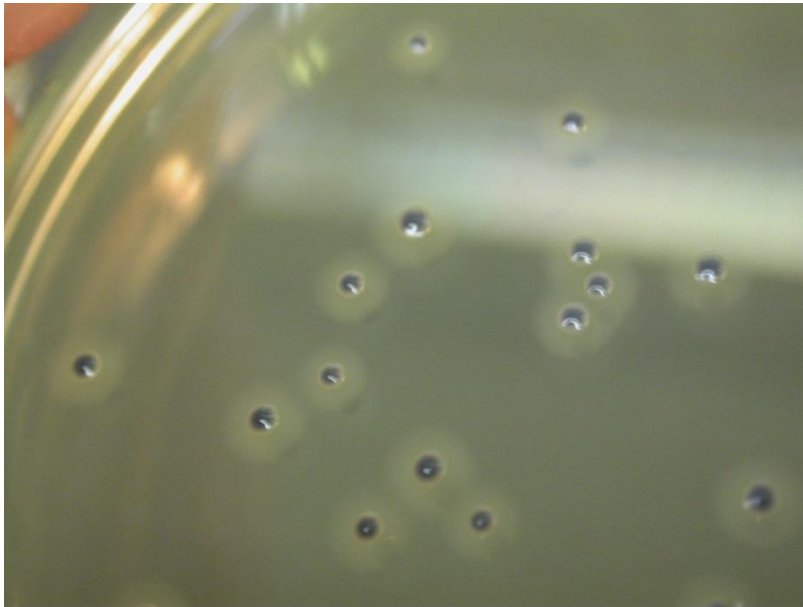
2.2.3 ISO 6888-2: 1999 (Rabbit plasma fibrinogen -agar)

ISO 6888-2: 1999 -menetelmässä käytetään valikoivana kasvualustana Baird-Parker -alustaa, jossa kaninplasmafibrinogeeni -lisäaineen (RPF) lisääminen korvaa perinteisen Baird-Parker -alustan munankeltuaisemulsion. Menetelmää suositellaan käytettäväksi erityisesti silloin, kun voidaan olettaa stafylokokkien muodostavan ei-tyypillisiä pesäkkeitä perinteisellä Baird-Parker -alustalla tai elintarvikkeen sisältämä taustamikrobisto häiritsee tyypillisten pesäkkeiden löytymistä. [17, s. 4–6.]

ISO 6888-2: 1999 -menetelmässä näytteiden siirrostus alustalle tehdään pintaviljelynä. Maljoja inkuboidaan aerobisesti 24 tuntia 35 °C:ssa tai 37 °C:ssa. Inkubointia jatketaan tarvittaessa vielä 24 tuntia. Tyypilliset pesäkkeet muodostavat alustalla RPF-lisäaineen ansiosta koagulaasireaktion, jolloin erillistä koagulaasikoetta ei tarvitse tehdä. Tulos ilmoitetaan koagulaasipositiivisten stafylokokkien pesäkemääränä joko millilitraa tai grammaa kohden näytteessä. [17, s. 5–8.]

RPF-lisäaine sisältää fibrinogeeniä, trypsiinia ja kaninplasmaa. Fibrinogeeni lisää koagulaasireaktiota ja trypsiini-inhibiittori estää fibrinolyysistä. Kaninplasman on havaittu olevan spesifisin koagulaasiaktiivisuudelle verrattaessa sitä muihin plasmoihin. [18.]

Kasvualusta on kirkas ja lievästi kellertävä/oljen värinen. Tyypillinen pesäke on musta/harmaa ja ympärillä on läpinäkymätön koagulaasikehä (kuva 3).



Kuva 3. Baird-Parker (RPF) -alusta, jolla kasvaa tyypillisiä koagulaasipositiivisia stafylokokkipesäkkeitä.

Häiritsevä kasvusto saattaa hävittää koagulaasireaktion aiheuttaman kehän pesäkkeiden ympärillä. Tämän menetelmän kasvualustaan viitattaessa käytetään jatkossa nimitystä Baird-Parker (RPF). [18.]

2.3 Mikrobiologisen menetelmän validointi

2.3.1 Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus

Mikrobiologiassa tutkittava analyytti on elävää materiaalia. Mikro-organismit voivat esimerkiksi lisääntyä tai kuolla näytteessä tai laimennoksessa, jolloin oikeaa lukumäärää ei yleensä tiedetä. Tutkittaessa kvantitatiivisilla menetelmillä tiettyjen mikro-organismien tai bakteeriryhmien esiintymistä elintarvikkeissa, useat tekijät vaikuttavat tulosten hajontaan ja saatujen tulosten epävarmuuteen. Epävarmuustekijöitä ovat aina vähintään tuloksen lukemisen epävarmuus, siirrostilavuuden epävarmuus sekä pesäkemäärän hiukkastilastollinen epävarmuus. Myös mikrobien epätasainen jakaantuminen näytteessä voi aiheuttaa hajontaa tuloksissa. Nämä tekijät tulisi ottaa huomioon lopullista tulosta arvioitaessa. On tärkeää, että määrätty mittausepävarmuus on realistinen ja että täsmällisyyden luottamusväli ei ole asetettu liian kapeaksi. [19, s. 4–9; 20, s. 14.]

2.3.2 Menetelmien määritelmät

Referenssimenetelmä

Referenssimenetelmällä tarkoitetaan menetelmää, joka on perusteellisesti tutkittu ja sen ominaisuudet tunnetaan. Menetelmässä tarvittavien työskentelyolosuhteiden ja menetelmäohjeiden tulee olla selkeästi ja täsmällisesti kuvattu. Referenssimenetelmän on myös osoitettu antavan oikeita ja toistettavia tuloksia. [21, s. 20.]

Standardimenetelmä

Standardimenetelmällä tarkoitetaan standardisoimisjärjestön julkaisemaa menetelmää. Standardisoimisjärjestöjä ovat kansallinen standardisoimisjärjestö Suomen Standardisoimisliitto (SFS), eurooppalainen järjestö European Committee for Standardization (CEN) sekä kansainvälinen järjestö International Organization for Standardization (ISO). [22, s. 5.]

Vaihtoehtoinen menetelmä

Vaihtoehtoisella menetelmällä tarkoitetaan yleensä menetelmää, joka on validoitu referenssimenetelmää vastaan EN/ISO 16140 -standardin tai muun samanarvoisen, kansainvälisesti hyväksytyyn protokollan mukaisesti. Kaupallisen pikamenetelmän tulee olla kolmannen osapuolen sertifioima. Kansainvälisiä validointiorganisaatioita ovat muun muassa AOAC Research Institute (AOAC RI), European Validation and Certification Organization (Microval), Association française de normalisation (AFNOR) tai Nordic Validation and Certification Organization (Nordval). [12, s. 13.]

Nopeatempoisissa teollisuusprosesseissa useita päiviä kestävät laboratoriomääritykset ovat usein liian hitaita. Vaihtoehtoisten menetelmien tarkoituksena on nopeuttaa ja helpottaa teollisuuden ja laadunvalvonnan rutiinianalyysyjä.

2.3.3 Matriisien, mikrobien ja mikrobipitoisuuksien valinta

Validoitavan menetelmän käyttöalue vaikuttaa aina matriisien valintaan. Määritettäessä *S. aureus* -bakteereita meijerituotteista, matriisit voidaan valita esimerkiksi pastöroidettomista, jäädytetyistä, fermentoiduista tai kuivatuotteista. [23, s. 35.]

Mikrobiksi valitaan validoitavalla menetelmällä analysoitava mikrobi. Ensisijaisesti näytteen kontaminointiin tulee käyttää tunnetun mikrobipitoisuuden omaavia referenssimateriaaleja. Laboratorio voi myös valmistaa mikrobisuspensioita tunnetuista bakteerikannoistaan. Koska elintarvikkeet yleensä sisältävät jonkin verran häiritseviä mikrobeja, niitä ei tarvitse erikseen lisätä. [22, s. 11.]

Mikäli validoinnissa määritettävälle mikrobille on olemassa yleisessä käytössä olevat ohje-arvot, pyritään nämä ottamaan huomioon valittaessa näytteen pitoisuustasoja. Käytössä olevat ohje-arvot saattavat olla pitoisuudeltaan korkeita. Teollisuudessa määrittämismenetelmillä halutaan yleensä löytää myös alhaisimmat mikrobipitoisuudet, jolloin kontaminointipitoisuuksiksi valitaan myös ohje-arvoja matalampia mikrobipitoisuuksia. Jokaisesta näytetasosta valmistetaan rinnakkaiset maljat, joiden laimennoksesta tehdään edelleen peräkkäiset laimennokset [22, s. 11; 23, s. 19.]

Pesäkkeiden laskeminen pyritään suorittamaan vähintään kahdesta peräkkäisestä laimennoksesta ja tulokset ilmoitetaan painotettuna keskiarvona kaavalla:

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1 n_2) d} \quad (1)$$

$\sum a$ on pesäkkeiden lukumäärä jokaiselta tuloksen laskentaan käytettävältä maljalta

V on pipetointitilavuus kullekin maljalle millilitroina

n_1 on ensimmäisen laskentaan käytetyn laimennoksen rinnakkaisten lukumäärä

n_2 on toisen laskentaan käytetyn laimennoksen rinnakkaisten lukumäärä

d on ensimmäinen (pienempi) laskentaan käytetty laimennos.

Painotettu keskiarvo lasketaan maljoilta, joilla on enintään maksimimäärä pesäkkeitä.

[13, s. 12–13.]

2.3.4 Matriisin keinotekoinen kontaminointi

Validoinnissa matriisien ja näytteiden valinnassa tulee ensisijaisesti käyttää tutkittavalla analyytillä luonnollisesti kontaminoituneita näytteitä. Mikäli luonnollisesti kontaminoituneita näytteitä ei ole, voidaan näytteet kontaminoida keinotekoisesti. [23, s. 9.]

Matriisin keinotekoinen kontaminointi suoritetaan siirrostamalla näytteeseen tunnettu määrä analysoitavaa mikrobia. Siirrostettujen näytteiden rinnalla tutkitaan aina myös siirrostamaton matriisi eli 0-näyte. [22.]

2.3.5 Referenssimateriaali

Referenssimateriaalin avulla voidaan arvioida menetelmien oikeellisuutta sekä laboratorion suorituskykyä ja pätevyyttä. Mikrobiologisia referenssimateriaaleja on saatavilla tunnetuilla mikrobikannoilla ja -pitoisuuksilla kylmäkuivattuina ampulleina. Kylmäkuivatut ampullit liuotetaan valmistajan ohjeiden mukaisesti, jolloin niistä saadaan tiettyjä mikrobipitoisuuksia sisältäviä suspensioita. [24.]

Varmennetun referenssimateriaalin (CRM) ominaisuudet on varmennettu useissa laboratorioissa ja useilla menetelmillä sekä tiedot on dokumentoitu jäljitettävästi. Referens-

simateriaali voidaan käyttää laimentamisen jälkeen joko sellaisenaan tai siirrostettuna tutkittavaan matriisiin. [22.]

2.3.6 Normaalinäytteet

Mikäli validoinnin yhteydessä koagulaasipositiivisilla stafylokokeilla luonnollisesti kontaminoituneita meijeriteollisuuden tuotenäytteitä ei ole saatavilla, voidaan käyttää normaalinäytteitä. Normaalinäytteillä tarkoitetaan laboratorion rutiinityöskentelyn ohessa kerättyjä näytteitä, joissa tiedetään olevan paljon häiritsevää mikrobistoa. Näytteiden tarkoituksena on tutkia näytematriiseja mahdollisimman laajalta käyttöalueelta, jolloin validoinnin laajuutta matriisien osalta voidaan kasvattaa. Näytteet on pyrittävä määrittämään mahdollisimman nopeasti näytteen saapumisesta, jotta minimoitaisiin muun muassa mahdolliset mikrobiologiset muutokset. Mikäli näytteitä joudutaan säilyttämään ennen analysointia, on huomioitava näytteiden oikeat säilytyslämpötilat ja olosuhteet, sekä bakteerisolujen mahdollinen stressaantuminen säilytyksen aikana [23, s. 20–38.]

2.4 Validoinnin suureet

2.4.1 Suhteellinen oikeellisuus

Suhteellinen oikeellisuus tarkoittaa referenssimenetelmän ja vaihtoehtoisen menetelmän tulosten vastaavuutta tutkittaessa samoja näytteitä. Mikrobiologiassa analytti on elävä mikro-organismi, jolloin menetelmien antamien tulosten oikeellisuutta ei pystytä varmuudella määrittämään. Oikeellisuutta voidaan määrittää käyttämällä sertifioituja referenssimateriaaleja, joiden valmistajan ilmoittamaa pitoisuutta voidaan pitää oikeana. Oikeellisuutta voidaan myös arvioida valmistamalla siirrostettuja näytteitä, jolloin referenssimenetelmän antamaa tulosta pidetään oikeana. [22, s. 7; 23, s. 8.]

2.4.2 Lineaarisuus

Lineaarisuus kuvaa kvantitatiivisen menetelmän kykyä antaa tuloksia, jotka ovat suoraan verrannollisia tutkittavan analyytin määrään näytematriisissa. Nostettaessa analyytin määrää, muutos saa aikaan tuloksissa samassa suhteessa yhtä suuren muutoksen. Menetelmän lineaarisuuden määrittämistä varten määritetään vähintään viisi eri

pitoisuustasoa. Pitoisuustasojen tulee kattaa tasaisesti koko menetelmän määrittelyalue: minimitaso (kontaminoimaton nollanäyte), keskitaso, maksimitaso ja kaksi välitasoa. [23, s. 18–19.]

Tulosten avulla voidaan laatia regressiosuora pienimmän neliösumman menetelmää käyttämällä. Kuvaajassa tuloksena saatu vaste esitetään pitoisuuden funktiona yhtälön (2) avulla. Regressiosuora voidaan merkitä yhtälöllä:

$$y = mx + b \quad (2)$$

- b on suoran kulmakerroin
- x on näytteen pitoisuus
- m on y-akselin leikkauspiste
- y on selittävän muuttujan arvo.

Regressioanalyysin avulla voidaan laskea pistejoukkoa mahdollisimman hyvin kuvaava suoran yhtälö, jonka sovituksen hyvyttä kuvaa regressiokerroin (R^2). [25, s. 83–84; 26, s. 6.]

Kvantitatiivisissa menetelmissä pesäkelaskennalle on asetettu ala- ja ylärajat, joiden sisällä voidaan laskea pesäkkeiden määrä luotettavasti. Jotta päästään laskenta-alueelle, näytettä joudutaan usein laimentamaan. Mikäli tulos joudutaan antamaan määrittelyalueen ulkopuolella olevien pesäkemäärien perusteella, annettu tulos esitetään arviona. [22, s. 10.]

2.4.3 Täsmällisyys

Täsmällisyys kuvaa vaihtelua toistettujen testien välillä. Täsmällisyyden suureita ovat toistettavuus ja uusittavuus. Toistettavuudella tarkoitetaan saman henkilön suorittamia, useiden mahdollisimman samankaltaisissa olosuhteissa toistettujen mittausten tulosten lähekkäisyyttä. Toistettavuusolosuhteissa tekijät pidetään vakioina, jolloin ne eivät aiheuta vaihtelua koetuloksiin. [27, s. 2.]

Laboratorion sisäisellä uusittavuudella tarkoitetaan yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyyttä eri henkilöiden tutkiessa identtisiä näytteitä. Uusittavuusolosuhteissa tekijät vaihtelevat, jolloin ne aiheuttavat vaihtelua koetuloksiin. [27, s. 46.]

2.4.4 Spesifisyys

Spesifisyys tarkoittaa menetelmän kykyä määrittää tutkittava analyytti näytteestä, jossa on myös muita häiritseviä tekijöitä. Menetelmän kykyä määrittää vain haluttu analyytti tai sen määrä häiritsevät yleensä matriisin ominaisuudet tai sen taustakohina. Mikrobiologiassa menetelmän spesifisyys määräytyy alustan koostumuksen ja kasvatolosuhteiden sekä mikrobikantojen ominaisuuksien vaihtelun perusteella. Analyytin erottelu tapahtuu vasta kasvualustalla, jolloin näyte analysoidaan häiritsevine taustoineen, mikrobistoinen ja materiaaleineen. [22, s. 2–3; 23, s. 24.]

Mikrobiologiset menetelmät eivät käytännössä ole täysin spesifisiä, joten menetelmää validoitaessa on opittava tunnistamaan tyypilliset pesäkkeet muun häiritsevän mikrobiston joukosta. [22, s. 10.]

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Kasvualustat ja laimennosliuokset

Työssä käytettyjen kasvualustojen ja laimennosliuosten koostumus ja valmistus on kuvattuna liitteessä 1.

Siirrostusvalmiit Baird-Parker -maljat sekä 150 ml:n puolivalmiit agar-annospullot tilattiin Valion alustapalvelusta. Pulloissa oleva agar sulatettiin ja temperoitiin lämpöhautteessa (45 °C), minkä jälkeen pulloihin lisättiin aseptisesti munankeltuaise-mulsiota ennen maljojen valamista. Brilliance Staph 24 -maljat tilattiin siirrostusvalmiina tavaran-toimittajalta. Baird-Parker (RPF) -agar valmistettiin alustapalvelussa puolivalmiiksi 90 ml:n annospulloihin. Pulloissa oleva agar sulatettiin ja temperoitiin lämpöhautteessa (45 °C). Alustaan lisättävä kylmäkuivattu RPF-lisäaine liuotettiin 10 ml:lla steriiliä vettä, minkä jälkeen RPF-lisäaine lisättiin pulloon ennen maljojen valamista. Maljat valettiin laminaarikaapissa ja maljoja kuivattiin kannet auki 15 minuuttia ennen siirrostuksen aloittamista.

3.2 Näytematriisit ja kontaminoititasot

Näytteinä käytettiin meijeriteollisuuden tuotenäytteitä, jotka keino-tekaisesti kontaminoitiin *Staphylococcus aureus* -kannalla (Valion kantakokoelman kanta 3269). Näytematriiseina olivat maitojauhe, kevytmaito, Oltermanni-juusto sekä Edam-juusto, ja kontaminointi tehtiin usealla pitoisuudella (taulukko 3).

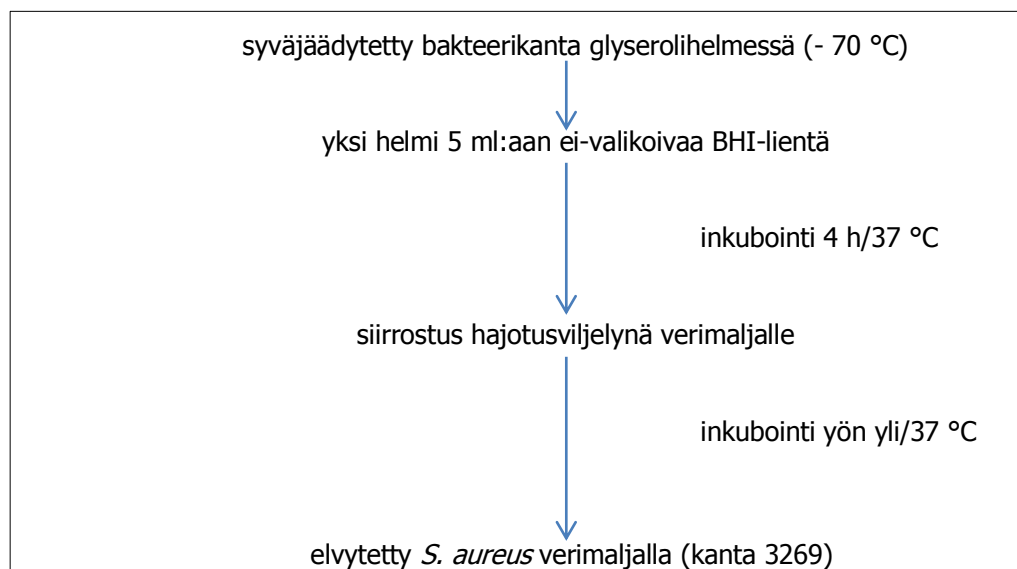
Taulukko 3. Näytematriisit ja oletuspitoisuudet.

Matriisi	Oletuspitoisuus (pmy/g)
Maito	0 pmy/g 0-10 ¹ pmy/g 10 ¹ -10 ² pmy/g 10 ² -10 ³ pmy/g 10 ³ -10 ⁴ pmy/g 10 ⁴ -10 ⁵ pmy/g
Maitojauhe, Edam ja Oltermanni	0 pmy/g 10 ¹ -10 ² pmy/g 10 ² -10 ³ pmy/g 10 ³ -10 ⁴ pmy/g

Jokainen näyte tehtiin kolmena rinnakkaisena määrittämyksenä. Kaikista matriiseista tutkittiin myös siirrostamaton 0-näyte.

3.3 Keinotekoiseen kontaminointiin käytetyn kannan elvytys

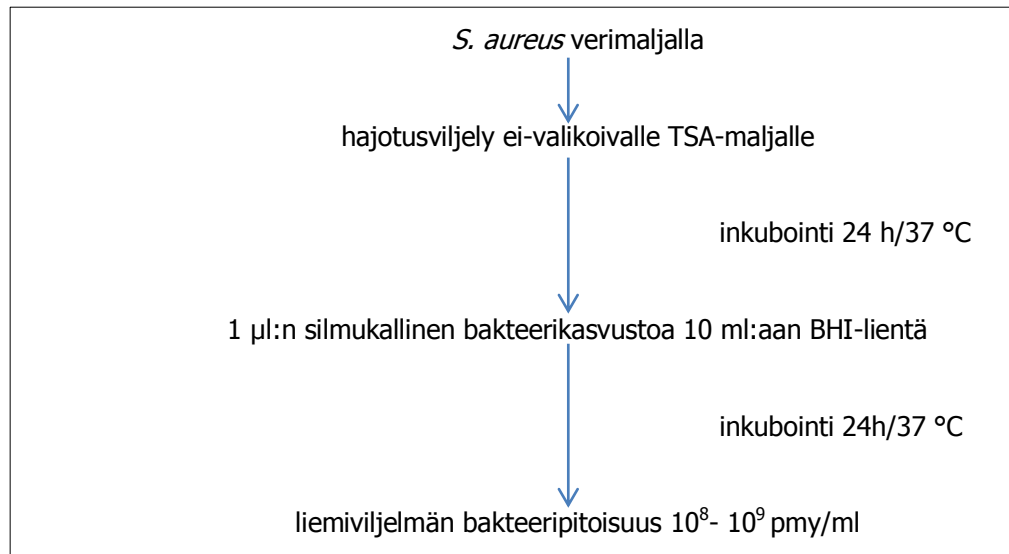
Näytteiden keinotekoiseen kontaminointiin käytetty *S. aureus* elvytettiin sulattamalla syväjäädytetty bakteerikanta glyserolihelmeistä. Yksi helmi siirrostettiin aseptisesti 5 ml:aan ei-valikoivaa brain-heart-infusion -lientä (BHI). Koeputkea inkuboitettiin neljä tuntia 37 °C:ssa, minkä jälkeen lientä siirrostettiin silmukallinen hajotusviljelynä verimaljalle. Maljaa inkuboitettiin lämpökaapissa vuorokausi 37 °C:ssa. Testikannan elvytys on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. Testikannan elvyttäminen.

3.4 Liemiviljelmän valmistus ja matriisien keinotekoinen kontaminointi

Työn aikana kantaa tuoreutettiin säännöllisesti siirrostamalla puhtasviljelmää uudelle verimaljalle. Jokaisen liemiviljelmän valmistuksen yhteydessä verimaljalta siirrostettiin bakteerikasvustoa hajotusviljelynä ei-valikoivalle tryptoni-soija-agar -maljalle (TSA). Liemiviljelmän valmistus on havainnollistettu kuvassa 5.

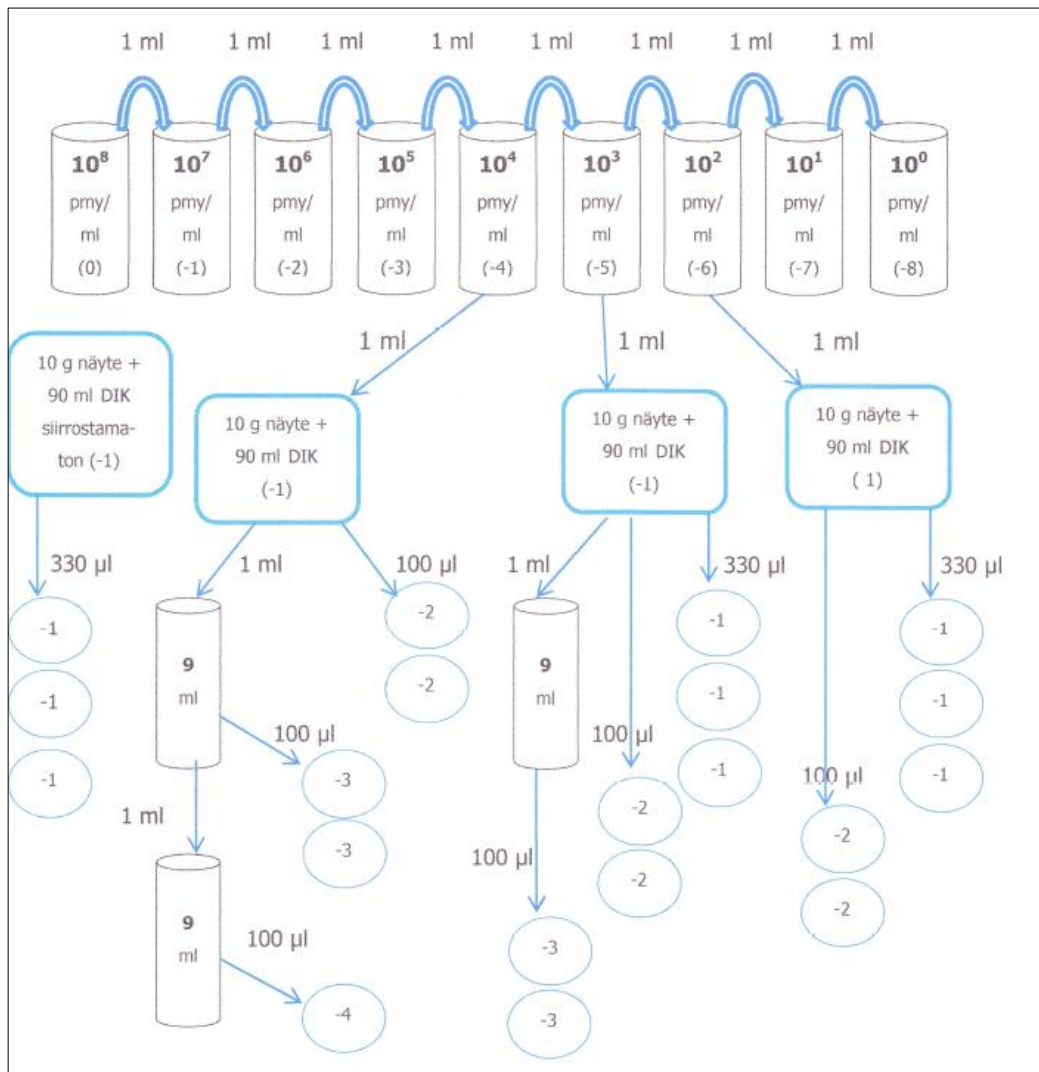


Kuva 5. Liemiviljelmän valmistaminen.

Liemiviljelmän mikrobiitiheys määritettiin jokaisen matriisin ja näytteen kontaminoinnin yhteydessä. Laimennossarja valmistettiin peptoniveteen. Liemiviljelmän solutiheys määritettiin viljelemällä TSA-maljoille pintalevityksenä 100 µl laimennoksista 10^{-6} , 10^{-7} ja 10^{-8} . Maljoja inkuboitii yksi vuorokausi 37 °C:ssa, jonka jälkeen pesäkemäärän perusteella laskettiin bakteeripitoisuus liemiviljelmässä.

Juustonäytettä punnittiin aseptisesti 10 g, minkä jälkeen näytepussiin lisättiin 90 ml esilämmitettyä (45 °C) 0,1 molaarista dikaliumvetyfosfaattia (DIK). Näyte homogenoitiin peristalttisella sekoittajalla (1 min/230 rpm). Maitonäytettä pipetoitiin 10 ml, minkä jälkeen pussiin lisättiin 90 ml peptonisuolavettä. Näyte homogenoitiin pussia sekoittamalla. Maitojauhetta punnittiin 10 g steriiliin lasiastiaan, minkä jälkeen astiaan lisättiin 90 ml esilämmitettyä (45 °C) peptonisuolavettä. Näytettä homogenoitiin sekoittamalla 10 sekunnin ajan, jonka jälkeen laimennosastia siirrettiin vesihauteeseen 5 minuutiksi välillä sekoittaen. Näin saatiin 10^{-1} -ensilaimennokset. Homogenoituihin näytteisiin lisättiin 1 ml tarvittavaa bakteeriviljelmän laimennosta niin, että saatiin aikaan haluttu kon-

taminoitipitoisuus. Laimennoskaavioesimerkki on havainnollistettu kuvassa 6. Esimerkissä liemiviljelmän lähtöbakteeripitoisuus on 10^8 pmy/ml.



Kuva 6. Laimennossarjan valmistus ja laimennoskaavioesimerkki.

Siirrostus kasvualustoille

Kontaminoidusta näytteestä valmistettiin tarvittavat laimennokset, joista näyte siirrettiin vertailtaville kasvualustoille pintalevityksenä. Matriisiin lisätyt liemiviljelmän laimennokset ja maljoille pipetoinnit on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Liemiviljelmän laimennokset ja maljoille pipetoinnit.

Matriisi	Matriisiin lisätty liemiviljelmän laimennos (1 ml)	pmy/näyte	pmy/g	Laimennokset maljoille * rinnakkainen
Maito	-	0	0	0
	-7	10^1-10^2	10^0-10^1	0*, -1*
	-6	10^2-10^3	10^1-10^2	-1, -2*
	-5	10^3-10^4	10^2-10^3	-1, -2*, -3*
	-4	10^4-10^5	10^3-10^4	-2*, -3*, -4
-3	10^5-10^6	10^4-10^5	-2, -3*, -4*, -5	
Maitojauhe	-	0	0	0
	-6	10^2-10^3	10^1-10^2	-1, -2*
	-5	10^3-10^4	10^2-10^3	-1, -2*, -3*
	-4	10^4-10^5	10^3-10^4	-2*, -3*, -4
Edam	-	0	0	0
	-6	10^2-10^3	10^1-10^2	-1, -2*
	-5	10^3-10^4	10^2-10^3	-1, -2*, -3*
	-4	10^4-10^5	10^3-10^4	-2*, -3*, -4
Oltermanni	-	0	0	0
	-6	10^2-10^3	10^1-10^2	-1, -2*
	-5	10^3-10^4	10^2-10^3	-1, -2*, -3*
	-4	10^4-10^5	10^3-10^4	-2*, -3*, -4

Baird-Parker -maljoja inkuboitin vuorokausi 37 °C:ssa, minkä jälkeen maljoilta laskettiin alustavasti tyypilliset pesäkkeet. Myös Baird-Parker (RPF) -maljat tutkittiin alustavasti vuorokauden inkuboinnin jälkeen, inkubointilämpötilan ollessa 35 °C. Alhaisempaan inkubointilämpötilaan päädyttiin, koska lämpötilan ollessa 37 °C, pesäkkeet levisivät maljoilla huomattavasti 48 tunnin inkuboinnin jälkeen. Molempien ISO-menetelmien maljat siirrettiin takaisin inkubointilämpötiloihin ja lopulliset tulokset laskettiin vuorokauden kuluttua. Brilliance Staph 24 -maljoja inkuboitin vuorokausi 37 °C:ssa, minkä jälkeen maljoilta laskettiin tyypilliset pesäkkeet.

Pesäkkeet laskettiin maljoilta, joilla oli enintään 150 tyypillistä pesäkettä. Mikäli pesäkkeet laskettiin maljoilta, joilla oli alle 10 tai yli 150 tyypillistä pesäkettä, tulos ilmoitettiin arviona. Vähintään viisi tyypillistä pesäkettä varmistettiin viljelemällä ne ei-valikoiville TSA-maljoille puhdasviljelmiksi, joista tehtiin varmistustestit.

Jokaisen menetelmän ja näytteenkäsittelyn yhteydessä määritettiin positiivi- ja negatiivikontrollit tutkittavilla kasvualustoilla hajotusviljelyinä. Positiivikontrollina käytettiin *S. aureus* 3269 -kantaa. Negatiivikontrollina käytettiin siirrostamatonta maljaa.

Suhteellisen oikeellisuuden laskeminen

Kvantitatiivisen menetelmän suhteellinen oikeellisuus laskettiin keskiarvon luottamusvälin avulla määrittämällä referenssimenetelmän tuloksille 95 %:n luotettavuusrajat keskihajonnan avulla.

Saatujen mittaustulosten oletettiin jakautuvan normaalijakaumakäyrän mukaisesti. Tulosten jakautuessa normaalisti, keskiarvo (\bar{x}) on käyrän maksimikohdassa ja käyrän muodon määrää yksittäisten tulosten hajonta, jota ilmaistaan keskihajontana (s). s_{ref} -arvo voidaan laskea kaavalla:

$$s_{\text{ref}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3)$$

x on mikrobiluvut logaritmisina arvoina

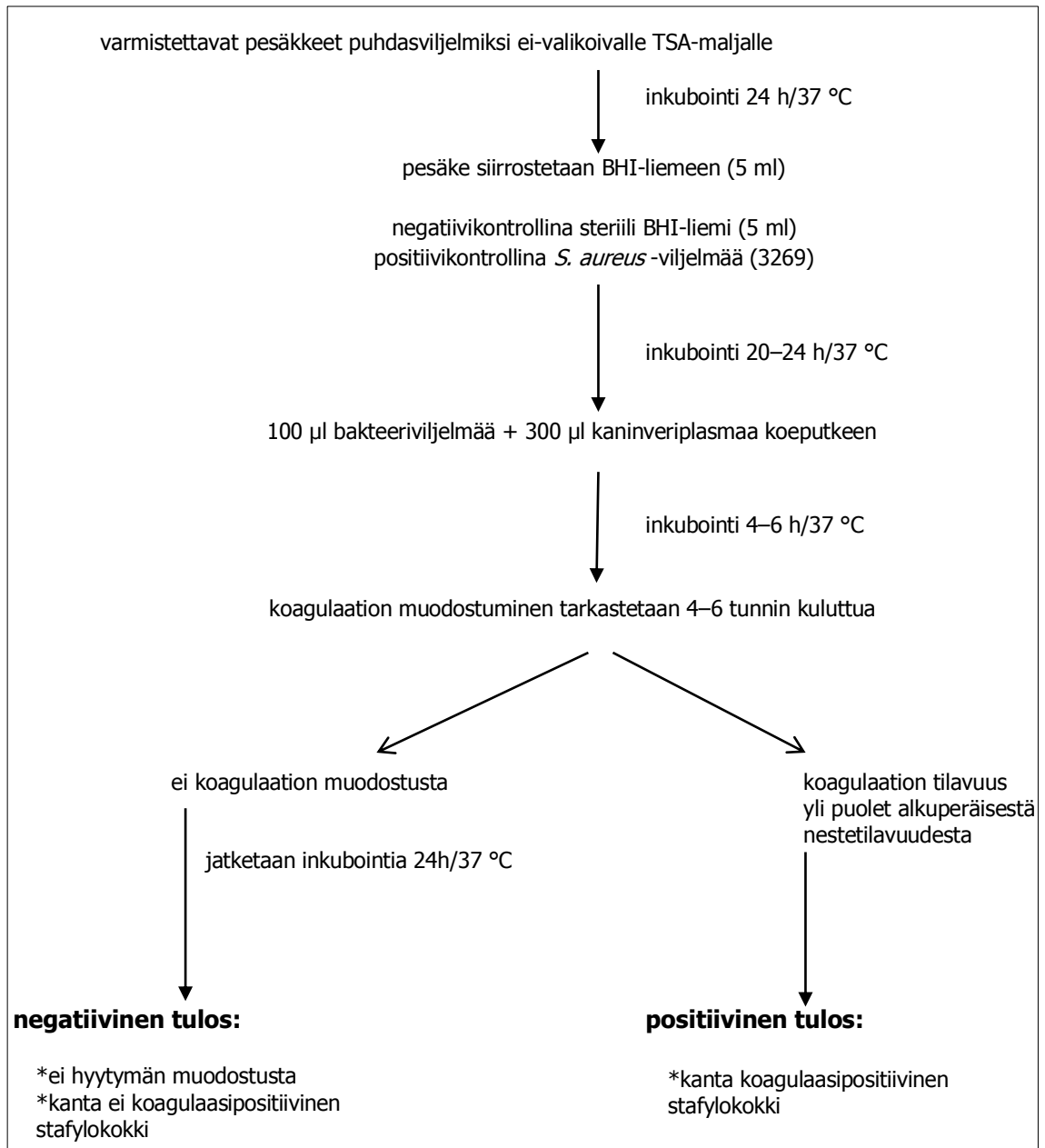
\bar{x} on mikrobilukujen keskiarvo

n on tulosten lukumäärä ääriarvojen poiston jälkeen.

Kullekin matriisille piirrettiin kuvaaja, jossa kontaminointitasot sijaitsivat x-akselilla ja keskiarvot y-akselilla. Normaalijakauman perusteella voitiin laskea, miten tulokset jakautuvat teoreettisesti keskiarvon ympärille. Kertomalla saatu s_{ref} -arvo kahdella, saatiin referenssimenetelmän keskiarvon ympärille alue, jonka sisään vertailtavilla menetelmillä kaikista tuloksista 95 % voitiin olettaa osuvan ($\bar{x} \pm s_{\text{ref}}$) [28, s. 7–8; 29, s. 12–13.]

3.5 Varmistustestit

Vähintään viisi tyypillistä pesäkettä varmistettiin viljelemällä ne ei-valikoiville TSA-maljoille puhtasviljelmiksi, joista tehtiin koagulaasikoe. Ei-tyypilliset pesäkkeet varmistettiin ryhmittäin. Kuvassa 7 on esitetty koagulaasikokeen suoritus.



Kuva 7. Koagulaasikokeen suorittaminen.

Jokaisesta plasmaerästä inkuboitin negatiivisena kontrollinäytteenä seos, jossa oli 100 µl steriiliä BHI-lientä ja 300 µl kaninveriplasmaa. Positiivikontrollina käytettiin *S. aureus* 3269 -kanta.

3.6 Referenssimateriaali

Täsmällisyyden ja tulosten oikeellisuuden määrittämiseen käytettiin referenssimateriaalina varmennettuja mikrobiampulleja, jotka sisälsivät tunnetun määrän *S. aureus* -bakteeria ja häiritsevää mikrobistoa kylmäkuivatuna (taulukko 5). Referenssimateriaali tilattiin Ruotsin elintarvikevirastosta (National Food Agency).

Taulukko 5. Referenssiampullin sisältö ja luotettavuusrajat (pmy/ml).

Analyysit	Luotettavuusrajat (pmy/ml)
<i>Micrococcus</i> sp	$4,0 \cdot 10^6 - 2,0 \cdot 10^7$
Koliformit 37 °C (Coliform count)	$4,0 \cdot 10^4 - 6,3 \cdot 10^5$
<i>Escherichia coli</i> (Coliform count) 44°C	$6,3 \cdot 10^3 - 7,9 \cdot 10^4$
<i>Klebsiella oxytoca</i> (Enterobacteriaceae)	$6,3 \cdot 10^4 - 7,9 \cdot 10^5$
<i>Escherichia coli</i>	$6,3 \cdot 10^3 - 7,9 \cdot 10^4$
<i>Clostridium perfringers</i>	$4,0 \cdot 10^3 - 3,2 \cdot 10^4$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2,5 \cdot 10^4 - 1,3 \cdot 10^5$
<i>Enterococcus faecalis</i> spiral plater	$2,5 \cdot 10^5 - 1,6 \cdot 10^6$ $1,3 \cdot 10^5 - 1,0 \cdot 10^6$
<i>Bacillus cereus</i>	$2,0 \cdot 10^4 - 2,0 \cdot 10^5$
<i>Candida</i> sp	$2,0 \cdot 10^4 - 1,0 \cdot 10^5$

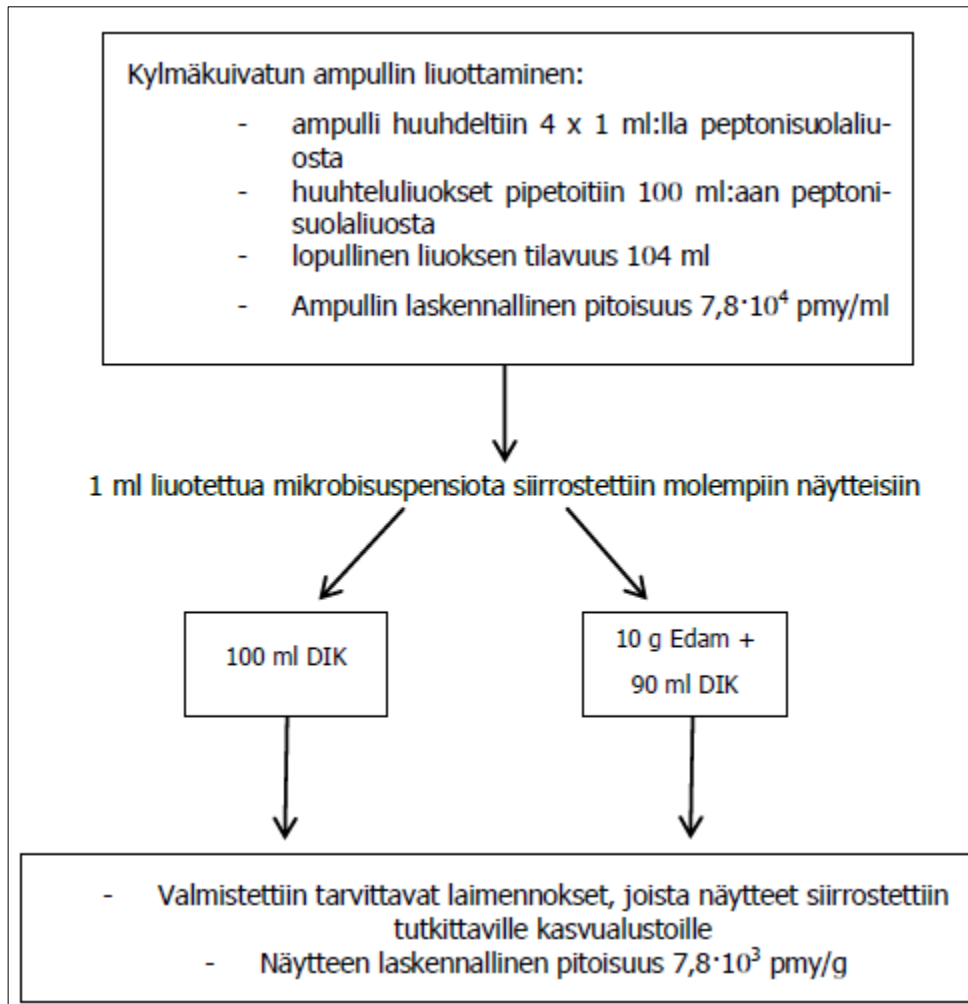
Mikrobisuspensiolle toimittajan varmentamat luotettavuusrajat olivat 95 %:n todennäköisyydellä *S. aureus* -bakteerille $2,5 \cdot 10^4 - 1,3 \cdot 10^5$ pmy/ml. Keskiarvo pitoisuudelle oli $7,8 \cdot 10^4$ pmy/ml.

Toistettavuus ja uusittavuus

Menetelmien toistettavuus määritettiin suorittamalla sarja mittauksia (10 rinnakkaista = 20 kpl maljoja) samana päivänä yhden henkilön toimesta identtisestä näytteestä ilman matriisia DIK-liuokseen. Menetelmien uusittavuus määritettiin analysoimalla referenssimateriaali kolmen henkilön toimesta samana päivänä ja viitenä eri ajankohtana.

Näyte valmistettiin kylmäkuivatusta ampullista toimittajan ohjeiden mukaisesti (kuva 8). Menetelmien uusittavuuden määrittämiseen matriisina käytettiin Edam-juustoa.

Matriisia punnittiin 10 g, joka liuotettiin 90 ml:aan DIK-liuosta (45 °C), minkä jälkeen näyte homogenoitiin. Näin saatiin 10^{-1} -laimennos. Näytteen laskennalliseksi pitoisuudeksi saatiin $7,8 \cdot 10^3$ pmy/g. Referenssimateriaali määritettiin myös ilman matriisia pipetoimalla samasta liuotetusta ampullista 1 ml näytettä 100 ml:aan DIK-liuosta.



Kuva 8. Referenssiampullin liuotus ja laimentaminen.

Näytteistä valmistettiin tarvittavat laimennokset, minkä jälkeen ne siirrostettiin vertailtaville kasvualustoille pintalevityksenä. Maljoja inkuboitii menetelmästä riippuen 35–37 °C:ssa 1–2 vuorokautta.

Toistettavuuden laskeminen

Kahden saman testaajan saaman testituloksen välinen suhde normaaliasteikolla ei saa yli 5 %:ssa tapauksista ylittää toistettavuusrajaa (r). Elintarvikenäytteitä määritettäessä toistettavuusrajan merkintään vertailumateriaalilla voidaan käyttää yleisesti muuttujan arvoa 1,55. Luku ilmaisee sarjan suuremman ja pienimmän testituloksen suhdetta. Toistettavuusehtojen mukaisesti suuremman ja pienemmän testituloksen suhde ei saisi olla suurempi kuin 1,55. [30, s. 2.]

Uusittavuuden laskeminen

Laboratorion sisäinen uusittavuus aloitetaan määrittämällä analysoijien välisten tulosarjojen sisäinen tarkkuus laskemalla jokaisen yksittäisen sarjan keskiarvo ja keskihajonta. Keskihajonnat yhdistetään, jolloin saadaan sarjojen toistettavuus:

$$Sr = \sqrt{\frac{sr_1^2 + sr_2^2 + sr_3^2}{x}} \quad (4)$$

sr_1 on ensimmäisen sarjan keskihajonta
 sr_2 on toisen sarjan keskihajonta
 sr_3 on kolmannen sarjan keskihajonta
 x on sarjojen lukumäärä yhteensä

Jotta tulokset voidaan antaa 95 %:n luottamusvälillä, edellä saatu toistettavuuden arvo kerrotaan kattavuuskertoimella (k) 2. [19, s. 19.]

Sarjojen välinen tarkkuus saadaan laskemalla sarjojen keskiarvojen välinen keskiarvo sekä keskiarvojen keskihajonta. Sarjojen välinen keskiarvo:

$$y = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \bar{x}_3}{x} \quad (5)$$

\bar{x}_1 on ensimmäisen sarjan keskiarvo
 \bar{x}_2 on toisen sarjan keskiarvo
 \bar{x}_3 on kolmannen sarjan keskiarvo
 x on sarjojen lukumäärä yhteensä.

Keskiarvojen keskihajonta lasketaan kaavalla:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x}_i - y)^2}{n - 1}} \quad (6)$$

\bar{x}_i on kunkin sarjan keskiarvo
 y on sarjojen keskiarvojen välinen keskiarvo.

Sarjojen välinen varianssi lasketaan edellä saaduista tuloksista kaavalla

$$S_L^2 = S_x^2 - \frac{S_r^2}{n} \quad (7)$$

jossa n on mittausten lukumäärä. Sisäinen uusittavuus on toistettavuuden varianssin ja sarjojen välisen varianssin summa:

$$u = S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2} \quad (8)$$

Jotta tulokset voidaan antaa 95 %:n luottamusvälillä, edellä saatu yhdistetty epävarmuus kerrotaan kattavuuskertoimella (k) 2. [19, s. 20.]

Menetelmien uusittavuus laskettiin Excel-ohjelmalla yksisuuntaisen ANOVA -varianssi-analyysin avulla (Analysis of Variance). Yksisuuntaisessa varianssianalyysissä aineistossa havaittava yhteisvarianssi hajotetaan ryhmien väliseen ja ryhmien sisäiseen varianssiin, joiden avulla lasketaan estimaatit populaatiovariانسsille. Varianssianalyysillä selvitetään, onko ryhmien välinen vaihtelu suurempaa kuin ryhmien sisäinen vaihtelu. Nollahypoteesin mukaan keskiarvot eivät poikkea populaatiossa merkitsevästi toisistaan. F-testin suhteen avulla voidaan tarkastella, ovatko varianssit yhtä suuria. Mikäli populaatiovariانسsin estimaatit ovat yhtä suuria, ei vertailtavien ryhmien keskiarvoissa ole eroa. Jos taas ryhmien välisen variانسsin avulla laskettu estimaatti on huomattavasti suurempi, poikkeavat ryhmäkeskiarvot toisistaan [31, s. 179–200.]

3.7 Normaalinäytteet

Normaalinäytteiksi valittiin neljä juustonäytettä, joissa oletettiin olevan paljon häiritsevää kasvustoa. Näytteiksi valikoitui Aura, Aura Gold, Oltermanni sekä Viola Salaattijuusto. 10 g juustonäytettä homogenoitiin 90 ml:aan esilämmitettyä (45 °C) DIK-liuosta. Näin saatiin 10⁻¹-laimennos. Näytteestä valmistettiin tarvittavat laimennokset, joista näyte siirrostettiin edelleen vertailtaville kasvualustoille pintalevityksenä. Maljoja inkuboiitiin alustasta riippuen 35–37 °C:ssa 1–2 vuorokautta. Inkuboinnin jälkeen tarkasteltiin maljojen ulkonäköä.

3.8 Kasvualustojen testaus häiritsevillä mikrobikannoilla

Menetelmien spesifisyyttä tutkittiin viljelemällä vertailtaville kasvualustoille lähisukuisia mikrobikantoja (taulukko 6).

Taulukko 6. Kasvualustojen spesifisyyden määrittämiseen valitut mikrobikannat.

Laji	Valion kantakoelma
<i>Staphylococcus warneri</i>	3726
<i>Staphylococcus xylosus</i>	3729
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2010
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	4637
<i>Enterococcus faecium</i>	2306
<i>Micrococcus</i> sp	2288

Mikrobikannat elvytettiin sulattamalla syväjäädetyt bakteerikanta glyserolihelmestä aikaisemmin kuvassa 4 havainnollistetun protokollan mukaisesti. Pesäkkeiden ulkonäköä ja kasvuominaisuuksia vertailtiin tyypillisiin *S. aureus* -pesäkkeisiin.

3.9 Kustannusten vertailu

Menetelmien kustannusten vertailussa laskettiin, saataisiinko alustaa vaihtamalla aikaiseksi säästöjä. Laskelmissa huomioitiin alustojen hinta näytekohtaisesti sekä varmistustesteihin kulunut työaika. Yhden maljan kustannuksissa otettiin huomioon reagensseihin sekä tarvikkeisiin menevät kulut. Työaikaseuranta suoritettiin validoinnin yhteydessä.

Siirrostusvalmiin maljan käyttöönottoajassa ja laboratorion työajassa huomioitiin agarin valmistuksessa maljanvalulaitteella valettujen maljojen, pulloihin valmistettujen agarannosten sekä valmismaljojen eroavaisuudet. Laboratorion työaikaan laskettiin työhön käytetty aika ilman odotusaikoja, sisältäen myös tilauksiin ja varastointiin kulunut aika.

4 Tulokset ja tulosten tarkastelu

4.1 Suhteellinen oikeellisuus ja lineaarisuus

Suhteellinen oikeellisuus molemmilla vertailtavilla alustoilla verrattuna käytössä olevaan ISO 6888-1:1999 -menetelmään oli hyväksyttävissä rajoissa. Suhteellinen oikeellisuus määritettiin vertailemalla referenssimenetelmän ja vertailtavien menetelmien pitoisuustulosten vastaavuutta tutkittaessa identtisiä keinotekoisesti kontaminoituja näytteitä. Referenssimenetelmän luotettavuusrajat on esitetty 95 %:n todennäköisyydellä. Kaikkien matriisien keskiarvot ja keskiarvojen keskihajonnat eri pitoisuustasoilla on esitetty taulukossa 7. Kaikkien näytteiden ja matriisien lasketut pitoisuudet ovat liitteessä 2, alasuilla 1–4. Edam, maitojauhe ja Oltermanni -matriisien kuvaajat ovat liitteessä 2, alasuilla 5–6.

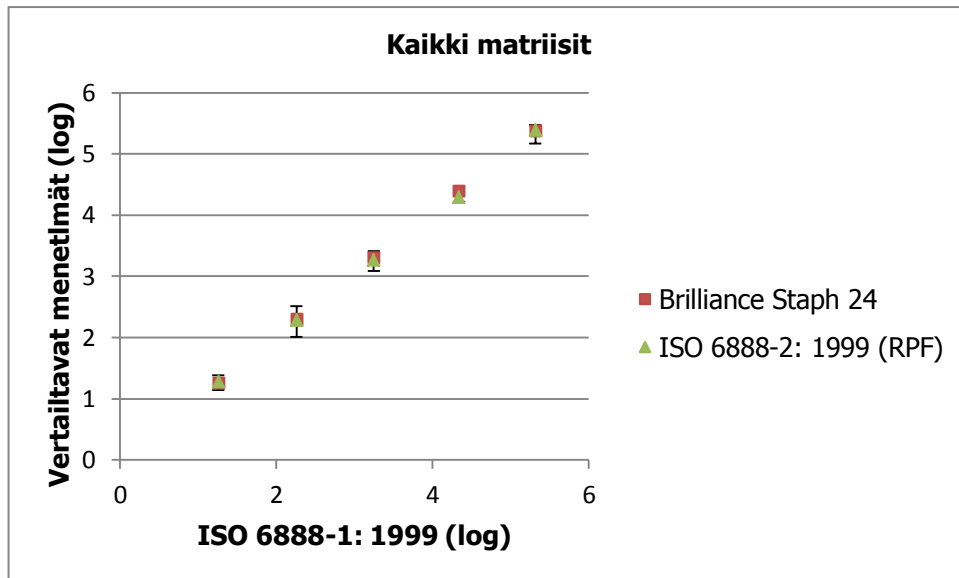
Taulukko 7. Kaikkien matriisien keskiarvot ja keskiarvojen keskihajonnat (ka ±s) vertailtavilla menetelmillä. Referenssimenetelmän luotettavuusrajat 95 %:n todennäköisyydellä (2*s).

Matriisit	ISO 6888-1: 1999	Brilliance Staph 24	ISO 6888-2: 1999
Edam	2,15 ±0,38 3,28 ±0,18 4,38 ±0,04	2,31 ±0,10 3,31 ±0,01 4,42 ±0,04	2,27 ±0,10 3,27 ±0,09 4,29 ±0,14
Maitojauhe	2,36 ±0,10 3,31 ±0,06 4,41 ±0,06	2,38 ±0,10 3,39 ±0,01 4,41 ±0,00	2,33 ±0,05 3,37 ±0,04 4,41 ±0,05
Oltermanni	2,30 ±0,04 3,23 ±0,06 4,30 ±0,14	2,25 ±0,09 3,28 ±0,00 4,36 ±0,11	2,28 ±0,10 3,21 ±0,04 4,20 ±0,11
Maito	1,26 ±0,12 2,22 ±0,18 3,17 ±0,20 4,29 ±0,02 5,32 ±0,16	1,26 ±0,04 2,26 ±0,05 3,28 ±0,04 4,41 ±0,06 5,38 ±0,08	1,28 ±0,11 2,24 ±0,03 3,21 ±0,05 4,26 ±0,11 5,39 ±0,10

Edam-matriisilla korkeimmat pitoisuudet kaikilla kontaminaatiotasolla määritti Brilliance Staph 24 -alusta. Lukuun ottamatta kontaminaatiotasoa 10^2 pmy/g, pienimmät pitoisuudet olivat Baird-Parker (RPF) -alustalla, jonka 10^4 pmy/g kontaminaatiotasoa jäi sallittua pitoisuutta alhaisemmaksi verrattuna referenssimenetelmään. Brilliance Staph 24 -alusta määritti korkeimmat pitoisuudet myös maitojauhe- ja Oltermanni-matriiseilla

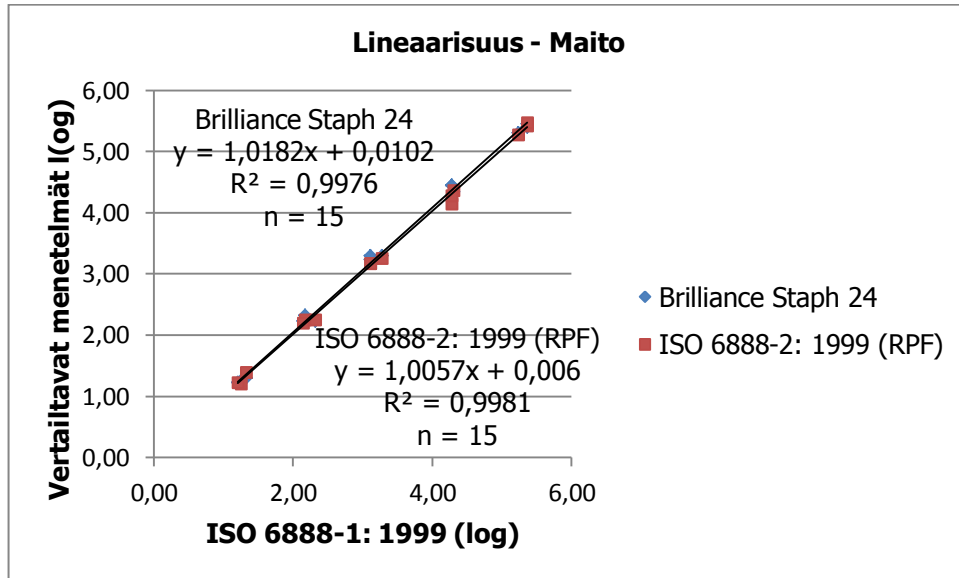
pois lukien Oltermanni-matriisin kontaminaatiopitoisuuden 10^2 pmy/g, jolloin korkeimmat pitoisuudet määritti referenssimenetelmä (taulukko 7).

Kuva 9 esittää keinotekoisesti kontaminoitujen matriisien kaikkien kontaminointitasojen yhdistetyt keskiarvot, jossa x-akselilla on ISO 6888-1: 1999 -menetelmän tulokset virherajoiheen ($2 \times s$) ja y-akselilla vertailtavat menetelmät.



Kuva 9. Kaikkien matriisien kontaminaatiotasojen yhdistetyt keskiarvot (virherajat: ISO 6888-1: 1999).

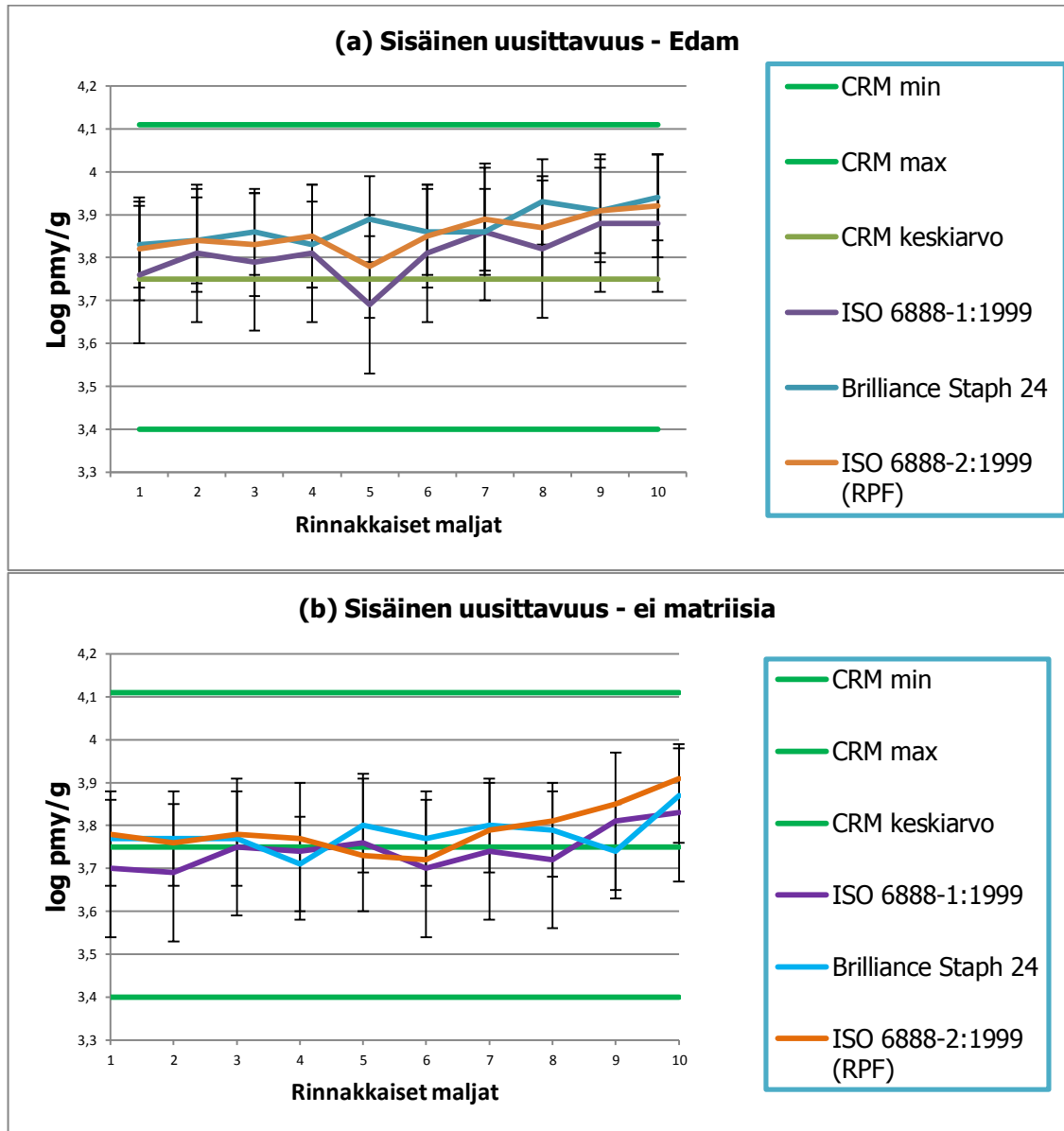
Menetelmien lineaarisuuden määrittämistä varten kontaminoitiin maitonäyte viidellä eri pitoisuustasolla. Menetelmien lineaarisuus oli hyvä (kuva 10). Korrelaatio molemmilla vertailtavilla menetelmillä verrattuna referenssimenetelmään oli korkea ($r > 0,99$).



Kuva 10. Menetelmien lineaarisuus tutkittaessa maitonäytteitä. X(log) = referenssimenetelmä, y(log) = vertailtavat menetelmät.

Kontaminaatiotason ollessa noin 10 pmy/g maitonäytteillä, kaikkien alustojen luettavuus hankaloitui ja tulkintaan kului aikaa. Pesäkkeiden selkeä ja pyöreä muoto sekä koagulaasireaktiosta indikoiva kehä pesäkkeen ulkopuolella katosi Baird-Parker- sekä Baird-Parker (RPF) -alustoilla. Brilliance Staph 24 -alustalla oli havaittavissa värin sekä pesäkkeen selkeän ulkorajan heikkenemistä.

Kuvassa 11 on nähtävissä matriisin vaikutus pitoisuuksiin. Matriisilla tehdyissä mittaus-sarjoissa pitoisuudet olivat referenssimateriaalin laskennallisen keskiarvon yläpuolella, mutta sallittujen rajojen sisällä. Kuvassa on tarkastelussa kolmen eri tekijän rinnakkaiset maljat.



Kuva 11. Menetelmien sisäinen uusittavuus a) matriisilla ja b) ilman matriisia. Tarkastelussa molemmissa kuvaajissa rinnakkaiset maljat.

Ilman matriisia tehdyissä mittaus-sarjoissa kaikkien menetelmien pitoisuustulokset olivat lähellä referenssimateriaalin laskennallista keskiarvoa. ISO 6888-1: 1999 -menetelmään verrattuna vertailtavat kasvualustat antoivat korkeampia pitoisuuksia sekä matriisilla että ilman matriisia määritettäessä. Baird-Parker -alustalla kasvoi usein yhteen kasva-

neita, mattomaisia pesäkkeitä, jolloin yksittäisten pesäkkeiden laskeminen oli hankalaa. Tämä vähensi selkeästi laskettavien pesäkkeiden määrää, jolloin myös tulos oli alhaisempi. Alustalla kasvoi paljon myös muuta häiritsevää mikrobistoa.

Brilliance Staph 24 -alustalla pesäkkeet erottuivat hyvin muusta häiritsevästä mikrobistosta alustan hyvän spesifisyyden vuoksi, eikä myöskään yhteen kasvaneita pesäkkeitä juuri ollut. Tämä todennäköisesti selittää korkeammat pitoisuudet verrattuna referenssimenetelmään.

Trendi on hieman nouseva kaikilla alustoilla. Tämä saattoi selittyä mikrobiampullien sisällöllisellä bakteerimäärällä. Valmistajan varmentamat rajat olivat 95 %:n todennäköisyydellä *S. aureus* -bakteerille $2,5 \cdot 10^4$ – $1,3 \cdot 10^5$ pmy/ml, jolloin keskiarvo oli laskennallinen. Pitoisuustuloksiin saattoivat vaikuttaa esimerkiksi siirrostilavuuden epävarmuus sekä pesäkemäärän hiukkastilastollinen epävarmuus.

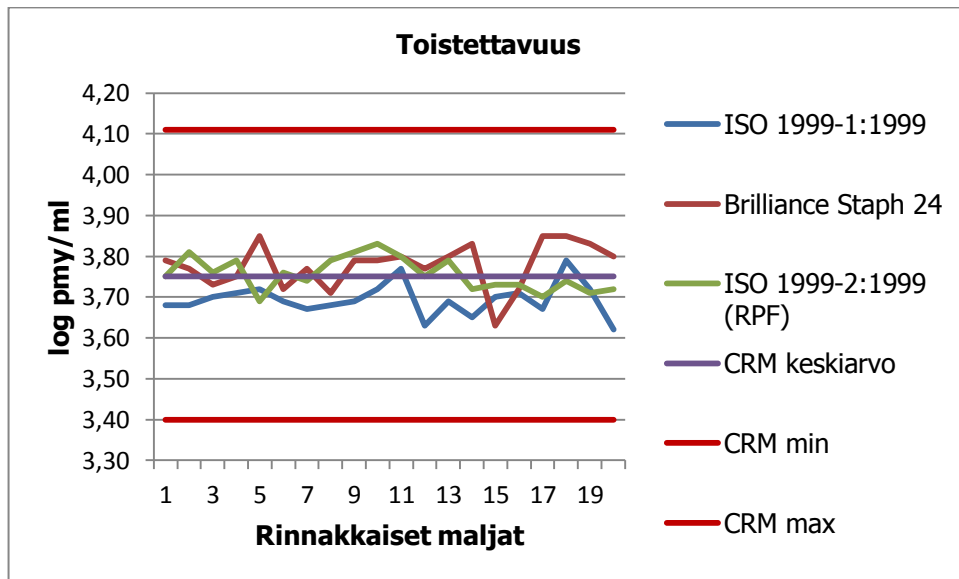
4.2.2 Toistettavuus

Toistettavuus suoritettiin yhtenä päivänä, yhdellä määrittäytasolla, yhden analysoijan toimesta. Täsmällisyyden ja tulosten oikeellisuuden varmennetusta referenssimateriaalista voitiin todeta olevan hyväksyttävissä rajoissa kaikilla vertailtavilla menetelmillä. Taulukossa 9 on laskettu menetelmien toistettavuusraja ilmaistuna suuremman ja pienemmän testituloksen suhtena normaaliasteikolla. Pitoisuustulokset kokonaisuudessaan on esitetty liitteessä 4.

Taulukko 9. Menetelmien toistettavuus määritettiin suorittamalla sarja mittauksia lyhyellä aikavälillä, identtisistä näytteistä.

Ei matriisia	Maljojen määrä	ISO 1999-1:1999	Brilliance Staph 24	ISO 1999-2:1999 (RPF)
Sarjan pienin arvo (pmy/g)	20 (10 rinnakkaista)	4600	5200	5200
Sarjan suurin arvo (pmy/g)		5500	6500	6100
Suhdeluku (suurin arvo/pienin arvo)		1,20	1,25	1,17
Referenssimateriaalin suurin sallittu suhdeluvun arvo (pitoisuuden ollessa noin 5000 pmy/g)		1,55	1,55	1,55

Kuvassa 12 on tarkastelussa vertailtavien menetelmien rinnakkaiset maljat. 95 %:n luotettavuusrajat on merkitty referenssimateriaalin perusteella.



Kuva 12. Menetelmien toistettavuus. Tarkastelussa rinnakkaiset maljat.

ISO 6888-1: 1999 -menetelmän pitoisuustulokset ovat pääsääntöisesti alhaisempia kuin referenssimateriaalin keskiarvo. Vastaavasti Brilliance Staph 24 -menetelmän pitoisuustulokset ovat hieman korkeampia kuin referenssimenetelmällä saadut pitoisuustulokset. Myös toistettavuutta määritettäessä Baird-Parker -alustalla kasvoi usein yhteen kasvaneita, mattomaisia pesäkkeitä, jolloin yksittäisten pesäkkeiden laskeminen oli hankalaa. Tämä vähensi selkeästi laskettavien pesäkkeiden määrää, jolloin pitoisuus oli alhaisempi. Alustalla kasvoi paljon myös muuta häiritsevää mikrobistoa.

Brilliance Staph 24 -alustalla pesäkkeet erottuivat hyvin muusta häiritsevästä mikrobistosta alustan hyvän spesifisyyden vuoksi, eikä myöskään yhteen kasvaneita pesäkkeitä juuri ollut. Tämä todennäköisesti selittää korkeammat pitoisuustulokset verrattuna referenssimenetelmään.

4.3 Spesifisyys

4.3.1 Normaalinäytteet

Normaalinäytteistä ei löytynyt koagulaasipositiivisia stafylokokkeja.

Baird-Parker -alustalla normaalinäytteissä kasvoi usein (n. 75 %:ssa) häiritsevää mikrobistoa niin tyypillisinä kehättöminä pesäkkeinä, että ne oli varmistettava koagulaasitestillä. Lisäksi maljoilla kasvoi runsaasti selkeästi ei-tyypillisiä pesäkkeitä.

Brilliance Staph 24- ja Baird-Parker (RPF) -alustoilla häiritsevä mikrobisto kasvoi selkeästi ei-tyypillisinä pesäkkeinä, joista ei tarvinnut tehdä varmistustestejä.

4.3.2 Kasvualustojen spesifisyyden testaus häiritsevillä mikrobikannoilla

Baird-Parker -alustalla lähisukuisista mikrobikannoista 5/6 kasvoi niin tyypillisen näköisinä pesäkkeinä, että ne olisi pitänyt varmistaa koagulaasitestillä. 3/6 kannoista muodosti pesäkkeen ympärille läpinäkymättömän kehän.

Brilliance Staph 24 -alustalla 1/6 kannasta (*Micrococcus* sp) muodosti tyypillisen näköisen pesäkkeen. Pesäkkeet olivat hieman levinneitä, väriltään tummansinertävän harmaita, kuitenkin ilman selkeätä sinisempää ulkoreunaa. 3/6 kannasta olivat väriltään keltaisia ja 2/6 tuhkanharmaita, jolloin ero tyypilliseen siniseen pesäkkeeseen oli selkeästi havaittavissa.

Baird-Parker (RPF) -alustalla 4/6 kannasta muodostivat koagulaasireaktion oloisen kehän pesäkkeen ympärille. Myös pesäkkeen väri oli tummanharmaa/musta. Nämä pesäkkeet olisi pitänyt varmistaa koagulaasitestillä.

Tulokset on esitetty kokonaisuudessaan liitteessä 5.

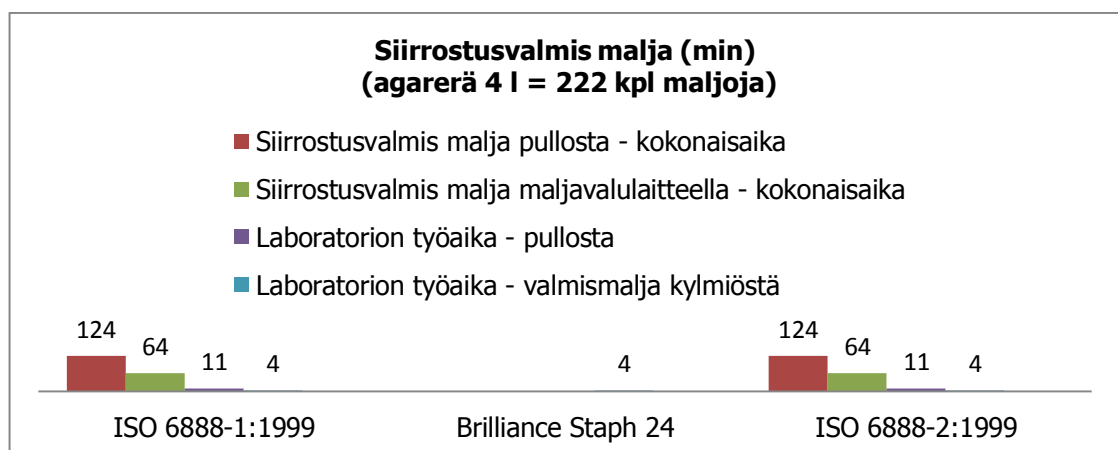
4.4 Kustannusten vertailu

Yhden maljan kustannuksissa otettiin huomioon reagenssiin sekä tarvikkeisiin menevät kulut.

Maljojen tarvikekustannuksien puolesta edullisin vaihtoehto oli Baird-Parker -alusta, jos mukaan ei lasketa mahdollisia varmistustestejä. On kuitenkin huomioitava, että alustalla kasvava runsas muu häiritsevä mikrobisto aiheuttaa paljon varmistustestejä, jotka lisäävät menetelmän reagenssi- ja työaikakustannuksia huomattavasti.

Brilliance Staph 24 -maljojen kappalehinta on korkeampi kuin tällä hetkellä käytössä olevan menetelmän maljojen hinta. Kuitenkin varmistettavien pesäkkeiden määrä on huomattavasti pienempi, jolloin menetelmien välinen tarvikekustannuksien hintaero pienenee.

Siirrostusvalmiin maljan käyttöönottoajassa ja laboratorion työajassa huomioitiin agarin valmistuksessa maljanvalulaitteella valettujen maljojen, pulloihin valmistettujen agarannosten sekä valmismaljojen eroavaisuudet (kuva 13). Agarerän kokonaistilavuus oli molemmilla valmistustavoilla 4 litraa (222 kpl valmiita maljoja), joka on käytännössä suurin kerralla tehtävä valmistuserä. Kokonaisuunaan on laskettu kaikki agarin valmistuksen työvaiheet odotusaikoineen. Laboratorion työaikaan on laskettu työssä kiinnioloaika ilman odotusaikoja, sisältäen myös tilauksiin ja varastointiin kuluva aika.



Kuva 13. Siirrostusvalmiin maljan aikaansaaminen maljanvalulaitteella, pullosta sulatettuna tai käytettäessä valmismaljaa kylmiöstä.

Alustapalvelun valmistaman alustan ja kylmiöstä otettavan käyttövalmiin valmismaljan käyttöönottoajassa oli odotetusti suuri ero. Laboratoriossa koagulaasipositiivisten stafylokokkien määritykset tehdään usein pieninä näytesarjoina, jolloin maljoja ei kannata tehdä maljanvalulaitteistolla. Tällöin käytetään puolivalmiita pulloihin valmistettuja agarreja, jotka täytyy sulattaa ja temperoida ja joihin täytyy lisätä lisääaine ennen maljoiksi valamista. Tämä vei kaikkine työvaiheineen huomattavasti enemmän laboratorion työaikaa, kuin kylmiöstä otettava valmismalja.

Koagulaasikokeen tarvikkekustannukset sekä työhön käytettävä aika ovat varsinkin tällä hetkellä käytössä olevassa menetelmässä merkittävät. Yhden varmistustestin tekeminen valmisteluineen ja kontrollinäytteineen kesti keskimäärin 10 minuuttia (taulukko 10).

Taulukko 10. Yhteen koagulaasikokeeseen tarvittavat välineet ja reagenssit sekä kokeeseen käytetty työaika.

Tarvikkeet ja reagenssit	Laboratorion työssä kiinnioloaika (min)
Koeputki esipesty 11,5x100 mm,koag.	
BHI-koeputki 15,5–150 mm	2
Selluloosatulppa suurpakkaus malli 13	
Koagulaasi plasma w edta	2
Brain heart infusion broth (BHI)	2
1000 µl kärki steriili 200–1000 µl	
Tryptone soy agar u.s.p + malja (TSA-malja)	2
Viljelysilmukka 1 µl	
Kontrollinäytteet	2
Työssä kiinnioloaika (min)	10

4.6 Käytännön työskentely

Maljoille siirrostus

Maljoille siirrostuksessa ja alustojen kanssa työskentelyssä oli havaittavissa eroja. Maljalle pintalevityksenä siirrostettaessa pitää välttää näytteen leviämistä maljan reunoille. Näytteen levitessä maljan reunoille, yksittäisten pesäkkeiden luettavuus vaikeutui huomattavasti tai estyi pesäkkeiden kasvaessa yhteen ja levitessä mattomaiseksi rykelmäksi.

Siirrostettaessa Baird-Parker -alustalle, näytteen leviämistä reunoille tapahtui suuressa osassa siirrostuksia, varsinkin kun 1 ml:n näyte jaettiin kolmelle maljalle. Yksi syy tähän saattoi olla näytteen huono imeytyminen alustaan. Ennen siirrostuksen aloittamista pyrittiin siihen, että kaikki vertailtavat alustat nostettiin yhtä aikaa pöydälle temperoitumaan noin kaksi tuntia ennen siirrostuksen aloittamista. Myös maljojen kosteus tarkastettiin ennen siirrostusta. Osaa maljoista kuivattiin laminaarikaapissa 15 minuuttia, mikäli havaittiin silminnähtävää kosteutta. Näytteen imeytyminen vei kuitenkin huomattavan paljon enemmän aikaa kuivaustavasta riippumatta, varsinkin verrattaessa sitä Brilliance Staph 24 -alustaan.

Brilliance Staph 24 -alustalle siirrostettaessa näyte jäi "paikalleen" ja oli paremmin hallittavissa näytettä levitettäessä. Alustassa reunat ovat hieman kaarellaan, jolloin valumista reunoille ei tapahtunut. Näytteen imeytyminen alustaan oli todella nopea ja maljojen siirto inkuboitumaan oli näin ollen nopeampaa, koska näytteen kuivumista ei tarvinnut juurikaan odotella.

Baird-Parker (RPF) -alustalle siirrostettaessa näyte imeytyi kohtuullisen hyvin. Leviämistä reunoille tapahtui jonkin verran, mutta näytteen levittäminen alustalle oli kuitenkin paremmin hallittavissa, kuin Baird-Parker -alustalla.

Maljojen luettavuus ja tulkinta

Maljojen luettavuus ja tulkinta vaihteli alustasta riippuen. Baird-Parker -alustalla oli havaittavissa vaihtelua luettavuudessa. Hyvin usein pesäkkeen ulkopuolella oleva kirkas kehä oli todella heikko. Tämä hidasti tulkintaa sekä lisäsi varmistustestejä. Reunoille levinneitä pesäkkeitä ja rykelmiä, joita ei voinut laskea, oli usein. Myös maljanvalulaitteella tehtyjen maljojen sekä pullosta sulatetun alustan väriero oli havaittavissa. Pullosta sulatettu agar oli kirkkaampaa, jolloin kehien muodostuminen pesäkkeen ulkopuolelle oli vieläkin vaikeampi havaita.

Brilliance Staph 24 -alustalla reunoille levinneitä tai muutoin levinneitä pesäkkeitä esiintyi todella harvoin, jolloin yksittäisten pesäkkeiden luettavuus oli helppoa ja nopeaa. 48 tunnin kylmäsäilytyksessä olleiden maljojen luettavuus oli todella hyvä. Pesäkkeiden tummansininen väri jopa syveni kylmäsäilytyksen aikana, jolloin tulkinta oli nopeaa. Alustan kirkas väri myös nopeutti näytteen erottumista alustasta ja vähensi virhetulkintoja muun kasvun suhteen.

Baird-Parker (RPF) -alustalla pesäkkeiden ulkonäkö muuttui huomattavasti 24 tunnin inkuboinnin jälkeen. Ensimmäisen vuorokauden jälkeen pesäkkeet olivat matriisista riippuen joko selkeän pyöreitä läpinäkymättömän kehän kanssa tai röpelöisen pyöreitä. Koagulaasireaktion aiheuttama kehä pesäkkeen ulkopuolella kuitenkin hävisi kokonaan 48 tunnin inkuboinnin jälkeen suuressa osassa näytteitä. Pesäkkeiden koko myös suuren jopa 2/3 lisäinkuboinnin aikana. Näytteen leviäminen reunoille sekä levinneet mattomaiset kasvustot olivat alustalla yleisiä. Nämä aiheuttivat paljon lisätyötä tulkinnassa.

5 Päätelmät

Määritettäessä keinotekoisesti kontaminoituja näytteitä molemmat vertailtavat menetelmät osoittivat korkean korrelaation ($r > 0,99$) kaikilla matriiseilla verrattaessa referenssimenetelmään. Molempien vertailtavien menetelmien lineaarisuus oli hyväksyttävissä rajoissa. Menetelmien täsmällisyys verrattaessa niitä referenssinäytteeseen oli hyväksyttävällä tasolla.

Normaalinäytteitä analysoitaessa käytössä olevalla ISO 6888-1: 1999 -menetelmällä kasvoi usein (n. 75 %) häiritsevää mikrobistoa niin tyypillisinä pesäkkeinä, että ne oli varmistettava koagulaasitestillä. Vertailtavilla alustoilla mikrobistoa kasvoi selkeästi ei-tyypillisinä pesäkkeinä, jolloin varmistustestejä ei tarvinnut tehdä. Tuloksissa on syytä huomioida, että normaalinäytteiden joukosta valittiin määritettäväksi näytteitä, joissa tiedettiin kasvavan erityisen paljon häiritsevää mikrobistoa.

Kustannuksia tarkasteltaessa pelkän maljan perusteella käytössä oleva ISO 6888-1: 1999 -menetelmä on edullisin. On kuitenkin huomioitava alustalla kasvava runsas muu häiritsevä mikrobistoa, joka aiheuttaa paljon varmistustestejä ja lisää alustan käyttökustannuksia huomattavasti.

Baird-Parker (RPF) -alustan kappalehinta on huomattavan korkea. Alusta ei myöskään sovellu 48 tunnin kylmäsäilytykseen, koska koagulaasireaktiosta indikoiva kehä pesäkkeen ympärillä hävisi säilytyksen aikana. Pesäkkeet myös levisivät huomattavasti 48 tunnin inkuboinnin aikana, jolloin maljojen luettavuus heikkeni.

Vertailtavista alustoista Brilliance Staph 24 -alusta osoittautui käytännössä toimivimmaksi. Brilliance Staph 24 -alustan voitiin todeta antavan yhtenevät pitoisuustulokset, verrattuna käytössä olevaan ISO 6888-1: 1999 -menetelmään, mutta se oli erittäin paljon spesifisempi, jolloin varmistustestien määrä oli pienempi. Alustan hyvän spesifisyyden vuoksi pitoisuusmääritysten tulkinta ja tulosten valmistuminen nopeutuivat sekä ylimääräiset kulut työkustannuksina ja reagenssikuluina vähenivät.

Brilliance Staph 24 -alusta oli keväällä 2011 mukana SLV-interkalibroinnissa käytössä olevan ISO 6888-1: 1999 -menetelmän rinnalla, jossa Brilliance Staph 24 -alustalla saatiin validoinnin kanssa samansuuntaiset tulokset. Varmistustestien määrä ja tulkintaan

kulunut aika olivat pienempiä Brilliance Staph 24 -alustalla verrattaessa sitä käytössä olevaan menetelmään.

Validoinnin perusteella Brilliance Staph 24 -menetelmä voidaan ottaa käyttöön. Brilliance Staph 24 -menetelmä on tällä hetkellä FINAS-akkreditoitu ja käytössä Valiolla Mikrobiologinen laatu -laboratoriossa ja Lapinlahden aluelaboratoriossa.

Lähteet

- [1] Dworkin, Martin ym. 2006. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Volume 4. 3rd edition. New York: Springer.
- [2] Korkeala, Hannu (toim.). 2007. *Elintarvikehygienia. Ympäristöhygienia, elintarvike- ja ympäristötoksikologia*. Helsinki: WSOY.
- [3] Hallavuo, Saija & Johansson, Tuula. 2010. *Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat*. Eviran julkaisu 1/2010. Elintarviketurvallisuusvirasto.
- [4] Tortora, Gerald, Funke, Berdell & Case, Cristine. 2010. *Microbiology. An introduction*. 10th edition. San Francisco: Pearson Education.
- [5] Desmarchelier, Patricia M. ym. 1999. *Incidence of coagulase positive Staphylococcus on beef carcasses in three Australian abattoirs*. International Journal of Food Microbiology. Vol. 47, issue 3, s. 221–229.
- [6] Adams, Martin & Moss, Maurice. 2008. *Food Microbiology*. 3rd edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- [7] Doyle, Michael, Beuchat, Larry & Montville, Thomas. 1997. *Food microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Washington DC: American Society for Microbiology.
- [8] Charlier, C. ym. 2009. *Interactions between Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives*. International Journal of Food Microbiology. Vol. 131, s. 30–39.
- [9] Zoonosikeskus. 2010. Verkkodokumentti. *Staphylococcus aureus - Elintarvikevälitteiset epidemiat*. <http://www.zoonosikeskus.fi/portal/fi/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytysten_aiheuttajat/staphylococcus_aureus/> Luettu 27.8.12
- [10] Elintarviketurvallisuusvirasto. 2012. Verkkodokumentti. *Elintarvikelainsäädäntö*. <http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/valmistus_ja_myynti/elintarvikelainsaadanto/> Päivitetty 8.5.2012. Luettu 16.5.2012.
- [11] Euroopan komissio. 2006. Verkkodokumentti. *Euroopan yhteisön asetus elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista. 2073/2005*. <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R2073:20060101:FI:PDF>> Luettu 16.5.2012.

- [12] *Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset, komission asetuksen (EY) No 2073/2005 soveltaminen. Ohje elintarvikealan toimijoille.* 2009. Eviran ohje 10501/1. Elintarviketurvallisuusvirasto.
- [13] SFS-EN ISO 6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. 1999. *Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species). Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.* Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- [14] Thermo Scientific. 2012. Verkkodokumentti. *Dehydrated Culture Media.* <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0275&org=153&c=UK&lang=EN> Luettu 10.5.2012.
- [15] Thermo Scientific. 2012. Verkkodokumentti. *Prepared Media - Ready Prepared Plates.* <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO1186&cat=&c=UK&lang=EN> Luettu 23.4.2012.
- [16] Certificate of Compliance Microval. 2010. *Collaborative Study for Method Validation according to ISO 16140 (2003) of Brilliance Staph 24 chromogenic medium.* Certificate no.: 2008-LR11.
- [17] SFS-EN ISO 6888-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs. 1999. *Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species). Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium.* Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- [18] Thermo Scientific. 2012. Verkkodokumentti. *Dehydrated Culture Media.* <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0961&org=153&c=UK&lang=EN> Luettu 23.4.2012.
- [19] NMKL. 2008. *Measurement of Uncertainty in Quantitative Microbiological Examination of Foods.* Procedure No. 8, 4.
- [20] Niemelä, Seppo. 2001. *Mikrobiologian kvantitatiivisten viljelymääritysten mittausepävarmuus.* Julkaisu J1/2001. Helsinki: Metrologian neuvottelukunta.
- [21] Eurachem. 2002. *Accreditation for Microbiological Laboratories.* EA Guide 04/10.
- [22] *Mikrobiologisten menetelmien validointiohje.* Valvonta 13/1997. Helsinki: Elintarvikevirasto.

- [23] SFS-EN ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs. 2003. *Protocol for the validation of alternative methods*. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- [24] Livsmedelsverket. 2012. Verkkodokumentti. *Microbiological reference materials for analyses of drinking water and food*. <<http://www.slv.se/en-gb/Banners/Proficiency-Testing/Reference-materials/Microbiological-reference-materials-for-analyses-of-drinking-water-and-food/>> Updated 1st March 2012. Luettu 8.4.2012.
- [25] Harris, Daniel. 2010. *Quantitative Chemical Analysis*. 8th edition. New York: W. H. Freeman and Company.
- [26] Teräsahde, Pertti & Manninen, Pentti. 1997. *Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje*. Valvonta 10/1997. Helsinki: Elintarviketurvallisuusvirasto.
- [27] SFS-ISO-5725. Testausmenetelmien täsmällisyys. 1988. *Toistettavuuden ja uusittavuuden määrittäminen laboratorioden välisissä kokeissa*. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- [28] Hovind, Håvard ym. 2006. *Sisäinen laadunohjaus – Ohjekirja kemian laboratorioille*. Helsinki: Edita Prima Oy.
- [29] Nordval. 2009. *Protocol for the validation of alternative microbiological methods*. Oslo: National Veterinary Institute.
- [30] SFS-ISO-6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. 2003. *Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species). Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium*. Amendment 1: Inclusion of precision data. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- [31] Nummenmaa, Lauri. 2004. *Käyttätymistieteiden tilastolliset menetelmät*. Helsinki: Tammi.

Kasvualustojen ja laimennosliuosten koostumus

Baird-Parker-, Baird-Parker (RPF)- ja Brilliance Staph 24 -alustojen koostumus:

Baird-Parker		Baird-Parker (RPF)		Brilliance Staph 24	
Valmistaja: Thermo Fisher		Valmistaja: Thermo Fisher		Valmistaja: Oxoid	
reagenssit	g	reagenssit	g	reagenssit	g
tryptoni	10,0	tryptoni	10,0	peptoni	21,0
lihauute	5,0	lihauute	5,0	kromogeenisekoitus	5,0
hiivauute	1,0	natriumpyruvaatti	10,0	natriumpyruvaatti	4,0
L-glysiini	12,0	hiivauute	1,0	litiumkloridi	5,0
natriumpyruvaatti	10,0	glysiini	12,0	agar	14,0
litiumkloridi	5,0	litiumkloridi	5,0		
agar	12–22	agar	20,0		
tislattu vesi	1000	tislattu vesi	1000		

Baird-Parker -kasvualustan valmistaminen:

Steriloidaan 15 minuuttia 121 ± 1 °C:ssa. Alustan pH steriloinnin jälkeen $7,2 \pm 0,2$. Ennen maljojen valamista 150 ml:aan perusalustaa (45 °C) lisätään munankeltuaistelluriittiemulsiota 7,5 ml. Maljaerän toimivuus testataan *S. aureus* 3629 -kannalla.

Brilliance Staph 24 -kasvualusta:

Maljat tilataan siirrostusvalmiina tavarantoimittajalta. Valmiin maljan pH $7,2 \pm 0,2$. Maljaerän toimivuus testataan *S. aureus* 3629 -kannalla.

Baird-Parker (RPF) -kasvualustan valmistaminen:

Sterilointi 15 minuuttia 121 ± 1 °C. Alustan pH steriloinnin jälkeen $7,2 \pm 0,2$. Ennen maljojen valamista 90 ml:aan perusalustaa (45 °C) lisätään 10 ml RPF-lisäainetta. Maljaerän toimivuus testataan *S. aureus* 3629 -kannalla.

RPF-lisäaineen koostumus:

Reagenssi	Yhdessä ampullissa
Valmistaja: Oxoid	
naudan fibrinogeeni	375 mg
kanin plasma	2,5 ml
trypsiini-inhibiittori	2,5 mg
natriumtelluriitti	2,5 mg

Laimennosliuosten koostumus:

Peptonisuolaliuos		Dikaliumpyrofosfaatti	
reagenssi	g	reagenssi	g
kaseiinipeptoni	1,0	K ₂ HPO ₄	20,0
natriumkloridi	8,5	tislattu vesi	1000
tislattu vesi	1000		

Peptoni-suolaliuos valmistetaan liuottamalla peptoni ja suola veteen. Tarpeen vaatiessa lämmitetään. pH steriloinnin jälkeen 7,0 ±0,2.

Dikaliumpyrofosfaattiliuos valmistetaan liuottamalla suola veteen kuumentamalla liuosta 45–50 °C:seen. pH säädetään lopuksi 7,5 ±0,2.

Suhteellinen oikeellisuus

Laskennalliset kontaminaatiopitoisuudet, kaikkien menetelmien pitoisuustulokset ja pitoisuustulosten logaritmit

Matriisit	Lisätty laskennallinen pitoisuus pmy/g (TSA)	pmy/g			pmy/g log		
		ISO 6888-1: 1999	Brilliance Staph 24	ISO 6888-2: 1999 (RPF)	ISO 6888-1: 1999	Brilliance Staph 24	ISO 6888-2: 1999 (RPF)
Edam 1	110	90	160	160	1,95	2,20	2,20
	1100	1500	2000	1500	3,18	3,30	3,18
	11000	23000	26000	17000	4,36	4,41	4,23
Edam 2	120	150	210	170	2,18	2,32	2,23
	1200	2300	2000	1900	3,36	3,30	3,28
	12000	24000	29000	28000	4,38	4,46	4,45
Edam 3	150	210	250	240	2,32	2,40	2,38
	1500	2000	2100	2300	3,30	3,32	3,36
	15000	25000	24000	15000	4,40	4,38	4,18
Maitojauhe1	130	250	200	190	2,40	2,30	2,28
	1300	1900	2400	2100	3,28	3,38	3,32
	13000	24000	26000	23000	4,38	4,41	4,36
Maitojauhe 2	160	240	310	230	2,38	2,49	2,36
	1600	2000	2500	2500	3,30	3,40	3,40
	16000	26000	26000	29000	4,41	4,41	4,46
Maitojauhe 3	130	200	220	230	2,30	2,34	2,36
	1300	2200	2500	2400	3,34	3,40	3,38
	13000	27000	26000	26000	4,43	4,41	4,41
Oltermanni 1	120	200	140	150	2,30	2,15	2,18
	1200	1600	1900	1600	3,20	3,28	3,20
	12000	23000	18000	12000	4,36	4,26	4,08
Oltermanni 2	120	190	200	240	2,28	2,30	2,38
	1200	1800	1900	1500	3,26	3,28	3,18
	12000	21000	22000	20000	4,32	4,34	4,30
Oltermanni 3	110	210	200	190	2,32	2,30	2,28
	1100	1700	1900	1800	3,23	3,28	3,26
	11000	17000	30000	17000	4,23	4,48	4,23
Maito 1	12	21	20	25	1,32	1,30	1,40
	120	150	210	180	2,18	2,32	2,26
	1200	1900	2000	1800	3,28	3,30	3,26
	12000	20000	22000	23000	4,30	4,34	4,36
	120000	230000	280000	260000	5,36	5,45	5,41

Maito 2	13	18	18	16	1,26	1,26	1,20
	130	140	170	160	2,15	2,23	2,20
	1300	1300	1700	1500	3,11	3,23	3,18
	13000	19000	28000	14000	4,28	4,45	4,15
	130000	170000	200000	190000	5,23	5,30	5,28
Maito 3	13	16	17	17	1,20	1,23	1,23
	130	210	170	180	2,32	2,23	2,26
	1300	1300	2000	1500	3,11	3,30	3,18
	13000	19000	28000	19000	4,28	4,45	4,28
	130000	230000	250000	300000	5,36	5,40	5,48

Pitoisuustulosten logaritmit, keskiarvot ja keskihajonnat matriiseittain, kaikkien keskiarvo, keskihajonta sekä 95 %:n luottamusväli - ISO 6888-1: 1999

	log (pmy/g)				
	1	2	3	4	5
Edam		1,95	3,18	4,36	
Edam		2,18	3,36	4,38	
Edam		2,32	3,30	4,40	
Keskiarvo		2,15	3,28	4,38	
Keskihajonta		0,19	0,09	0,02	
Maitojauhe		2,40	3,28	4,38	
Maitojauhe		2,38	3,30	4,41	
Maitojauhe		2,30	3,34	4,43	
Keskiarvo		2,36	3,31	4,41	
Keskihajonta		0,05	0,03	0,03	
Oltermanni		2,30	3,20	4,36	
Oltermanni		2,28	3,26	4,32	
Oltermanni		2,32	3,23	4,23	
Keskiarvo		2,30	3,23	4,30	
Keskihajonta		0,02	0,03	0,07	
Maito	1,32	2,18	3,28	4,30	5,36
Maito	1,26	2,15	3,11	4,28	5,23
Maito	1,20	2,32	3,11	4,28	5,36
Keskiarvo	1,26	2,22	3,17	4,29	5,32
Keskihajonta	0,06	0,09	0,10	0,01	0,08
Kaikkien keskiarvo	1,26	2,26	3,25	4,34	5,32
keskihajonta (s)	0,06	0,12	0,08	0,06	0,08
s*2	0,12	0,25	0,16	0,12	0,15

Pitoisuustulosten logaritmit, keskiarvot ja keskihajonnat matriiseit-
tain, kaikkien keskiarvo ja keskihajonta - Brilliance Staph 24

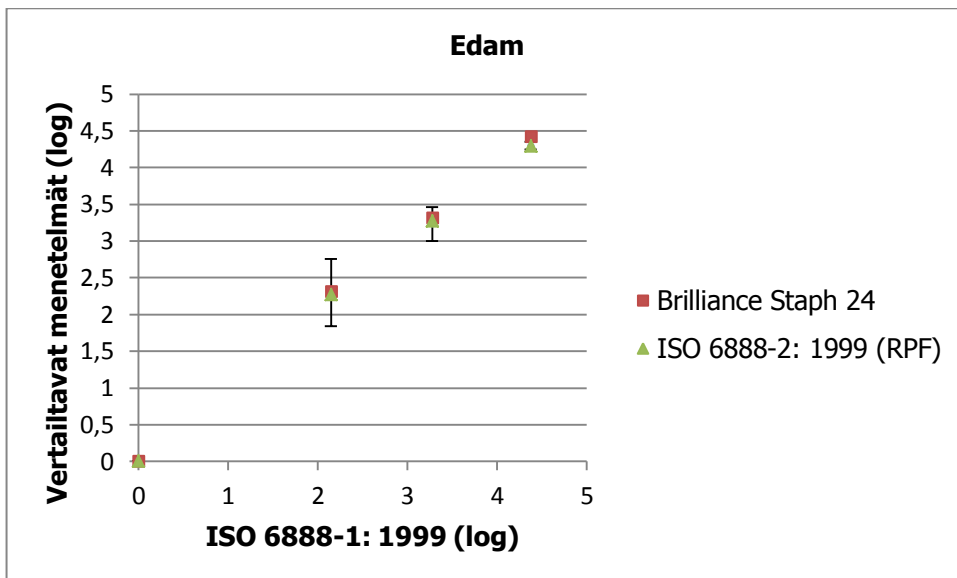
	log (pmy/g)				
	1	2	3	4	5
Edam		2,20	3,30	4,41	
Edam		2,32	3,30	4,46	
Edam		2,40	3,32	4,38	
Keskiarvo		2,31	3,31	4,42	
Keskihajonta		0,10	0,01	0,04	
Maitojauhe		2,30	3,38	4,41	
Maitojauhe		2,49	3,40	4,41	
Maitojauhe		2,34	3,40	4,41	
Keskiarvo		2,38	3,39	4,41	
Keskihajonta		0,10	0,01	0,00	
Oltermanni		2,15	3,28	4,26	
Oltermanni		2,30	3,28	4,34	
Oltermanni		2,30	3,28	4,48	
Keskiarvo		2,25	3,28	4,36	
Keskihajonta		0,09	0,00	0,11	
Maito	1,30	2,32	3,30	4,34	5,45
Maito	1,26	2,23	3,23	4,45	5,30
Maito	1,23	2,23	3,30	4,45	5,40
Keskiarvo	1,26	2,26	3,28	4,41	5,38
Keskihajonta	0,04	0,05	0,04	0,06	0,08
Kaikkien keskiarvo	1,26	2,30	3,31	4,40	5,38
keskihajonta (s)	0,035	0,091	0,053	0,062	0,076
s*2	0,07	0,18	0,11	0,12	0,15

Pitoisuustulosten logaritmit, keskiarvot ja keskihajonnat matriiseit-
tain, kaikkien keskiarvo ja keskihajonta – ISO 6888-2: 1999 (RPF)

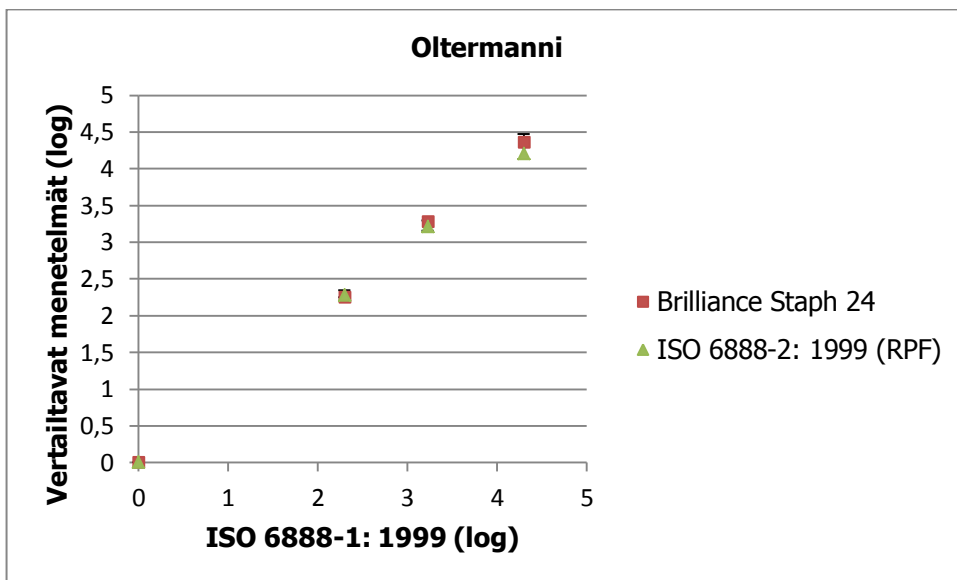
	log (pmy/g)				
	1	2	3	4	5
Edam		2,20	3,18	4,23	
Edam		2,23	3,28	4,45	
Edam		2,38	3,39	4,18	
Keskiarvo		2,27	3,27	4,29	
Keskihajonta		0,10	0,09	0,14	
Maitojauhe		2,28	3,32	4,36	
Maitojauhe		2,36	3,40	4,46	
Maitojauhe		2,36	3,38	4,41	
Keskiarvo		2,33	3,37	4,41	
Keskihajonta		0,05	0,04	0,05	
Oltermanni		2,18	3,20	4,08	
Oltermanni		2,38	3,18	4,30	
Oltermanni		2,28	3,26	4,23	
Keskiarvo		2,28	3,21	4,20	
Keskihajonta		0,10	0,04	0,11	
Maito	1,40	2,26	3,26	4,36	5,41
Maito	1,20	2,20	3,18	4,15	5,28
Maito	1,23	2,26	3,18	4,28	5,48
Keskiarvo	1,28	2,24	3,21	4,26	5,39
Keskihajonta	0,11	0,03	0,05	0,11	0,10
keskiarvo	1,28	2,28	3,27	4,29	5,39
keskihajonta (s)	0,108	0,073	0,087	0,121	0,101
s*2	0,22	0,15	0,17	0,24	0,20

Suhteellinen oikeellisuus – Edam

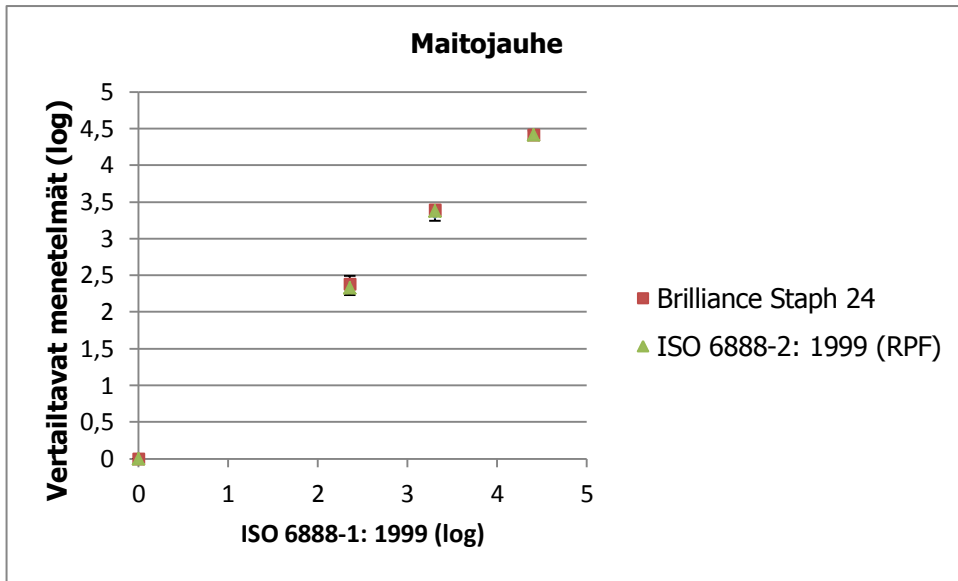
(virherajat: [2 x s] ISO 6888-1: 1999)



Suhteellinen oikeellisuus - Oltermanni



Suhteellinen oikeellisuus - Maitojauhe



Uusittavuus

(matriisilla) ISO 6888-1: 1999

Malja-nro	Matriisi	Analysoija			Analysoija		
		1	2	3	1	2	3
		cfu/g			cfu/g log		
1	Edam	6600	6100	4700	3,82	3,79	3,67
2	Edam	6700	7800	5300	3,83	3,89	3,72
3	Edam	5800	6700	6000	3,76	3,83	3,78
4	Edam	5900	7600	5800	3,77	3,88	3,76
5	Edam	4100	4900	5700	3,61	3,69	3,76
6	Edam	5300	7600	6500	3,72	3,88	3,81
7	Edam	8100	6300	7600	3,91	3,80	3,88
8	Edam	6100	7300	6400	3,79	3,86	3,81
9	Edam	7000	8300	7500	3,85	3,92	3,88
10	Edam	5900	8900	8200	3,77	3,95	3,91

Anova: yksisuuntainen

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
1	10	37,82672	3,78	0,006211
2	10	38,48645	3,85	0,005704
3	10	37,98261	3,80	0,005683
keskiarvo			3,81	

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	0,0237801	2	0,01189	2,026907	0,1513	3,354131
Ryhmissä	0,1583851	27	0,005866			
Yhteensä	0,1821652	29				

$F_{\text{testi}} < F_{\text{crit}}$, joten H_0 ei hylätä.

Ryhmiä odotusarvojen vaihtelu on selitettävissä mittausepävarmuudesta johtuvalla vaihtelulla

Ryhmiä sisäinen varianssi $s_w^2 = M_w =$ 0,005866

(S_r) Ryhmiä sisäinen keskihajonta s_w **0,08**

(S_L^2) ryhmiä välinen varianssi **0,0006**

$u = S_r = \text{neliöjuuri}(S_r^2 + S_L^2)$ **0,08043**

Mittausepävarmuus
(95 % luottamusväli)

$U = 2 * u$ 0,16

Tulos **$3,81 \pm 0,16 \text{ log cfu/g}$**

Uusittavuus (ilman matriisia) – ISO 6888-1: 1999

Malja- nro	Matriisi	Analysoija			Analysoija		
		1	2	3	1	2	3
		cfu/g			cfu/g log		
1	DIK	5800	4500	4900	3,76	3,65	3,69
2	DIK	4700	6100	4200	3,67	3,79	3,62
3	DIK	6200	5200	5500	3,79	3,72	3,74
4	DIK	5300	7100	4300	3,72	3,85	3,63
5	DIK	5900	5600	5600	3,77	3,75	3,75
6	DIK	5300	4000	5900	3,72	3,60	3,77
7	DIK	6400	4000	6700	3,81	3,60	3,83
8	DIK	4000	6400	5500	3,60	3,81	3,74
9	DIK	6500	6200	6100	3,81	3,79	3,79
10	DIK	7600	6100	6500	3,88	3,79	3,81

Anova: yksisuuntainen

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
1	10	37,549	3,75	0,006186
2	10	37,342	3,73	0,0077229
3	10	37,371	3,74	0,0047972
keskiarvo			3,74	

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	0,002519684	2	0,00126	0,2020469	0,818	3,3541308
Ryhmissä	0,168355643	27	0,006235			
Yhteensä	0,170875327	29				

F_testi < F_crit, joten H0 ei hylätä.

Ryhmien odotusarvojen vaihtelu on selitettävissä mittausepävarmuudesta johtuvalla vaihtelulla

Ryhmien sisäinen varianssi $s_w^2 = M_w =$ 0,0062354

(Sr) Ryhmien sisäinen keskihajonta s_w **0,08**

(S_L^2) ryhmien välinen varianssi **-0,0005**

$u = Sr = \text{neliöjuuri}(S_r^2 + S_L^2)$ **0,07575**

Mittausepävarmuus (95 % luottamusväli)

$U = 2 * u$ 0,15

Tulos **3,74 ± 0,15 log cfu/g**

Uusittavuus (matriisilla) – Brilliance Staph 24

Malja-nro	Matriisi	Analysoija			Analysoija		
		1	2	3	1	2	3
		cfu/g			cfu/g log		
1	Edam	7400	6000	7200	3,87	3,78	3,86
2	Edam	7200	6700	7100	3,86	3,83	3,85
3	Edam	8500	6600	6600	3,93	3,82	3,82
4	Edam	6400	7300	6700	3,81	3,86	3,83
5	Edam	8100	8000	7100	3,91	3,90	3,85
6	Edam	7300	8200	6400	3,86	3,91	3,81
7	Edam	6400	7400	7900	3,81	3,87	3,90
8	Edam	7900	8100	9400	3,90	3,91	3,97
9	Edam	8700	7500	8000	3,94	3,88	3,90
10	Edam	8200	8400	9400	3,91	3,92	3,97

Anova: yksisuuntainen

YHTEENVETO

<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>
1	10	38,79111	3,88	0,002228
2	10	38,68105	3,87	0,002265
3	10	38,75862	3,88	0,003577
Keskiarvo			3,87	

ANOVA

<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>
Luokkien välissä	0,000639	2	0,00032	0,118859	0,888395	3,354131
Ryhmissä	0,072634	27	0,00269			
Yhteensä	0,073273	29				

F_testi < F_crit, joten H0 ei hylätä.

Ryhmien odotusarvojen vaihtelu on selitettävissä mittausepävarmuudesta johtuvalla vaihtelulla

Ryhmien sisäinen varianssi $s_w^2 = M_w =$ 0,00269(Sr) Ryhmien sisäinen keskihajonta s_w **0,05** (S^2_L) ryhmien välinen varianssi **-0,0002** $u = Sr = \text{neliöjuuri}(S_r^2 + S^2_L)$ **0,04953**

Mittausepävarmuus (95 % luottamusväli)

 $U = 2 * u$ 0,10Tulos **3,87 ± 0,10 log cfu/g**

Uusittavuus (ilman matriisia) – Brilliance Staph 24

Malja-nro	Matriisi	Analysoija			Analysoija		
		1	2	3	1	2	3
		cfu/g			cfu/g log		
1	DIK	5800	5500	6400	3,76	3,74	3,81
2	DIK	6500	5900	5400	3,81	3,77	3,73
3	DIK	6300	6200	5100	3,80	3,79	3,71
4	DIK	4600	6300	4800	3,66	3,80	3,68
5	DIK	6700	6400	6000	3,83	3,81	3,78
6	DIK	6900	5200	5600	3,84	3,72	3,75
7	DIK	6500	6600	6000	3,81	3,82	3,78
8	DIK	5700	6700	6300	3,76	3,83	3,80
9	DIK	6300	5700	4500	3,80	3,76	3,65
10	DIK	8400	6200	7900	3,92	3,79	3,90

Anova: yksisuuntainen

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
1	10	37,99577	3,80	0,004454115
2	10	37,81902	3,78	0,001261045
3	10	37,58206	3,76	0,004945027
Keskiarvo			3,78	

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	0,00861845	2	0,004309	1,212705925	0,313081	3,3541308
Ryhmissä	0,09594168	27	0,003553			
Yhteensä	0,10456013	29				

F_testi < F_crit, joten H0 ei hylätä.

Ryhmien odotusarvojen vaihtelu on selitettävissä mittausepävarmuudesta johtuvalla vaihtelulla

Ryhmien sisäinen varianssi $s_w^2 = M_w =$ 0,00355

(Sr) Ryhmien sisäinen keskihajonta s_w **0,06**

(S^2_L) ryhmien välinen varianssi **7,6E-05**

$u = Sr = \text{neliöjuuri}(S_r^2 + S^2_L)$ **0,06024**

Mittausepävarmuus (95 % luottamusväli)

$U = 2 * u$ 0,12

Tulos **3,78 ± 0,12 log cfu/g**

Uusittavuus (matriisilla) – ISO 6888-2: 1999 (RPF)

Malja-nro	Matriisi	Analysoija			Analysoija		
		1	2	3	1	2	3
		cfu/g			cfu/g log		
1	Edam	8000	5500	6700	3,90	3,74	3,83
2	Edam	7100	6900	6600	3,85	3,84	3,82
3	Edam	7000	6900	6200	3,85	3,84	3,79
4	Edam	7300	7200	6600	3,86	3,86	3,82
5	Edam	6100	6400	5700	3,79	3,81	3,76
6	Edam	7500	8100	5800	3,88	3,91	3,76
7	Edam	8300	7900	7200	3,92	3,90	3,86
8	Edam	6700	8000	7400	3,83	3,90	3,87
9	Edam	8000	7300	9000	3,90	3,86	3,95
10	Edam	9500	8700	7100	3,98	3,94	3,85

Anova: yksisuuntainen

YHTEENVETO

<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>
1	10	38,74913	3,87	0,0029002
2	10	38,59362	3,86	0,0033406
3	10	38,30892	3,83	0,0033046
Keskiarvo			3,86	

ANOVA

<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>
Luokkien välissä	0,009967	2	0,004984	1,5662882	0,227207	3,3541308
Ryhmissä	0,085908	27	0,003182			
Yhteensä	0,095875	29				

F_testi < F_crit, joten H0 ei hylätä.

Ryhmien odotusarvojen vaihtelu on selitettävissä mittausepävarmuudesta johtuvalla vaihtelulla

Ryhmien sisäinen varianssi $s_w^2 = M_w =$ 0,00318(Sr) Ryhmien sisäinen keskihajonta s_w **0,06** (S^2_L) ryhmien välinen varianssi **0,0002** $u = Sr = \text{neliöjuuri}(S_r^2 + S^2_L)$ **0,05798**

Mittausepävarmuus (95 % luottamusväli)

 $U = 2 \cdot u$ 0,12Tulos **3,86 ± 0,12 log cfu/g**

Uusittavuus (ilman matriisia) – ISO 6888-2: 1999 (RPF)

Malja-nro	Matriisi	Analysoija			Analysoija		
		1	2	3	1	2	3
		cfu/g			cfu/g log		
1	DIK	6100	6300	5700	3,79	3,80	3,76
2	DIK	4600	6700	6200	3,66	3,83	3,79
3	DIK	6600	6600	4900	3,82	3,82	3,69
4	DIK	5900	6800	5100	3,77	3,83	3,71
5	DIK	6300	5200	4600	3,80	3,72	3,66
6	DIK	4900	5600	5100	3,69	3,75	3,71
7	DIK	7000	6300	5300	3,85	3,80	3,72
8	DIK	7000	7000	5500	3,85	3,85	3,74
9	DIK	7600	6700	7200	3,88	3,83	3,86
10	DIK	7500	9400	7600	3,88	3,97	3,88

Anova: yksisuuntainen

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
1	10	37,97409	3,80	0,005389
2	10	38,1853	3,82	0,004568
3	10	37,51915	3,75	0,005108

Keskiarvo **3,79**

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	0,023178	2	0,011589	2,307772	0,118782	3,354131
Ryhmissä	0,135588	27	0,005022			
Yhteensä	0,158766	29				

F_testi < F_crit, joten H0 ei hylätä.

Ryhmiä odotusarvojen vaihtelu on selitettävissä mittausepävarmuudesta johtuvalla vaihtelulla

Ryhmiä sisäinen varianssi $s_w^2 = M_w =$ 0,005022(Sr) Ryhmiä sisäinen keskijajonta s_w 0,07 (S^2_r) ryhmiä välinen varianssi 0,0007 $u = S_r = \text{neliöjuuri}(S_r^2 + S^2_r)$ 0,07536

Mittausepävarmuus (95 % luottamusväli)

 $U = 2 * u$ 0,15Tulos **3,79 ± 0,15 log cfu/g**

Toistettavuus

Toistettavuus - ISO 6888-1: 1999

		keskiarvo (pmy/g)
4800	5900	5400
4800	4300	4600
5000	4900	5000
5100	4500	4800
5200	5000	5100
4900	5100	5000
4700	4700	4700
4800	6100	5500
4900	5200	5100
5200	4200	4700

suurimman ja pienimmän suhde 1,20 (=5500/4600)

sallittu vaihteluväli

 pienin arvo (pmy/g) 3000 (=4600/1,55)

 suurin arvo (pmy/g) 7100 (=4600*1,55)

Toistettavuus - Brilliance Staph 24

		keskiarvo (pmy/g)
6100	6300	6200
5900	5900	5900
5400	6300	5900
5600	6800	6200
7000	4300	5700
5200	5200	5200
5900	7000	6500
5100	7100	6100
6200	6800	6500
6200	6300	6300

suurimman ja pienimmän suhde 1,25 (=6500/5200)

sallittu vaihteluväli

 pienin arvo (pmy/g) 3400 (=5200/1,55)

 suurin arvo (pmy/g) 8100 (=5200*1,55)

Toistettavuus - ISO 6888-2:1999 (RPF)

		keskiarvo (pmy/g)	
5600	6300	6000	
6500	5600	6100	
5800	6200	6000	
6200	5300	5800	
4900	5400	5200	
5700	5400	5600	
5500	5000	5300	
6100	5500	5800	
6500	5100	5800	
6800	5200	6000	

suurimman ja pienimmän suhde

1,17 (=6100/5200)

sallittu vaihteluväli

 pienin arvo (pmy/g)

3400 (=5200/1,55)

 suurin arvo (pmy/g)

8100 (=5200*1,55)

Kasvualustojen spesifisyyden testaus häiritsevillä mikrobikannoilla

ISO 6888-1: 1999

Laji	<i>S. warneri</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
Kanta	3726	3729	2010	4637	2306	2288
Muoto	pyöreä	pyöreä, nappi	ei selkeää pesäkettä	ei selkeäreunaisia pesäkkeitä	ei selkeää pesäkettä	pyöreä, pesäkkeet ei juurikaan erillään
Ulkonäkö	kiiltäväpintainen, mattomainen	kiiltäväpintainen, todella runsas kasvu	kiiltäväpintainen, niukahko kasvu	röpelöpintainen, niukka ja heive- roinen kasvu	ei kasva juuri lainkaan, pieni viirujälki siirrostukselta	kiiltäväpintainen, levinnyt, mattomainen
Väri	musta	musta	musta	musta	musta	tumman harmaa/musta
Kirkas kehä ympärillä	ei	ei	ei	ei	ei	ei
Läpinäkymätön kehä ympärillä	kyllä, todella selkeä	kyllä, epätyypillisen leveä	ei	ei	ei	kyllä, tyypillinen reaktio
Huomioitavaa	<i>S. warneri</i> : ulkopuolinen kehä "puolet" pesäkkeen koosta <i>S. xylosus</i> : ulkopuolinen kehä pesäkkeen kokoinen					

Kasvualustojen spesifisyyden testaus häiritsevillä mikrobikannoilla

– Brilliance Staph 24

Laji	<i>S. warneri</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
Kanta	3726	3729	2010	4637	2306	2288
Muoto	pyöreä, todella pieni	pyöreä, litteä	pyöreä, pieni	ei selkeää pesäkettä	pyöreä, todella pieni	pyöreä, levinnyt
Ulkonäkö	kiiltäväpintainen, niukahko, pesäkkeet erillään	limaisen kiiltävä, levinnyt, runsas kasvu	kiiltävähkö, hieman levinnyt, mattomainen	todella niukka kasvu	kiiltäväpintainen, niukka kasvu	matalampi, kuin tyypillinen kasvu, ei selkeää tummansinistä reunaa
Väri	keltainen	likaisen keltainen	tuhkan harmaa	vaalean keltainen	vaalean sinisen/tuhkan harmaa	tumman sinertävänharmaa
Huomioitavaa	<i>S. epidermidis</i> : ei selkeää reunaa pesäkkeessä <i>E. faecium</i> : ei tyypillistä sinertävää ulkoreunaa pesäkkeessä <i>Micrococcus sp.</i> : paljon tyypillisen pesäkkeen oloinen					

Kasvualustojen spesifisyyden testaus häiritsevilla mikrobikannoilla

– ISO 6888-2: 1999 (RPF)

Laji	<i>S. warneri</i>	<i>S. xylosum</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
Kanta	3726	3729	2010	4637	2306	2288
Muoto	pyöreä, nappimainen	ei irrallisia pesäkkeitä	pyöreä	ei selkeätä pesäkettä	pyöreä, pieni	pyöreä, röpelökhö reuna
Ulkonäkö	kiiltävän limainen	mattomainen, todella levinnyt	kiiltäväpintainen, limainen, levinnyt	niukahko kasvu	kiiltäväpintainen, teräväreunainen	kiiltäväpintainen, valkoinen reunus pesäkkeessä
Väri	tummanvihertävän harmaa	tummanharmaa, jossa kellerävää	tummanharmaa	musta	musta	tummanharmaa, vihertävä
Kirkas kehä ympärillä	ei	ei	ei	ei	ei	ei
Läpinäkymätön kehä ympärillä	ohuehko vaalea reuna	ohuehko valkea reuna	paksu valkoinen kehä	ei	ei	usvainen sameahko panta todella leveällä ympärillä
Huomioitavaa						