

Taru Kariniemi

ENTEROBAKTEERIEN JA KOLIMUOTOISTEN BAKTEERIEN
MÄÄRITYSMENETELMIEN VALIDOINTI

Kemiantekniikan koulutusohjelma
2014

ENTEROBAKTEERIEN JA KOLIMUOTOISTEN BAKTEERIEN MÄÄRITYS MENETELMIEN VALIDOINTI

Kariniemi, Taru

Satakunnan ammattikorkeakoulu

Kemiantekniikan koulutusohjelma

Toukokuu 2014

Työn valvoja : Työppönen, Susanna; laboratorionjohtaja, mikrobiologi

Työn ohjaaja: Timo Hannelius; kemiantekniikan lehtori, SAMK

Sivumäärä: 34

Liitteitä: 4

Asiasanat: Enterobakteerit, kolimuotoiset bakteerit, validointi, mittausepävarmuus

TIIVISTELMÄ

Suomessa toimiva elintarvikevalvonta varmistaa kaikille kansalaisille laadukkaita ja turvallisesti syötäviä elintarvikkeita. Elintarvikevalvonta takaa myös elintarvikkeista annettavien tietojen oikeellisuuden. Elintarvikealan yrittäjiä ja toimijoita velvoitetaan laatimaan omavalvontasuunnitelma. EU-tasolla on laadittu mikrobikriteeriasetus, jonka mikrobiologiset vaatimukset ovat suunnattu lähinnä omavalvontaan. Mikrobiologinen vaatimus asettaa tuotteelle, elintarvike-erälle tai – prosessille hyväksyttävyyden. Elintarvikkeita testattaessa virallisessa akkreditoitussa laboratoriossa, tulee testimenetelmien olla ajantasaisia ja akkreditoituja tai arvioituja. Työn tarkoituksena oli validoida kaksi menetelmää ja määrittää näille mittausepävarmuudet.

Validoitavina menetelminä olivat kolimuotoisten bakteerien määrittäminen menetelmä, joka on laboratorion sisäinen menetelmä sekä enterobakteerien määrittäminen menetelmä NMKL 144:2005. Kolimuotoisten bakteerien määrittämisessä käytettiin kaupallista petrifilmi-alustaa (Petrifilm™ Coliform Count Plate) kun taas enterobakteereja määritettiin VRBG-agaralustalla perinteisellä maljavalutekniikalla. Näytematriiseina toimivat metsämarjavalmisteen, kirkas perunasalaatti ja kananmunamassa, mitkä olivat hyvin tyypillisiä näytteitä laboratorion jokapäiväisessä toiminnassa. Validoinnissa valmistettiin mikrobisuspensiot sekä tutkittavasta että häiritsevistä mikrobikannasta, joita lisättiin näytteisiin tunnetut määrät ja näytteet tutkittiin tämän jälkeen validoitavilla menetelmillä. Validoinnissa tarkasteltiin saatujen tulosten perusteella menetelmien uusittavuutta, toistettavuutta, lineaarisuutta ja spesifisyyttä sekä määritettiin menetelmäkohtaiset mittausepävarmuudet.

Työssä onnistuttiin odotusten mukaisesti ja näytteistä saatiin hyvät tulokset. Menetelmät olivat uusittavuudeltaan, toistettavuudeltaan sekä lineaarisuudeltaan hyvät ja niiden osoitettiin olevan spesifiset ja toimivan erinomaisesti. Molemmille menetelmille saatiin myös laskettua mittausepävarmuudet.

OPINNÄYTETYÖN NIMI ENGLANNIKSI
VALIDATION METHODS FOR COLIFORM BACTERIA AND
ENTEROBACTERIA

Kariniemi, Taru

Satakunta University of Applied Sciences

Degree Programme in Chemical Engineering

May 2014

Supervisor 1: Työppönen, Susanna; Laboratory Director, Microbiologist

Supervisor 2: Hannelius, Timo; Senior Lecturer, Chemical Engineering, SAMK

Number of pages: 34

Appendices: 4

Keywords: Enterobacter, Coliforming Bacteria, Validation, Measuring Uncertainty

ABSTRACT

Food supervision in Finland ensures high quality and safely eatable foodstuff for all citizens. Food supervision secures that all information which are given about foodstuff is reliable. The entrepreneurs and actors of foodstuff industry are obligated to do self-monitoring plan (HACCP). Microbial criteria act has been created by EU, which point out self-monitoring of microbiological requirements. Microbiological requirements are set for acceptability of a product, a foodstuff batch or –process. Test methods should be updated and accredited or at least assessed, when foodstuffs are testing in official accredited laboratory. The purpose of the work was to validate two different methods and determine measuring uncertainty for these methods.

The methods which have been validated were coliform bacteria determination method, which is laboratory's internal method and enterobacteria determination method NMKL 144:2005. Commercial petrifilm-base (Petrifilm™ Coliform Count Plate) was used in coliform bacteria determination while enterobacteria were determined with VRBG-agarbase and by conventional plate pouring. The forrest fruit product, the clear potato salad and the egg mass, which were very typical samples used in laboratory daily, were used as sample matrices. Microbial suspensions under study was prepared as well as disruptive bacterial strains, which were added known amounts to samples, which were then tested by validated methods. Reproducibility, repeatability, linearity, specificity and measuring uncertainty of the methods were studied in validation.

Work was successful as expected; good results were received from studied samples. Reproducibility, repeatability, and linearity were good and these proved to be specific and working excellent. Measuring uncertainties could be calculated for both methods.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	ELINTARVIKEVALVONTA	7
	2.1 Mikrobikriteeriasetus	7
	2.2 Mikrobiologinen vaatimus	7
	2.3 Omavalvonta.....	7
	2.4 Elintarvikkeen myyntiajan määrittäminen.....	8
3	KOLIMUOTOISET BAKTEERIT JA ENTEROBAKTEERIT.....	9
	3.1 Kolimuotoiset bakteerit.....	9
	3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	9
	3.2 Enterobakteerit.....	10
	3.2.1 <i>Cronobacter</i> (ent. <i>Enterobacter sakazakii</i>).....	10
4	MIKROBIOLOGISTEN MENETELMIEN VALIDOINTI.....	12
	4.1 Validoinnin merkitys	12
	4.2 Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus.....	12
	4.3 Validoinnin suureet.....	13
	4.3.1 Oikeellisuus.....	14
	4.3.2 Täsmällisyys.....	15
	4.3.3 Toteamisraja.....	15
	4.3.4 Määritysraja.....	16
	4.3.5 Spesifisyys ja herkkyys	16
	4.3.6 Lineaarisuus	17
	4.4 Mikrobiologisen menetelmän validoinnin suoritus	17
	4.4.1 Matriisin, mikrobien ja pitoisuuksien valinta.....	18
	4.4.2 Mikrobisuspension valmistus ja mikrobipitoisuuden määrittäminen.....	18
	4.4.3 Siirrostetun näytteen valmistus	19
5	VALIDOINNIN SUORITUS.....	21
	5.1 Validoitavat menetelmät	21
	5.1.1 Kolimuotoisten bakteerien määrittäminen	21
	5.1.2 Enterobakteerien määrittäminen	22
	5.2 Kasvatusalustat ja reagenssit	23
	5.3 Työn suoritus	24
	5.3.1 Bakteerisuspension valmistus	24
	5.3.2 Siirroksen mikrobipitoisuuden määrittäminen	25
	5.3.3 Näytteiden lähtötilanteen mikrobipitoisuuden määrittäminen	26
	5.3.4 Siirrostettujen näytteiden valmistus ja tutkiminen	26

6 TULOKSET	28
6.1 Uusittavuus	29
6.2 Toistettavuus	29
6.3 Lineaarisuus	31
6.4 Spesifisyys	31
7 PÄÄTELMÄT	33
LÄHTEET	34
LIITTEET	

1 JOHDANTO

Elintarvikkeiden turvallisuutta varmennetaan Suomessa elintarvikevalvonnan avulla. Täten voidaan varmistua elintarvikkeiden laadusta kuin myös elintarvikkeiden koostumuksesta annettavien tietojen oikeellisuudesta. /4/

Käytännössä suurin osa elintarvikevalvonnasta tapahtuu kuntien toimesta yhteistointa-alueittain. Kunnissa toimivia elintarvikevalvontaviranomaisia ovat eläinlääkärit ja terveystarkastajat, mutta teurastamoiden ja niiden yhteydessä olevien laitosten valvonnasta ja lihantarkastuksesta on vastuussa Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. Evira johtaa ja kehittää koko Suomen alueen kattavaa elintarvikevalvontaa. Tulli valvoo EU-jäsenmaiden sekä muiden maiden elintarvikkeiden tuontia yhdessä Eviran kanssa. Puolustusvoimat vastaavasti valvovat elintarvikkeiden vaatimuksen mukaisuutta ja turvallisuutta omalla alueellaan. Yritykset vastaavat itse tuottamiensa tuotteiden turvallisuudesta omavalvonnan avulla. Kuluttajat kuitenkin voivat ilmoittaa havaitsemistaan elintarvikkeiden laatua koskevista puutoksista kuntien viranomaisille. /4/

Jokaisella elintarvikealan yrittäjällä/toimijalla on lakisääteinen velvollisuus laatia ja toteuttaa omavalvontasuunnitelma. Yrityksen toiminnan moninaisuus sekä tuotteiden monipuolisuus ja niihin liittyvät riskitekijät vaikuttavat omavalvontasuunnitelman laajuuteen. Omavalvontasuunnitelman tulee olla kirjallinen, jotta kaikki yrityksessä työskentelevät voivat tutustua työhönsä liittyviin ohjeisiin ja käytännön toiminta olisi kaikilla yhteneväistä. Omavalvontasuunnitelman tulee myös olla ajantasainen, jolloin sitä tulee päivittää tarpeen tullen. /4/

2 ELINTARVIKEVALVONTA

2.1 Mikrobikriteeriasetus

”Mikrobikriteeriasetus perustuu EU:n strategiaan mikrobiologisten kriteerien asettamiseksi, Euroopan elintarviketurvallisuusviraston (EFSA) mielipiteisiin ja kansainvälisiin periaatteisiin” /3, s.6/. Mikrobikriteeriasetuksen (Komission asetus (EY) N:o 2073/2005 Elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista) mukaan elintarvikealan toimijoiden on varmistettava, että elintarvikkeet täyttävät asetuksen antamat mikrobiologiset vaatimukset. Asetuksen mikrobiologiset vaatimukset on pääsääntöisesti suunnattu omavalvontaan. /4/

2.2 Mikrobiologinen vaatimus

Mikrobiologinen vaatimus määrittelee tuotteelle, elintarvike-erälle tai prosessille hyväksyttävyyden. Se perustuu mikro-organismien puuttumiseen tai esiintymiseen ja niiden määrään sekä mahdollisesti myös niiden metaboliittien tai toksiinien määrään. Elintarvikkeiden mikrobiologinen vaatimus koostuu myös muista osatekijöistä, kuten analyysimenetelmästä, näytteenottosuunnitelmasta, raja-arvoista ja tutkimustulosten tulkinnasta sekä toimenpiteiden kuvauksista, joihin ryhdytään raja-arvojen ylittyessä. /3, s.7-12/

2.3 Omavalvonta

Elintarviketeollisuudessa on elintarviketurvallisuuden kannalta välttämätöntä noudattaa omavalvontaa. Toimijan, joka tarkoittaa lähinnä tuotteen/elintarvikkeen valmistajaa, on laadittava omavalvontasuunnitelma, joka sisältää näytteenotto- ja tutkimussuunnitelman. Elintarvikelaki (23/2006) velvoittaa elintarviketurvallisuuden kannalta välttämättömiin omavalvontatutkimuksiin. Valvontaviranomaiset hyväksyvät toimijan omavalvontasuunnitelman riittävyyden ja tarkoituksenmukaisuuden. Tarkastuskäynnerein valvotaan omavalvontasuunnitelman toteutumista ja tutkimusten tuloksia ja

jos tuloksissa havaitaan normaalista poikkeavaa, tulee toimijan lisätä näytteenottoa.
/3, s.8/

2.4 Elintarvikkeen myyntiajan määrittäminen

Elintarvikkeiden säilyvyystutkimuksia tehdään, jotta voitaisiin varmistua siitä, että tuotteen mikrobiologiset vaatimukset täyttyvät myyntiajan loppuun asti. Säilyvyystutkimukset sisältävät usein tutkimuksia tuotteiden fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista mm. suolapitoisuus, pH, säilöntäainekertymä. Näiden lisäksi säilyvyystutkimukset sisältävät aistinvaraista arviointia sekä mikrobiologisia tutkimuksia indikaattori- ja/tai patogeenibakteereista. Myyntiajan lisäksi tutkimuksia suunniteltaessa tulee ottaa huomioon myös varastointi- ja tuotanto-olosuhteet sekä saastumismahdollisuus. /3, s.10/

3 KOLIMUOTOISET BAKTEERIT JA ENTEROBAKTEERIT

3.1 Kolimuotoiset bakteerit

Kolimuotoisiksi bakteereiksi kutsutaan *Escherichia*-, *Enterobacter*-, *Klebsiella*- ja *Citrobacter*-sukujen bakteereita /12, s.627/. Koliryhmän bakteerit ovat aerobeja tai fakultatiivisesti anaerobeja gram-negatiivisia itiöttömiä sauvabakteereja /14, s.99/. Kolimuotoiset bakteerit kuuluvat *Enterobacteriaceae*-heimoon ja tuottavat laktoosista happoa ja kaasua. /8, s.166/

Kolimuotoiset bakteerit sinällään eivät ole taksonominen ryhmä, vaan tutkittava tulos riippuu aina määrittämenetelmästä. Yleensä kolimuotoiset bakteerit määritetään 37°C lämpötilassa, mutta maitotuotteille suositus on kuitenkin 30°C lämpötilassa määrittäminen, koska on olemassa kolimuotoisia bakteerilajeja, jotka käyttävät laktoosia 30°C:ssa eivätkä 37°C:ssa. Lisäongelmaa aiheuttavat hitaasti laktoosia käyttävät lajit, jotka eivät tule esiin lyhyessä ajassa vaan vaatisivat pidemmän inkubointi ajan. /8, s.166-167/

Koliryhmän bakteereiden esiintyminen ja niiden määrä kertoo elintarvikkeiden raaka-aineiden sekä valmistusprosessin hygieniatasosta. Kolimuotoiset bakteerit eivät kestä kuumentamista ja niiden esiintyminen pastöroiduissa valmisteissa kertoo usein miten jälkikontaminaatiosta. Koliformisia bakteereja määritetään myös vesijohtovedestä kuvaamaan riittävää veden käsittelyä. /14, s.99/

3.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli on koliryhmän bakteeri, jota tavataan ihmisten ja eläinten suolistossa. Sen runsasta esiintymistä elintarvikkeissa voidaan pitää merkinä heikosta hygieniasta. *E.colin* erottaminen muista koliryhmän bakteereista on oleellista, koska sen läsnäolo näytteissä osoittaa suorasta tai epäsuorasta ulostekontaminaatiosta. Osa *E.coli*-bakteereista on muuntunut siten, että ne voivat aiheuttaa ihmisille suolistotu-

lehduksia, jotka ilmenevät ripulina. Eräs tällainen taudinaiheuttajakanta on EHEC-bakteeri (Enterohemorraginen *Escherichia coli*). /5/; /8, s.167/

3.2 Enterobakteerit

Enterobacteriaceae-heimon bakteerit ja enterobakteerit ovat gramnegatiivisia aerobeja tai fakultatiivisesti anaerobeja sauvabakteereja. Ne tuottavat glukoosista ja muista sokereista happoa. Enterobakteerisuku on hyvin laaja ja se voidaan ryhmitellä aineenvaihduntatuotteiden perusteella pienempiin osiin. *Enterobacteriaceae*-heimon muodostavat varsinaisten enterobakteerien lisäksi *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Klebsiella*. /11, s.492-493/; /8, s.168/

Enterobakteerien käyttämisestä kolimuotoisten bakteerien sijaan hygieniaindikaattorina on keskusteltu runsaasti. *Enterobacteriaceae*-heimo on taksonomisena ryhmänä selkeämmin määritelty ja välttyttäisiin koliryhmäkäsittelyn aiheuttamilta hankaluuksilta sekä hitaasti laktoosia käyttävät kannat eivät olisi enää ongelma. /8, s.168/

3.2.1 *Cronobacter* (ent. *Enterobacter sakazakii*)

Enterobacter sakazakii-bakteerilajin havaittiin tarkempien taksonomisten tutkimusten perusteella edustavan aivan omaa ja uutta bakteerilajia, joka nimettiin *Cronobacter*-suvuksi. *Cronobacter*-suku jakautuu useisiin lajeihin ja ala-lajeihin, joita ovat *C.sakazakii*, *C.malonaticus*, *C.turicensis*, *C.muytjensii*, *C.dublinensis* subsp. *dublinensis*, *C.dublinensis* subsp. *laucannensis*, *C.dublinensis* subsp. *lactaridi*. Koko *Cronobacter*-suku luokitellaan sairautta aiheuttavaksi, koska sen kaikki lajit on yhdistetty vastasyntyneiden sekä aikuisten sairastumisiin. /6, s.118/

Cronobacter-suvun bakteereita löytyy kasviksista, lihasta ja maitotuotteista ja se on henkeäuhkaavia infektioita aiheuttava etenkin vastustuskyvyltään heikentyneille vastasyntyneille. Kronobakteerit lisääntyvät sekä hapellisissa että hapettomissa olosuh-

teissa ja ne ovat tietyssä kasvun vaiheessa erittäin kestäviä kuivuudelle, kuumuudelle ja osmoottiselle stressille, joka on aiheutunut esimerkiksi suolan tai sokerin vaikutuksesta. Kronobakteerit eivät kuitenkaan kestä kuumennusprosessia, mitä käytetään jauhemaisen äidinmaidonvastikkeen valmistuksessa, jolloin näissä tuotteissa havaitut bakteerit ovat todennäköisesti kuumennuksen jälkeisen saastumisen seurausta, joka on mahdollista, kun lämpöherkkiä ainesosia lisätään tuotteeseen. /6, s.118/

4 MIKROBIOLOGISTEN MENETELMIEN VALIDOINTI

Validoimalla testausmenetelmä voidaan osoittaa menetelmän toimivuus sekä menetelmän antamien tulosten oikeellisuus. Tämä on tarpeen etenkin, kun laboratoriossa otetaan käyttöön uusi menetelmä. Testausmenetelmän soveltuvuus ja toimivuus tulee osoittaa laboratoriossa yleisimmin käytettävillä matriiseilla. Täysin uuden testausmenetelmän käyttöönotto vaatii enemmän perehtymistä ja työtä kuin esimerkiksi jo käytössä ollut menetelmä, joka uudelleen validoidaan jonkin työnsuorituksen kannalta oleellisesti muuttuneen seikan vuoksi.

4.1 Validoinnin merkitys

Validoinnin tarkoituksena on menetelmän luotettavuuden todentaminen tuotettujen vertailuarvojen avulla. Mikrobiologiassa tällaisia luotettavuutta kuvaavia suureita ovat menetelmän herkkyys, lineaarisuus, spesifisyys, suhteellinen oikeellisuus, toistettavuus, toteamisraja ja uusittavuus. Validoinnin vaatimukset laaditaan menetelmän ja sen käyttötarkoituksen mukaan. Menetelmän täydellisen validoinnin suorittaa yleensä menetelmän kehittäjä (esim. standardisimisjärjestö), jolloin laboratorioissa tehtävä validointi on enemmänkin menetelmän käyttöönottoon liittyvä dokumentoitava menettely, jolla laboratorio osoittaa hallitsevansa menetelmän. /13, s.1/

4.2 Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus

Mikrobiologisissa ja kemiallisissa analyyseissä on hyvinkin paljon poikkeavuuksia keskenään. Kemiallisissa analyyseissä pyritään analyytti erottamaan matriisista kemiallisen erotusmenetelmän avulla, jolloin laimeankin analyytin (molekyylit, atomit) hiukkaspitoisuus on usein suuri ja satunnaisella hajonnalla tässä tapauksessa on hyvin vähän vaikutusta tulosten kannalta. Kun taas mikrobiologiassa näyte analysoidaan mikrobeineen, materiaaleineen ja häiritsevine taustoineen, analyytin erottelu tapahtuu puolestaan vasta kasvualustalla. Kasvualustan koostumus sekä kasvuolosuhteet vaikuttavat menetelmän spesifisyyteen. Menetelmän spesifisyyteen vaikutta-

vat myös tutkittavien bakteerikantojen vaihtelevat ominaisuudet. Mikrobiologisten menetelmien epävarmuuteen piilee myös yksi syy näytteiden laimentamisessa. Jotta kvantitatiivisissa määrittelyissä saadaan laskettua yksittäisten solujen muodostamia pesäkkeitä, joudutaan näytteitä laimentamaan halutulle pitoisuusalueelle useassa osassa, jolloin rinnakkaisanalyysien pesäkemäärät saattavat vaihdella suurestikin ilman, että analysoinnissa olisi tapahtunut virhe. /13, s.2/

Mikrobiologiassa täsmälleen oikean tuloksen saaminen on hyvin vaikeaa, ellei jopa mahdotonta, koska mikrobit ovat elävää materiaalia. Mikrobeista ei voida tehdä valmistetta, jonka tarkka ja todellinen pitoisuus olisi tiedossa ja se pysyisi muuntumattomana. Mikrobiologiassa oikea tulos saadaan useiden toistojen keskiarvosta, jos toistetut tulokset ovat riittävän hyviä ja hajonnaltaan tarpeeksi lähellä toisiaan. Eräs merkityksellinen epävarmuustekijä mikrobiologiassa on näytteen homogenointi, koska se saattaa tuhota mikrobeja. Työntekijäkohtaiset työskentelyerot, matriisin ominaisuudet ja taustamikrobiston luonne muun muassa lisäävät myös analyysitulosten hajontaa. /13, s.3/

4.3 Validoinnin suureet

Validointiin liittyvien suureiden määritelmiä on pyritty yhden mukaistamaan niin kansallisesti kuin kansainvälisestikin, koska käytössä on ollut useita toisistaan poikkeavia määritelmiä. Samaa suuretta on saatettu käyttää eri merkityksiin, mikä on aiheuttanut sekaannusta. Taulukossa 1 on esitetty suureet, joita kuvataan numeerisesti menetelmän kehittelyyn liittyvässä täydellisessä validoinnissa. /13, s.6/

TAULUKKO 1. Suureet, jotka liittyvät kvalitatiivisten ja kvantitatiivisten menetelmien validointiin /13, s.6/

Suureet	Kvalitatiivinen menetelmä	Kvantitatiivinen menetelmä
Oikeellisuus (trueness)	x	x
Suht.oikeellisuus (relative accuracy)	x	x
Virhepositiivisuus (false positive ratio)	x	-
Virhenegatiivisuus (false negative ratio)	x	-
Täsmällisyys (precision)	x	x
Toistettavuus (repeatability)	x	x
Uusittavuus (reproducibility)	x	x
Toteamisraja (limit of detection)	x	-
Määrittysraja (limit of determination)	-	x
Spesifisyys (specificity)	x	x
Herkkyys (sensitivity)	x	-
Lineaarisuus (linearity)	-	x

4.3.1 Oikeellisuus

Arvioitaessa menetelmällä saatujen tulosten oikeellisuutta tarvitaan tarkka tieto analysoitavan mikrobin todellisesta pitoisuudesta tutkittavassa näytteessä. Validoitavalla menetelmällä määritettäessä saatujen tulosten oikeellisuus on vaikea todentaa, koska mikrobiologiassa analyyttinä toimii elävä materiaali. Oikeellisuuden määrittämiseen käytetäänkin sertifioituja referenssimateriaaleja, joiden ilmoitettua pitoisuutta voidaan pitää oikeana tuloksena. Käytännössä kuitenkin useimmiten käytetään siirrostetuja näytteitä oikeellisuuden määrittämiseen, koska sertifioidut referenssimateriaalit ovat kalliita. /13, s.6-7/

Suhteellista oikeellisuutta voidaan arvioida samojen näytteiden tutkimustulosten vastaavuuden / lähekkäisyyden perusteella, kun mittauksia on suoritettu sekä validoitavalla menetelmällä että referenssimenetelmällä. Mittaustulos voidaan tulkita virhepositiiviseksi silloin, jos menetelmällä on saatu positiivinen tulos, vaikka referenssimateriaalilla

teriaali / siirrostettu näyte ei sisällä tutkittavaa mikrobia. Virhenegatiivinen tulos voidaan saada silloin, kun menetelmä antaa negatiivisen tuloksen, vaikka näyte sisältääkin tutkittavaa mikrobia. /13, s.7/

4.3.2 Täsmällisyys

Täsmällisyys on yleistermi testien väliselle vaihtelevuudelle, mitä kuvaavat toistettavuus ja uusittavuus. Vanhoina termeinä tunnetut ovat toistotarkkuus sekä täsmällisyys. /7, s.17/ Mikrobiologiassa analyysien täsmällisyyteen vaikuttaa suuresti tutkitavan näytteen mikrobipitoisuus eli mitä pienempi pitoisuus, sen epävarmempi tulos on. Toistettavuutta kuvaa peräkkäisten toistojen antamien tulosten lähekkäisyys, kun tutkitaan identtisiä näytteitä samalla menetelmällä samoissa olosuhteissa ja samojen henkilöiden toimesta. Uusittavuus saadaan yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyyksiä arvioimalla, kun identtisiä näytteitä ovat tutkineet eri henkilöt samoja menetelmiä käyttäen samassa tai eri laboratoriossa. /13, s.7/

4.3.3 Toteamisraja

Toteamisraja on mikrobiologiassa pienin mahdollinen mikrobipitoisuus, mikä voidaan luotettavasti menetelmällä todeta. Tähän vaikuttavat menetelmän selektiivisyys, mikrobin ”tila” näytteessä sekä itse näytematriisi taustamikrobeineen. Toteamisraja määritetään erikseen jokaiselle tutkittavalle matriisille ja se on määritettävissä vain kvalitatiivisille menetelmille. Menetelmän toteamisrajaa määritettäessä mahdollisena referenssimateriaalin tai siirrostetun näytteen mikrobipitoisuutena voidaan pitää yleensä viisi solua / tutkittava näytemäärä. /13, s.7-8/

4.3.4 Määrittysraja

Määrittysraja on pienin saatava mikrobipitoisuus, joka voidaan kvantitatiivisesti määrittää validoitavalla menetelmällä. Määrittysrajaa ei siis käytetä kvalitatiivisissa menetelmissä. Nestemäisille näytteille määrittysraja yleensä on < 1 pmy/ml maljavalutekniikalla ja < 10 pmy/ml pintaviljelytekniikalla. Kiinteillä näytteillä määrittysraja on yleensä maljavaluna < 10 pmy/g ja pintaviljelynä < 100 pmy/g. Määrittysrajaan vaikuttavat myös samat seikat kuin toteamisrajankin eli menetelmän selektiivisyys, spesifisyys, näytteessä olevien mikrobeiden ”tila” sekä näytematriisin taustakasvu. /13, s.8/

4.3.5 Spesifisyys ja herkkyys

Spesifisyyttä käytetään sekä kvantitatiivisten että kvalitatiivisten menetelmien yhteydessä tarkoittamaan kykyä löytää tutkittava mikrobi / mikrobit näytteessä olevien häiritsevien tekijöiden vaikutuksesta huolimatta. Menetelmä, joka toteaa vain analysoitavan mikrobin / mikrobiston, on täysin spesifinen, mutta käytännössä mikrobiologiassa se ei ole mahdollista. Menetelmän validointiprosessissa on opittava tunnistamaan tyypilliset pesäkkeet häiritsevän mikrobikasvun joukosta varmistustestien avulla. /13, s.8/

Herkkyys kertoo menetelmän kyvystä todeta vähäisetkin vaihtelut mikrobipitoisuuksissa. Herkkyyden avulla voidaan verrata eri menetelmiä toisiinsa ja se on tärkeä ominaisuus täydellistä validointia tehtäessä uudelle kehitteellä olevalle menetelmälle. Kvalitatiivisen menetelmän herkkyys voidaan antaa menetelmällä saatujen positiivisten tulosten prosenttiosuutena. /13, s.8/

4.3.6 Lineaarisuus

Lineaarisuuden avulla saadaan kuva kvantitatiivisten menetelmien kyvystä antaa tuloksia, jotka ovat suoraan verrannollisia näytteen mikrobipitoisuuteen. Muutos mikrobipitoisuudessa saa aikaan suhteessa yhtä suuren muutoksen tuloksissa.

Mikrobiologiassa voidaan pitää pesäkelaskennan ylärajana muutamaa sataa pesäkettä maljaa kohti. Näytteestä valmistetaan laimennossarja halutulle laskenta-alueelle. Menetelmässä useimmiten annetaan laskenta-alue, joka kertoo pienimmän ja suurimman pesäkemäärän, joiden perusteella tulos voidaan ilmoittaa luotettavasti. Menetelmän validoinnin yhteydessä tulisi selvittää, pystyykö laboratorio suorittamaan pesäkelaskennan menetelmän antamissa rajoissa (pesäkelaskentatarkkuus). Käytännön työssä tulos joudutaan usein antamaan pesäkemäärien perusteella, jotka sijoittuvat laskenta-alueen ulkopuolelle, jolloin tulos esitetään arvioina. /13, s.8/

4.4 Mikrobiologisen menetelmän validoinnin suoritus

On kyseessä sitten standardimenetelmän, kansainvälisen menetelmäkokoelman tai virallisen menetelmän validointi, matriisin valinta on tärkeä osa prosessia. Toinen huomion tärkeä seikka on tutkittavien mikrobien ja niiden pitoisuuksien valinta. Menetelmämuunnosten ollessa validoinnin kohteena, on osattava ratkaista se, kuinka laaja validointiprosessin tulee olla. Validoitavia kohteita menetelmämuunnoksissa voivat olla esimerkiksi lämpötilojen, viljelyolosuhteiden, elatusaineen tai varmistustestien muutokset. Biokemiallisen testisarjan korvaaminen kaupallisella testikitillä ei kuitenkaan välttämättä edellytä validointia, jos testin käyttö on hallinnassa. /13, s.9/

4.4.1 Matriisiin, mikrobien ja pitoisuuksien valinta

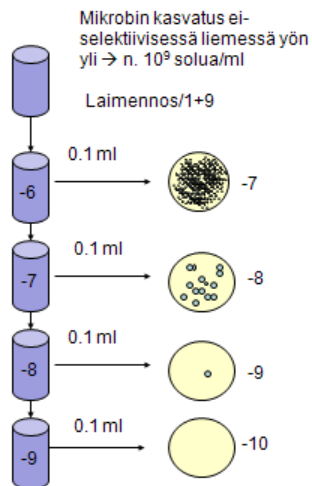
Matriisiin valinnassa on tärkeää huomioida laboratorion tutkimustarpeet ja suosituksena on pidetty vähintään kolmen elintarvikeryhmän matriisien käyttämistä, kun menetelmän käyttöalueena ovat elintarvikkeet. Näytetyypit valitaan sen mukaisesti, mitä laboratoriossa yleisimmin menetelmällä aiotaan analysoida. Mikrobeina tulisi ensisijaisesti käyttää referenssimateriaaleja, joiden mikrobit ja niiden pitoisuus tunnetaan, mutta laboratorio voi myös itse valmistaa tunnetuista bakteerikannoista mikrobisuspension. Referenssimateriaaleissa on yleensä joko yhtä tai useampaa mikrobikantaa ja välttämättä häiritsevää mikrobistoa ei ole tarve lisätä, jos näytteessä luonnostaan kasvaa sellaisia. /13, s.9;/ /1/ Varmennetulle vertailumateriaalille vertailumateriaalin tuottaja antaa kirjallisen todistuksen sen sisältämästä mikrobistosta ja niiden pitoisuuksista /7, s.34/

Kvalitatiivista menetelmää validoitaessa käytetään yleensä kahta eri mikrobipitoisuutta. Toinen mikrobipitoisuuksista on hyvin lähellä menetelmän toteamisrajaa ja toisen pitoisuuksista tulisi olla noin kymmenkertainen siihen nähden. Jos toteamisraja ei ole tiedossa, tulee se selvittää siirrostamalla eri mikrobipitoisuuksia matriiseihin. Kvantitatiivisilla menetelmillä pitoisuusluokat ovat erilaisia. Kvantitatiivisia ja kvalitatiivisia menetelmiä validoitaessa tulee tutkimussarjoissa aina olla mukana myös siirrostamattomat näytteet eli nollanäytteet. /13, s.10/

4.4.2 Mikrobisuspension valmistus ja mikrobipitoisuuden määrittäminen

Siirroksen valmistuksessa lähdetään liikkeelle puhtaaksiviljelemällä hajotusviljelynä tutkittavaa mikrobilajia veriagarille tai muulle ei-selektiiviselle agarille ja inkuboidaan sitä optimilämpötilassa mikrobikannalle sopiva aika. Suurin osa bakteerikannoista voidaan inkuboida +37°C:ssa vuorokausi. Inkuboinnin jälkeen puhtaaksiviljeltyä bakteerikansaa siirrostetaan tryptoni-soijaliemeen (TSB) tai muuhun ei-selektiiviseen, mikrobikannalle sopivaan kasvatusliemeen ja inkuboidaan vuorokausi

+37°C:ssa, jolloin mikrobiitiheydeksi saadaan 10^8 - 10^9 solua/ml. Kasvatusliemen mikrobiitiheys inkuboinnin jälkeen saadaan määritettyä valmistamalla laimennossarja 10^9 asti kuvion 1 mukaisesti. /13, LIITE 1 (3/4)/; /1/

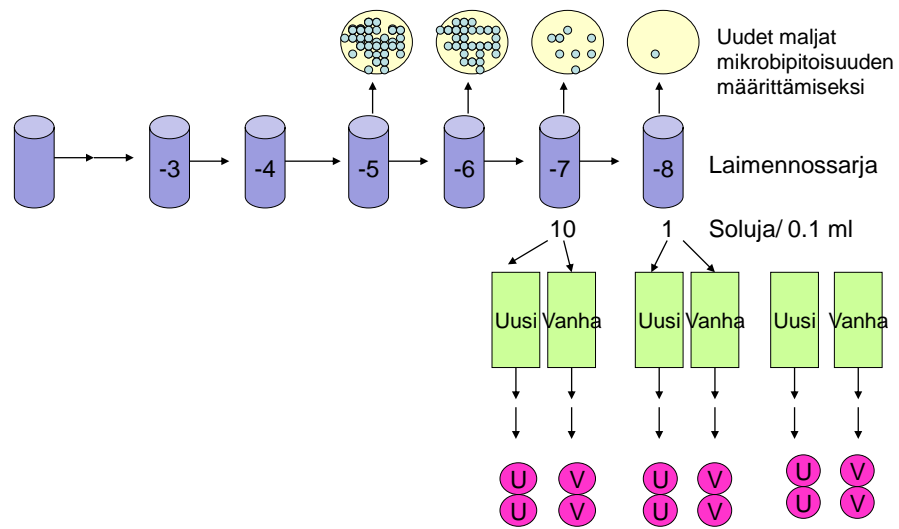


KUVIO 1. Laimennossarjan tekeminen ja mikrobipitoisuuden määrittäminen. /1, muokattu/

Laimennoksista 10^{-6} - 10^{-9} tehdään pintaviljely ei-selektiivisille maljoille mikrobilukumäärän selvittämiseksi. Tämän avulla voidaan tehdä laskelmat, mistä laimennoksesta tulisi mikrobisiirrosta lisätä validoitaviin näytteisiin.

4.4.3 Siirrostetun näytteen valmistus

Näytematriisit punnitaan stomacher-pusseihin tai muihin vastaaviin näyteastioihin. Mikrobiitiheysmäärittystulosten ja niistä tehtyjen laskelmien perusteella siirrostetaan sopiva määrä mikrobiviljelmää matriiseihin kuvion 2 mukaisesti. Siirroksen annetaan imeytyä matriisiin muutaman minuutin ajan ja tämän jälkeen näytteet homogenisoidaan huolellisesti ja tutkitaan validoitavan menetelmän mukaisesti.



KUVIO 2. Siirrostus matriiseihin, kvalitatiivinen menetelmä. /1, muokattu/

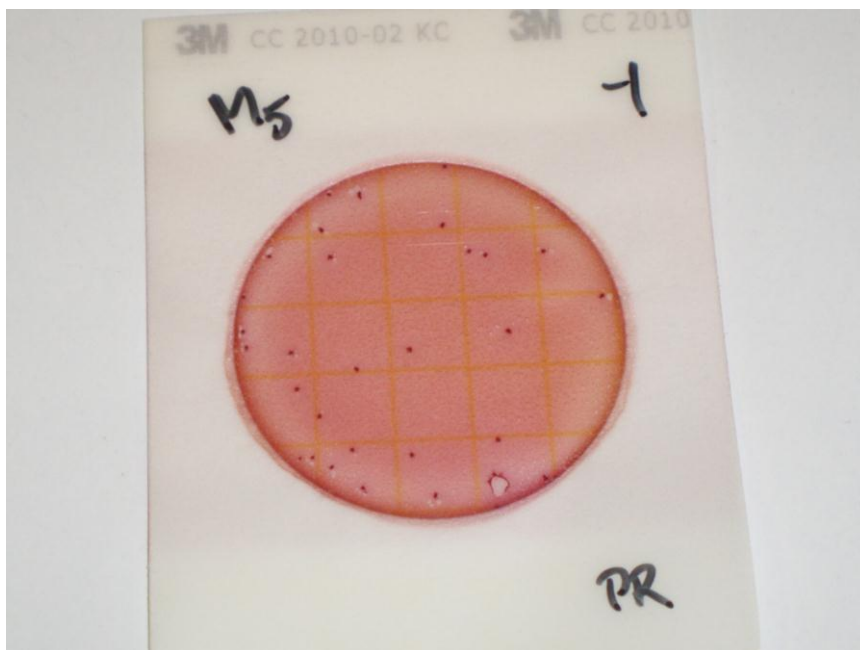
5 VALIDOINNIN SUORITUS

5.1 Validoitavat menetelmät

Validoitavina menetelminä olivat Kolimuotoisten bakteerien määrittäminen elintarvikkeista laboratorion sisäisellä menetelmällä sekä *Enterobacteriaceae*:n määrittäminen elintarvikkeista NMKL:n Nro.144: 2005-menetelmällä.

5.1.1 Kolimuotoisten bakteerien määrittäminen

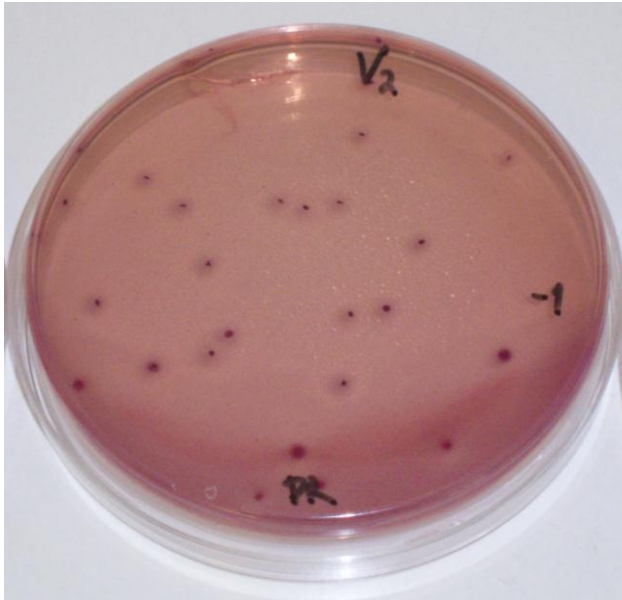
Kolimuotoisten bakteerien määrittämiseen käytetty sisäinen menetelmä pohjautuu suurelta osin NMKL:n Nro. 44: 2004-menetelmään Kolityyppisten bakteerien määrittäminen elintarvikkeista ja rehuista, mutta suurimpana eroavaisuutena on se, ettei viljely tapahdu perinteisellä maljavalutekniikalla vaan petrifilmillä (Petrifilm™ Coliform Count Plate), jossa agar on olemassa valmiina ohuena kerroksena ja jonka päälle näytettä pipetoidaan. Menetelmällä haetaan kolityyppisiä bakteereja, jotka muodostavat tyypillisiä pesäkkeitä kasvaessaan VRB-agarilla (Violet Red Bile agar) 37°C:ssa 24 tunnin kuluessa. Petrifilm™ Coliform Count Plate-petrifilmi sisältää VRB-agarin, hyytelöimisaineen, glukuronidaasi- ja tetrazolium-indikaattorin, joka helpottaa pesäkkeiden lukemista. Koliformipesäkkeet värjäytyvät vaaleanpunaisella alustalla punaisiksi (KUVA 1.). Kaasua tuottavat lajikkeet pystytään identifioimaan näkyvien kaasukuplien avulla.



KUVA 1. Punaisia koliformisia pesäkkeitä petrifilmillä.

5.1.2 Enterobakteerien määrittäminen

NMKL:n Nro.144: 2005 menetelmällä haetaan Enterobacteriaceae-heimoon kuuluvia bakteereja, jotka muodostavat vaaleanpunaisesta punaiseen olevia pesäkkeitä VRBG-agarilla (Violet-Red-Bile-Glucose agar) $37\pm 1^{\circ}\text{C}$:ssa 22-26 tunnissa (KUVA 2.). Viljely suoritetaan perinteisellä maljavalutekniikalla, jossa pipetoidun näytteen päälle kaadetaan paksumpi agar-kerros ja tämän jähmetyttyä päälle valetaan vielä ohut kerros samaa VRBG-agaria. Pesäkkeet varmistetaan Enterobacteriaceae-heimoon kuuluviksi oksidaasitestillä puhtasviljelmämaljalta. Tulos pyritään saamaan maljoilta, joilla kasvaa 15-150 pesäkettä.



KUVA 2. Enterobakteereja VRBG-agarmaljalla.

5.2 Kasvatusalustat ja reagenssit

Laboratoriotyöskentelyssä on tärkeää, että käytössä olevat elatusaineet toimivat asianmukaisella tavalla. Määrityksissä saatavien tulosten luotettavuus on oleellisesti riippuvainen käytettyjen elatusaineiden laadusta. Myös laadunvarmistukseen tulee kiinnittää riittävästi huomiota valmistettaessa ja käytettäessä kasvatusalustoja ja rikastusliemiä. Kasvatusalustat ja -liemet voidaan tilata valmiina agar-maljoina, agar-pulloina, liuoksina tai myös petrifilmeinä, mutta usein miten ne tilataan kuitenkin elatusjauhepurkkeina, jolloin elatusalusta valmistetaan laboratoriossa. Tärkeää elatusaineiden laadun kannalta on myös hankkia ne luotettavilta toimittajilta, jolloin tilauksen mukana saadaan asianmukaiset laatusertifikaatit. Maljojen ja liuosten valmistuksen yhteydessä niiden oikea pH, ulkonäkö ja maljojen paksuus tarkastetaan sekä lopullisen tuotteen laatu varmistetaan steriilisyys- ja toimivuustestein elatusainetyypille sopivissa olosuhteissa. Ennen uuden elatusaineen käyttöönottoa laboratoriossa tulee elatusaineen toimivuus validoida riittävän laajasti. /2, s.8/

Validoitavissa menetelmissä käytettävät elatusaineet ja reagenssit sekä näiden valmistajat ovat lueteltuna taulukossa 2. Menetelmän validointiin tarvittiin lisäksi Plate Count-agar-maljoja (PCA, LABEMA), Brain Heart Infusion Broth Media (BHI, LABEMA).

TAULUKKO 2. Menetelmien elatusaineet, reagenssit ja valmistajat.

Elatusaine / Reagenssi	Valmistaja
Maximum Recovery Diluent (Peptoni-suolaliuos) LAB103	LAB M ltd.
V.R.B.G. AGAR 200 ML, PULLO 300ML, KIERREKORKKI	bioTRADING
3M™ PETRIFILM™ COLIFORM COUNT PLATES	3M Microbiology
PYO-TEST (OKSIDAASITESTI)	Medical Wire & Equipment

5.3 Työn suoritus

Työssä lähdettiin liikkeelle petrifilmin toimintaperiaatteeseen tutustumalla, koska se erosi perinteisestä maljavalutekniikasta jonkin verran. Itse menetelmien validointiprosesseissa aloitettiin matriisien valinnalla ja validointisuunnitelman teolla. Näytematriiseiksi valittiin Saarioisten säilyke oy:n (SSOY) banaanivalmiste, Saarioisten kirkas perunasalaatti ja Farmimunanan kananmunamassa. Työt suoritettiin kahdessa eri osassa, joita käsitellään jatkossa nimillä Projekti I ja Projekti II.

5.3.1 Bakterisuspension valmistus

Positiivisena bakterikantana validoinneissa päätettiin käyttää *Escherichia coli*-kantaa ATCC 51813, joka on enterobakteereihin kuuluva koliforminen ja oksidaasinegatiivinen bakteeri. Häiritsevänä negatiivisena bakterikantana käytettiin *Pseudomonas aeruginosa*-kantaa ATCC 9027, joka on oksidaasipositiivinen bakteeri. Bakterisuspensiot valmistettiin siirrostamalla 1 µl:n viljelysilmukalliset kumpainkin bakterimassaa PCA-maljoilta (Plate Count Agar, LABEMA) 10 ml:aan BHI(Brain Heart Infusion Broth, LABEMA)-elatusainelientä ja inkuboimalla BHI-liemiputkia +37°C:ssa 22h.

5.3.2 Siirroksen mikrobipitoisuuden määrittäminen

Siirrostetuissa ja vuorokauden inkuboiduissa BHI-liemiputkissa voitiin olettaa esitutkimusten perusteella mikrobiitiheyden olevan 10^8 - 10^9 pmy/ml. Bakteerisuspensioista valmistettiin laimennossarjat tarkan mikrobipitoisuuden määrittämiseksi ja sopivan solupitoisuuden saamiseksi näytteisiin siirrostamista varten. Laimennossarjat valmistettiin peptonisuolaliuosputkiin (Maximum Recovery Diluent, LABEMA) 1ml + 9ml (1:9) 10^{-1} - 10^{-9} . Laimennosputkista 10^{-6} ja 10^{-7} viljeltiin 0,1ml rinnakkaisille PCA-maljoille (10^{-7} ja 10^{-8}), joita inkuboitiiin $+37^\circ\text{C}$:ssa 24h.

BHI-liemiputkien mikrobipitoisuudet saatiin selville laskemalla seuraavana päivänä pesäkkeet PCA-maljoilta. Taulukoissa 3 ja 4 on esitetty mikrobilukumäärät laimennoksissa.

TAULUKKO 3. Mikrobimäärät PCA-maljoilla, Projekti I.

	E.coli (PCA)	P.aeruginosa (PCA)
10^{-8}	20 / 16	7 / 6
10^{-7}	143 / 149	71 / 76
Tulos (painotettukeskiarvo)	1'490'000'000 solua/ml BHI	730'000'000 solua/ml BHI

E.coli

→ 10^{-5} = 14 900 solua / ml

→ 10^{-5} = 5960 solua / 0,4 ml

P.aeruginosa

→ 10^{-5} = 7300 solua / ml

→ 10^{-4} = 73 000 solua / ml

→ 10^{-4} = 29 200 solua / 0,4 ml

TAULUKKO 4. Mikrobipitoisuudet PCA-maljalla, Projekti II.

	E.coli (PCA)	P.aeruginosa (PCA)
10^{-8}	16	14
10^{-7}	131	68
Tulos (painotettukeskiarvo)	1'340'000'000 solua/ml BHI	745'000'000 solua/ml BHI

E.coli

→ 10^{-5} = 13 100 solua / ml

→ 10^{-5} = 2620 solua / 0,2 ml

P.aeruginosa

→ 10^{-5} = 7450 solua / ml

→ 10^{-4} = 74 500 solua / ml

→ 10^{-4} = 29 800 solua / 0,4 ml

5.3.3 Näytteiden lähtötilanteen mikrobipitoisuuden määrittäminen

Validointiprojektiin valitut näytteet tutkittiin validoitavilla menetelmillä ilman bakteerisuspensiolisäyksiä näytteiden lähtötilanteen mikrobipitoisuuden määrittämiseksi. Lisäksi näytteistä määritettiin kokonaisbakteeripitoisuus. Saadut alkutilatulokset ovat esitettynä alla olevassa taulukossa 5.

TAULUKKO 5. Näytteiden mikrobipitoisuudet lähtötilanteessa, pmy/g.

	Valmiste	Perunasalaatti	Munamassa
Enterobakteerit (NMKL144:2005)	<10 pmy/g	<10 pmy/g	<10 pmy/g
Koliformisetbakteerit (sisäinen menetelmä)	<10 pmy/g	<10 pmy/g	<10 pmy/g
Aerobiset mikro-organismit (NMKL86:2006, 4. painos)	<10 pmy/g	1300 pmy/g	260 pmy/g

5.3.4 Siirrostettujen näytteiden valmistus ja tutkiminen

Näytematriiseiksi valittuja tuotteita (valmiste, perunasalaatti ja munamassa) punnittiin Projekteissa I ja II noin 10 g ja laimennettiin suhteessa 1:9 peptonisuolaliuokseen, jonka jälkeen näytteet homogenoitiin. Laimennettuihin ja homogenoituihin näytteisiin lisättiin tutkittavaa ja häiritsevää mikrobikantaa aktiivisina viljelminä.

Projektissa I näytteisiin siirrostettiin E.coli-bakteerisuspensiota 0,4 ml:a laimennosputkesta 10^{-5} ja häiritsevää P.aeruginosa-bakteerisuspensiota arviolta 10-kertainen määrä 0,4 ml:a 10^{-4} -putkesta. Projektissa II näytteisiin siirrostettiin E.coli-kantaa 0,2 ml:a laimennosputkesta 10^{-5} ja P.aeruginosa-bakteerisuspension määrä pidettiin ennallaan eli 0,4 ml:a putkesta 10^{-4} . Näytteet sekoitettiin huolellisesti ja viljeltiin laimennoksien 10^{-1} ja 10^{-2} koliformisten tutkimista varten petrifilmeille sekä enterobakteereja varten maljavaluna. Petrifilmit inkuboitettiin vaakasuorassa kirkaspuoli ylöspäin ja VRBG-maljoja inkuboitettiin agarpuoli ylöspäin $37\pm 1^{\circ}\text{C}$:ssa $24\pm 2\text{h}$ (NMKL nro 144, 3.painos 2005).

Näytteiden teoreettisesti lasketut mikrobitulokset Projekteista I ja II ovat esitettynä alla olevissa taulukoissa 6 ja 7.

TAULUKKO 6. Näytteiden teoreettiset bakteeripitoisuudet, Projekti I.

	Punnittu näytemäärä	1:9 laimennos (10^{-1})	E.coli pitoisuus 10^{-1}	E.coli pitoisuus 10^{-2}	P.aerug. pitoisuus 10^1	P.aerug. pitoisuus 10^2
Valmiste	10,63 g	106,3 ml	56	6	275	28
Perunasalaatti	10,90 g	109,0 ml	55	6	268	27
Kananmunamassa	10,81 g	108,1 ml	55	6	270	27

Näytteiden teoreettiset E.coli-pitoisuudet tulisi olla 550–560 pmy / g.

TAULUKKO 7. Näytteiden teoreettiset bakteeripitoisuudet, Projekti II.

	Punnittu näytemäärä	1:9 laimennos (10^{-1})	E.coli pitoisuus 10^{-1}	P.aerug. pitoisuus 10^{-1}
Valmiste	10,00 g	100,0 ml	26	298
Perunasalaatti	10,00 g	100,0 ml	26	298
Kananmunamassa	10,00 g	100,0 ml	26	298

Näytteiden teoreettiset E.coli-pitoisuudet tulisi olla 260 pmy / g.

6 TULOKSET

Työssä käytetyillä kahdella eri menetelmällä, Enterobakteerien määrittäminen NMKL 144:2005-menetelmällä ja Koliformisten bakteerien määrittäminen petrifilmillä (Petrifilm™ Coliform Count Plate), saatiin yhteneväiset tulokset keskenään. Koliformisten bakteerien lukumääräksi projektissa I saatiin metsämarjavalmisteen 426 pmy/g, kirkkaalle perunasalaatille 365 pmy/g ja kananmunamassalle 527 pmy/g sekä projektissa II metsämarjavalmisteen 250 pmy/g, perunasalaatille 258 pmy/g ja kananmunamassalle 323 pmy/g. Enterobakteeripitoisuuksiksi saatiin metsämarjavalmisteen 513 pmy/g, perunasalaatissa 445 pmy/g ja kananmunamassassa 470 pmy/g projektissa I sekä projektissa II saatiin valmisteen 278 pmy/g, perunasalaatille 260 pmy/g ja kananmunamassalle 308 pmy/g. Tulokset ovat esitetty alla olevissa taulukoissa 8.-11. Tulokset ovat keskiarvoja näytesarjoista saaduista tuloksista, jotka löytyvät liitteistä 1-4.

TAULUKKO 8. Koliformisten bakteerien tulokset projektissa I.

Koliformit I	Taru	Pirjo	Susanna	k.-a
Valmiste	408	460	408	425,6
Perunasalaatti	428	375	292	365,0
Munamassa	565	503	513	527,2

TAULUKKO 9. Enterobakteerien tulokset projektissa I.

Enterot I	Taru	Pirjo	Susanna	k.-a
Valmiste	480	508	552	513,3
Perunasalaatti	485	450	400	445,0
Munamaassa	425	513	472	470,0

TAULUKKO 10. Koliformisten bakteereiden tulokset projektissa II.

Koliformit II	Taru	Pirjo	Susanna	k.-a
Valmiste	282	176	293	250,4
Perunasalaatti	243	248	283	258,3
Munamaassa	311	329	329	323,1

TAULUKKO 11. Enterobakteerien tulokset projektissa II.

Enterot II	Taru	Pirjo	Susanna	k.-a
Valmiste	263	315	257	278,4
Perunasalaatti	301	192	288	260,2
Munamassa	303	295	325	307,8

6.1 Uusittavuus

Uusittavuuden arvioimiseksi molemmat laborantit ja mikrobiologi suorittivat määritykset itsenäisesti. Satalab Oy:ssä tarkkaillaan uusittavuutta säännöllisesti ja työohjeen mukaisesti tulosten ero saa olla maksimissaan 0,2 logaritmista yksikköä. Raja-arvo on mikrobiologin määrittelemä hyväksyttävä ero tässä laboratorioissa. Hyväksyttäviin rajoihin päästiin myös tässä validoinnissa.

6.2 Toistettavuus

Menetelmän toistettavuutta arvioitiin tekemällä analyysit kolmella erilaisella tuotteella, joista tehtiin projektissa I 6 kpl (-1) ja 6 kpl (-2) alustaa/näyte ja projektissa II 15 kpl alustaa/näyte sekä molemmissa projekteissa yksi henkilö pipetoi 10 rinnakkaisen maljan sarjan. Hiukkastilastollinen hajonta oli kaikissa näytteissä 8-11 % sekä koliformisten petrifilmillä että VRBG-maljoilla määritettynä (laimennos -1). Toistettussa pesäkelaskennassa ero (rv) saa olla enintään 7 % ja eri laboranttien välillä enintään 18 %. Tähän päästiin hienosti. Laimennoksella -2 tehdyissä maljoissa laskettavien pesäkkeiden lukumäärä oli niin pieni, että rv oli 0 ja laborantit yksimielisiä. Toisaalta näissä taas hiukkastilastollinen hajonta oli 25-50 %.

Lukemaepävarmuus oli enterobakteereilla ensimmäisessä projektissa 5,0 % ja toisessa 2,9 % kun taas koliformeilla ne olivat 3,2 % ja 3,1 % vastaavasti. Lukemaepävarmuudessa on sekä -1 että -2 laimennoksilta luetut maljat. Siirrostilavuuden epävarmuus on Satalabissa määritetty 1ml:lle 0,35 % ja laimennuskertoimelle 0,38 %. Yhdistetty epävarmuus voitiin laskea kaavan 1 avulla, jolloin koliformien määrittelykselle

saatiin mittausepävarmuudeksi 17,2 % ja enterobakteerien määrittelykselle 17,6 %. Taulukossa 12 on esitetty laskennassa käytetyt lukuarvot.

$$u_y \% = \sqrt{\frac{10000}{Z} + u_z^2 + f * u_f^2 + u_v^2} \quad (1)$$

u_y % = yhdistetyn mittausepävarmuuden arvo prosenteissa

Z = pesäkeluku

u_z = lukemaepävarmuus

f = laimennoskerroin

u_f = laimennoskerroimen mittausepävarmuus

u_v = siirrostilavuuden mittausepävarmuus

TAULUKKO 12. Yhdistetyn mittausepävarmuuden arvot.

Menetelmässä käytetty elatusaine	Pesäkeluku	Laboratorio kohtainen lukema-epävarmuus	Laimennuskerroin -1	Laimennuskertoimen epävarmuus	Siirrostilavuuden epävarmuus	Yhdistetty epävarmuus %
Petrifilmi koliformit	35	3,2	1	0,38	0,35	17,22
VRBG	35	5	1	0,38	0,35	17,64

Kahden peräkkäisen laimennoksen rinnakkaismaljojen pesäkeluvun epävarmuus on esimerkinomaisesti seuraavaa:

Näytteen tekijä: Taru, Materiaali: Kirkas perunasalaatti

Laimennus -1 Pesäkkeet 49 kpl ja 49 kpl (Liite 3: 3/8)

Laimennus -2 Pesäkkeet 5 kpl ja 3 kpl (Liite 3: 4/8)

Suhteellinen epävarmuus on $\sqrt{\frac{1}{(49+49+5+3)}}$ eli 0,097 eli 9,7 %, mikä on näin pienillä pesäkeluvuilla erinomainen saavutus.

6.3 Lineaarisuus

Lineaarisuus kertoo kvantitatiivisen menetelmän kyvystä antaa suoraan verrannollisia tuloksia riippuen näytteen mikrobipitoisuudesta. Menetelmän lineaarisuus voidaan todeta lisäämällä tutkittavaan näytteeseen kahta tai useampaa eri pitoisuutta määritettävää mikrobia. Lisätyn mikrobipitoisuuden muutoksen tulisi saada aikaan yhtä suuri muutos tuloksissa. Koliformisten bakteerien ja enterobakteerien tutkimiseen validoitavissa menetelmissä käytettiin kahta eri pitoisuutta, joista toinen oli kaksinkertainen toiseen verrattuna. Pitoisuudet olivat pieniä, mutta toisaalta eivät liian pieniä, jotta tyhjäksi jääviä maljoja (< 1 pesäke) ei muodostunut. Molemmat menetelmät voitiin tulosten perusteella todeta lineaarisiksi.

6.4 Spesifisyys

Alustojen spesifisyyttä arvioitiin materiaaleihin lisätyn häiritsevän mikrobikannan avulla. Koliformisten bakteerien määrittämiseen käytettävä Petrifilmi kasvattaa koliformit punaisiksi pesäkkeiksi, joiden yhteydessä havaitaan kaasukupla. Häiritseväksi kasvuksi lisätty *P.aeruginosa* kasvaa Petrifilmillä epätyypillisinä pesäkkeinä valmistajan antaman tuoteselosteen mukaan. Petrifilmeissä havaittiin haaleita punaisia epätyypillisennäköisiä pesäkkeitä ilman kaasukuplaa. Näiden epätyypillisten pesäkkeiden voitiin olettaa olevan lisättyä *P.aeruginosa*-bakteerikantaa, koska näytteiden lähtömikrobitasot osoittivat, ettei näytematriiseissa kasvanut luonnostaan koliformisia bakteereja eikä epätyypillisenkään näköistä bakteerikasvua. Epätyypillisen näköiset *P.aeruginosa* pesäkkeet olivat kuitenkin helposti erotettavissa tyypillisistä koliformisista pesäkkeistä eikä niitä voida sekoittaa normaaleissa koliformisten bakteerien määrittämistä tilanteissa toisiinsa. Menetelmä ja Petrifilmi-alusta voidaan todeta riittävän spesifiseksi koliformisten bakteerien tutkimiseen.

VRBG-alustalla *P.aeruginosa*-pesäkkeet havaittiin epätyypillisenä kasvuna, hyvin pieninä pesäkkeinä muistuttavina pisteinä, joita hädin tuskin pystyi silmällä erottamaan

ja laskemaan. Muutamalta maljalta *P.aeruginosa*-bakteerikannaksi oletetut pesäkkeet laskettiin ja voitiin huomata tulosten samansuuntaisuus lisätyn *P.aeruginosa*-bakteeri-määrän kanssa. Tulokset olivat kuitenkin jonkin verran pienemmät kuin lisätyt määrät, joten tässä kohtaa alustan selektiivisyys ja menetelmän spesifisyys tulevat ilmi hyvin. Valmisteen antamat huomattavasti pienemmät *P.aeruginosa*-tulokset saattoivat johtua mahdollisesti valmisteen happamuudesta, joka lisäksi selektoi *P.aeruginosa* kasvua VRBG-maljalla. Häiritsevän *P.aeruginosa*-kasvun määrää ei petrifilmeiltä laskettu, sillä pieniä pesäkkeitä oli kymmeniä ja ne olivat osittain tyyppillisen koliformisen kasvuston alla.

VRBG-maljoilta tehtiin enterobakteerien varmistamiseen tarkoitetut oksidaasitestaukset sekä tyyppillisille pesäkkeille että epätyypillisille pesäkkeille ja voitiin todeta seuraavaa: Tyyppilliset varmistuksiin valitut pesäkkeet antoivat enterobakteereille ominaisen oksidaasinegatiivisen tuloksen, kun taas epätyypillisen näköiset *P.aeruginosaksi* epäillyt pesäkkeen tapaiset antoivat *P.aeruginosalle* ominaisen oksidaasipositiivisen tuloksen. Menetelmä ja määrittämiseen käytettävä selektiivinen VRBG-alusta voidaan todeta spesifiseksi, koska häiritsevä kasvu pystytään erinomaisesti erottamaan tyyppillisistä *enterobakteeriaceae*:seen kuuluvista bakteereista ja lopulliset varmistukset kuitenkin tehdään oksidaasitestauksen avulla.

Petrifilmeille tarkoitettua erillistä bakteerien varmistustestiä ei ole. Kaasun muodostuksesta voidaan havaita koliformiset bakteerit aivan kuten käytettäessä menetelmän NMKL 44 mukaista VRB-alustaa, jolloin pesäkkeet varmistetaan durhan-kaasuputkilla varustetuin Briljanttivihreä-sappi-laktoosi-liemiputkin.

7 PÄÄTELMÄT

Validointiprojektit I ja II onnistuivat hyvin. *E.coli*-bakteerisuspensiota siirrostettiin näytteisiin siten, että projektissa I saatiin kaksinkertainen määrä projektiin II nähden. Eroa tuloksiin saatiin eriävällä pipetointi määrällä (projektissa I 0,4ml ja projektissa II 0,2 ml). Jälkimmäisestä projektista saatiin siis puolet pienempiä tuloksia puolet pienemmän pipetointi tilavuuden mukaisesti ottaen huomioon tietenkin alkuperäisten bakteerisuspensioiden pitoisuudet. Jos projekteissa olisi käytetty kymmenkertaista eroavaisuutta toisiinsa nähden, hiukkastilastollinen hajonta olisi käynyt liian suureksi pienten pesäkemäärien vuoksi, mitä ilmeni jo projekti I:n laimennos 10^{-2} :n tuloksissa. Menetelmien lineaarisuudet on kuitenkin hyvin nähtävissä saaduissa tuloksissa. Pientä pitoisuutta haluttiin käyttää validoinnissa sen vuoksi, että enterobakteerien ja koliformien pitoisuudet erilaisissa valmisteissa ja kypsennetyissä tuotteissa ovat tyyppillisesti pieniä valtaosassa laboratoriossa tutkittavista näytteistä.

Laboranttien ja mikrobiologin tulokset molempien projektien ja menetelmien osalta olivat yhteneväisiä, jonka ansiosta uusittavuus oli hyvä, kuin myös oli pesäkkeiden laskentatarkkuus. Hiukkastilastollisen hajonnan perusteella menetelmän tarkkuus on $\pm 10\%$, mikä on myös hyvä tulos. Näillä samoilla Kolimuotoiset bakteerit elintarvikkeissa-menetelmällä (sisäinen menetelmä) ja Enterobacteriaceae-menetelmällä (NMKL 144:2005) on osallistuttu interkalibrointeihin jo vuosia ja saadut tulokset ovat olleet hyviä. Interkalibroinneista saatujen z-arvojen, joka osoittaa keskimääräistä oikeellisuutta, ääripäät ovat olleet suunnilleen -1,0 ja +0,5, mutta pääosin tulokset ovat olleet lähellä nollaa. Molempien menetelmien voidaan siis katsoa toimivan ja antavan oikeita tuloksia.

LÄHTEET

1. Adamson, R. 2009. Mikrobiologisten menetelmien validointi. Esitelmä. Mikrobiologisten menetelmien validointi-koulutus 21.4.2009. Pirkanmaan Laboratorioyhdistys ry-PirLab. Pirkanmaan ammattiopisto PIRKO. Tampere.
2. Ehder, T. 2006. Mikrobiologian laboratorion elatusaineiden sisäinen laadunvarmistus. Julkaisu J6/2006. Espoo: Mittatekniikan keskus Mikes.
3. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2009. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset, komission asetuksen (EY) 2073/2005 soveltaminen. Eviran ohje 10501/1. Helsinki: Elintarviketurvallisuusvirasto Evira.
4. Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran www-sivut. Viitattu 27.3.2012.
<http://www.evira.fi>
5. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. *Escherichia coli* / EHEC ruokamyrkytysten aiheuttajana. Viitattu 27.2.2014.
<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa+elintarvikkeista/elintarvikkeevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia+aiheuttavia+bakteereja/escherichia+coli/>
6. Hallanvuori, S. & Johansson, T. 2010. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat. Eviran julkaisuja 1/2010. Helsinki: Evira.
7. Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2002. Laboratorion analyysitekniikka. 3.-4. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
8. Mantere-Alhonen, S. ym. 1990. Maidon ja maitovalmisteiden mikrobit. Helsinki: Valtion painatuskeskus.
9. NMKL Menetelmä No. 44, 6.painos 2004. Kolityyppiset bakteerit. Määrittäminen elintarvikkeista ja rehuista.
10. NMKL Menetelmä No. 144, 3.painos 2005. *Enterobacteriaceae*. Määrittäminen elintarvikkeesta.
11. Prescott, L., Harley, J. & Klein, D. 2005. Microbiology. Sixth edition. New York: Mc-Graw-Hill Companies.
12. Salkinoja-Salonen, M. 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
13. Salminen, K. 1997. Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Valvonta 13/1997. Helsinki.
14. Sivelä, C. & Saarinen, T. 1992. Laborantin mikrobiologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Valtion painatuskeskus.

Pesäkelaskennan toistotarkkuuden määrittäminen, Koliformiset bakteerit, Projekti I

Näytteet Valmiste (V), Kirkas perunasalaatti (P), Kananmunamassa (M)

LIITE 1 (1/8)

laimennus-1

Taru Valmiste

	Taru	Pirjo	Susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna 2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	37	35	32	37	36	33	0	-1	-1	37,0	35,5	32,5	0,00	-2,82	-3,08	35	29	41
2	41	41	41	42	41	41	-1	0	0	41,5	41,0	41,0	-2,41	0,00	0,00	41	34	49
3	46	43	39	44	43	41	2	0	-2	45,0	43,0	40,0	4,44	0,00	-5,00	43	35	50
4	41	37	38	42	38	38	-1	-1	0	41,5	37,5	38,0	-2,41	-2,67	0,00	39	32	46
5	39	39	38	41	40	39	-2	-1	-1	40,0	39,5	38,5	-5,00	-2,53	-2,60	39	32	46
6	42	40	37	42	40	39	0	0	-2	42,0	40,0	38,0	0,00	0,00	-5,26	40	33	47
7	49	47	44	48	47	45	1	0	-1	48,5	47,0	44,5	2,06	0,00	-2,25	47	38	55
8	34	33	32	36	33	33	-2	0	-1	35,0	33,0	32,5	-5,71	0,00	-3,08	34	27	40
9	48	49	48	49	48	48	-1	1	0	48,5	48,5	48,0	-2,06	2,06	0,00	48	40	57
10	47	44	44	48	45	44	-1	-1	0	47,5	44,5	44,0	-2,11	-2,25	0,00	45	37	54

	42,4	40,8	39,3
rsd	0,00816		
hiuk.haj.	0,09035		
ka keskih	3,74469		

Tulos kolimuotoisetbakteerit valmisteessa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
424	408	393	408 pmy/g
2,63	2,61	2,59	2,6

laimennus-1

Pirjo Valmiste

	Taru	Pirjo	Susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna 2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	44	45	44	42	44	44	2	1	0	43,0	44,5	44	4,65	2,25	0,00	44	36	52
2	48	46	49	50	47	49	-2	-1	0	49,0	46,5	49	-4,08	-2,15	0,00	48	39	57

	46	45,5	46,5
rsd	0,00725		
hiuk.haj.	0,08513		
ka keskih	2,09762		

Tulos kolimuotoisetbakteerit valmisteessa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
460	455	465	460 pmy/g
2,66	2,66	2,67	2,7

laimennus-1
Susanna Valmiste

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	49	48	49	48	49	49	1	-1	0	48,5	48,5	49	2,06	-2,06	0,00	49	40	58
2	34	33	32	32	33	33	2	0	-1	33,0	33	32,5	6,06	0,00	-3,08	33	27	39

	41,5	40,5	40,5
--	------	------	------

	rsd	0,00816
--	-----	---------

	hiuk.haj.	0,09035
--	-----------	---------

	ka keskih	8,61201
--	-----------	---------

Tulos kolimuotoisetbakteerit valmisteessa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
415	405	405	408 pmy/g
2,62	2,61	2,61	2,6

laimennus-2
Taru Valmiste

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	5	5	5	5	5	5	0	0	0	5,0	5	5	0,00	0,00	0,00	5	4	6
2	7	7	7	7	7	7	0	0	0	7,0	7	7	0,00	0,00	0,00	7	6	8

	6	6	6
--	---	---	---

	rsd	0,05556
--	-----	---------

	hiuk.haj.	0,2357
--	-----------	--------

	ka keskih	1,09545
--	-----------	---------

Tulos kolimuotoisetbakteerit valmisteessa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
600	600	600	600 pmy/g
2,78	2,78	2,78	2,8

laimennus-2
Pirjo valmiste

	Taru	Pirjo	susanna	Taru2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2,0	2	2	0,00	0,00	0,00	2	2	2
2	5	5	5	5	5	5	0	0	0	5,0	5	5	0,00	0,00	0,00	5	4	6

	3,5	3,5	3,5
--	-----	-----	-----

	rsd	0,09524
--	-----	---------

	hiuk.haj.	0,30861
--	-----------	---------

	ka keskih	1,64317
--	-----------	---------

Tulos kolimuotoisetbakteerit valmisteessa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
350	350	350	350 pmy/g
2,54	2,54	2,54	2,5

laimennus-2

Susanna valmiste

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1,0	1	1	0,00	0,00	0,00	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2,0	2	2	0,00	0,00	0,00	2	2	2

1,5 1,5 1,5

rsd 0,22222

hiuk.haj. 0,4714

ka keskih 0,54772

Tulos kolimuotoisetbakteerit valmisteessa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
150	150	150	150 pmy/g
2,18	2,18	2,18	2,2

laimennus-1

Taru Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	34	34	34	35	34	34	-1	0	0	34,5	34	34	-2,90	0,00	0,00	34	28	40
2	54	53	48	55	53	50	-1	0	-2	54,5	53	49	-1,83	0,00	-4,08	52	43	62

44 43,5 41

rsd 0,00778

hiuk.haj. 0,08822

ka keskih 9,8877

Tulos kolimuotoisetbakteerit perunasalaatissa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
440	435	410	428 pmy/g
2,64	2,64	2,61	2,6

laimennus-1

Pirjo Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	37	37	35	37	37	35	0	0	0	37,0	37	35	0,00	0,00	0,00	36	30	43
2	39	39	38	38	39	38	1	0	0	38,5	39	38	2,60	0,00	0,00	39	31	46

38 38 36,5

rsd 0,00889

hiuk.haj. 0,09428

ka keskih 1,51658

Tulos kolimuotoisetbakteerit perunasalaatissa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
380	380	365	375 pmy/g
2,58	2,58	2,56	2,6

laimennus-1

Susanna Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	32	33	33	34	33	33	-2	0	0	33,0	33	33	-6,06	0,00	0,00	33	27	39
2	25	27	25	26	26	25	-1	1	0	25,5	26,5	25	-3,92	3,77	0,00	26	21	30
	28,5	30	29															
	rsd	0,01143																
	hiuk.haj.	0,1069																
	ka keskih	3,92003																

Tulos kolimuotoisetbakteerit perunasalaatissa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
285	300	290	292 pmy/g
2,45	2,48	2,46	2,5

laimennus-2

Taru Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	6	6	6	6	6	6	0	0	0	6,0	6	6	0,00	0,00	0,00	6	5	7
2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2,0	2	2	0,00	0,00	0,00	2	2	2
	4	4	4															
	rsd	0,08333																
	hiuk.haj.	0,28868																
	ka keskih	2,19089																

Tulos kolimuotoisetbakteerit perunasalaatissa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
400	400	400	400 pmy/g
2,60	2,60	2,60	2,6

laimennus-2

Pirjo Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	6	6	6	6	6	6	0	0	0	6,0	6	6	0,00	0,00	0,00	6	5	7
2	4	4	4	4	4	4	0	0	0	4,0	4	4	0,00	0,00	0,00	4	3	5
	5	5	5															
	rsd	0,06667																
	hiuk.haj.	0,2582																
	ka keskih	1,09545																

Tulos kolimuotoisetbakteerit perunasalaatissa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
500	500	500	500 pmy/g
2,70	2,70	2,70	2,7

laimennus-2

Susanna Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	4	4	4	4	4	4	0	0	0	4,0	4	4	0,00	0,00	0,00	4	3	5
2	3	3	3	3	3	3	0	0	0	3,0	3	3	0,00	0,00	0,00	3	2	4

3,5 3,5 3,5

rsd 0,09524

hiuk.haj. 0,30861

ka keskih 0,54772

Tulos kolimuotoisetbakteerit perunasalaatissa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
350	350	350	350 pmy/g
2,54	2,54	2,54	2,5

laimennus-1

Taru Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	49	51	51	51	51	51	-2	0	0	50,0	51	51	-4,00	0,00	0,00	51	41	60
2	64	64	60	65	64	61	-1	0	-1	64,5	64	60,5	-1,55	0,00	-1,65	63	52	74

56,5 57,5 55,5

rsd 0,0059

hiuk.haj. 0,07681

ka keskih 6,94982

Tulos kolimuotoisetbakteerit munamassassa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
565	575	555	565 pmy/g
2,75	2,76	2,74	2,8

laimennus-1

Pirjo Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	46	45	45	43	45	45	3	0	0	44,5	45	45	6,74	0,00	0,00	45	37	53
2	56	58	52	55	58	53	1	0	-1	55,5	58	52,5	1,80	0,00	-1,90	55	45	65

51 51,5 48,5

rsd 0,00662

hiuk.haj. 0,08138

ka keskih 5,81951

Tulos kolimuotoisetbakteerit munamassassa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
510	515	485	503 pmy/g
2,71	2,71	2,69	2,7

laimennus-1

anna Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	44	46	42	42	45	43	2	1	-1	43,0	45,5	42,5	4,65	2,20	-2,35	44	36	52
2	58	59	59	58	59	59	0	0	0	58,0	59	59	0,00	0,00	0,00	59	48	69

51 52,5 50,5

rsd 0,00649

hiuk.haj. 0,08058

ka keskih 8,14043

Tulos kolimuotoisetbakteerit munamassassa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
510	525	505	513 pmy/g
2,71	2,72	2,70	2,7

laimennus-2

Taru Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	8	9	8	8	9	8	0	0	0	8,0	9	8	0,00	0,00	0,00	8	7	10
2	6	6	6	6	6	6	0	0	0	6,0	6	6	0,00	0,00	0,00	6	5	7

7 7,5 7

rsd 0,04651

hiuk.haj. 0,21567

ka keskih 1,32916

Tulos kolimuotoisetbakteerit munamassassa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
700	750	700	717 pmy/g
2,85	2,88	2,85	2,9

laimennus-2

Pirjo Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	6	6	6	6	6	6	0	0	0	6,0	6	6	0,00	0,00	0,00	6	5	7
2	4	4	4	4	4	4	0	0	0	4,0	4	4	0,00	0,00	0,00	4	3	5

5 5 5

rsd 0,06667

hiuk.haj. 0,2582

ka keskih 1,09545

Tulos kolimuotoisetbakteerit munamassassa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
500	500	500	500 pmy/g
2,70	2,70	2,70	2,7

laimennus-2

LIITE 1 (7/8)

Susanna Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	-18,2%	+18,2%
1	3	3	3	3	3	3	0	0	0	3,0	3	3	0,00	0,00	0,00	3	2	4
2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2,0	2	2	0,00	0,00	0,00	2	2	2

	2,5	2,5	2,5
rsd	0,13333		
hiuk.haj.	0,36515		
ka keskih	0,54772		

Tulos kolimuotoisetbakteerit munamassassa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
250	250	250	250 pmy/g
2,40	2,40	2,40	2,4

		Taru	Pirjo	Susanna	k.-a
kolimuotoisetbakteerit -1	V	408	460	408	425,6
	P	428	375	292	365,0
	M	565	503	513	527,2
kolimuotoisetbakteerit -2	V	600	350	150	366,7
	P	400	500	350	416,7
	M	717	500	250	488,9

LIITE 1 (8/8)

Pesäkelaskennan toistotarkkuuden määrittäminen, Koliformiset bakteerit, Projektii II

LIITE 2 (1/6)

Näytteet Valmiste (V), Kirkas perunasalaatti (P), Kananmunamassa (M)

laimennus-1

Pirjo Valmiste

	Taru	Pirjo	Susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna 2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	16	15	16	16	16	16	0	-1	0	16,0	15,5	16,0	0,00	-6,45	0,00	16	13	19
2	17	16	17	16	16	16	1	0	1	16,5	16,0	16,5	6,06	0,00	6,06	16	13	19
3	27	28	27	28	28	27	-1	0	0	27,5	28,0	27,0	-3,64	0,00	0,00	28	22	33
4	19	19	19	19	19	19	0	0	0	19,0	19,0	19,0	0,00	0,00	0,00	19	16	22
5	11	13	12	13	13	13	-2	0	-1	12,0	13,0	12,5	-16,67	0,00	-8,00	13	10	15
6	18	19	18	19	19	19	-1	0	-1	18,5	19,0	18,5	-5,41	0,00	-5,41	19	15	22
7	16	16	17	16	17	17	0	-1	0	16,0	16,5	17,0	0,00	-6,06	0,00	17	13	20
8	19	19	18	20	19	19	-1	0	-1	19,5	19,0	18,5	-5,13	0,00	-5,41	19	16	22
9	15	17	16	17	18	17	-2	-1	-1	16,0	17,5	16,5	-12,50	-5,71	-6,06	17	14	20
10	16	16	16	17	17	17	-1	-1	-1	16,5	16,5	16,5	-6,06	-6,06	-6,06	17	13	20

17,4	17,8	17,6
rsd	0,01894	
hiuk.haj.	0,13762	
ka keskih	4,8116	

Tulos kolimuotoisetbakteerit valmisteessa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
174	178	176	176 pmy/g
2,24	2,25	2,25	2,2

laimennus-1

Taru Valmiste

	Taru	Pirjo	Susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna 2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	22	22	23	23	23	22	-1	-1	1	22,5	22,5	22,5	-4,44	-4,44	4,44	23	18	27
2	28	28	28	29	29	29	-1	-1	-1	28,5	28,5	28,5	-3,51	-3,51	-3,51	29	23	34
3	25	26	27	26	27	27	-1	-1	0	25,5	26,5	27	-3,92	-3,77	0,00	26	22	31
4	39	38	38	41	40	40	-2	-2	-2	40,0	39	39	-5,00	-5,13	-5,13	39	32	46
5	26	27	26	28	27	28	-2	0	-2	27,0	27	27	-7,41	0,00	-7,41	27	22	32

28	28,2	28,4
rsd	0,01182	
hiuk.haj.	0,10872	
ka keskih	5,60867	

Tulos kolimuotoisetbakteerit valmisteessa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
280	282	284	282 pmy/g
2,45	2,45	2,45	2,5

laimennus-1
Susanna Valmiste

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	29	29	30	29	29	29	0	0	1	29,0	29	29,5	0,00	0,00	3,39	29	24	34
2	33	33	33	35	33	34	-2	0	-1	34,0	33	33,5	-5,88	0,00	-2,99	34	27	40
3	38	38	37	37	38	37	1	0	0	37,5	38	37	2,67	0,00	0,00	38	31	44
4	25	26	26	28	26	27	-3	0	-1	26,5	26	26,5	-11,32	0,00	-3,77	26	22	31
5	18	19	20	19	19	20	-1	0	0	18,5	19	20	-5,41	0,00	0,00	19	16	23

	29	29	30
rsd	0,01136		
hiuk.haj.	0,1066		
ka keskih	0,57735		

Tulos kolimuotoisetbakteerit valmisteessa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
290	290	300	293 pmy/g
2,46	2,46	2,48	2,5

laimennus-1
Taru Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	29	29	28	29	29	28	0	0	0	29,0	29	28	0,00	0,00	0,00	29	23	34
2	26	25	27	25	25	25	1	0	2	25,5	25	26	3,92	0,00	7,69	26	21	30
3	23	21	24	22	22	22	1	-1	2	22,5	21,5	23	4,44	-4,65	8,70	22	18	26
4	19	19	20	19	19	19	0	0	1	19,0	19	19,5	0,00	0,00	5,13	19	16	23
5	25	25	25	26	26	26	-1	-1	-1	25,5	25,5	25,5	-3,92	-3,92	-3,92	26	21	30

	24,4	23,8	24,8
rsd	0,0137		
hiuk.haj.	0,11704		
ka keskih	3,35233		

Tulos kolimuotoisetbakteerit perunasalaatissa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
244	238	248	243 pmy/g
2,39	2,38	2,39	2,4

laimennus-1

Pirjo Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	26	26	26	27	27	28	-1	-1	-2	26,5	26,5	27	-3,77	-3,77	-7,41	27	22	32
2	23	25	23	25	26	22	-2	-1	1	24,0	25,5	22,5	-8,33	-3,92	4,44	24	20	28
3	37	37	36	37	37	37	0	0	-1	37,0	37	36,5	0,00	0,00	-2,74	37	30	44
4	16	16	18	15	16	16	1	0	2	15,5	16	17	6,45	0,00	11,76	16	13	19
5	27	27	27	27	27	27	0	0	0	27,0	27	27	0,00	0,00	0,00	27	22	32
	24,5	25,5	24,5															
	rsd	0,01342																
	hiuk.haj.	0,11586																
	ka keskih	1,47196																

Tulos kolimuotoisetbakteerit perunasalaatissa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
245	255	245	248 pmy/g
2,39	2,41	2,39	2,4

laimennus-1

Susanna Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	32	32	31	30	31	30	2	1	1	31,0	31,5	30,5	6,45	3,17	3,28	31	25	37
2	25	25	25	25	25	25	0	0	0	25,0	25	25	0,00	0,00	0,00	25	20	30
3	35	35	34	35	35	35	0	0	-1	35,0	35	34,5	0,00	0,00	-2,90	35	28	41
4	16	16	17	15	15	15	1	1	2	15,5	15,5	16	6,45	6,45	12,50	16	13	19
5	23	23	23	23	23	22	0	0	1	23,0	23	22,5	0,00	0,00	4,44	23	19	27
	28,5	28,5	28															
	rsd	0,01176																
	hiuk.haj.	0,10847																
	ka keskih	3,6697																

Tulos kolimuotoisetbakteerit perunasalaatissa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
285	285	280	283 pmy/g
2,45	2,45	2,45	2,5

laimennus-1

Taru Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	24	24	25	24	24	24	0	0	1	24,0	24	24,5	0,00	0,00	4,08	24	20	29
2	36	36	37	37	37	36	-1	-1	1	36,5	36,5	36,5	-2,74	-2,74	2,74	37	30	43
3	32	31	32	30	30	30	2	1	2	31,0	30,5	31	6,45	3,28	6,45	31	25	36
4	27	27	28	28	28	27	-1	-1	1	27,5	27,5	27,5	-3,64	-3,64	3,64	28	22	33
5	36	36	36	38	37	37	-2	-1	-1	37,0	36,5	36,5	-5,41	-2,74	-2,74	37	30	43

31 30,8 31,6

rsd 0,01071

hiuk.haj. 0,10347

ka keskih 4,9116

Tulos kolimuotoisetbakteerit munamassassa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
310	308	316	311 pmy/g
2,49	2,49	2,50	2,5

laimennus-1

Pirjo Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	37	34	37	35	35	36	2	-1	1	36,0	34,5	36,5	5,56	-2,90	2,74	36	29	42
2	36	36	37	36	36	36	0	0	1	36,0	36	36,5	0,00	0,00	2,74	36	30	43
3	36	35	37	34	35	35	2	0	2	35,0	35	36	5,71	0,00	5,56	35	29	42
4	25	26	25	24	25	23	1	1	2	24,5	25,5	24	4,08	3,92	8,33	25	20	29
5	31	30	31	31	31	30	0	-1	1	31,0	30,5	30,5	0,00	-3,28	3,28	31	25	36

33 32,2 33,4

rsd 0,01014

hiuk.haj. 0,10071

ka keskih 4,5492

Tulos kolimuotoisetbakteerit munamassassa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
330	322	334	329 pmy/g
2,52	2,51	2,52	2,5

laimennus-1

anna Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	37	35	36	34	35	35	3	0	1	35,5	35	35,5	8,45	0,00	2,82	35	29	42
2	33	33	33	34	34	34	-1	-1	-1	33,5	33,5	33,5	-2,99	-2,99	-2,99	34	27	40
3	32	32	33	32	32	32	0	0	1	32,0	32	32,5	0,00	0,00	3,08	32	26	38
4	29	30	29	31	31	30	-2	-1	-1	30,0	30,5	29,5	-6,67	-3,28	-3,39	30	25	35
5	34	34	34	33	33	33	1	1	1	33,5	33,5	33,5	2,99	2,99	2,99	34	27	40

	33	32,8	33
rsd	0,01012		
hiuk.haj.	0,10061		
ka keskih	2,31352		

Tulos kolimuotoisetbakteerit munamassassa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
330	328	330	329 pmy/g
2,52	2,52	2,52	2,5

		Taru	Pirjo	Susanna	k.-a
kolimuotoisetbakteerit -1	V	282	176	293	250,4
	P	243	248	283	258,3
	M	311	329	329	323,1

LIITE 2 (6/6)

Pesäkelaskennan toistotarkkuuden määrittäminen, Enterobakteerit, Projekt I

Näytteet Valmiste (V), Kirkas perunasalaatti (P), Kananmunamassa (M)

LIITE 3 (1/8)

laimennus-1

Taru Valmiste

	Taru	Pirjo	Susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna 2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	52	50	48	55	51	48	-3	-1	0	53,5	50,5	48,0	-5,61	-1,98	0,00	51	41	60
2	38	36	34	37	35	35	1	1	-1	37,5	35,5	34,5	2,67	2,82	-2,90	36	29	42
3	59	53	54	61	56	54	-2	-3	0	60,0	54,5	54,0	-3,33	-5,50	0,00	56	46	66
4	42	42	38	43	41	40	-1	1	-2	42,5	41,5	39,0	-2,35	2,41	-5,13	41	34	48
5	38	38	38	39	38	38	-1	0	0	38,5	38,0	38,0	-2,60	0,00	0,00	38	31	45
6	53	50	48	53	51	50	0	-1	-2	53,0	50,5	49,0	0,00	-1,98	-4,08	51	42	60
7	54	55	54	53	54	54	1	1	0	53,5	54,5	54,0	1,87	1,83	0,00	54	44	64
8	50	48	44	49	49	46	1	-1	-2	49,5	48,5	45,0	2,02	-2,06	-4,44	48	39	56
9	54	56	55	55	54	55	-1	2	0	54,5	55,0	55,0	-1,83	3,64	0,00	55	45	65
10	54	53	52	55	53	53	-1	0	-1	54,5	53,0	52,5	-1,83	0,00	-1,90	53	44	63

49,4	48,1	46,5
rsd	0,00694	
hiuk.haj.	0,08333	
ka keskih	8,19645	

Tulos enterobakteerit valmisteessa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
494	481	465	480 pmy/g
2,69	2,68	2,67	2,7

laimennus-1

Pirjo Valmiste

	Taru	Pirjo	Susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna 2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	55	55	54	54	55	55	1	0	-1	54,5	55	54,5	1,83	0,00	-1,83	55	45	65
2	48	47	46	47	46	47	1	1	-1	47,5	46,5	46,5	2,11	2,15	-2,15	47	38	55

51,5	51	50
rsd	0,00656	
hiuk.haj.	0,08098	
ka keskih	4,26224	

Tulos enterobakteerit valmisteessa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
515	510	500	508 pmy/g
2,71	2,71	2,70	2,7

laimennus-1
Susanna Valmiste

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	50	50	50	50	51	50	0	-1	0	50,0	50,5	50	0,00	-1,98	0,00	50	41	59
2	61	61	59	61	61	60	0	0	-1	61,0	61	59,5	0,00	0,00	-1,68	61	49	72

	55,5	55,5	54,5
--	------	------	------

rsd	0,00604
-----	---------

hiuk.haj.	0,07773
-----------	---------

ka keskih	5,70672
-----------	---------

Tulos enterobakteerit valmisteessa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
555	555	545	552 pmy/g
2,74	2,74	2,74	2,7

laimennus-2
Taru Valmiste

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1,0	1	1	0,00	0,00	0,00	1	1	1
2	6	6	5	6	6	6	0	0	-1	6,0	6	5,5	0,00	0,00	-18,18	6	5	7

	3,5	3,5	3
--	-----	-----	---

rsd	0,1
-----	-----

hiuk.haj.	0,31623
-----------	---------

ka keskih	2,58199
-----------	---------

Tulos enterobakteerit valmisteessa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
350	350	300	333 pmy/g
2,54	2,54	2,48	2,5

laimennus-2
Pirjo valmiste

	Taru	Pirjo	susanna	Taru2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	7	7	6	7	7	7	0	0	-1	7,0	7	6,5	0,00	0,00	-15,38	7	6	8
2	3	3	3	3	3	3	0	0	0	3,0	3	3	0,00	0,00	0,00	3	2	4

	5	5	4,5
--	---	---	-----

rsd	0,06897
-----	---------

hiuk.haj.	0,26261
-----------	---------

ka keskih	2,04124
-----------	---------

Tulos enterobakteerit valmisteessa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
500	500	450	483 pmy/g
2,70	2,70	2,65	2,7

laimennus-2

Susanna valmiste

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2,0	2	2	0,00	0,00	0,00	2	2	2
2	4	4	4	4	4	4	0	0	0	4,0	4	4	0,00	0,00	0,00	4	3	5
	3	3	3															

rsd	0,11111
hiuk.haj.	0,33333
ka keskih	1,09545

Tulos enterobakteerit valmisteessa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
300	300	300	300 pmy/g
2,48	2,48	2,48	2,5

laimennus-1

Taru Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	49	48	48	48	48	48	1	0	0	48,5	48	48	2,06	0,00	0,00	48	39	57
2	49	50	47	51	50	48	-2	0	-1	50,0	50	47,5	-4,00	0,00	-2,11	49	40	58
	49	49	47,5															

rsd	0,00687
hiuk.haj.	0,0829
ka keskih	1,04881

Tulos enterobakteerit perunasalaatissa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
490	490	475	485 pmy/g
2,69	2,69	2,68	2,7

laimennus-1

Pirjo Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	43	42	44	42	42	44	1	0	0	42,5	42	44	2,35	0,00	0,00	43	35	51
2	44	46	51	44	45	50	0	1	1	44,0	45,5	50,5	0,00	2,20	1,98	47	38	55
	43,5	44	47,5															

rsd	0,00741
hiuk.haj.	0,08607
ka keskih	3,2249

Tulos enterobakteerit perunasalaatissa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
435	440	475	450 pmy/g
2,64	2,64	2,68	2,7

laimennus-1

Susanna Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	xx-18,2%	+18,2%	
1	45	47	44	43	46	45	2	1	-1	44,0	46,5	44,5	4,55	2,15	-2,25	45	37	53
2	36	35	33	35	35	34	1	0	-1	35,5	35	33,5	2,82	0,00	-2,99	35	28	41
	40,5	41	38,5															
	rsd	0,00833																
	hiuk.haj.	0,09129																
	ka keskih	6																

Tulos enterobakteerit perunasalaatissa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
405	410	385	400 pmy/g
2,61	2,61	2,59	2,6

laimennus-2

Taru Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	xx-18,2%	+18,2%	
1	5	5	5	5	5	5	0	0	0	5,0	5	5	0,00	0,00	0,00	5	4	6
2	3	3	3	3	3	3	0	0	0	3,0	3	3	0,00	0,00	0,00	3	2	4
	4	4	4															
	rsd	0,08333																
	hiuk.haj.	0,28868																
	ka keskih	1,09545																

Tulos enterobakteerit perunasalaatissa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
400	400	400	400 pmy/g
2,60	2,60	2,60	2,6

laimennus-2

Pirjo Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	xx-18,2%	+18,2%	
1	6	6	6	6	6	6	0	0	0	6,0	6	6	0,00	0,00	0,00	6	5	7
2	3	3	3	3	3	3	0	0	0	3,0	3	3	0,00	0,00	0,00	3	2	4
	4,5	4,5	4,5															
	rsd	0,07407																
	hiuk.haj.	0,27217																
	ka keskih	1,64317																

Tulos enterobakteerit perunasalaatissa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
450	450	450	450 pmy/g
2,65	2,65	2,65	2,7

laimennus-2

Susanna Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	2	1	1	2	2	1	0	-1	0	2,0	1,5	1	0,00	-66,67	0,00	2	1	2
2	4	4	3	4	4	4	0	0	-1	4,0	4	3,5	0,00	0,00	-28,57	4	3	5
	3	2,5	2															
	rsd	0,13333																
	hiuk.haj.	0,36515																
	ka keskih	1,3784																

Tulos enterobakteerit perunasalaatissa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
300	250	200	250 pmy/g
2,48	2,40	2,30	2,4

laimennus-1

Taru Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	55	61	45	55	57	47	0	4	-2	55,0	59	46	0,00	6,78	-4,35	53	44	63
2	33	30	31	33	32	32	0	-2	-1	33,0	31	31,5	0,00	-6,45	-3,17	32	26	38
	44	45,5	38															
	rsd	0,00784																
	hiuk.haj.	0,08856																
	ka keskih	13,2929																

Tulos enterobakteerit munamassassa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
440	455	380	425 pmy/g
2,64	2,66	2,58	2,6

laimennus-1

Pirjo Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	57	54	51	55	55	52	2	-1	-1	56,0	54,5	51,5	3,57	-1,83	-1,94	54	44	64
2	51	47	48	50	49	48	1	-2	0	50,5	48	48	1,98	-4,17	0,00	49	40	58
	54	50,5	49,5															
	rsd	0,00649																
	hiuk.haj.	0,08058																
	ka keskih	3,7238																

Tulos enterobakteerit munamassassa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
540	505	495	513 pmy/g
2,73	2,70	2,69	2,7

laimennus-1

anna Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	52	50	50	53	52	52	-1	-2	-2	52,5	51	51	-1,90	-3,92	-3,92	52	42	61
2	44	43	44	45	44	44	-1	-1	0	44,5	43,5	44	-2,25	-2,30	0,00	44	36	52

48 46,5 47

rsd 0,00707

hiuk.haj. 0,08407

ka keskih 3,92003

Tulos enterobakteerit munamassassa, Susanna viljeli

Taru Pirjo Susanna

480 465 470 472 pmy/g

2,68 2,67 2,67 2,7

laimennus-2

Taru Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	7	8	7	8	8	7	-1	0	0	7,5	8	7	-13,33	0,00	0,00	8	6	9
2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2,0	2	2	0,00	0,00	0,00	2	2	2

4,5 5 4,5

rsd 0,07143

hiuk.haj. 0,26726

ka keskih 2,94392

Tulos enterobakteerit munamassassa, Taru viljeli

Taru Pirjo Susanna

450 500 450 467 pmy/g

2,65 2,70 2,65 2,7

laimennus-2

Pirjo Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	6	6	6	6	6	6	0	0	0	6,0	6	6	0,00	0,00	0,00	6	5	7
2	7	7	7	7	7	7	0	0	0	7,0	7	7	0,00	0,00	0,00	7	6	8

6,5 6,5 6,5

rsd 0,05128

hiuk.haj. 0,22646

ka keskih 0,54772

Tulos enterobakteerit munamassassa, Pirjo viljeli

Taru Pirjo Susanna

650 650 650 650 pmy/g

2,81 2,81 2,81 2,8

laimennus-2

LIITE 3 (7/8)

Susanna Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	-18,2%	+18,2%
1	5	5	5	5	5	5	0	0	0	5,0	5	5	0,00	0,00	0,00	5	4	6
2	4	4	4	4	4	4	0	0	0	4,0	4	4	0,00	0,00	0,00	4	3	5

	4,5	4,5	4,5
rsd	0,07407		
hiuk.haj.	0,27217		
ka keskih	0,54772		

Tulos enterobakteerit munamassassa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
450	450	450	450 pmy/g
2,65	2,65	2,65	2,7

		Taru	Pirjo	Susanna	k.-a
enterobakteerit -1	V	480	508	552	513,3
	P	485	450	400	445,0
	M	425	513	472	470,0
enterobakteerit -2	V	333	483	300	372,2
	P	400	450	250	366,7
	M	467	650	450	522,2

LIITE 3 (8/8)

Pesäkelaskennan toistotarkkuuden määrittäminen, Enterobakteerit, Projekti II

LIITE 4 (1/6)

Näytteet Valmiste (V), Kirkas perunasalaatti (P), Kananmunamassa (M)

laimennus-1

Pirjo Valmiste

	Taru	Pirjo	Susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna 2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	36	35	35	35	36	35	1	-1	0	35,5	35,5	35,0	2,82	-2,82	0,00	35	29	42
2	28	28	28	29	28	28	-1	0	0	28,5	28,0	28,0	-3,51	0,00	0,00	28	23	33
3	32	31	32	32	32	32	0	-1	0	32,0	31,5	32,0	0,00	-3,17	0,00	32	26	38
4	25	25	25	26	26	26	-1	-1	-1	25,5	25,5	25,5	-3,92	-3,92	-3,92	26	21	30
5	27	27	26	26	27	26	1	0	0	26,5	27,0	26,0	3,77	0,00	0,00	27	22	31
6	23	22	23	22	22	21	1	0	2	22,5	22,0	22,0	4,44	0,00	9,09	22	18	26
7	37	37	39	37	37	37	0	0	2	37,0	37,0	38,0	0,00	0,00	5,26	37	31	44
8	39	39	39	39	39	38	0	0	1	39,0	39,0	38,5	0,00	0,00	2,60	39	32	46
9	31	31	30	31	32	30	0	-1	0	31,0	31,5	30,0	0,00	-3,17	0,00	31	25	36
10	39	38	39	39	38	39	0	0	0	39,0	38,0	39,0	0,00	0,00	0,00	39	32	46

31,7	31,3	31,6
rsd	0,01057	
hiuk.haj.	0,10281	
ka keskih	4,06761	

Tulos enterobakteerit valmisteessa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
317	313	316	315 pmy/g
2,50	2,50	2,50	2,5

laimennus-1

Taru Valmiste

	Taru	Pirjo	Susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna 2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	36	35	35	35	36	35	1	-1	0	35,5	35,5	35	2,82	-2,82	0,00	35	29	42
2	24	24	24	24	24	24	0	0	0	24,0	24	24	0,00	0,00	0,00	24	20	28
3	31	31	31	31	31	31	0	0	0	31,0	31	31	0,00	0,00	0,00	31	25	37
4	14	14	14	14	14	14	0	0	0	14,0	14	14	0,00	0,00	0,00	14	11	17
5	28	26	28	28	28	27	0	-2	1	28,0	27	27,5	0,00	-7,41	3,64	28	22	33

26,6	26	26,4
rsd	0,01266	
hiuk.haj.	0,11251	
ka keskih	7,49921	

Tulos enterobakteerit valmisteessa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
266	260	264	263 pmy/g
2,42	2,41	2,42	2,4

laimennus-1
Susanna Valmiste

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	26	26	25	27	25	25	-1	1	0	26,5	25,5	25	-3,77	3,92	0,00	26	21	30
2	36	35	35	34	34	34	2	1	1	35,0	34,5	34,5	5,71	2,90	2,90	35	28	41
3	38	38	37	38	38	38	0	0	-1	38,0	38	37,5	0,00	0,00	-2,67	38	31	45
4	40	37	39	38	38	38	2	-1	1	39,0	37,5	38,5	5,13	-2,67	2,60	38	31	45
5	29	30	29	31	30	30	-2	0	-1	30,0	30	29,5	-6,67	0,00	-3,39	30	24	35

	26	26	25
rsd	0,01299		
hiuk.haj.	0,11396		
ka keskih	0,57735		

Tulos enterobakteerit valmisteessa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
260	260	250	257 pmy/g
2,41	2,41	2,40	2,4

laimennus-1
Taru Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	39	38	37	37	37	37	2	1	0	38,0	37,5	37	5,26	2,67	0,00	38	31	44
2	33	33	33	33	33	33	0	0	0	33,0	33	33	0,00	0,00	0,00	33	27	39
3	19	19	17	19	19	18	0	0	-1	19,0	19	17,5	0,00	0,00	-5,71	19	15	22
4	32	31	34	31	32	33	1	-1	1	31,5	31,5	33,5	3,17	-3,17	2,99	32	26	38
5	29	29	28	28	28	28	1	1	0	28,5	28,5	28	3,51	3,51	0,00	28	23	33

	30,4	30	29,8
rsd	0,01109		
hiuk.haj.	0,10529		
ka keskih	6,86052		

Tulos enterobakteerit perunasalaatissa, Taru viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
304	300	298	301 pmy/g
2,48	2,48	2,47	2,5

laimennus-1

Pirjo Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	8	8	8	8	8	8	0	0	0	8,0	8	8	0,00	0,00	0,00	8	7	9
2	31	30	30	30	30	30	1	0	0	30,5	30	30	3,28	0,00	0,00	30	25	36
3	32	30	30	30	31	30	2	-1	0	31,0	30,5	30	6,45	-3,28	0,00	31	25	36
4	31	31	31	31	31	31	0	0	0	31,0	31	31	0,00	0,00	0,00	31	25	37
5	23	23	26	23	23	25	0	0	1	23,0	23	25,5	0,00	0,00	3,92	24	19	28
	19,5	19	19															

rsd	0,01739
hiuk.haj.	0,13188
ka keskih	12,2379

Tulos enterobakteerit perunasalaatissa, Pirjo viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
195	190	190	192 pmy/g
2,29	2,28	2,28	2,3

laimennus-1

Susanna Kirkas perunasalaatti

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	31	31	32	30	31	30	1	0	2	30,5	31	31	3,28	0,00	6,45	31	25	36
2	26	27	26	28	28	27	-2	-1	-1	27,0	27,5	26,5	-7,41	-3,64	-3,77	27	22	32
3	23	23	26	23	23	24	0	0	2	23,0	23	25	0,00	0,00	8,00	24	19	28
4	51	51	49	51	51	50	0	0	-1	51,0	51	49,5	0,00	0,00	-2,02	51	41	60
5	44	40	43	41	41	41	3	-1	2	42,5	40,5	42	7,06	-2,47	4,76	42	34	49
	28,5	29	29															

rsd	0,01156
hiuk.haj.	0,10752
ka keskih	2,78687

Tulos enterobakteerit perunasalaatissa, Susanna viljeli

Taru	Pirjo	Susanna	
285	290	290	288 pmy/g
2,45	2,46	2,46	2,5

laimennus-1

Taru Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	29	29	30	29	29	29	0	0	1	29,0	29	29,5	0,00	0,00	3,39	29	24	34
2	31	29	31	31	30	31	0	-1	0	31,0	29,5	31	0,00	-3,39	0,00	31	25	36
3	31	30	31	30	30	31	1	0	0	30,5	30	31	3,28	0,00	0,00	31	25	36
4	33	34	33	33	33	33	0	1	0	33,0	33,5	33	0,00	2,99	0,00	33	27	39
5	28	26	29	28	28	29	0	-2	0	28,0	27	29	0,00	-7,41	0,00	28	23	33

30,4 29,6 30,8

rsd 0,01101

hiuk.haj. 0,10494

ka keskih 2,08624

Tulos enterobakteerit munamassassa, Taru viljeli

Taru Pirjo Susanna

304 296 308 303 pmy/g

2,48 2,47 2,49 2,5

laimennus-1

Pirjo Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	27	26	26	25	25	25	2	1	1	26,0	25,5	25,5	7,69	3,92	3,92	26	21	30
2	27	26	26	26	27	26	1	-1	0	26,5	26,5	26	3,77	-3,77	0,00	26	22	31
3	34	34	33	34	34	34	0	0	-1	34,0	34	33,5	0,00	0,00	-2,99	34	28	40
4	28	28	28	28	28	28	0	0	0	28,0	28	28	0,00	0,00	0,00	28	23	33
5	34	33	33	35	34	34	-1	-1	-1	34,5	33,5	33,5	-2,90	-2,99	-2,99	34	28	40

30 29,4 29,2

rsd 0,01129

hiuk.haj. 0,10624

ka keskih 3,44065

Tulos enterobakteerit munamassassa, Pirjo viljeli

Taru Pirjo Susanna

300 294 292 295 pmy/g

2,48 2,47 2,47 2,5

laimennus-1

anna Kananmunamassa

	Taru	Pirjo	susanna	Taru 2	Pirjo 2	Susanna2	Tt1-Tt2	Pt1-Pt2	st1-st2	Tx	Px	sx	Trv	Prv	srv	x	x-18,2%	+18,2%
1	30	30	29	30	30	30	0	0	-1	30,0	30	29,5	0,00	0,00	-3,39	30	24	35
2	33	33	32	33	33	32	0	0	0	33,0	33	32	0,00	0,00	0,00	33	27	39
3	34	31	33	34	33	33	0	-2	0	34,0	32	33	0,00	-6,25	0,00	33	27	39
4	33	35	33	33	34	33	0	1	0	33,0	34,5	33	0,00	2,90	0,00	34	27	40
5	34	33	35	34	34	34	0	-1	1	34,0	33,5	34,5	0,00	-2,99	2,90	34	28	40

32,8 32,4 32,4

rsd 0,01025

hiuk.haj. 0,10122

ka keskih 1,80739

Tulos enterobakteerit munamassassa, Susanna viljeli

Taru Pirjo Susanna

328 324 324 325 pmy/g

2,52 2,51 2,51 2,5

		Taru	Pirjo	Susanna	k.-a
enterobakteerit -1	V	263	315	257	278,4
	P	301	192	288	260,2
	M	303	295	325	307,8

LIITE 4 (6/6)

