

Mikael Korte

bioMérieux TEMPO-menetelmän validointi

Valion maitotuotteet

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Biotekniikan insinööri

Bio- ja elintarviketekniikka

Opinnäytetyö

1.3.2014

Tekijä Otsikko	Mikael Korte bioMérieux TEMPO-menetelmän validointi
Sivumäärä Aika	50 sivua + 1 liite 1.3.2014
Tutkinto	Biotekniikan insinööri
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaajat	projektin vetäjä Anu Surakka lehtori Mikko Halsas
<p>Insinöörityössä tutkittiin, kuinka hyvin bioMérieux TEMPO:n mikrobimääritysten tulokset vastaavat standardimenetelmän tuloksia. TEMPO-menetelmässä automatisoidaan useita työvaiheita, jolloin suurien näytemäärien analysoimiseksi tarvitaan vähemmän työtä kuin perinteisessä maljavalulmenetelmässä. Näytematriiseiksi valittiin viisi erilaista maitotuotetta ja vesi.</p> <p>Osa näytteistä kontaminoitiin erilaisilla <i>Escherichia coli</i> -bakteeria sisältävillä liuoksilla. Niiden solupitoisuus vaihteli siten, että $0...10^4$ pmy/g -välinen mitta-alue tuli tutkituksi. TEMPO-menetelmällä tehtiin TVC-kokonaisbakteerimääritys ja EB-enterobakteerimääritys. Niiden tuloksia verrattiin perinteisiin maljavalutuloksiin, jotka toteutettiin vastaavasti MPCA- ja VRBG-kasvatusalustoilla. Tuloksiin sovitettiin lineaarinen regressiomalli, jossa huomioitiin maljatulosten mittausepävarmuus.</p> <p>Tulosten luotettavuus vaihteli selvästi, mutta mitään selkeää matriisista riippuvaa johdonmukaisuutta ei ollut havaittavissa. Parhaimmat tulokset saatiin kevytkerman TVC-testissä, jolloin lineaarisen mallin kulmakerroin oli 0,9915 ja R^2 0,9480. Täysin päinvastaisia tuloksia saatiin useammallakin matriisilla, joista huonoin oli rasvattoman maidon TVC-testi, Sen regressioanalyysin tulokset eivät olleet lainkaan tilastollisesti merkitseviä, ja kulmakerroinkin oli epärealistisen pieni.</p> <p>Yleisesti ottaen tulokset eivät vastanneet toisiaan riittävän hyvin, jotta tämän menetelmän käyttöönottoa olisi voitu suositella Valion laadunvalvontalaboratoriolle, jossa sillä olisi tutkittu rutiininomaisesti useiden eri maitotuotteiden mikrobiologista puhtautta. TEMPO-menetelmää voidaan käyttää luotettavasti vain tiettyjen näytematriisien mikrobipitoisuuksia tutkiessa, mutta se ei kykene kokonaan korvaamaan standardimenetelmää. Parhaimmillaan se tuottaa luotettavia tuloksia vaivattomasti, mutta sen järkevä käyttö edellyttää näytematriisien ja testien huolellista valintaa. Valio olisi halunnut korvata sillä työläänsä standardimenetelmän, mutta näissä olosuhteissa uuteen menetelmään investointi ei olisi kannattanut.</p>	
Avainsanat	maitotuotteet, mikrobimääritys, automaatio, validointi

Author Title	Mikael Korte Validation of bioMérieux TEMPO for dairy products
Number of Pages Date	50 pages + 1 appendix 1 March 2014
Degree	Bachelor of biotechnology
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructors	Anu Surakka, Project manager Mikko Halsas, Lecturer
<p>The aim of the project was to determine whether a traditional, time consuming microbial enumeration method could be replaced by a new, automated one. Valio carries out numerous microbial analyses on a daily basis as a part of their quality assurance system and bioMérieux TEMPO could potentially speed up the process and thus reduce costs.</p> <p>Valio was mainly interested in determining whether TEMPO could replace a more laborious, but reliable method of plate count. Both methods were used to analyze and estimate total viable count and the number of enterobacteria of each sample. Artificially contaminated and unadulterated samples were analyzed to determine the validity of TEMPO in the most commonly used detection ranges. TEMPO EC and VRBG plates were used to measure the number of enterobacteria colony forming units in each sample, while TEMPO TVC test and MPCA plates were used for determining the total viable count of each sample.</p> <p>Accuracy of the results was far from uniform. Most TEMPO results proved to be inconsistent with the standard methods of plate count in MPCA and VRBG, respectively. The results ranged from highly significant and reliable to statistically completely insignificant and somewhat non-correlated. The best slope of 0,9915 and best correlation coefficient of 0,9480 was observed in the TVC test of low-fat cream. However, the vast majority of tests produced much lower slopes and lower correlation coefficients.</p> <p>It is unadvised for Valio to upgrade their microbial analysis method to TEMPO. These results are significant to Valio, since otherwise they might have invested in an unsuitable equipment and education. However, if TEMPO had been proven accurate enough throughout all the matrices tested, it would have significantly improved the efficiency of the quality assurance process, due to its capacity to process samples in a short period of time.</p>	
Keywords	Dairy products, microbial assay, automation, validation

Sisällys

Lyhenteet	6
1 Johdanto	7
2 Tavoitteet	8
3 Automaatio ja pikamenetelmät mikrobiologiassa	9
3.1 Näytteenotto	9
3.2 Esikäsittely	9
3.3 Kasvatus	10
3.4 Tulosten lukeminen	11
3.5 MPN:ään perustuvat menetelmät	11
3.6 Immunologiset testit	12
4 Maitotuotteiden hygienia	12
4.1 Maidon mikrobiologia	12
4.2 Lämpökäsittelyt	15
4.3 Kokonaisbakteerimäärä	16
4.4 Enterobakteerit	17
4.5 Maidon kautta välittyvät ruokamyrkytykset	17
5 Epävarmuudet	18
5.1 Mikrobeista johtuva mittausepävarmuus	18
5.2 Pipetoinnin mittausepävarmuus	20
5.3 Mittaustulosten epävarmuus	21
6 Materiaalit ja menetelmät	22
6.1 MPN – todennäköisimmän lukumäärän menetelmä	22
6.2 TEMPO-menetelmän teoria	23
6.3 TEMPO-menetelmän aikaisemmat validoinnit	24
6.4 Maljaviljelyn teoria	24
6.4.1 Maljavalumenetelmä	25

6.4.2	VRBG-agarimenetelmä	25
6.4.3	Pesäkkeiden laskusäännöt	26
7	Reagenssit	26
7.1	Kasvatusalustat	26
7.2	muut reagenssit	27
7.3	TEMPO TVC:n koostumus	27
8	Näytteet	28
8.1	Nestemäiset näytteet	28
8.2	Herajauheet	28
9	Työn suoritus	29
9.1	Yleistä	29
9.2	Näytteiden kontaminointi	29
9.3	Näytteiden esikäsittely	30
9.4	Laimennukset	30
9.5	Standardimenetelmän kuvaus	31
9.6	Laskenta	32
9.7	TEMPO-menetelmän toteutus	32
10	tulokset	36
10.1	Tulosten karsiminen	36
10.2	Mallien tunnusluvut	37
11	Kuvaajat	39
11.1	Vesi	39
11.1.1	Vesi MPCA-TVC	39
11.1.2	Vesi VRBG-EB	40
11.2	Kaikki tulokset	42
11.3	TVC-MPCA	43
11.3.1	Rasvaton maito	43
11.3.2	Kevytmaito	44
11.3.3	Kevytkerma	45
11.3.4	kuohukerma	46
11.3.5	maitojauhe	47
11.4	EB-VRBG	49

11.4.1 Rasvaton maito	49
11.4.2 Kevytmaito	50
11.4.3 Kevytkerma	51
11.4.4 kuohukerma	52
11.4.5 maitojauhe	53
12 Ajansäästö	54
13 Mahdolliset virhelähteet	55
14 Loppupäätelmät	56
Lähteet	56
Liitteet	57

Lyhenteet

4MU = 4-methylumbelliferone. Fluoresoiva aine.

AFNOR = *Association Française de Normalisation*. Ranskan kansallinen standardointiorganisaatio.

ATCC = *American Type Culture Collection*. Amerikkalainen järjestö, jonka tavoitteena on ylläpitää mikrobikirjastoa.

BAM = *Bacteriological Analytical Manual*. Bakteeriviljelmien ohjekirja.

BHI = *Brain Heart Infusion broth*. Kasvatusalusta.

EB = *enterobacteriae*. TEMPO-menetelmän enterobakteerimääritys.

EC = *Escherichia coli*

EDW = *Electrodialysed Whey*. Valion käyttämä merkintä, joka ilmoittaa millä menetelmällä herasta on poistettu suolaa.

IEW = *Ion Exchanged Whey*. Valion käyttämä merkintä, joka ilmoittaa millä menetelmällä herasta on poistettu suolaa.

LW = *Low Mineral*. Valion käyttämä merkintä, joka ilmoittaa että herasta on poistettu suolaa.

MPCA = *Milkpowder Plate Count Agar*. Kasvatusalusta.

MPN = *Most Probable Number*. Tilastollinen menetelmä todennäköisimmän solumäärän laskemiseksi.

SMEDP = *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. Amerikan kansanterveyslaitoksen julkaisema standardi.

SWP = *sweet whey powder*. Vähäsuolainen hera.

TC = *total coliforms*. TEMPO:n koliformitesti.

TVC = *total viable count*. TEMPO-menetelmän kokonaibakteerimääritys.

UV = *ultravioletti*

VRBG = *violet red bile agar with glucose*. Kasvatusalusta.

1 Johdanto

Monet mikrobiologian työt ovat työläitä ja hitaita, jolloin aikaa kuluu runsaasti varsinaisen työskentelyn lisäksi myös mikrobien kasvattamiseen, mikä tavallisesti vaatii useita päiviä. BioMérieux on kehittänyt TEMPO-menetelmän, jonka tavoitteena on helpottaa näitä laboratoriorutiineja vähentämällä käsin tehtävä työn osuutta. Menetelmä kehitettiin tuottamaan tuloksia, jotka olisivat vertailukelpoisia EN ISO 4833, BAM ja SMEDP-standardien kanssa. TEMPO-menetelmässä toteutetaan automatisoidusti pienessä mittakaavassa MPN-määrittäminen (*Most Probable Number*). Menetelmä perustuu siihen, että useita kertoja peräkkäin laimennettaessa näyte ei loppujen lopuksi sisällä ainuttakaan solua. Alkuperäisestä näytteestä valmistetaan useita erilaisia laimennuksia koeputkiin, jolloin niiden kasvusta tai sen puutteesta voidaan laskea, kuinka paljon soluja alkuperäisessä näytteessä todennäköisimmin oli. Tulos voidaan lukea MPN-taulukosta, joka on liitteessä 1. (1.)

TEMPO-menetelmässä sama periaate toteutuu kämmenen kokoisella muovikortilla, jossa lasiset koeputket on korvattu muovikortin pienillä uurteilla, joiden tilavuudet ovat 225 µl, 22,5 µl ja 2,25 µl. Kasvun aikana mikrobit kuluttavat alustan substraattia ja vapauttavat samalla fluoresoiva 4MU-yhdistettä (4-methylumbelliferone), jolloin kasvua sisältäneet näytekaivot erottuvat selvästi UV-valossa. TC (total coliform) ja EB (enterobacteriae) kohdalla vastaava mittaus perustuu pH:n alenemiseen subsatraatin hajottamisen sijasta. Bakterikasvu tuottaa happoa, minkä seurauksena alustan pH-arvo laskee alle kuuden ja sen 4MU muuttuu UV-valossa näkymättömäksi. TEMPO-menetelmässä on erilaiset testit kokonaisbakteerimääritykseen sekä enterobakteerien ja koliformien pitoisuuksien tutkimiseen.

Menetelmässä automatisoidaan useita vaiheita, jolloin standardimenetelmään verrattuna analyysien tekemisestä jäävät pois alustan valmistaminen, näytteiden laimentaminen, laimennusten siirrostus maljoille, pesäkkeiden laskeminen ja tulosten kirjaaminen. TEMPO-menetelmän käyttö kuitenkin edellyttää näytteen valmistelua, homogenisointia, pipetointia ja inkubointia, jolloin työn osuus lyhenee selvästi, mutta inkubointi on edelleen merkittävä osa koko määrittämyksen kestosta. TEMPO-menetelmää ei voida kutsua pikamenetelmäksi, koska näytteen käsittelyn ja tulosten lukemisen välinen aika on inkuboinnin vuoksi edelleen pitkä.

TEMPO-menetelmän käyttö vaatii kuitenkin vähemmän työvoimaa kuin perinteisten menetelmien käyttö, joten sillä voidaan analysoida suuriakin näytemääriä suhteellisen vaivattomasti. TEMPO-menetelmällä voidaan selvittää kokonaisbakteerimäärä, enterobakteerit, koliformit, *E.coli*, staphylococcus-suvun bakteerit, maitohappobakteerit sekä hiivat ja homeet. Näiden mikrobien pitoisuuksia seuraamalla saadaan käsitystä tuotteen puhtaudesta ja tuotantoprosessin hygieniatasosta. Yksittäinen testi havaitsee luotettavasti vain tietyt mikrobipitoisuudet, mutta tarkan mittauksen aluetta voidaan kuitenkin laajentaa käyttämällä erilaisia laimennuksia, jolloin kokonaismääritysalue on 1...4 900 000 pmy/g. Nämä rajat johtuvat siitä, että näytteen laimennuksen on oltava 1/4, 1/40 tai 1/400. Näytteitä voisi periaatteessa laimentaa enemmänkin, jolloin kokonaismääritysalue voisi olla nykyistä laajempikin. Käytännössä näin ei kuitenkaan voi tehdä, koska näytteitä kirjatessa tietokoneohjelmaan on syötettävä yksi kolmesta laimennuskertoimesta, jotta ohjelma voisi laskea alkuperäisen näytteen mikrobipitoisuuden oikein. (2.)

2 Tavoitteet

Työn päätavoite oli testata, kuinka hyvin TEMPO-menetelmä soveltuu maitotuotteiden mikrobimäärityksiin. Lisäksi keinotekoisesti kontaminoiduilla näytteillä tutkittiin tulosten lineaarisuutta. Rasvattoman maidon oli aikaisemmin havaittu aiheuttavan ongelmia erilaisissa mikrobimäärityksissä, joten tämänkään menetelmän käyttökelpoisuus ei ollut itsestään selvää.

Toinen tavoite oli selvittää, kuinka paljon aikaa TEMPO-menetelmä voisi säästää. Työssä verrattiin niitä aikoja, jotka kuluivat TEMPO-menetelmällä ja standardimenetelmällä yhden näytteen analysointiin. Inkubointiaikaa ei huomioida tässä tarkastelussa, sillä sen lyhentäminen ei selkeästikään ollut bioMérieux:n päätavoite, eikä se myöskään merkittävästi eronnut standardimenetelmän inkubointiajasta.

3 Automaatio ja pikamenetelmät mikrobiologiassa

Monet mikrobiologian menetelmät pohjautuvat yli sata vuotta vanhoihin menetelmiin, mutta 1960-luvun jälkeinen elektroniikan kehitys on muuttanut tätäkin alaa

merkittävästi. Biokemiallisten reaktioiden ja vuorovaikutusten parempi tunteminen on johtanut immunologisiin testeihin ja biosensoreihin. Mikrobit kasvavat kuitenkin edelleen samalla nopeudella kuin ennenkin, mutta lähes kaikkea muuta on onnistuttu nopeuttamaan aina näytteenotosta tulosten kirjaamiseen ja tulkintaan. Parhaimmillaan suurissa laboratorioissa tavallisimmat analyysit voidaan myös toteuttaa automaatiolinjaston avulla. Tällöin työntekijöiden täytyy enää asettaa näytteet koneeseen ja vetää oikeat johtopäätökset sen antamista tuloksista. Kokonainen automaatiolinjasto voi suorittaa esimerkiksi verinäytteelle tavallisimmat esikäsitteilyt ja testit. Automaatioon turvaudutaan kuitenkin pääsääntöisesti silloin kun näytemäärien odotetaan olevan hyvin suuria. Muutaman satunnaisen testituloksen lukemiseen ei tavallisesti hankita mitään erillisiä laitteita, mikäli ilman niitäkin voi tulla toimeen. (3, s. 1–3.)

3.1 Näytteenotto

Pintojen hygienian analysointi on aina ollut ongelmallista ja todennäköisesti sellaisena se tulee toistaiseksi pysymäänkin. Aikaisemmin käytettiin pumpulipuikkoja tietyn pinta-alan pyyhkimiseen. Tämän jälkeen puikoista pestiin mikrobit pois ja siihen käytetty vesi viljeltiin maljoille, joista tulokset luettiin inkuboinnin jälkeen. Nykyään näytteenotto ja viljely on onnistuttu yhdistämään kasvatusalustalla, jolla kosketetaan suoraan analysoitavaa pintaa. Saman asian ajaa teippi, joka asetetaan näytteenoton jälkeen kasvatusalustalle. Professori Fung kehitti vuonna 2000 ranteeseen kiinnitettävän teippiannostelijan, joka mahdollistaa pintanäytteiden ottamisen vaivattomasti ja hygieenisesti. (3) Tiettyjen tuotteiden kohdalla tuotantolinjastoilta voidaan automaattisesti poimia näytteitä jatkotutkimuksiin, mutta merkittäviä helpotuksia varsinaiseen näytteenottoon ei ole saavutettu.

3.2 Esikäsitteily

Näytteiden esikäsitteilyä on monissa tapauksessa mahdollista automatisoida ja tehostaa. Elintarvikenäytteitä analysoitaessa ongelmaksi muodostuu näytteen heterogeenisyys. Aikaisemmin käytettiin erilaisia tehosekoittimen kaltaisia laitteita näytteen hienontamiseksi, joista ehkä tunnetuin sekoitinmerkki on Ultra-Turrax. Suurella nopeudella pyörivät terät voivat vahingoittaa näytteen mikrobeja, jolloin mittaustulos ei enää ole luotettava. Esimerkiksi homeen myseeli pilkkoutuu useaksi pieneksi palaseksi, joista jokainen kasvaa maljalla omaksi pesäkkeekseen ja antaa

näin ollen kuvan todellista suuremmasta solupitoisuudesta. Jollei sekoitinta jäähdytetä, nousee sen lämpötila, ja bakteereita vaurioituu tai kuolee sekoituksen aikana, jolloin mittaustulos jää todellista tulosta pienemmäksi. Tämän lisäksi sekoittaessa muodostuu myös aerosoleja, jotka leviävät hyvin helposti ja voivat kontaminoida muita näytteitä. Pyörivän terän käyttö on perusteltava hyvin, sillä sen haittavaikutukset, kuten jatkuva huolto, hygieniariskit ja tulosten epäluotettavuus voidaan välttää vaihtoehtoisilla menetelmillä. (3, s. 5.)

Nykyään on erilaisia stomacherin-kaltaisia sekoituslaitteita, joissa sekoitustulos on lähestulkoon yhtä hyvä kuin Ultra-Turraxilla. Stomacher-laitteissa näyte asetetaan laimennusveden kanssa steriiliin muovipussiin, jota kone puristelee muutaman minuutin ajan. Näyte on kosketuksissa vain steriilin muovipussin kanssa, jolloin yksikään koneen osa ei vaadi jatkuvaa sterilointia, eikä näyte altistu korkeille lämpötiloille homogenisoinnin aikana. Nämä samat edut saavutetaan myös uudessa pulsifier-laitteessa, jossa näyte ja laimennusvesi ovat stomacherin tapaan steriilissä pussissa. Pulsifier ei kuitenkaan litistele pussia, vaan kohdistaa siihen voimakasta värähtelyä. Alkuperäinen näyte pysyy lähes koskemattomana, mutta mikrobit irtoavat silti näytteestä veteen. Tutkittava neste pysyy paljon kirkkaampana, kuin jos se olisi homogenisoitu stomacherilla. Näytteen kirkkaudesta on merkittävä hyöty, koska silloin pipetit eivät tukkeudu ja tulosten lukeminenkin on helppoa. Tavallisesti 10^{-1} laimennuksesta tehdyn kasvatusmaljan lukeminen on vaikeaa, koska kasvatusalustan seassa on runsaasti sameaa näytteestä peräisin olevaa lientä. Kirkkaalta maljalta tulokset voidaan myös lukea luotettavasti koneellisesti. (3, s. 4–5.)

Spiral Biotechin kehittämä Gravimetric Diluter suorittaa näytteen laimennuksen automaattisesti. Siinä näyte asetetaan steriilissä pussissa laitteen vaa'alle. Laite punnitsee näytteen ja laskee halutun laimennussuhteen perusteella laimennusveden oikean määrän ja lisää sen automaattisesti näytteen sekaan. (3, s. 5.)

3.3 Kasvatus

Spiral Biotech on myös kehittänyt hyvin omaperäisen tavan tehdä kokonaisbakteerimäärityksiä. Kone levittää nestemäisen näytteen agar-maljalle Arkhimedeen spiraalin muotoon. Spiraalissa kukin kierros on vakioetäisyydellä edellisestä kierroksesta, joten maljan pinta-ala hyödynnetään mahdollisimman hyvin. Samalla näytteen konsentraatio pienenee ulkokehälle edetessä ja kuhunkin paikkaan

siirrostettu tilavuus tunnetaan tarkasti. Tällöin maljan keskiosaan kasvaa eniten pesäkkeitä ja reunoille vähiten. Tulokset myös analysoidaan toisella saman yrityksen laitteella, joka ottaa huomioon juuri tämän epätavallisen menetelmän ja hyödyntää sitä mittaustuloksen laskemiseksi. Yhden maljan siirrostaminen ja lukeminen kestää vain joitain sekunteja, mutta inkubointiaikaa menetelmä ei lyhennä.

3.4 Tulosten lukeminen

UV-valossa maljojen ja putkien kuvaaminen on hyväksi havaittu ja usein sovellettu menetelmä. Fluoresoivat merkkiaineet ovat osoittautuneet turvallisemmiksi ja helppokäyttöisemmiksi kuin niiden radioaktiiviset vastineet. Etenkin immunologisissa pikatesteissä tulokset ovat usein nähtävissä ilman apuvälineitäkin ja mitä helpompaa tulosten lukeminen on, sitä todennäköisemmin se myös koneistetaan. Etenkin kokonaisbakteerimäärityksissä voidaan käyttää automaattista laskentaa, jossa malja kuvataan ja tietokoneen kuvantulkintaohjelma määrittää sen perusteella näytteen mikrobipitoisuuden.

3.5 MPN:ään perustuvat menetelmät

TEMPO-menetelmän lisäksi on olemassa muitakin MPN-menetelmään perustuvia järjestelmiä. Esimerkiksi ISOGRID-järjestelmässä bakteereita viljellään levyllä, jossa on 1600 pientä neliötä. Laitteen suodattimen läpi laskettu neste jakautuu tasaisesti kaivoihin ja näytteessä olleet mikrobit tarttuvat kasvatusalustaan. Kaivojen seinämät on tehty hydrofobisesta materiaalista, joka estää mikrobien kulkeutumisen kaivosta toiseen, jolloin kukin kaivo edustaa yksittäistä MPN-putkea.

Myös SimPlate -niminen tuote perustuu MPN-menetelmään, mutta siinä kasvatuskaivoja on 198. Tavallisesti tällaiset usean kaivon kortit ovat olleet nelikulmaisia ja kaivot sijainneet tasaisesti kortin joka osassa, mutta SlimPlate -menetelmässä käytetään pyöreää maljaa, jossa kaivot sijaitsevat kehällä. Keskiosaan kaadetaan näyte ja kuivattua kasvatusalustaa, minkä jälkeen maljaa sekoitetaan pyörivin liikkein, jolloin näyte ja alusta sekoittuvat keskenään ja jakautuvat tasaisesti kaikkiin kaivoihin maljan kehällä. Ylimääräinen neste imeytetään maljan mukana tulevaan sieneen ja inkuboinnin jälkeen tulokset luetaan UV-valossa. (3, s. 9–11.)

3.6 Immunologiset testit

Monet testit toimivat enemmän tai vähemmän samalla periaatteella kuin ELISA-testi. Itse toteutuksessa on tapahtunut paljonkin uudistuksia, joista ehkäpä poikkeuksellisin käyttää ferromagneettisia hiukkasia kantajamateriaalina. Tällöin rautahippusen pintaan kiinnittyneet antigeenit voidaan helposti erottaa muusta liuoksesta voimakkaan magneettikentän avulla. BioMérieux on myös valmistanut VIDAS-järjestelmän, jossa ELISA-testi on toteutettu automatisoidusti. Vaikka testi onkin melko yksinkertainen ja helppo, vaatii se silti työvoimaa, joten VIDAS-järjestelmä on erityisen hyödyllinen juuri elintarvike- ja sairaalalaboratorioissa, sillä niissä tehdään paljon tunnistustutkimuksia juuri ELISA-testeillä. (3, s. 11–14.)

4 Maitotuotteiden hygienia

4.1 Maidon mikrobiologia

Maidossa on jo luonnostaan erilaisia bakteereita, joista kaikki eivät kuitenkaan varsinaisesti pilaa maitoa, joten bakteerikasvun laadulla ja määrällä on merkitystä lopputuloksen kannalta. Yleisesti ottaen voidaan sanoa, että ilmiselvää pilaantumista havaitaan aistinvaraisesti maidon mikrobipitoisuuden saavuttaessa arvon $10^6 \dots 10^7$ pmy/ml. Varsinaisen pilaantumisen vaikutukset ja haitat riippuvat paljolti kontaminoivan mikrobin tyypistä ja siitä, millä tavoin ne kulloinkin maidossa toimivat. Tietyissä tapauksissa pienikin bakteeripitoisuus voi pilata maidon ja toisissa taas suurikaan määrä ei oleellisesti vaikuta makuun. Eräessä kaksi viikkoa säilytetyssä maidossa ei todettu aistinvaraista pilaantumista, vaikka mikrobiologisissa testeissä solupitoisuudeksi todettiin yli 10^8 pmy/ml (4, s. 100).

On kuitenkin suositeltavaa olla valmistamatta maitoa raakamaidosta, jonka solupitoisuus ylittää $5 \cdot 10^6$ pmy/ml, mutta eri maiden viranomaiset tavallisesti asettavat rajan alemmaksi. Myös säilyvyyden vuoksi kannattaa käyttää mahdollisimman puhdasta maitoa, koska raakamaidon bakteeripitoisuuden ylittäessä 10^6 pmy/ml ei siitä valmistetun maidon voida odottaa säilyvän juomakelpoisena viikkoa pidempään.

Nykyään maitoon voidaan myös lisätä tiettyjä probiootteja positiivisten terveysvaikutusten aikaansaamiseksi, jolloin yksin mikrobipitoisuus ei välttämättä kerro kovinkaan paljoa tuotteen puhtaudesta. Tavallisen maidon kohdalla sen perusteella kuitenkin voidaan päätellä jotain maidon pilaantumisasteesta, koska tavallisessa maidossa useimmiten kasvavat bakteerit vaikuttavat negatiivisesti tuotteen makuun ja muihin ominaisuuksiin. Toisaalta hapanmaitotuotteet nimenomaan perustuvat tiettyyn maitohappobakteerikantaan, joka pitää pilaantumista aiheuttavat mikrobit loitolla. Vaikka maitohappobakteereita olisi tuotteessa hyvin runsaastikin, ei siinä tapauksessa puhuta pilaantuneesta maidosta, sillä niiden muuttama maito on eri tuote, jolla on jo oma asemansa ruokakulttuurissa. Pastöroinnin jälkeen maidon mikrobifloora koostuu pääasiassa samoista bakteereista, joita elää raakamaidossakin. Jälkikontaminaation kautta tuotteeseen voi tietysti päästä myös epätavallisia bakteereita. (4, s. 98–101.)

Maidon korkea veden aktiivisuus, ravinteiden runsaus ja lähes neutraali pH (6,4...6,6) luovat monille mikrobeille hyvät kasvuolosuhteet. Aseptisesti lypsetty maito ei sisällä merkittäviä määriä mikrobeja, vaan saattaa joissain tapauksissa jopa olla steriiliä. Tavallisimmin mikrobipitoisuus on kuitenkin välillä 10^3 ... 10^4 pmy/g. Jos lehmien hygieniasta ja lypsyn aseptisuudesta pidetään hyvää huolta, on maidossa tavallisesti mikrobeja alle 10^2 ... 10^3 pmy/g.

Tavallisesti utareet eivät ole aivan puhtaita ja niissä saattaa olla myös infektioita ja/tai mastiittia, joka on utareen tulehdussairaus. Varsinainen mastiitti ei aina johdu bakteeriperäisestä infektiosta, mutta sen yhteydessä kuitenkin on usein muita bakteerinfektioita, jolloin raakamaidon bakteeripitoisuus ylittää helposti 10^5 pmy/ml. Vakavan mastiitin aikana raakamaidosta on mitattu 10^8 pmy/ml ylittäviä pitoisuuksia, jolloin maito on käyttökeltontonta. Tällaisissa tilanteissa infektio hoidetaan antibioottikuurilla ja sen aikana lypsettyä maitoa ei voi myydä meijerille. Koska lievemässäkin tulehduksessa maidon ulkonäkö muuttuu silmin havaittavasti, on mastiitti merkittävä taloudellisen tappion aiheuttaja maitoteollisuudessa. Osa tappioista johtuu myös antibioottikuurin jälkeisestä ajasta, jolloin lypsettyä maitoa ei voida käyttää mahdollisten antibioottijäämien vuoksi. (5, s. 125.)

Tavallisimmin raakamaidossa elää *Streptococcus* ja *Micrococusi*-sukujen bakteereita. Mastiitin yhteydessä todennäköisimmin esiintyy *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Pseudomonas aeruginosa*, ja *Corynebacterium pyogenes* -lajien bakteereita, joista kolme ensin mainittua ovat

ihmiselle patogeeneja. Toisinaan ilmenee myös muita lajeja, kuten *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis* ja *Mycobacterium tuberculosis*. Suomessa kuitenkin näistä esiintyy vain *L. monocytogenes* -lajia. (5, s. 125–126.)

Piilevän mastiitin aikana maidon bakteeripitoisuus voi nousta arvoon 10^5 pmy/ml. Patogeenisen kontaminaation lähteitä ovat tavallisesti multa ja lanta. Näiden kautta erityisesti *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* ja *Bacillus* -lajit voivat päästä utareisiin ja edelleen maitoon. Rehun kautta maitoon voi päätyä myös *Clostridium* -suvun bakteereita, kuten *C. butyricum* ja *C. tyrobutyricum*. Maidon kanssa tekemisissä olevien pintojen säännöllinen pesu ehkäisee kontaminaatioita tehokkaasti. Satunnainen pintojen likaantuminen voi kuitenkin johtaa korkeisiin bakteeripitoisuuksiin, mutta asia saadaan korjattua pastöroinnilla. Pitkäaikainen hygienian puute mahdollistaa hitaasti kasvavien termoresistenttien mikrobien, kuten *Micrococcus* ja *Enterococcus* -sukujen bakteerien kasvun. Ne voivat selviytyä pastöroinnista ja näin ollen heikentää lopputuotteen laatua merkittävästi. Raakamaidon kylmäsäilytys suo otolliset kasvuolosuhteet myös psykrotrofeille bakteereille, ja kaikkein tavallisimmin raakamaidosta tavatut gram-negatiiviset sauvamaiset bakteerit kuuluvat sukuihin *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* ja *Flavobacterium*, mutta myös psykrotrofeja coliformeja on löydetty maidosta. Pilaantumisen kuitenkin aiheuttavat usein gram-positiiviset *Bacillus*-suvun bakteerit, koska ne tuottavat lämpöä kestäviä itiöitä. Psykrotrofit ja psykrofiilit bakteerit eivät kuitenkaan ole maitoteollisuuden merkittävin huolenaihe, joten mikrobiologiset testit painottuvat mesofilien havaitsemiseen. (5, s. 125–128.)

Maitoa pilaavat varsinaisesti bakteerit ja niiden tuottamat entsyymit. Vaikka itse entsyymien tuottaja tuhottaisiinkin pastöroinnissa, sen entsyymit voivat silti aiheuttaa pahaa makua, väriaihteluita tai maidon rakenteen muutoksia. Entsyymattainen pilaantuminen johtuu pääasiassa bakteerien tuottamista solun ulkoisista katabolisista entsyymeistä, joilla bakteeri normaalioloissa hajottaa sellaisenaan sille soveltumattomia ravinneaineita helposti hyödynnettävään muotoon. UHT-käsittely pyrkiikin tuhoamaan tai inaktivoimaan molemmat pilaantumisen aiheuttajat, jolloin tuotteen säilyvyys pitenee huomattavasti. (4, s. 98–101.)

4.2 Lämpökäsittelyt

Louis Pasteur tutki mikrobeja 1860-luvulla ja havaitsi niiden kuolevan 50...60 °C lämpötilassa, jolloin jo muutaman minuutin lämpökäsittelyllä voitiin ehkäistä tai vähintäänkin lykätä ruuan pilaantumista. Hänen mukaansa nimetyn lämpökäsittelyn tavoitteena on denaturoida kataboliset entsyymit ja tuhota vegetatiivisolut tai ainakin vähentää niiden määrää oleellisesti. On olemassa useita erilaisia pastörintitapoja, jotka eroavat toisistaan lämpötilan ja käsittelyajan suhteen. Korkeassa lämpötilassa mikrobeja kuolee enemmän samassa ajassa kuin matalassa lämpötilassa, mutta korkea lämpötila muuttaa samalla maidon makua. Näin ollen matala lämpötila olisi maun kannalta suotuisampi vaihtoehto, mutta se vaatii vastaavasti pitkän käsittelyajan. (4, s. 92–94.)

Vuoteen 1956 asti pastörintilämpötila oli määräytynyt *Mycobacterium tuberculosis*-bakteerin lämpöherkkyyden mukaan, koska sen katsottiin olevan parhaiten lämpöä kestävä patogeeni. Myöhemmissä tutkimuksissa kuitenkin havaittiin sitä paremmin lämpöä kestäviä patogeeneja, joten pastörintilämpötila nostettiin 63 °C:seen. Ei ole olemassa vain yhä ainoaa pastörintitapaa, vaan lämpökäsittely valitaan tapauskohtaisesti ja nykyään USA:ssa käytetään taulukon 1 mukaisia lämpötiloja ja aikoja. Siinä nähdään selkeästi, että vähäininkin lämpötilan nosto lyhentää pastörintiaikaa merkittävästi. (4, s. 95.)

Taulukko 1. Pastörintilämpötilat ja -ajat.

T [°C]	t
63	30 min
72	26 s
89	1,0 s
90	0,5 s
94	0,1 s
96	0,05 s
100	0,01 s

(4, s. 94.)

Mikäli tuotteen halutaan säilyvän erityisen pitkään, voidaan se käsitellä UHT-menetelmällä, joka perustuu tavallista pastörintia korkeampien lämpötilojen käyttöön. UHT-käsittely tuhoaa melkein kaikki vegetatiivisolut ja itiöt, sekä denaturoi entsyymit.

Tällaisen käsittelyn läpikäyneet maitotuotteet säilyvät kolmesta kuukaudesta jopa vuoteen, mikäli purkkia ei avata ja se säilytetään huoneenlämmössä. Viileässä säilytetyn UHT-maidon säilyvyysaika pitenee vielä entisestään. Käsittelyn yksityiskohdissa on runsaasti maakohtaista vaihtelua, mutta yleisesti ottaen kuitenkin käytetään 135...150 °C lämpötiloja ja 2...8 s käsittelyaikoja. Toisin sanoen alle 135 °C lämpötiloja ei pidetä UHT-käsittelyinä.

Ruotsalainen TetraPak-yritys kehitti vuonna 1961 uudenlaisen pakkauksen, jonka ansiosta maitotuotteet voitiin pakata hermeettisesti ja aseptisesti, jolloin UHT-käsittelyllä alkoi olla runsaasti merkitystä säilyvyysaikojen kannalta. Sitä edeltäneet pakkaukset ja pakkausmenetelmät eivät eristäneet sisältöä mikrobeilta kovin hyvin, jolloin puhdaskin maito pilaantui melko pian. Laadukas pakkaus ja kunnollinen lämpökäsittely ovat pidentäneet säilyvyysaikoja merkittävästi, ja tästä syystä TetraPak-pakkauksia käytetäänkin laajalti monissa maissa. (4, s. 94–97.)

Lämpökäsittelylaskelmat ovat erittäin herkkiä lämpötilan vaihteluille, joten niissä steriloinnin lämpötila oletetaan usein vakioksi. Jos lämpötilaa nostetaan vähänkin, lyhenee sterilointi- ja pastörintiaika huomattavasti. Mikrobien tuhoutuminen lämmön vaikutuksesta voidaan arvioida yhtälöiden 1 ja 2 avulla. Vegetatiivisolut kuolevat itiöitä herkemmin, joten lyhyelläkin käsittelyllä voidaan merkittävästi vähentää mikrobien määrää. Itiöiden tuhoaminen vaatii enemmän aikaa ja korkeamman lämpötilan kuin pelkkien vegetatiivisolujen tuhoaminen. Jos kaikki solut tuhoutuvat lämpökäsittelyssä, voidaan sitä kutsua pastöroinnin sijasta steriloinniksi.

$$\frac{dN}{dt} = -k_d(N_0 - N') = -k_d t \quad (1)$$

$$\ln \frac{N_0}{N} = k_d t \quad (2)$$

N on elävien solujen lukumäärä lämpökäsittelyn jälkeen

N_0 on elävien solujen alkuperäinen lukumäärä

N' on kuolleiden solujen lukumäärä

k_d on ensimmäisen kertaluvun kuolemisvakio.

(6, s. 137.)

4.3 Kokonaisbakteerimäärä

Vaikka maito olisi läpikäynyt minkä tahansa lämpökäsittelyn, on aina olemassa jälkikontaminaation mahdollisuus. Pastöroidun maidon kokonaisbakteerimäärytyksessä havaitaan pääasiassa samoja bakteereita, joita siinä oli ennen lämpökäsittelyä. Toisinaan pakkausprosessi sekä -materiaali voivat aiheuttaa kontaminaatioita, jolloin maitoon voi päätyä myös muitakin lajeja. Pakkausmateriaalina käytetty kartonki voi toisinaan sisältää pieniä määriä homeitiöitä, jotka alkavat lisääntyä pitkän säilytyksen aikana. Mikäli siitä kulkeutuu tuotteeseen mikrobeja, saattavat ne olla esimerkiksi *Penicillium*-homeita, mutta myös aerobisia itiöitä muodostavia bakteereita, kuten *Bacillus* ja *Paenibacillus* -bakteereita on eristetty pakkauskartongista. Homeiden ilmaantumista UHT-maidossa on havaittu vasta kun maitoa on säilytetty yli 45 päivää. (4, s. 107–108.)

4.4 Enterobakteerit

Enterobacteriaceae-heimon tavallisimpia sukuja ovat *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia* ja *Yersinia*. Ne ovat suoria sauvamaisia liikkuvia bakteereita, jotka eivät muodosta itiöitä. Ne ovat anaerobeja tai fakultatiivisesti anaerobeja, joten niiden hapensietokyky riippuu suvusta. Ne ovat myös oksidaasinegatiivisia ja gramnegatiivisia, ja valtaosa on myös katalaasipositiivisia. Glukoosista ne kykenevät fermentoimaan happoja. (7, s. 1–2.)

Enterobakteereihin kuuluvat myös koli-ryhmän bakteerit. Ne muodostavat laktoosista kaasua ja happoa. Sen tavallisimpia edustajia ovat *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* ja *Citrobacter* -suvut. Nämä kuumennuksessa tuhoutuvat bakteerit ovat hyvä hygieniaindikaattori, koska niiden havaitseminen pastöroinnin jälkeen viittaa selvästi jälkikontaminaatioon. (7, s. 1–2.)

4.5 Maidon kautta välittyvät ruokamyrkytykset

Tavallisimmat ruokamyrkytykset johtuvat bakteerien tuottamista toksineista. Seuraavien patogeenien on havaittu aiheuttavan ruokamyrkytyksiä maidon välityksellä: *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. sphaericus*, *B. brevis*, *B. pumilus*, *Campylobacter* -lajit, *Listeria monocytogenes*, *Salmonellan* useat serotyypit ja *Staphylococcus aureus*. Osa bakteereista lisääntyy myös suolistossa, jolloin

ruokamyrkytys voi muuttua infektioksi. Monet bakteerit ja niiden toksiinit tuhoutuvat pastöroinnissa, mutta muutamat bakteerit ja niiden toksiinit ovat osoittautuneet ihmiselle haitallisiksi esikäsitteilyistä huolimatta. Näissä tapauksissa joko toksini tai itse kontaminantti säilyy riittävän vahingoittumattomana ruoansulatuskanavaan saakka. Useat ruokamyrkytykset ilmenevät oksenteluna, vatsakipuina, kramppeina, ripulina, veriripulina, kuumeena, päänsärkynä ja voimattomuutena tai näiden erilaisina yhdistelminä. (8, s. 21, 27, 32, 59, 70, 86.)

5 Epävarmuuden lähteet

5.1 Mikrobeista johtuva mittausepävarmuus

Kemia ja mikrobiologia eroavat toisistaan mittaustarkkuuden osalta merkittävästi. Molemmille on kuitenkin yhteistä se, että osa tutkittavista yksiköistä reagoi odotusten mukaisesti, osa reagoi epätavallisella tavalla ja osa jää kokonaan reagoimatta. Yksittäisen yksikön liikkeitä ei voida ennustaa tarkasti, mutta koska äärimmäisimmät ilmiöt ovat harvinaisia, voidaan joukon keskimääräinen käyttäytyminen ennustaa suhteellisen hyvin. Mitä enemmän tutkittavia hiukkasia reaktioon osallistuu, sitä ennustettavammin atomit, molekyylit ja mikrobit joukkona reagoivat. Tällöin voidaankin sanoa, että kemiallisissa analyyseissä on suurempi tilastollinen otanta kuin mikrobiologisissa analyyseissä. Kemiallisissa analyyseissä tutkittavia hiukkasia on näytettä kohti usein noin 10^8 molekyyliä tai useita kertaluokkia enemmänkin, jolloin niiden suuri määrä tekee vakavan erehtymisen erittäin epätodennäköiseksi.

Jotta tulos olisi luettavissa, on näytettä laimennettava niin paljon, että lopullisessa kasvatusmaljassa pesäkkeitä olisi enintään 300. Tässä suuruusluokassa yksittäisten mikrobien ennalta arvaamattomuus alkaa vaikuttaa lopputulokseen merkittävästi, joten kymmenen pesäkettä sisältävä malja ei ole erityisen luotettava pienen otantansa vuoksi. Jos kymmenen pesäkkeen maljassa sattuukin olemaan yksi epätavallisen hitaasti kasvava pesäke, saattaa se jäädä pienen kokonsa vuoksi huomaamatta ja näin ollen vääristää tuloksia 10 %. Jos sadan pesäkkeen maljaan moinen poikkeama sattuisi, olisi sen tuloksia vääristävä vaikutus vain 1 %. Tämän ongelman ratkaisemiseksi on olemassa poikkeuksellisen suuria kasvatusmaljoja, mutta niiden kanssa työskentely on epäkäytännöllistä, joten niitä käytetään vain harvoin. Pienen

otannan kompensoimiseksi yhdestä näytteestä tehdään tavallisesti useita eri laimennuksia ja rinnakkaismaljoja. (9, s. 2–3; 10, s. 14.)

Mikrobien kohdalla ennalta arvaamattomuus tarkoittaa usein sitä, että osa niistä alkaa kasvaa heti ja osa vasta myöhemmin tai ei milloinkaan. Kasvu saattaa viivästyä esimerkiksi solujen vaurioitumisen vuoksi, jolloin niiltä kuluu aikaa vaurioiden korjaamiseen ennen normaaliin aineenvaihduntaan siirtymistä. Erityisesti lämpökäsiteltyjen näytteiden kohdalla vaurioituneet bakteerit ja itiöt jäävät helposti huomaamatta niiden viivästyneen kasvun vuoksi. Myöhässä kasvavat pesäkkeet saavat tavallisesti alkunsa vaurioituneesta tai muutoin poikkeavasta mikrobista. Niiden kuluttaessa aikaa johonkin muuhun kuin jakaantumiseen lisääntyvät terveet solut kovaa vauhtia, muodostavat näkyviä pesäkkeitä ja hautaavat alleen muut pesäkkeet.

Maljaviljelyn tulos ilmoittaa, kuinka monta pesäkettä muodostavaa yksikköä näytteessä vähintään on. Viljelyssä ei päästä varsinaisesti käsiksi todelliseen mikrobien määrään, sillä osa näytteen mikrobeista muodostaa näkyviä pesäkkeitä ja osa ei. Menetelmät kuitenkin antavat riittävän hyvän arvion todellisesta mikrobimäärästä. Kasvuun vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa lämpötilan vaihtelut, sekoitus, laimennus ja pH:n muutokset.

Monilla bakteereilla on myös taipumusta muodostaa ketjuja tai ryppäitä, eikä sekoituksessa voida taata, että jokainen bakteeri olisi irronnut muista bakteereista. Yksittäinen pesäke voi hyvinkin olla saanut alkunsa useamman mikrobin ryppäästä, jolloin pesäkkeen ei voida väittää varmasti kasvaneen yksittäisestä solusta. Tästä syystä mittaustulos kertoo pesäkkeitä muodostavien yksiköiden lukumäärän (pmy), eikä varsinaista solumäärää. Näytteessä saattaa myös olla anaerobisia mikrobeja, jotka eivät tämän työn mikrobimäärityksissä ilmene lainkaan. Anaerobisten bakteerien määrä kuitenkin oletettiin hyvin pieneksi. Eri mikrobit saattavat myös vaikuttaa toistensa kasvuun erittämällä esimerkiksi antibiootteja tai muita toisten solujen kasvua estäviä tai kiihdyttäviä yhdisteitä, jolloin etenkin kokonaisbakteerimäärityksessä heterogeenisen mikrobipopulaation koostumus saattaa vaikuttaa lopullisen tuloksen suuruuteen. Pesäkkeet voivat myös kasvaa hyvin lähellä toisiaan, saada epätavallisen muodon tai jäädä erittäin pieniksi. Kermojen kohdalla 10^0 ja 10^{-1} maljoista tuli hyvin sameita näytematriisin läpinäkymättömyyden vuoksi, jolloin maljojen lukeminen vaatii kirkkaan valon ja runsaasti huolellisuutta. (10, s. 14; 11, s. 58–60.)

Myös maljojen luku tuo oman epävarmuutensa tähän kokonaisuuteen, koska pesäkkeet lasketaan silmämääräisesti. Niin kauan, kun pesäkkeitä ei lasketa koneellisesti, ilmenee tuloksissa vääjäämättä toisinaan karkeita lasku- ja kirjausvirheitä. Uusintalaskennoissa ihmisen antaman laskutuloksen on havaittu vaihtelevan muutaman prosentin verran. Satunnaiset laskuvirheet johtuvat inhimillisistä erehdyksistä, maljalla olevista epäselvistä pesäkkeistä ja niitä muistuttavista partikkeleista. (10, s. 22.)

Tämän työn aikana tavallisimmaksi kontaminaation lähteeksi osoittautui vesihaude, jossa säilytettiin maljojen valamiseen tarvittavia agarosipulloja. Sieltä maljalle pääsi muutaman kerran voimakkaan keltaisia pesäkkeitä muodostavia mikrobeja. Maidossa tavallisesti kasvavat bakteerit muodostivat lähes poikkeuksetta vaalean harmaita pesäkkeitä, joten kontaminaatiot havaittiin vaivattomasti. Tämä ei tietenkään poissulje niitä kontaminaatioita, jotka näyttävät samalta kuin tavalliset pesäkkeet, mutta niiden aiheuttama virhe oletettiin hyvin pieneksi.

5.2 Pipetoinnin mittausepävarmuus

Näytettä laimennettaessa käytettiin valmiita 9 ml peptonivettä sisältäviä koeputkia, jotka oli steriloitu laimennusveden mittaamisen jälkeen. Tällöin putkista johtuva epävarmuus s_b on 0,089 ml. Näytteiden siirrostuksessa käytettiin automaattipipettiä, joka oli säädetty mittaamaan 1 ml tilavuus, jolloin sen epävarmuus s_a on 0,0087 ml. Koska laimennuksissa pipetoitiin aina automaattipipetillä 1 ml näytettä 9 ml:aan peptonivettä, on tällöin yhtälöön 4 sijoitettavat a 1 ml ja b 9 ml. Näiden tietojen perusteella yhtälöillä 4 ja 6 voitiin laskea taulukon 7 luvut. (10, s. 65)

$$u_f = \frac{1}{a+b} \sqrt{s_b^2 + \left(\frac{b}{a}\right)^2 s_a^2} \quad (4)$$

u_f on laimennuksen suhteellinen epävarmuus.

a on pipetoidun näytteen tilavuus.

b on tilavuus johon näyte pipetoitiin.

s_a on mittauksen a epävarmuus

s_b on mittauksen b epävarmuus

$$u_f = \frac{1}{1\text{ ml} + 9\text{ ml}} \sqrt{0.098^2 + \left(\frac{9\text{ ml}}{1\text{ ml}}\right)^2 0.0087^2} \quad (5)$$

$$u_F = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 \dots u_k^2} \quad (6)$$

Taulukko 2. epävarmuuden riippuvuus laimennuksesta

laimennus	Epävarmuus (ml)
10^{-1}	0,0119
10^{-2}	0,0168
10^{-3}	0,0205
10^{-4}	0,0237

(10, s. 28–29, 65.)

5.3 Mittaustulosten epävarmuus

Maljatulosten kokonaisepävarmuuden laskemisessa käytetyt kolme lukuarvoa olivat: hiukkastilastollinen epävarmuus, siirrostustilavuuksien epävarmuus ja laimennuskertoimien epävarmuus. Useamman maljan mittainstrumentin hiukkastilastollinen epävarmuus u_c lasketaan yhtälöllä 8.

$$u_c = \sqrt{\frac{1}{\sum c_i}} \quad (8)$$

c = maljan pesäkemäärä

Eräästä näytteestä saatiin tulokset, jotka on esitetty taulukossa 15.

Taulukko 3. Mikrobimäärityksen esimerkkitulokset

Laimennus	pesäkemäärä
10^0	71
10^{-1}	12
10^{-2}	1

Tämän instrumentin hiukkastilastollinen epävarmuus on laskettu yhtälöllä 9.

$$u_c = \sqrt{\frac{1}{71+12+1}} \approx 0,1 \quad (9)$$

(10, s. 40, 57)

siirrosotustilavuus lasketaan yhtälön 10 mukaisesti.

$$V_s = \sum 10^L \quad (10)$$

V_s on siirrosotustilavuus

L on laimennuskertoimen eksponentti

Jos mikrobimääritys toteutetaan esimerkiksi neljän maljan instrumentilla, jossa laimennuskertoimet ovat 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-2} ja 10^{-3} , toteutettaisiin lasku yhtälön 11 mukaisesti.

$$V_s = 10^{-1} + 10^{-2} + 10^{-2} + 10^{-3} = 0,121 \text{ ml} \quad (11)$$

6 Materiaalit ja menetelmät

6.1 MPN

MPN-menetelmä soveltuu erityisen hyvin sellaisille mikrobeille, joita ei voida viljellä tavallisella agar-maljalla. Suuren työmääränsä vuoksi sitä ei myöskään käytetä ilman hyvää syytä. Koska MPN-menetelmässä ei lasketa pesäkkeitä, tulokset tulkitaan tilastotieteellisin menetelmin. Tuloksena saadaan alkuperäisen näytteen todennäköisin solupitoisuus. Jos näyte sisältää alun perin 3 pmy/ml, ja yksi millilitra näytettä jaetaan kymmeneen putkeen, todennäköisimmin kolmessa niistä havaitaan myöhemmin kasvua. Mitä enemmän putkia käytetään, sitä tarkempi tulos saadaan, mutta käytännön syistä yli viittä rinnakkaista putkea käytetään harvoin. Menetelmän varjopuolia ovat muun muassa tuloksen epätarkkuus ja työn määrä. Kymmeniin koeputkiin pipetoimiseen kuluu paljon aikaa, reagensseja kuluu runsaasti ja pestäviä laboratoriotarvikkeita joutuu käyttämään paljon. MPN-menetelmä soveltuu erityisen hyvin näytteille, joiden mikrobipitoisuuden oletetaan olevan erityisen alhainen.

(11, s. 58-60; 12, s. 104-105; 13, s. 2.)

Näytteestä tehdään vähintään kolmen putken laimennussarja ja kustakin laimennuksesta siirrostetaan sama tilavuus koeputkiin, joissa on nestemäistä kasvatusalustaa. Jokaisesta siirrostetusta putkesta tehdään vähintään kolme rinnakkaista putkea. Toisin sanoen pienin MPN-instrumentti sisältää yhteensä yhdeksän putkea. Jotta tulos olisi mahdollisimman tarkka, on käytettävä useita laimennuksia. Jos siis näytteen solupitoisuutta haarukoitaisiin neljällä laimennuksella ja kustakin laimennuksesta tehtäisiin kolme rinnakkaista putkea, inkuboitaisiin tällöin yhteensä 12 putkea. Suuren työmäärän vuoksi yli viiden rinnakkaisen putken MPN-instrumentteja käytetään hyvin harvoin. Kaikkia putkia kasvatetaan lämpökaapissa samassa lämpötilassa sama aika, minkä jälkeen kasvua havaitaan niissä putkissa, joihin on päätyntä yksi tai useampi mikrobi. Kasvua sisältäneet putket merkitään positiivisiksi ja loput negatiivisiksi. Menetelmä toimii, kunhan osa putkista on positiivisia ja osa negatiivisia, mutta mikäli kaikki putket ovat joko positiivisia tai negatiivisia, ei siitä voida vetää mitään täsmällistä johtopäätöstä. Siinä tilanteessa vastaukseksi voidaan vain ilmoittaa, että näytteen solumäärä joko ylitti tai alitti detektorajan. Kyseiset rajat riippuvat laimennusten ja rinnakkaisten näytteiden määristä. Oheisessa MPN-taulukoissa (liite 1) detektioalue on 0,3...110 pmy/ml.

Tulosten tulkitsemiseksi saman laimennuksen positiivisten putkien lukumäärä lasketaan yhteen. Tästä lukumäärästä lasketaan näytteen pitoisuus MPN-taulukon avulla. Siinä ensimmäinen laimennus tarkoittaa vahvinta liuosta, ja toinen laimennus saadaan ottamalla edellisestä 1 ml ja siirrostamalla se koeputkeen, joka sisältää 9 ml peptonivettä. Kolmannessa laimennuksessa menetellään samalla tavalla, mutta 1 ml siirrostetta otetaan toisesta laimennuksesta. Nykyaikana tulokset voidaan tarkempien tulosten saamiseksi analysoida myös tietokoneella, jolloin voidaan käyttää perinteistä taulukkoa monimutkaisempia tilastollisia menetelmiä. (14, s. 76.)

6.2 TEMPO-menetelmän teoria

TEMPO-menetelmässä käytetään muovisia kortteja, joiden kaivot muodostavat 16 putken kolmen laimennuksen MPN-instrumentin. Kaivot jaetaan positiivisiin ja negatiivisiin sen perusteella, onko testille ominainen biokemiallinen reaktio tapahtunut kasvatusalustassa. (15, s. 2.)

Kasvatusalustassa on glukoosiin sitoutunutta 4-metyyliubelliferonia (4MU), ja kaivossa kasvavat bakteerit vapauttavat sitä aineenvaihduntansa seurauksena, jolloin se

muuttuu fluoresoivaksi. TVC-testi perustuu bakteerien entsyymaattiseen aktiivisuuteen, joten mitä enemmän entsyymaattista aktiivisuutta kortin kaivoissa on, sitä voimakkaampi fluoresenssi-ilmiö havaitaan. (15, s. 3.)

TC- ja EB-testeissä puolestaan on kyse hapon muodostuksesta ja näiden testien kasvatusalustoissa 4MU on jo valmiiksi vapaana. Monet bakteerit tuottavat happoja normaalin hiilihydraattiaineenvaihdunnan sivutuotteena, jolloin alustan pH laskee alle kuuden ja 4MU lakkaa olemasta fluoresoiva. Tämä testi siis poikkeaa TVC:stä oleellisesti sikäli, että UV-valossa hohtavat kaivot eivät sisällä merkittävää bakteerikasvua eli ovat negatiivisia. Koska haponmuodostus on vahvasti yhteydessä bakteerikasvuun, kortit on luettava mahdollisimman pian niiden inkuboinnin jälkeen. (15, s. 3–4.)

6.3 TEMPO-menetelmän aikaisemmat validoinnit

Validointijärjestö Afaq AFNOR on jo validoinut TEMPO-menetelmän useille eri näytematriiseille. Vuonna 2004 sen on osoitettu toimivan tutkittaessa muun muassa lihaa, kissanruokaa, porkkanaa, munavanukasta ja pakastekalaa. Testiin valittiin 50 näytettä, joista 25 oli luonnollisesti ja 25 keinotekoisesti kontaminoituja. Maitotuotteille kattavaa testausta ei vielä ole suoritettu, joten tämän työn tulokset olivat hyödyllisiä myös bioMerieux:lle. (18, s. 1–4.)

6.4 Maljaviljelyn teoria

Bakteereita ja muita mikrobeja kasvatetaan tavallisimmin agarmaljoilla. Menetelmä perustuu siihen oletukseen, että näytteen yksittäinen mikrobi tai useamman mikrobin yhteenliittymä muodostaa maljalla yhden havaittavan pesäkkeen, joiden lukumäärästä lasketaan alkuperäisen näytteen mikrobipitoisuuden arvio. Näytettä laimennetaan tarpeen mukaan siten, että kullakin maljalla olisi sopiva määrä pesäkkeitä.

Kasvatusalustaan on usein laitettu erilaisia ravintoaineita, joiden avulla vain halutut mikrobit muodostavat näkyviä pesäkkeitä. Esimerkiksi vain laktoosia hiilen- ja energianlähteenä sisältävä kasvatusalusta karsii pois kaikki ne mikrobit, jotka eivät kykene hajottamaan laktoosia ja saamaan siitä kasvuun vaadittavaa energiaa. Samoin suolapitoisuudella, happamuudella, antibiooteilla ja monilla muilla tavoilla alustasta voidaan tehdä selektiivinen, eli valikoiva. Tämän lisäksi myös muut kasvatusolosuhteet, kuten lämpötila ja happipitoisuus vaikuttavat siihen, mitkä mikrobit niillä pesäkkeitä

muodostavat. Inkuboitessa maljoja hapettomissa oloissa aerobiset mikrobit eivät kasva lainkaan ja vastaavasti esimerkiksi viileässä inkuboitessa psykrofiilit bakteerit saadaan näkyviin. Usein valitaan kuitenkin joku tietty inkubointilämpötila 20...40 °C väliltä, koska tavallisimmat bakteerit kasvavat parhaiten näissä lämpötiloissa. Tunnettua mikrobia kasvatettaessa lämpötilaksi valitaan luonnollisesti kyseisen mikrobin optimilämpötila, mutta muissa tapauksissa lämpötila on usein 37 °C.

Kasvatusalustalla selviytyvät mikrobit kuluttavat ympäristönsä ravinteita, jolloin ne kasvavat paljain silmin havaittaviksi pesäkkeeksi. Kasvatuksen jälkeen maljoista lasketaan pesäkkeiden määrät ja näytteen mikrobipitoisuus lasketaan yhtälön 3 avulla. Niistä saadaan alkuperäisen näytteen pitoisuus painotetulla keskiarvolla. Eri laimennukset tehdään tavallisesti 1/10 suhteessa, joten maljojen pesäkelukumäärissä ilmenee noin kymmenkertaisia eroja. (9, s. 1; 10, s. 32; 11, s. 58–59; 16, s. 1.)

$$x = \frac{\sum c_i}{\sum v_i} \quad (3)$$

x on mikrobipitoisuus

c on laskettujen pesäkkeiden määrä

v on siirrostettu tilavuus

6.4.1 Maljavalumenetelmä

Kutakin esikäsiteltyä ja laimennettua näytettä pipetoidaan eri maljoille 1 ml. Näytteen päälle valetaan 12...15 ml steriiliä kasvatusalustaa, jonka lämpötila on 44...47 °C. Kasvatusalustan jähmettyessä mikrobit eivät pääse enää liikkumaan, jolloin niistä kasvaa selkeitä erillisiä pesäkkeitä. Inkubointiaika riippuu kasvatusalustasta ja tutkittavasta mikrobista. Maljat asetetaan kasvatuskaappiin ylösalaisin, jotta niihin muodostuva kondenssivesi ei koskettaisi kasvatusalustaa. Inkuboinnin jälkeen maljoilta lasketaan pesäkkeet ja eri laimennuksista lasketaan painotettu keskiarvo. (16)

6.4.2 VRBG-agarimenetelmä

Violet red bile glucose agar soveltuu erityisen hyvin kolirbakteerien tutkimiseen näytteestä. VRBG-agar ei kestä uudelleen sulattamista, joten tarvittava määrä joudutaan valmistamaan jokaista analyysiä varten muutamia tunteja ennen sen käyttöä. Maljat valetaan hieman poikkeavalla tavalla, sillä maljaan tulee kaksi kerrosta.

Maljan pohjalle lisätään 1 ml näytettä ja sen päälle valetaan noin 10 ml kasvatusalustaa. Sen jähmetyttyä päälle valetaan vielä noin 4 ml peittokerrokseksi. Ilman peittokerrosta kasvatusalustan pinnalle jäävät pesäkkeet eivät kasvaisi lajille tyypillisellä ja helposti tunnistettavalla tavalla, joten tällä menettelyllä voidaan välttää lukuvirheitä. Tyypillisellä tavalla kasvaessaan pesäkkeitä ympäröi punainen tai punertava saostumarengas, jolloin VRBG-maljojen lukeminen on hyvin sujuvaa ja helppoa. Maljoja inkuboidaan 24 ± 3 h, 37 ± 1 °C:ssa. (7, s. 1–2.)

VRBG-agar soveltuu sappea kestävien gramnegatiivisten enterobakteerien määrittämiseen ja sitä käytetäänkin laajalti elintarviketeollisuudessa; etenkin maitoteollisuudessa. Kasvatusalustan glukoosi toimii hiilen ja energian lähteenä ja peptoni puolestaan hiilen, typen, vitamiinien ja mineraalien lähteenä. Sappisuolat ja kristallivioletti inhiboivat grampositiivisten bakteerien kasvua, neutraalipuna toimii pH-indikaattorina ja natriumkloridi ylläpitää osmoottista tasapainoa. (13, s. 1–2.)

6.4.3 Pesäkkeiden laskusäännöt

Petrimaljojen pesäkkeiden laskennassa käytetään apuna pesäkelaskuria, jossa on pesäkkeiden havainnointia helpottava linssi ja himmeä taustavalo. Rinnakkaisista maljoista lasketaan aritmeettinen keskiarvo ja eri laimennuksista lasketaan laimennuskertoimella kerrottu painotettu keskiarvo. Maljalla saa olla 10...300 pesäkettä/malja, koska tätä pienemmät ja suuremmat luvut eivät tuota riittävän luotettavia tuloksia. Mikäli yhdenkään maljan pesäkemäärä ei osu välille tälle välille, lasketaan tulos niistä maljoista, jotka ovat lähimpänä toivottua määrää. Jos maljalle on pipetoitu laimentamatonta näytettä, eikä inkuboinnin jälkeen havaita ainuttakaan pesäkettä, ilmoitetaan tulokseksi <1 pmy/ml. Laimennetun näytteen kohdalla tyhjän maljan tulos olisi laimennuksesta riippuen esimerkiksi <10 pmy/ml tai <100 pmy/ml. Maljan pesäkemäärän ylittäessä 300 jaetaan malja useampaan osaan ja yhden osan pesäkemäärä lasketaan. Maljan lopullinen pesäkemäärä saadaan kertomalla tulos osien lukumäärällä. Malja voidaan jakaa kahteen tai neljään osaan, tai apuna voidaan myös käyttää laskentaruudukkoa. On kuitenkin syytä huomata, ettei tämä menetelmä ole kovin tarkka, joten siihen turvaudutaan vain tarvittaessa. Näin ollen maljat pyritään ensisijaisesti laskemaan kokonaan ilman pienempiin osiin jakamista. VRBG-maljojen kohdalla suotuisin pesäkemäärä on 15...150. Tätä suurempi määrä johtaa niiden epätavalliseen kasvuun, mikä vaikeuttaa laskentaa. (13, s. 2; 16; 7, s. 2.)

7 Reagenssit

7.1 Kasvatusalustat

Kontaminointeja varten tarvittava *E.coli* kasvatus toteutettiin BHI -liemessä.

Taulukko 4.BHI-liemi.

Aineen nimi	Pitoisuus (g/l)
Aivo- ja sydänuute	17,5
tryptosi	10,0
Glukoosi	2,0
Natriumkloridi	5,0
Dinatriumvetysofaatti	2,5

Laboratoriohenkilökunta valmisti MPCA-agarin ja se varastoitettiin jääkaappiin, josta sitä sulatettiin käytettäväksi tarpeen mukaan.

VRBG-agar täytyi valmistaa joka aamu erikseen, sillä se ei kestä uudelleenlämmittämistä. Taulukon 3 mukaiset aineet sekoitettiin ionivaihdettuun veteen ja seos kuumennettiin painekattilassa.

Taulukko 5.VRBG-agar

Ainen nimi	Määrä
Peptoni	7,0 g
Hiivauute	3,0 g
Laktoosi	10,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Sappisuolat	1,5 g
Neutraalipuna	0,03 g
Kristallivioletti	0,002 g
Agar	12...18 g
Tislattu vesi	1000 ml

Kasvatusalusta valmistetaan kuumentamalla se noin 100 °C :een, mutta varsinaisen autoklavoinnin korkeita lämpötiloja se kuitenkin ei kestä. Alustan pH:n tulee olla $7,4 \pm 0,2$. (13)

7.2 muut reagenssit

- peptonivesi
- TEMPO-reagenssit
- ionivaihdettu vesi

7.3 TEMPO TVC:n koostumus

- kasvutekijät
- puskuri
- ravinteet
- vaahdonestoaine
- kasvualustan pH on 7,4

8 Näytteet

8.1 Nestemäiset näytteet

Näytteiksi valittiin rasvaton maito, kevytmaito, kuohukerma, kevytkerma ja erilaisia maitojauheita.

8.2 Herajauheet

Juuston valmistuksen yhteydessä maidosta jää käyttämättä runsaasti heraa, joka sisältää osan maidon proteiineista, suolaa ja vettä. Heraa voidaan kuitenkin käyttää elintarviketeollisuuden raaka-aineena, ja siitä voidaan edelleen valmistaa ns. ”demijauhetta”, joka saa nimensä demineralisoinnista eli erilaisten suolojen poistosta. Suolanpoistomenetelmiä ja suolaisuusasteita on useita, ja mineraalien määrä vaikuttaa lopputuotteen makuun. Suolanpoistomenetelmä ilmoitetaan tuotteen nimen perässä olevalla lyhenteellä ja mikäli sen yhteydessä on joku luku, kertoo se siihen, kuinka monta prosenttia suolaa on poistettu. Valio käyttää muun muassa seuraavia lyhenteitä: SWP, 70 EDW, IEW ja LW. IEW-herasta on poistettu noin 90 % suolasta, ja LW-herasta noin 40 %. Prosesissa heran proteiinit ja sokerit jäävät lopputuotteisiin, joita voidaan hyödyntää esimerkiksi lastenruoissa. Vaikka maitojauheita oli useanlaisia,

kokeissa ne miellettiin samaksi näytematriisiksi. Erilaisten jauheiden lukumäärät ja testit on eritelty taulukossa 4. (17)

Taulukko 6. Onnistuneet herajauheet.

nimi	EB (kpl)	TVC (kpl)
rasvaton maitojauhe	14	30
SWP (sweet whey powder)	4	19
herajauhe	0	5
kirnumaitojauhe	0	3
EDW (electrodialysed whey)	2	2
yhteensä	20	20

Vaikka herajauhe näyttää maitojauheelta, veteen liotettuna se on kuitenkin keltaista. Suolapitoisuuden vaihteluista johtuen myös keltainen väri vaihtelee ja saattaa olla hyvinkin vaalea. Suolapitoisuuden vaikutus mittaukseen ja bakteerikasvuun oletettiin hyvin vähäiseksi, joten erilaisia demijauheita käsiteltiin kuin ne olisivat samaa ainetta. Tällöin siis erilaiset demijauheet laitettiin samaan kuvaajaan maitojauheiden kanssa.

9 Työn suoritus

9.1 Yleistä

Näytteet analysoitiin TEMPO-menetelmällä ja perinteisillä enterobakteeri- ja kokonaisbakteeriviljelymenetelmillä ja tuloksia verrattiin keskenään. Koska maitotuotteissa ei ole pääsääntöisesti riittävää määrää mikrobeja, eikä etenkin enterobakteereja, näytteitä kontaminoitiin keinotekoisesti referenssimikrobilla. Siihen käytettiin *Escherichia coli* ATCC 25922 -kantaa. Enterobakteeri- (EB) ja kokonaisbakteeritestit (TVC) tehtiin kontaminaatiopitoisuuksilla: 10^1 , 10^2 , 10^3 ja 10^4 pmy/g. Tämän lisäksi analysoitiin myös näytteitä, joihin ei ollut lisätty mitään bakteereita.

9.2 Näytteiden kontaminointi

Mikrobiologiassa standardipitoisuuksien valmistaminen on osoittautunut hyvin haasteelliseksi tehtäväksi. Kontaminaation suuruusluokka on tiedossa, mutta tarkka pitoisuus on kuitenkin joka kerralla erilainen.

Näytteitä kontaminoitiin keinotekoisesti *E. coli* ATCC 25922 -bakteereita sisältävällä BHI-liemellä, joka valmistettiin aina kokeita edeltävänä päivänä. Koeputkeen lisättiin reilu siirrostussilmukallinen bakteereita ja putki jätettiin vuorokauden ajaksi 37 °C lämpökaappiin. Siinä ajassa kasvatusliemen bakteeripitoisuudeksi tulee noin 10⁹ pmy/ml. Viikonloppuisin sama kasvatus toteutettiin erityisen ”katkaisukaapin” avulla, joka ohjelmoitiin pitämään putkea +5 °C:ssa perjantaista sunnuntaihin ja sen jälkeen 37 °C:ssa maanantaiaamuun saakka, jona aikana bakteerit olivat kasvaneet putkissa yhtä paljon kuin arkipäivisin.

Tästä viljelmästä valmistettiin kontaminaatiotasot 10⁴, 10³, 10² ja 10¹ pmy/ml. Kasvatusliuoksesta tehtiin laimennussarja aina 10⁻⁷ laimennukseen saakka, jolloin se sisälsi noin 10² pmy/ml. Siitä otettiin 1 ml ja sekoitettiin 9 ml:aan peptonivettä, jolloin sen bakteeripitoisuudeksi tuli noin 10¹ pmy/ml. Siirrostettaessa tätä liuosta 1 ml kasvatusmaljalle on odotettavissa, että maljalla kasvaisi noin kymmenen pesäkettä, jolloin MPCA-menetelmän alaraja saavutetaan.

Taulukko 7. Kontaminaatioiden laimennukset.

laimennus	Bakteeripitoisuus (pmy/ml)
10 ⁰	10 ⁹
10 ⁻¹	10 ⁸
10 ⁻²	10 ⁷
10 ⁻³	10 ⁶
10 ⁻⁴	10 ⁵
10 ⁻⁵	10 ⁴
10 ⁻⁶	10 ³
10 ⁻⁷	10 ²
10 ⁻⁸	10 ¹

9.3 Näytteiden esikäsittely

Standardimenetelmän ja TEMPO-menetelmän välillä oli muutamia eroja jo esikäsittelyvaiheessa. Nestemäisiä näytteitä ei laimennettu, eikä käsitelty muillakaan

tavoin. Maitojauhe ja juusto sekoitettiin ja hienonnettiin stomacher-homogenisaattorilla peptoniveteen. Kunkin kiinteän näytteen kohdalla sekoituspusssiin punnittiin 10 g näytettä ja 90 ml peptonivettä. Biomerieux oli toimittanut tätä tarkoitusta varten hyvin tukevia muovipusseja, joissa oli suodatinväliseinä. Suodattimen huokoskoko on 70 µm, joten sen tarkoituksena on päästää mikrobit läpi ja eristää mahdollinen karkeajakoinen näyte seinämän toiselle puolelle. Näyte punnittiin pussin suurempaan osaan ja sekoituksen jälkeen analyysijä varten näyte pipetoitiin seinämän vastakkaiselta puolelta. Tällöin näytematriisi ei tukkinut pipettejä, eikä korttien putkia, ja liuos pysyi kohtuullisen kirkkaana.

9.4 Laimennukset

Laimennussarjassa käytettiin koeputkia, joissa oli 9 ml peptonivettä, ja niihin pipetoitiin 1 ml näytettä. Näytettä laimennettiin tarpeen mukaan. Maljaviljelyissä 10^0 tarkoittaa laimentamatonta näytettä sellaisenaan, jolloin maljalle pipetoitiin 1 ml laimentamatonta maitoa tai kermaa, mikä teki maljoista hyvin sameita ja vaikealukuisia. Kiinteistä näytteistä sen sijaan oli mahdotonta toteuttaa 10^0 mittauksia, koska niiden saattaminen pipetoitavaan muotoon vääjäämättä laimensi ne.

TEMPO-menetelmässä käytettiin neljää eri laimennusta, jotka valittiin laittamalla kasvatusalustapulloon tietty määrä näytettä ja loput laimennusvettä siten, että niiden yhteistilavuus oli 4 ml.

Taulukko 8. TEMPO-menetelmän laimennukset ja detektioalue

laimennus	Detektioalue (pmy/g)	Näytteen tilavuus (µl)
1/4	1...4 900	1000
1/40	10...49 000	100
1/400	100...490 000	10
1/4000	1000...4 900 000	1

9.5 Standardimenetelmän kuvaus

1. Valmistettiin ja steriloidtiin painekattilassa tarvittava määrä VRBG- ja MPCA-kasvatusalustaa.

2. Tussilla kirjoitettiin tyhjiin maljoihin näytteen nimi, valamispäivämäärä, laimennus, kasvatusalustan nimi, ja tekijän nimikirjaimet.

3. Maljat merkittiin ja näytettä pipetoitiin 1 ml koeputkiin, joissa oli 9 ml peptonivettä.

4. Pipetoitiin 1 ml kunkin näytteen eri laimennuksia niitä varten valmisteltuihin maljoihin, ja kaadettiin näytteiden päälle noin 12 ml:aa kasvatusalustaa, jonka lämpötila oli 45 °C. Maljoja sekoitettiin varovasti, jotta mikrobit ja näyte olisivat levinneet mahdollisimman tasaisesti maljan koko alalle. Enterobakteerien kasvatukseen käytettiin VRBG-agaria ja kokonaisbakteerimääritykseen MPCA-agaria.

5. VRBG-maljoja inkuboitiin lämpökaapissa 37 °C:ssa noin vuorokauden ajan ja MPCA maljoja 30 °C:ssa noin kolme vuorokautta.

6. Inkuboinnin jälkeen maljat luettiin pesäkelaskurin avulla.

7. Tulokset kirjattiin vihkoon ja tietokoneelle Excel-tiedostoon.

8. Tuloksista laskettiin näytteen pitoisuus painotetulla keskiarvolla ja mittauksia verrattiin TEMPO-menetelmällä saatuihin vastaaviin tuloksiin.

9.6 Laskenta

Kasvatuksen jälkeen maljoissa havaittiin melkein aina selviä pesäkkeitä ja ne pyrittiin laskemaan välittömästi. Toisinaan kuitenkin laskentaa jouduttiin lykkäämään muutamalla päivällä, jona aikana maljoja säilytettiin muovipusseihin pakattuina jääkaapissa. Tulos merkittiin tulosvihkoon, josta ne myöhemmin siirrettiin tietokoneelle excel-tilukkaan.

Kuohu- ja kevytkerman sameus aiheutti ongelmia 10^0 ja 10^{-1} maljoja luettaessa. Ne luettiin pesäkelaskurin avulla niin hyvin kuin mahdollista ja loput pesäkkeet laskettiin ilman laskuria pitämällä maljaa mikroskoopin kirkasta lamppua vasten. Vaikka toisinaan oli havaittavissa, ettei kerma ollutkaan levinnyt tasaisesti maljan joka osaan, olivat pesäkkeet kuitenkin levittäytyneet tästä huolimatta oikein tasaisesti.

9.7 TEMPO-menetelmän toteutus

TEMPO-menetelmän toteutus voidaan jakaa kahteentoista työvaiheeseen.

1. Kiinteät näytteet homogenisoitiin peptoniveden kanssa stomacher-laitteella, mutta nestemäistä näytettä ei tarvinnut esikäsitellä lainkaan. Molemmissa tapauksissa näytettä otettiin 10 g (tai 10 ml) ja peptonivettä 90 ml.

2. Esikäsitelty näyte mitattiin reagenssipulloon, jossa oli valmiiksi bioMérieux:n kuivattua jauhemaista kasvatusalustaa.
3. Pulloon lisättiin ionivaihdettua vettä, jolloin näytteen ja veden yhteistilavuus oli 4 ml. Käyttämällä esimerkiksi $\frac{1}{4}$ laimennusta, voidaan havaita 1 pmy/ml, mutta detektioalueeseen voi vaikuttaa laimentamalla näytettä eri tavalla.
4. Pullon sisältö sekoitettiin vortex-sekoittimella.
5. Pullo asetettiin täyttötelineeseen.
6. Tietokoneelle kirjattiin näytteen nimi.
7. TEMPO-täyttöaseman viivakoodinlukijalle näytettiin reagenssipullon testiä vastaava kortti, jolloin laite tunnistaa sen ja syöttää tietokantaan oikeat tiedot, kuten päivämäärän sekä testin tyyppin, ja ilmoittaa milloin kortti on luettavissa. Myöhemmin ohjelma myös muistuttaa jos joku kortti täytyy lukea samana päivänä.
8. Kortti asetettiin täyttötelineeseen siten, että sen harmaa muovinen putki ulottui reagenssipullon sisälle.



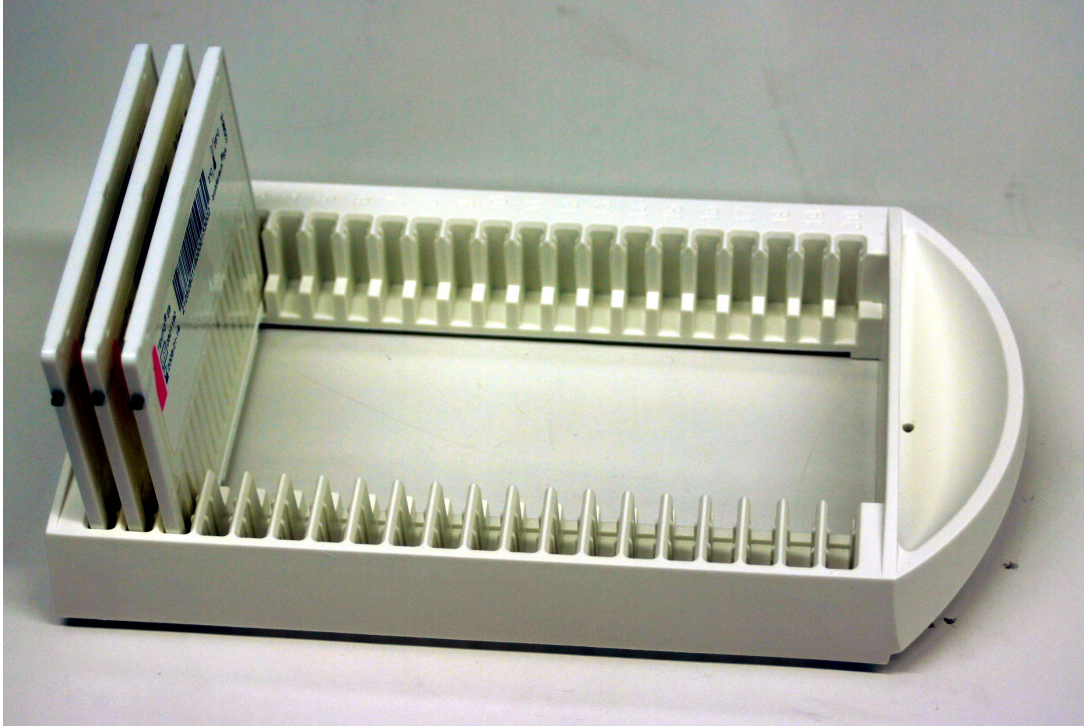
Kuva 1. Täyttöteline

9. Teline asetettiin reagenssipulloineen täyttöaseman sisälle, suljettiin kammion luukku ja painettiin laitteen start -painiketta.

10. Koneen täytettyä ja sinetöityä kortit ne siirrettiin erilliseen kasvatustelineeseen.



Kuva 2. Sinetöidyt kortit



Kuva 3.Kortit kasvatustelineessä

11.Teline ja kortit asetettiin lämpökaappiin inkuboitumaan testin vaatimaksi ajaksi.

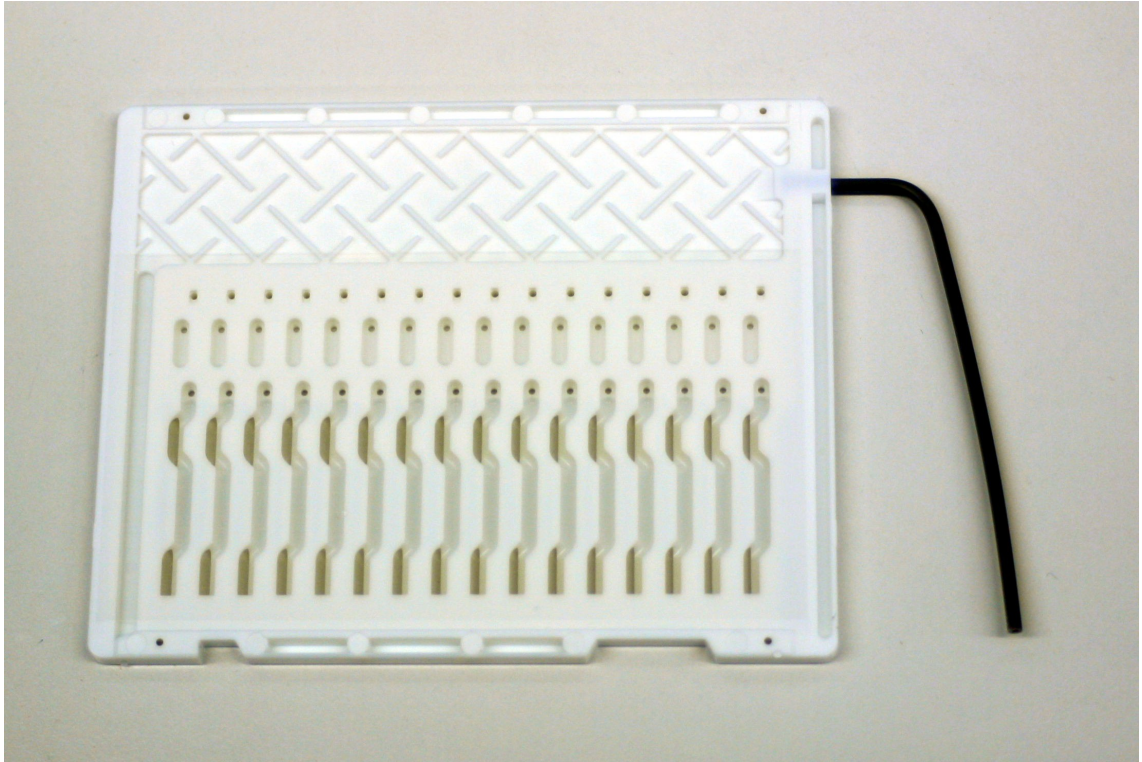
12.Inkuboinnin jälkeen teline asetettiin kortteineen lukuasemaan ja painettiin jälleen aseman start-painiketta. Tällöin TEMPO-lukuasema kuvasi kortit UV-valossa, laski sen perusteella positiivisten ja negatiivisten putkien määrät, ja ilmoitti näytteen mikrobipitoisuuden. Kuvassa kortin kaivot hohtivat valoa, jos niissä oli kasvua.



Kuva 4.Lukuasema

Lukuaseman tietokone käytti MPN-menetelmän laskukaavaa arvioidessaan alkuperäisen näytteen bakteeripitoisuutta, jolloin käyttäjä ei päässyt näkemään korttien kuvia missään vaiheessa.

TEMPO-kortissa on kuusitoista kaivoa, ja kukin on jaettu kolmeen osaan, joiden tilavuudet ovat 225 μl , 22,5 μl ja 2,25 μl . Vaikka kussakin putkessa on samaa nestettä, saavutetaan kaivojen tilavuuksia vaihtelemalla sama vaikutus, mikä laimennuksilla olisi., kuten perinteisen laimennussarjan siirrostuksissa, myös TEMPO:n kaivoissa tilavuudet ovat kymmenkertaisia toisiinsa nähden. Tavallisesti MPN-putkissa käytetään myös 10^{-1} ja 10^{-2} putkia, mutta TEMPO:ssa niitä edustavat 22,5 μl ja 2,25 μl näytettä sisältävät kaivot.



Kuva 5.Kortin kaivot

10 tulokset

10.1 Tulosten karsiminen

Osa mittauksista epäonnistui, joten jos esimerkiksi TVC-mittaustulosta ei saatu, ei sitä vastaavaa MPCA-mittaustakaan voitu käyttää. Suoritettujen mittausten lukumäärä on suurempi kuin varsinaisissa laskuissa hyödynnettyjen lukumäärä. Taulukossa 8 on esitetty käyttökelpoisten mittausten lukumäärä.

Taulukko 9.Onnistuneiden mittausten lukumäärä

Näytematriisi	Enterobakteerimääritys	Kokonaisbakteerimääritys
Rasvaton maito	20	36
kevytmaito	22	23
kevytkerma	25	24
kuohukerma	10	29
maitojauhe	19	60
vesi	8	12

Tulokset analysoitiin R-ohjelmointiympäristössä toteutetuilla regressioanalyysillä. Laskujen yhteydessä ilmeni, että tiettyjen mittausten standardiresiduaali oli alle -2 tai yli +2, jolloin ne voitiin katsoa karkeiksi virheiksi. Tällaiset mittaukset poistettiin lopullisesta regressiomallista, jolloin lopullinen näytemäärä on selvästi alkuperäistä pienempi.

10.2 Mallien tunnusluvut

Vain suuret erot näkyvät kuvaajissa, sillä ne on piirretty logaritmiasteikolle. X-akseliksi valittiin maljavalumenetelmä ja Y-akseliksi TEMPO-menetelmä. TEMPO:n EB-määrittystä vastaa VRBG ja TEMPO:n TVC-määrittystä MPCA. Monissa kuvaajissa mittauspisteet eivät kuitenkaan sijoittuneet suoran läheisyyteen, vaan niissä oli melko runsaasti hajontaa.

Regressioanalyysin luotettavuus riippuu muun muassa mittausten hajonnan normaaliudesta. Jos residuaalien jakauma sijoittuu symmetrisesti nollan molemmille puolille, on mittavirhe riittävän normaalisti jakautunut. Epänormaalin jakauman mediaani ei ole nollan läheisyydessä, eikä se välttämättä ole symmetrinenkään.

Taulukoiden 9 ja 10 luvuista voidaan havaita, että kaikkien näytematriisien standardiresiduaalien mediaanit olivat nollan tuntumassa ja muut ne jakautuivat symmetrisesti nollan molemmin puolin. Näin ollen residuaalien voidaan katsoa olevan riittävän normaalisti jakautuneita, joten regressioanalyysi on näiltä osin luotettavalla pohjalla.

Taulukko 10. TVC-mittauksien standardiresiduaalit

näytematriisi	Min	1Q	Mediaani	3Q	Max
rasvaton maito	-0,56374	-0,13382	-0,00666	0,08358	0,53266
kevytmaito	-1,02657	-0,22045	0,01715	0,16777	0,87483
kevytkerma	-0,21791	-0,07951	0,01792	0,09096	0,32975
kuohukerma	-0,58368	-0,1799	0,02639	0,1235	0,54433
maitojauhe	-0,80744	-0,12599	-0,02025	0,13232	0,42255
vesi	-0,10669	-0,04753	0,01086	0,05294	0,08778

Taulukko 11.EB-mittaustulosten standardiresiduaalit

näytematriisi	Min	1Q	Mediaani	3Q	Max
rasvaton maito	-1,37499	-0,50917	-0,21665	0,01093	1,45528
kevytmaito	-0,59479	-0,01856	0,03571	0,13962	0,66698
kevytkerma	-0,9674	-0,02166	0,04208	0,15458	0,61873
kuohukerma	-0,51417	-0,04029	-0,00386	0,02844	0,41355
maitojauhe	-0,90526	-0,12808	-0,03807	0,18009	0,66954
vesi	-0,291637	-0,083141	-0,005525	0,136585	0,230593

Tuloksiin sovitettiin suora, jonka noudattaa yhtälöä 7.

$$y = a \cdot x + b \quad (7)$$

y on TEMPON tuloksen logaritmi

a on kulmakerroin

x on maljavalutuloksen logaritmi

b on leikkauspiste

Tällaisessa vertailussa kulmakertoimella ja korrelaatiolla on muita tunnuslukuja suurempi merkitys. Kulmakertoimen tulisi olla lähellä yhtä ja korrelaatiokertoimen tulisi olla mahdollisimman suuri, jotta eri menetelmillä tuotetut tulokset vastaisivat toisiaan. Taulukoissa 11 ja 12 on esitetty mittaustuloksiin sovitettujen parametrien arvot.

Taulukko 12.mallin sopivuus, EB

näytematriisi	a	b	a:n p-arvo	b:n p-arvo	R ²
rasvaton maito	0,2071	1,665	0,335	0,0300	0,0423
kevytmaito	0,6973	-0,0881	1,06E-008	0,7153	0,8121
kevytkerma	0,651	0,2594	7,76E-007	0,4402	0,6455
kuohukerma	0,7168	0,1671	0,0005	0,6901	0,7962
maitojauhe	0,6832	0,0879	4,36E-005	0,8132	0,6141
vesi	0,6229	-0,071	0,0024	0,8513	0,8078

Taulukko 13.mallin sopivuus, TVC

näytematriisi	a	b	a:n p-arvo	b:n p-arvo	R ²
rasvaton maito	1,3877	-1,6138	2,50E-013	0,0012	0,7972
kevytmaito	0,5437	0,9851	0,1044	0,4339	0,1106
kevytkerma	0,9915	0,1275	1,29E-015	0,4642	0,948
kuohukerma	1,0669	-0,294	1,98E-009	0,4395	0,7421
maitojauhe	0,5211	1,3545	6,43E-012	1,60E-007	0,5597
vesi	1,0881	-0,1415	1,81E-011	0,2387	0,9906

Useimmat leikkauspisteet eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, mutta suurin osa kulmakertoimista sen sijaan oli. Mallien korrelaatiokertoimet vaihtelivat huomattavasti, mikä kertoo tulosten hajonnasta ja epäluotettavuudesta.

Korrelaatiokertoimia tulkitessa on hyvä huomata, että vaikeasti ennustettavia asioita tutkiessa R² ei aina kerro kaikkea mallin luotettavuudesta. Tuloksissa ilmenevä hajonta johtuu osaltaan siitäkin, että mittaustulokset riippuvat oleellisesti siitä miten mikrobit kasvavat kunkin menetelmän määräämissä olosuhteissa. Mikrobit voivat toisinaan kasvaa hyvinkin arvaamattomalla tavalla, jolloin tuloksetkin voivat vastaavasti poiketa toisistaan selvästi. Vaikka maljatulos ja TEMPO:n tulos saatiin samasta näytteestä, kasvoivat mikrobit silti eri olosuhteissa ja eri kasvatusalustalla ennen näytteiden lukemista.

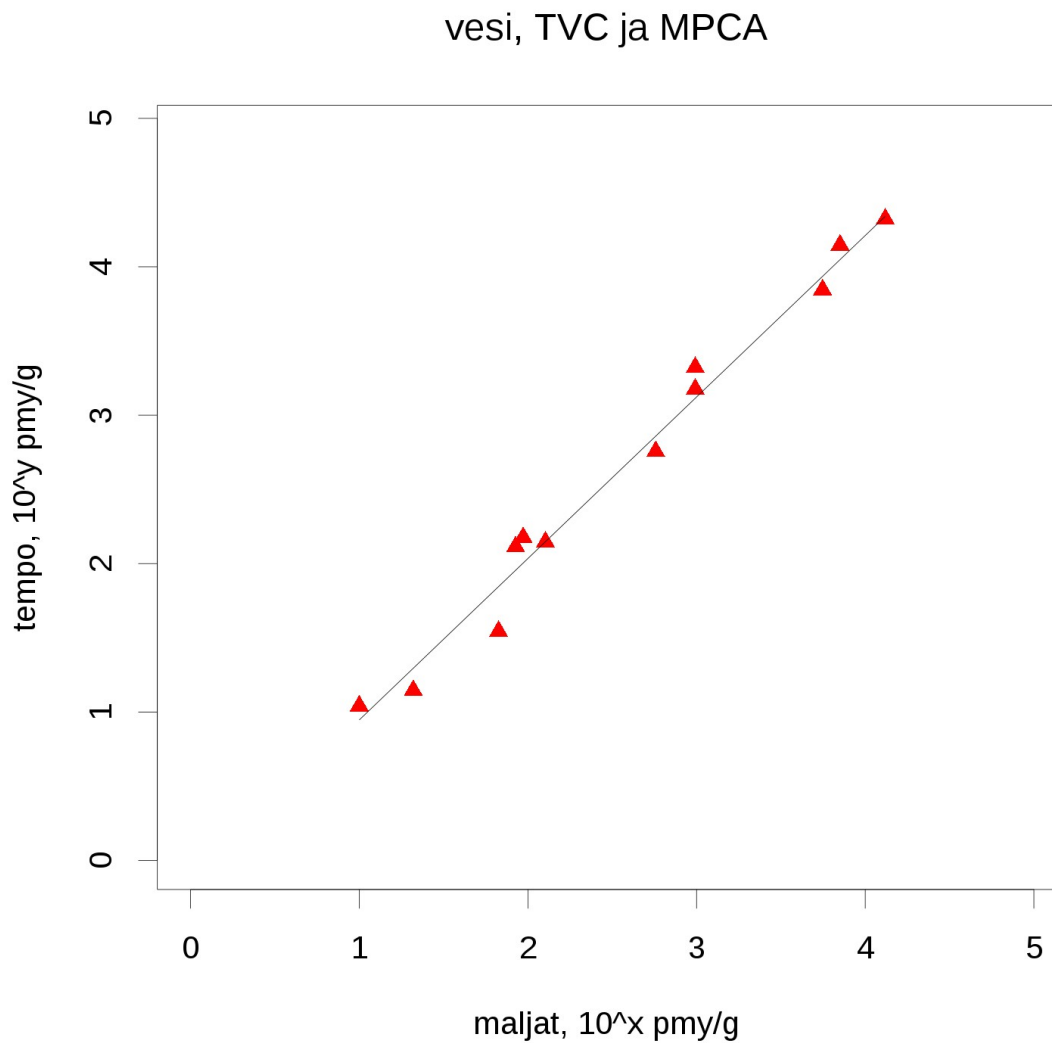
11 Kuvaajat

Kuvaajissa standardimenetelmä on asetettu x-askelille, koska sitä pidetään lähtökohtaisesti TEMPO:a luotettavampana. Valion laboratorio on akkreditoitu, joten sen käyttämät menetelmät on todettu riittävän luotettaviksi. Uuden tuntemattoman menetelmän luotettavuutta voidaan siis arvioida vertaamalla sitä maljavalumentelmään.

11.1 Vesi

11.1.1 Vesi MPCA-TVC

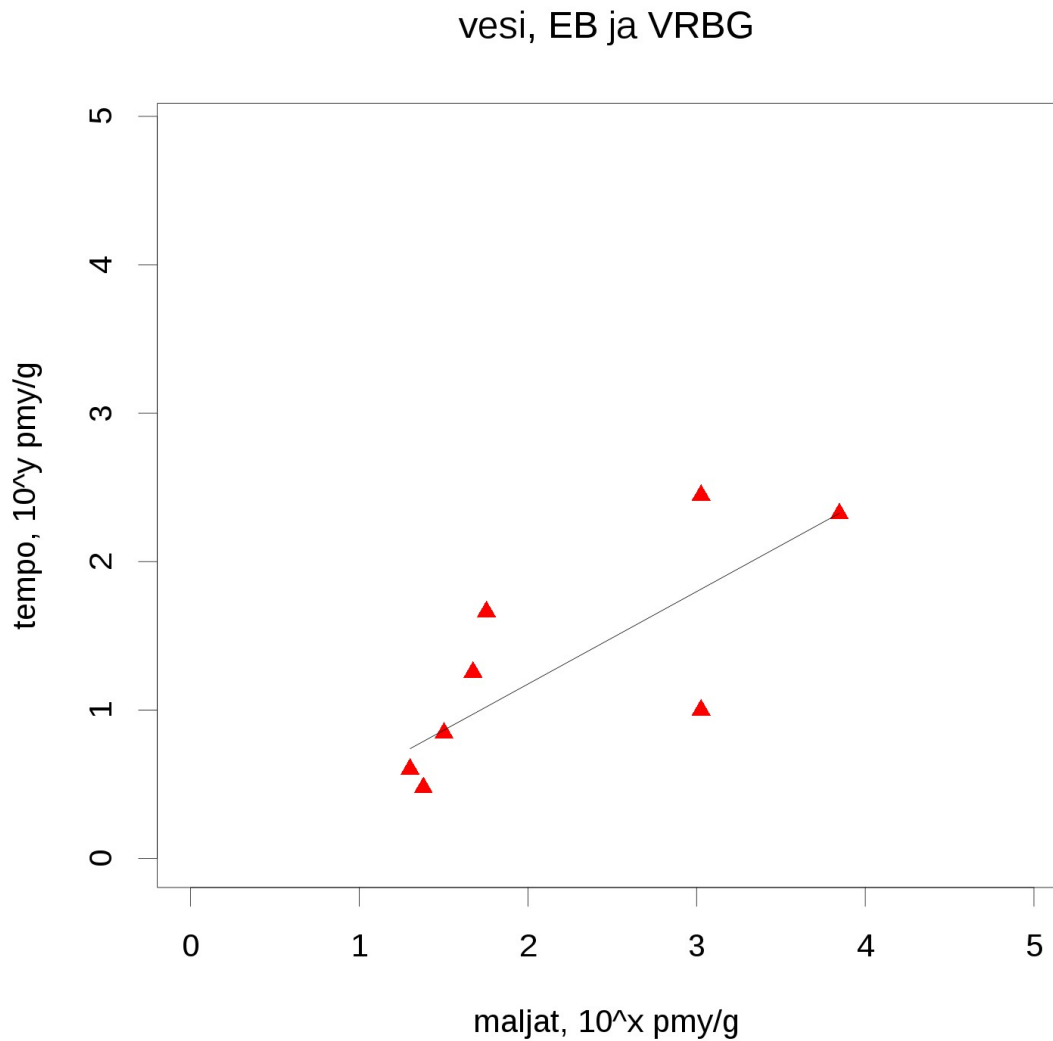
Tämän mallin R^2 oli varsin lähellä yhtä (0,9906), joten sen voidaan todeta selittävän suuren osan mittaustuloksista. Odotusten mukaisesti lineaarisen mallin kulmakerroinkin (1,0881) on hyvin lähellä yhtä. Myös kuvaajasta ilmenee, kuinka hyvin pisteet sijoittuvat suoran läheisyyteen.



Kuva 6.Vesi MPCA-TVC

11.1.2 Vesi VRBG-EB

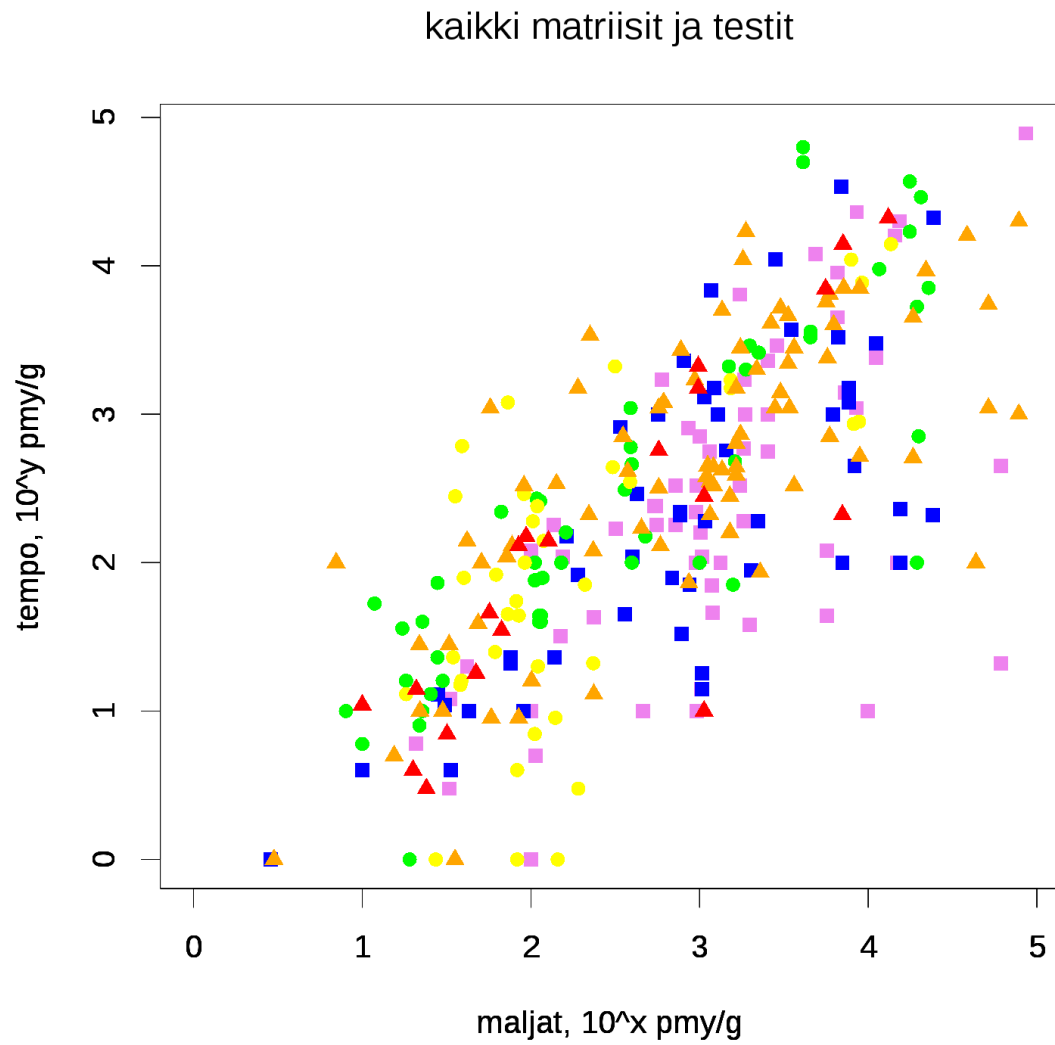
Veden EB-testitulosten R^2 oli kohtuullisen suuri (0,8078). Kaikkien odotusten vastaisesti myös tällä matriisilla oli poikkeuksellisen alhainen kulmakerroin (0,6229). Tällöin Maljatus on TEMPO:n tulosta pienempi, joten menetelmien tuottamat tulokset eivät vastaa tosiaan odotetulla tavalla. Toisaalta näitä mittaustuloksia ei ollut yhtä paljon kuin muutamissa muissa matriiseissa, jolloin tämän lineaarisen mallin luotettavuus on jo pelkästään pienen otannan vuoksi epäilyttävällä pohjalla. Todennäköisesti tuloksiin olisi voitu sovittaa nykyistä luotettavampi malli, mikäli mittauksia olisi ollut edes kaksinkertainen määrä.



Kuva 7.Vesi VRBG-EB

11.2 Kaikki tulokset

Kun kaikkia mittauksia tarkastellaan samanaikaisesti, havaitaan niissä runsaasti hajontaa.

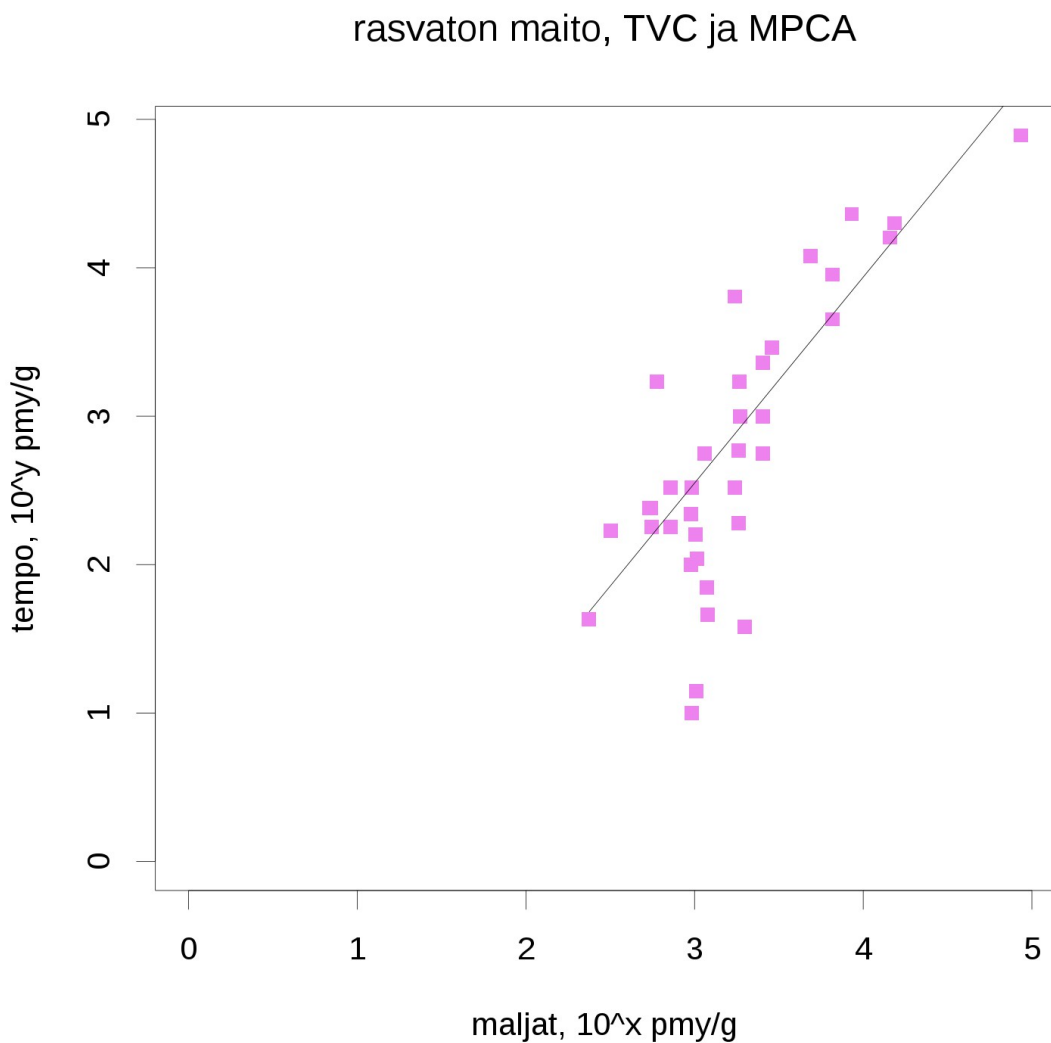


Kuva 8. Kaikki tulokset

11.3 TVC-MPCA

11.3.1 Rasvaton maito

Rasvattoman maidon TVC-tuloksiin sovitetun suoran kulmakerroin oli koko joukon suurin (1,3877). Tämä siis tarkoittaa sitä, että maljatulos oli usein TEMPO:n tulosta pienempi. Tämän lisäksi leikkauspiste ei osunut nollan tuntumaan, jolloin pisteisiin sovitettu malli on jokseenkin epärealistinen. Huomattakoon kuitenkin, että mallin molemmat parametrit olivat tilastollisesti erittäin merkitseviä, mutta sitäkin huolimatta mallia ei voida pitää hyvänä.

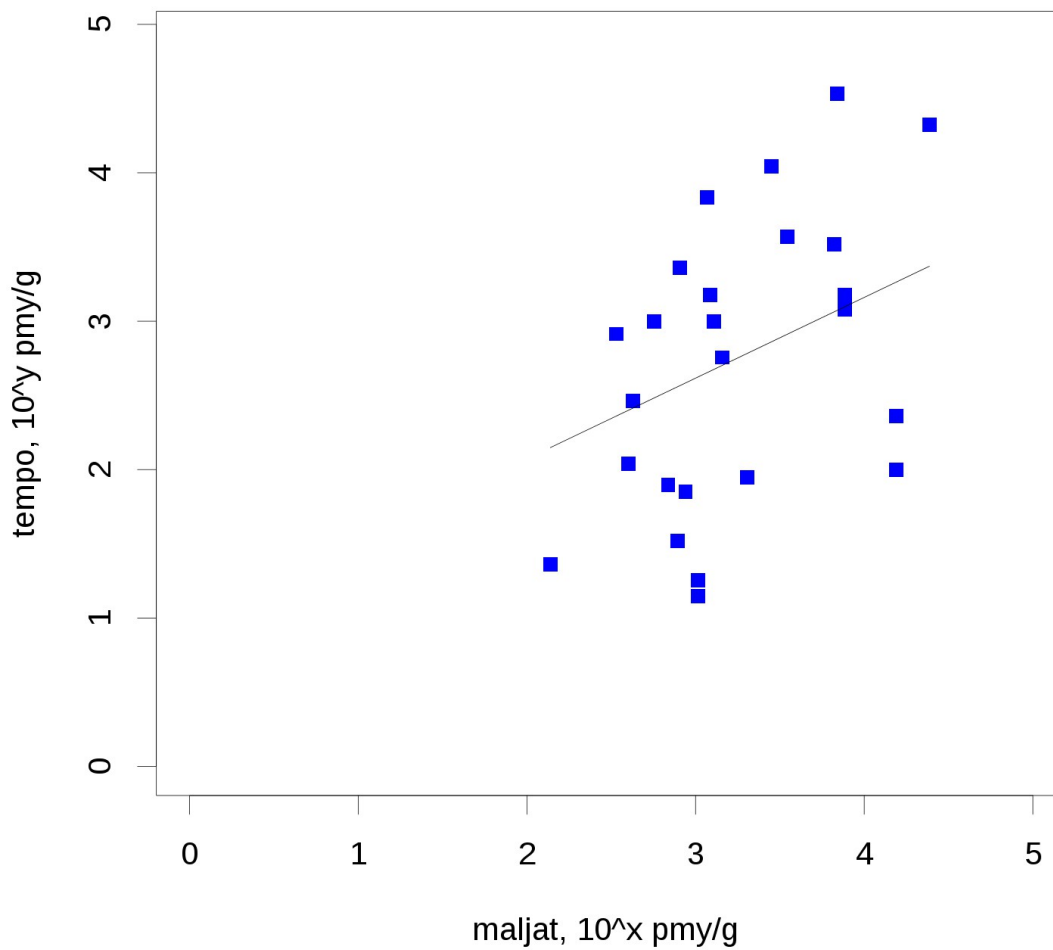


Kuva 9. Rasvaton maito MPCA-TVC

11.3.2 Kevytmaito

Koska mallin R^2 jäi hyvin pieneksi (0,1106), eikä kulmakerroin ollut tilastollisesti merkitsevä, jolloin voidaan todeta, että mittaustulokset eivät vastanneet toisiaan juuri lainkaan ja niihin sovitettu malli oli epäluotettava. Nämä luvut sopivat hyvin myös itse kuvaajaan, josta nähdään pisteiden olevan täysin hajallaan, eikä niistä näytä muodostuvan minkäänlaista suoraa.

kevytmaito, TVC ja MPCA



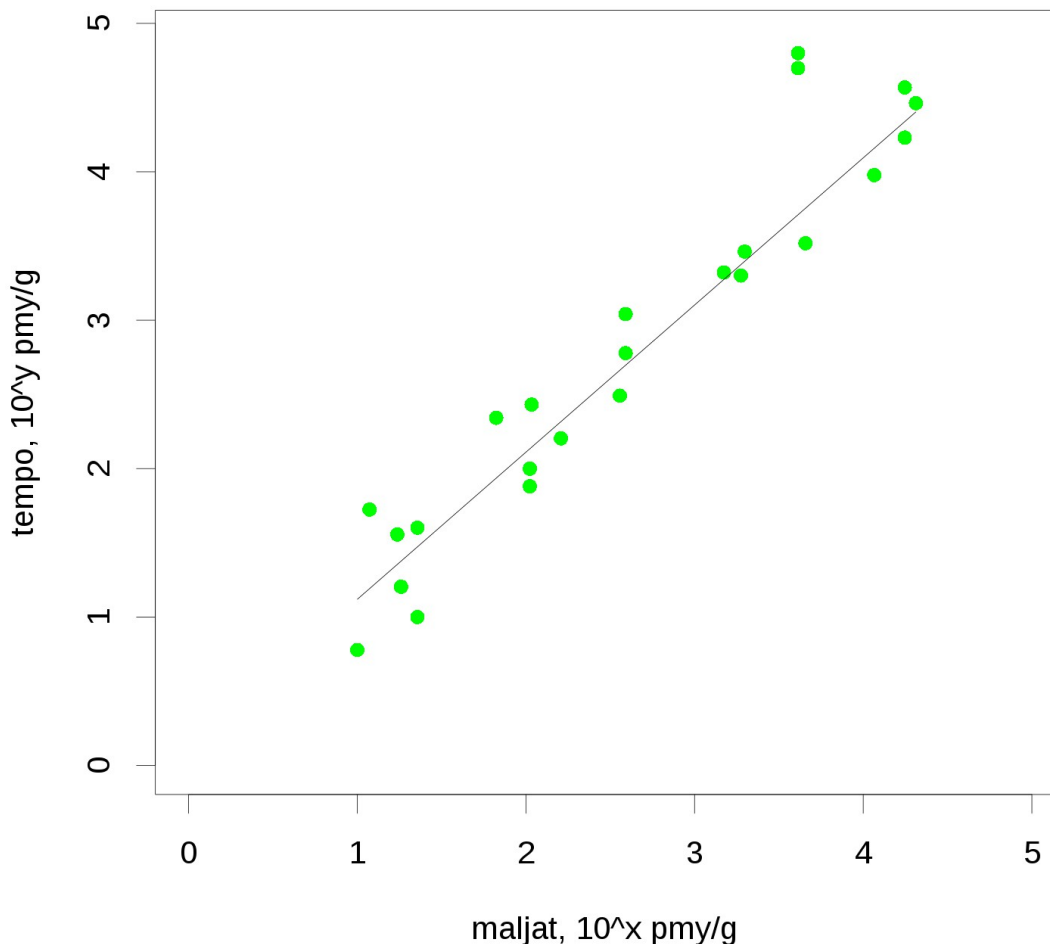
Kuva 10. Kevytmaito MPCA-TVC

11.3.3 Kevytkerma

Kevytkerman mittaustuloksiin sovitetun suoran kulmakerroin oli erittäin lähellä yhtä (0,9915), ja korrelaatiokerroin (0,9480) tukee sitä, jolloin eri menetelmillä tuotettujen tulosten voidaan todeta vastaavan toisiaan erittäin hyvin. Kevytkerman TVC-tulos olikin yksi koesarjan luotettavimmista tuloksista.

Tämä ei kuitenkaan välttämättä tarkoita, että kevytkerma olisi muita luotettavampi matriisi, sillä tällaiset vaihtelut voivat johtua mittavirheen satunnaisuudesta. Se vaihtoehto on kuitenkin jokseenkin epätodennäköinen, koska tuloksia oli riittävän paljon järkeväen mallin laskemiseksi. Näytteen rasvapitoisuuskaan selittää tätä ilmiötä, koska kevytkerma ei ole joukon rasvaisin, eikä rasvattominkaan.

kevytkerma, TVC ja MPCA

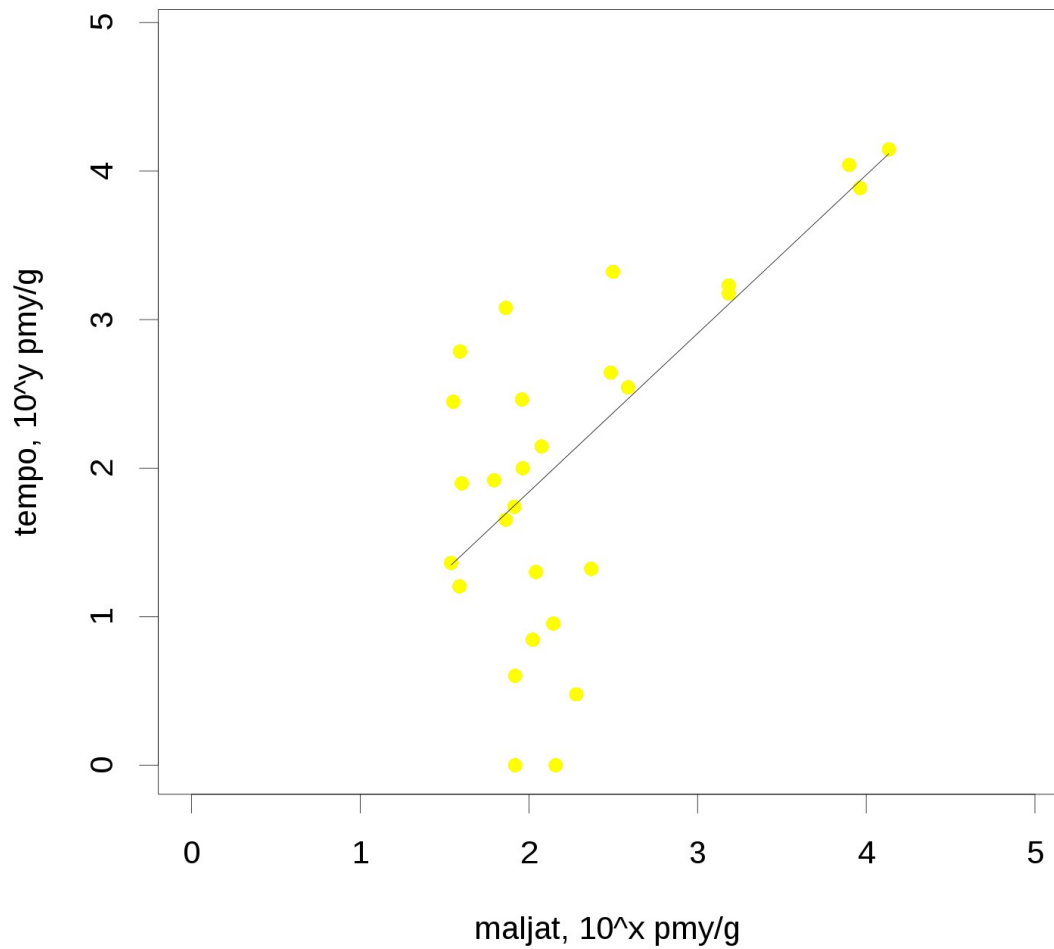


Kuva 11. Kevytkerma MPCA-TVC

11.3.4 kuohukerma

Kulmakerroin on hyvin lähellä yhtä (1,0669), ja se oli myös tilastollisesti erittäin merkitsevä, jolloin tulokset vastaavat toisiaan melko hyvin. Malli ei kuitenkaan selitä kaikkia mittauksia erityisen hyvin, koska korrelaatiokerroin (0,7421) ei ollut kovin suuri.

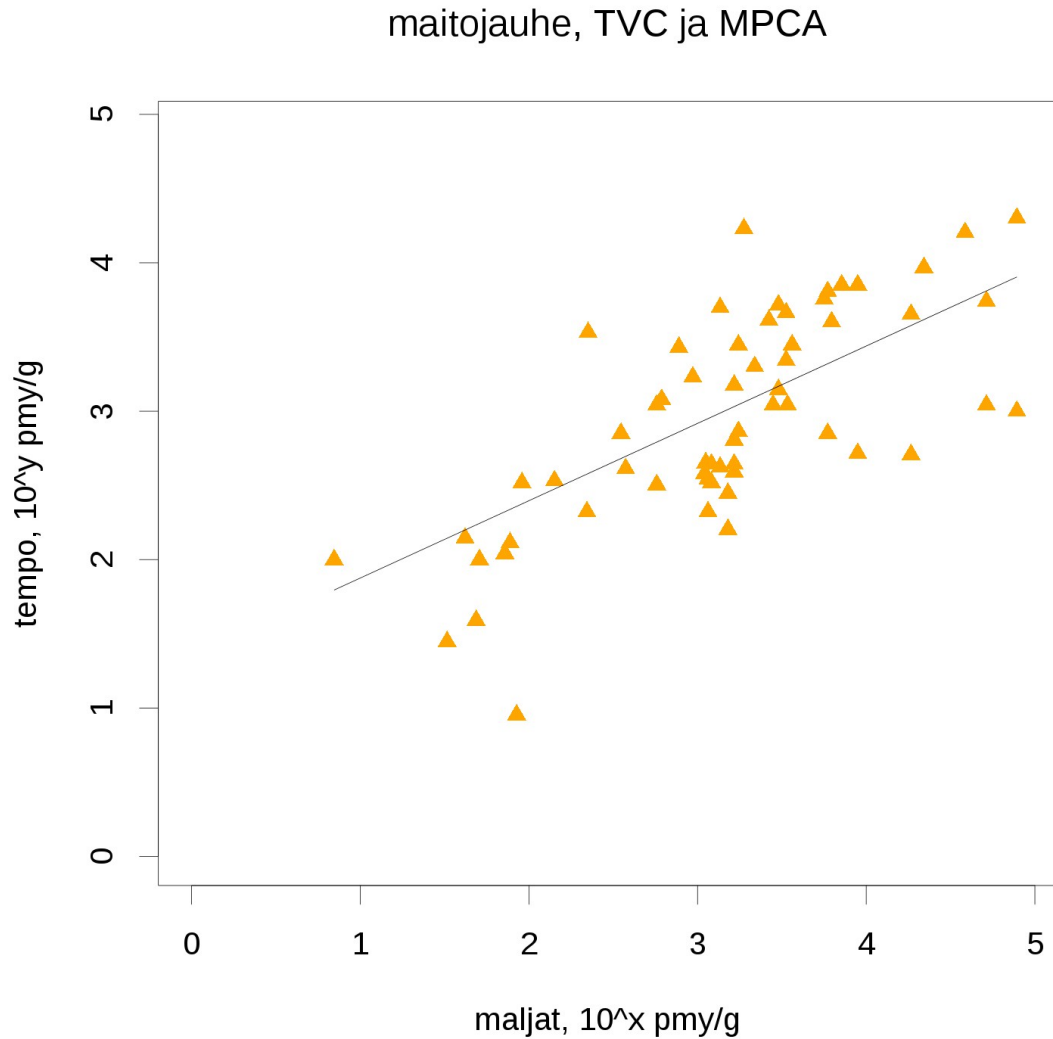
kuohukerma, TVC ja MPCA



Kuva 12. Kuohukerma MPCA-TVC

11.3.5 maitojauhe

Korrelaatiokerroin oli hyvin pieni (0,5597), jolloin suuri osa mittaustuloksista ei selity tässä käytetyllä mallilla. Sen parametrit olivat kuitenkin tilastollisesti erittäin merkitseviä, mutta se ei vielä tee mallista luotettavaa. Kuvaajasta nähdään, että pisteet sijoittuvat silti suoran muotoon, mutta hajontaa on hyvin runsaasti. Epätavallinen kulmakerroin ja leikkauspiste selittyvät helposti sillä, ettei malli sovi mittaustuloksiin kovin hyvin.



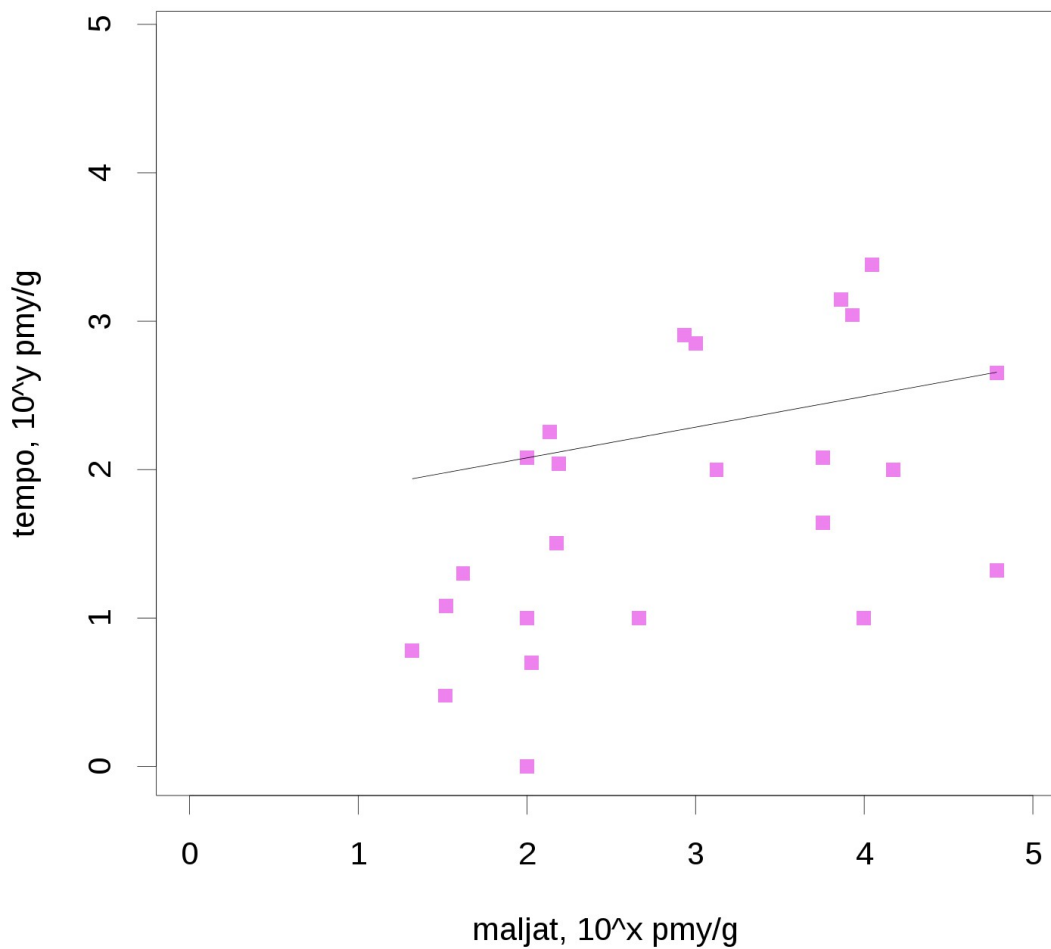
Kuva 13.Maitojauhe MPCA-TVC

11.4 EB-VRBG

11.4.1 Rasvaton maito

Kulmakerroin ei ollut tilastollisesti merkitsevää. Myös mallin selityssaste osoitti etteivät tulokset korreloi keskenään juuri lainkaan (0,0423). Kuvaajasta nähdään hajontaa olevan hyvin runsaasti, mikä osaltaan selittää pienen kulmakertoimenkin (0,5996). Näin ollen malli ei sovi tuloksiin kovinkaan hyvin.

rasvaton maito, EB ja VRBG

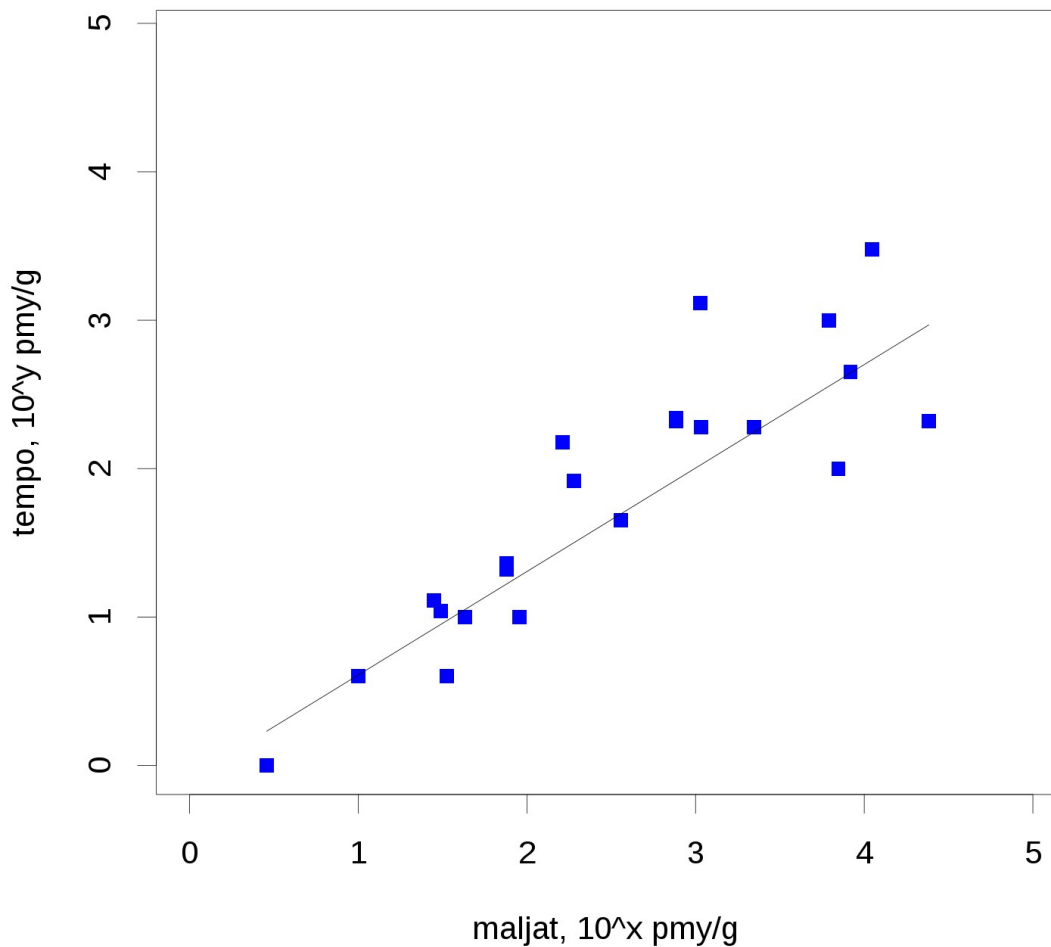


Kuva 14. Rasvaton maito VRBG-EB

11.4.2 Kevytmaito

Lineaarisen mallin kulmakerroin on varsin pieni (0,6973), jolloin tulosten ei voida sanoa vastaavan toisiaan kovin hyvin. Tulokset ovat suoran muodossa, mutta etenkin suurissa mittaustuloksissa hajonta näyttää kasvavan. Korrelaatiokerroin (0,8121), kuitenkin viittaa siihen, että malli selittäisi silti tietyn osan tuloksista, mutta hajonnan vuoksi malli ei kokonaisuutena ole erityisen hyödyllinen taikka luotettava.

kevytmaito, EB ja VRBG

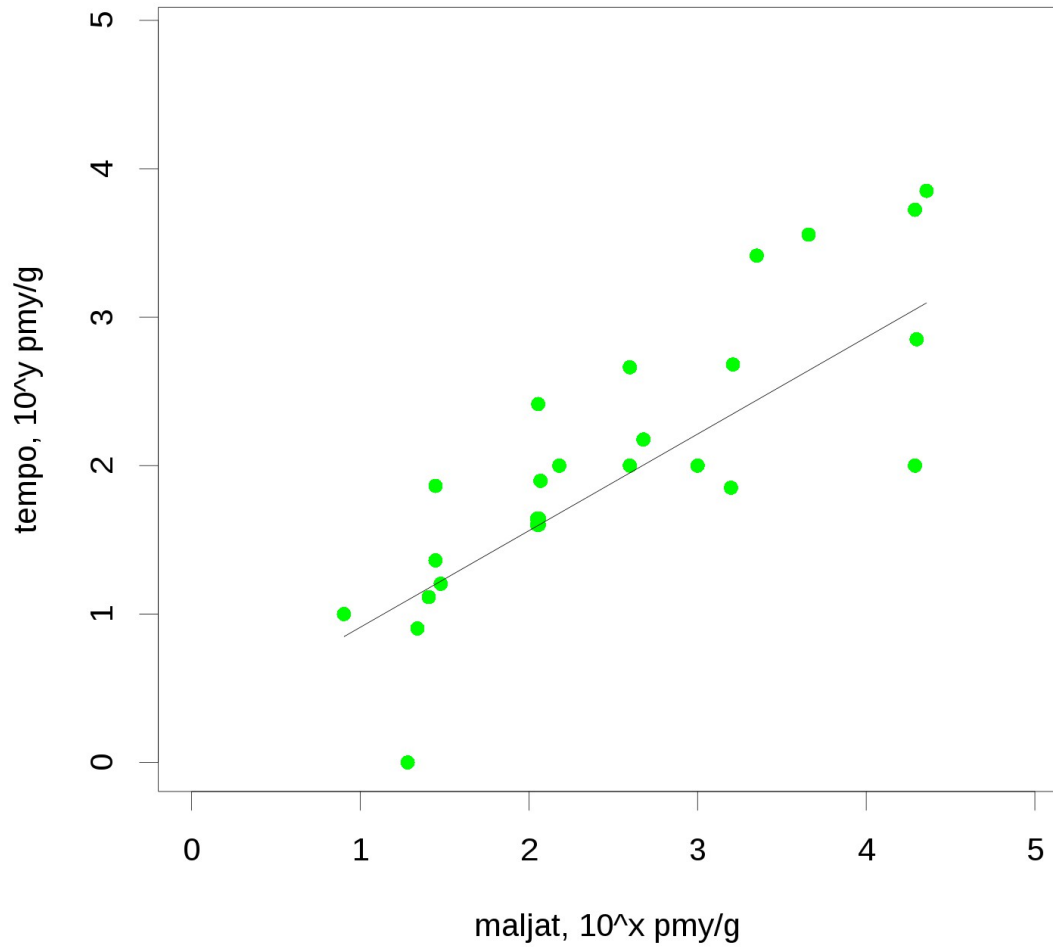


Kuva 15.Kevytmaito VRBG-EB

11.4.3 Kevytkerma

Kulmakerroin oli pieni (0,6510), mutta tilastollisesti merkitsevä. Myös selitysaste (0,6455) jäi jokseenkin pieneksi.

kevytkerma, EB ja VRBG



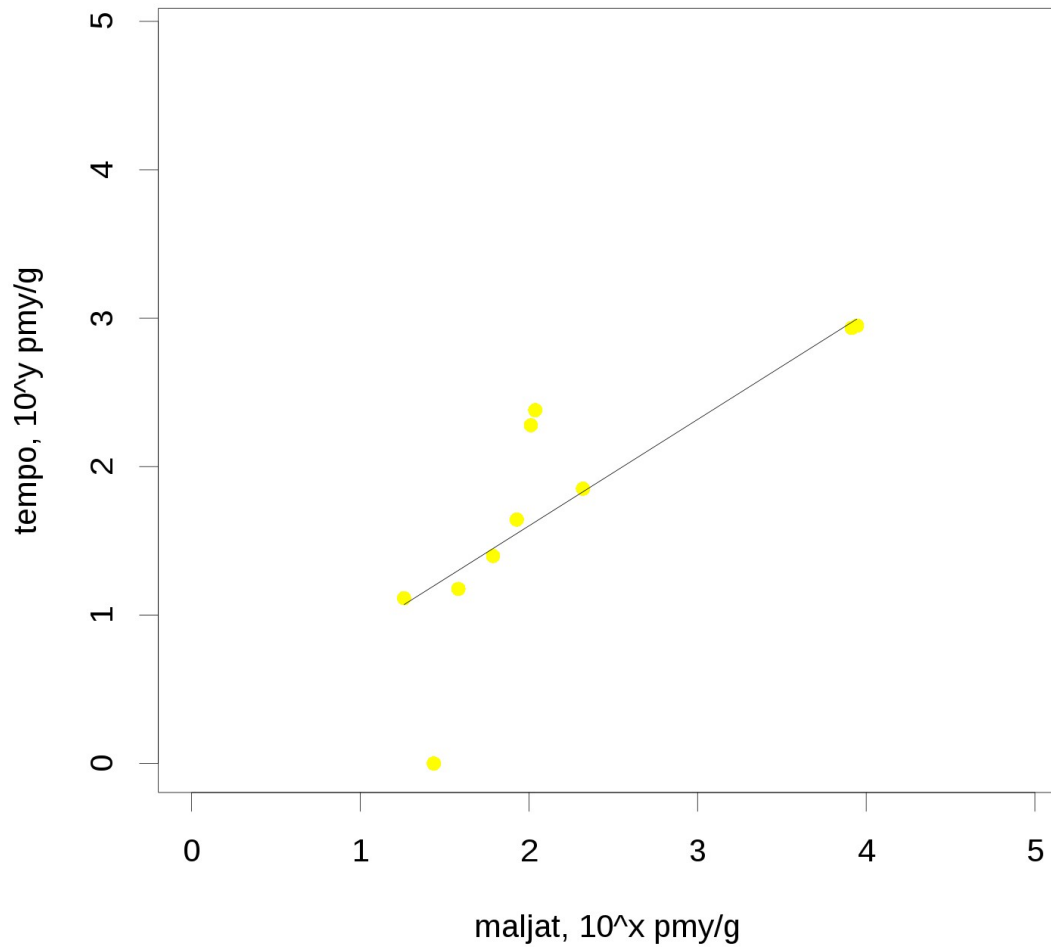
Kuva 16. Kevytkerma VRBG-EB

Kuva 17.

11.4.4 kuohukerma

Kulmakerroin jäi hieman pieneksi (0,7168), eikä korrelaatiokerroinkaan (0,7962) ollut kovin suuri. Tuloksiin sovitettu malli ei siis ole kovin luotettava vaikka sen kulmakerroin onkin tilastollisesti merkitsevä.

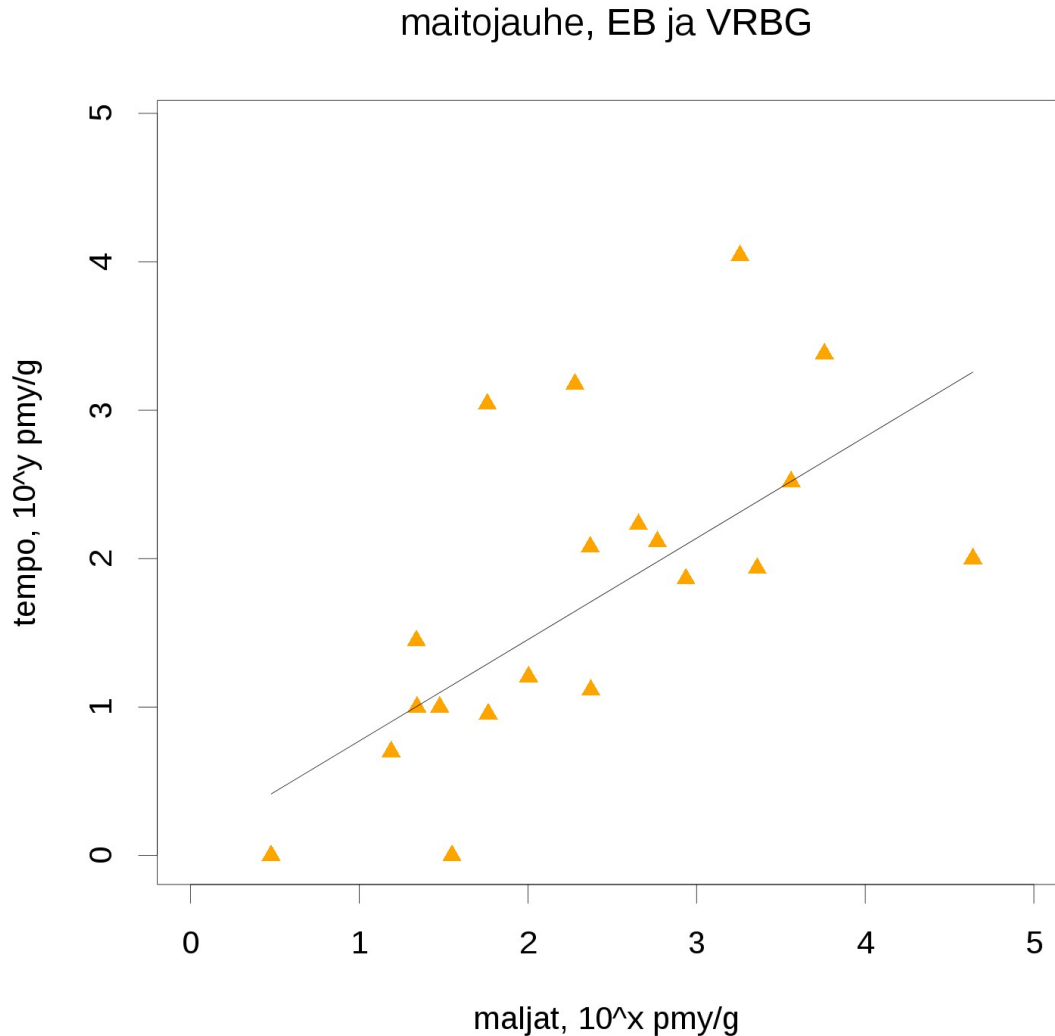
kuohukerma, EB ja VRBG



Kuva 18. Kuohukerma VRBG-EB

11.4.5 maitojauhe

Kulmakerroin (0,6832) oli kaukana yhdestä, ja korrelaatiokerroin (0,6141) oli selvästi niin pieni, ettei mallia voida pitää hyvänä.



Kuva 19.Maitojauhe VRBG-EB

12 Ajansäästö

Tämän työn aikana mitattiin myös eri työvaiheisiin kulunutta aikaa ja laskettiin niiden keskiarvot. Kasvatuksen kestoa ja muita passiivisia työvaiheita ei vertailtu, sillä ne eivät vaikuta työtunteihin lainkaan. Laskelmissa verrattiin menetelmiin kuluvia työtunteja, koska TEMPO-menetelmän varsinainen tavoite oli nopeuttaa laboratoriotyöskentelyä ja siinä on selvästikin onnistuttu hyvin. Menetelmän automatisointi on vaikuttanut merkittävästi etenkin näytteiden kirjaamiseen, siirrostukseen, lukemiseen ja moniin

muihin pienempiin asioihin. TEMPO:n korttien lukemiseen kulunut aika voidaan katsoa merkityksettömän lyhyeksi, kun taas maljojen lukeminen oli selkeästi erillinen työvaihe, johon kului huomattavasti aikaa.

Maljavalumenetelmässä yhden näytteen käsittelyyn kului keskimäärin 13,9 min, kun taas TEMPO-menetelmällä vastaava aika oli 4,7 min. Näihin lukuihin sisältyvät kaikki työvaiheet kasvatusaikaa lukuun ottamatta. Tällöin maljavaluun kului lähes kolminkertainen aika TEMPO-menetelmän toteuttamiseen verrattuna. Mitä suurempia näytemääriä analysoidaan, sitä suurempi etu TEMPO:sta olisi. Etenkin suuren mittakaavan maljaviljelmissä kasvatusalustan valmistelu, maljojen merkkäminen, valaminen ja maljojen lukeminen alkavat viedä huomattavan paljon aikaa, ja juuri niiden työvaiheiden nopeuttaminen onnistuisi TEMPO:lla. Tällöin yksi työntekijä kykenisi analysoimaan aikaisempia suuriakin näytemääriä, ja tuottavuus kasvaisi merkittävästi. TEMPO-menetelmän laajamittaisessa käytössä merkittävimmiksi työvaiheiksi jäisivät näytteiden pipetointi pulloihin ja niiden nimien kirjoittaminen tietokoneelle.

13 Mahdolliset virhelähteet

Proteiinit absorboivat UV-valoa, ja tätä ominaisuutta hyödynnetäänkin, kun proteiinipitoisuuksia mitataan spektrofotometrisesti. Myös TEMPO:n tulosten lukeminen perustuu nimenomaan näytteen fluoresenssiin UV-valossa. Jos maidon proteiinit absorboivat merkittävästi UV-valoa, voi mittauksen kannalta oleellinen fluoresenssi-ilmio jäädä odotettua heikommaksi, mikä voi vääristää tuloksia.

Käytännön syistä johtuen TEMPO:n EB-kortteja jouduttiin inkuboimaan kaksi astetta ohjearvoa lämpimämmässä, mikä on saattanut vaikuttaa TEMPO:n kortissa tapahtuvaan mikrobikasvuun. Lähtökohtaisesti voidaan kuitenkin olettaa, että vedestä olisi saatu kaikkein luotettavimmat tulokset, mutta EB-testin kohdalla näin ei kuitenkaan käynyt, mikä antaa syytä epäillä inkubointilämpötilan vaikuttaneen tuloksiin.

Lämpötila ei kuitenkaan selitä kaikkia virheitä, koska myös TVC-mittauksissa ilmeni huomattavan paljon hajontaa, vaikka ne inkuboitii ohjeen mukaisessa lämpötilassa.

Toisaalta kaikista eri näytematriiseista ei saatu yhtä suuria näytemääriäkään, joten tulokset eivät ole täysin vertailukelpoisia. Olisi suositeltavaa tehdä jokaiselle näytematriisille saman määrä testejä, jotta joka testillä olisi sama otanta.

Kontaminoitua näytettä laimennettiin peptonivedellä, kuten mikrobiologiassa pääsääntöisesti on tapana. Tässä tapauksessa olisi kuitenkin ollut perusteltua laimentaa näytteet steriilillä maidolla tai kermalla, jotta näytematriisin vaikutus olisi ilmennyt selvästi ja näytteet olisivat poikenneet toisistaan vain mikrobimäärän osalta. Tässä työssä siis 10^{-4} laimennuksessa varsinaista näytematriisia oli enää murto-osa alkuperäisestä.

14 Päätelmiä

Tässä työssä toteutetut mittaukset ja muualta saadut tiedot osoittivat TEMPO-menetelmän toimivan helpossa ympäristössä, mitä maitotuotteet selvästikään eivät ole. Monissa mittauksissa ilmeni, etteivät menetelmät vastanneet toisiaan riittävän hyvin. Ainoat poikkeukset olivat kevytkerman ja veden TVC-tulokset, joista saatiin hyviä tuloksia. Yleisesti ottaen TVC-tulokset olivat EB-tuloksia luotettavampia. Useimmissa mittauksissa ilmeni kuitenkin liian suurta virhettä, jolloin yleisesti ottaen maljavalumentelmän korvaamista TEMPO-menetelmällä ei voida suositella. Valiolle ei riitä, että kevytkermalla saadaan luotettavia tuloksia, koska laitteella olisi tarkoitus analysoida monia muitakin näytteitä.

Jos TEMPO-menetelmän soveltuvuutta haluttaisiin tutkia lisää, kannattaisi aloittaa vesinäytteistä ja edetä siitä pienin askelin vaikeampia näytematriiseita kohti. Maitotuotteiden kohdalla näytteitä ei välttämättä kannattaisi laimentaa peptonivedellä, vaan esimerkiksi steriilillä maidolla tai kermalla.

Lähteet

- 1 bioMérieux. TEMPO:n TVC ohje ref 80 007
- 2 bioMérieux. 2004. TEMPO preparation station user manual. Marcy l'Etoile, Ranska: bioMérieux SA
- 3 Fung, Daniel, Y., C. 2002. Inagural Issue. Comprehensive review in food science and food safety. Rapid methods and automation in microbiology. Institute of food tehcnologists,
- 4 Robinson, Richard, K. 2002. Dairy Microbiology Handbook, Third Edition. New York: John Wiley and Sons, Inc,
- 5 Adamns, M., R., Moss, M., O. 2002. Food Microbiology second edition. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- 6 Aittomäki, Esa, Eerikäinen, Tero, Leisola, Matti, Ojamo, Heikki, Suominen Ilari, von Weynmarn, Niklas. 2002. Bioprosessitekniikka. Porvoo: WS Bookwell Oy.
- 7 Valio. 2005. Valio OY: enterobakteerit 3. versio
- 8 Johansson, Tuula, Markkula, Annukka, Maijala, Riitta, Hatakka, Maija, Oivanen, Leena, Pakkala, Pekka. 2003. Opas elintarvikkeiden ja talousveden mikrobiologisista vaaroista. Elintarvikevirasto
- 9 Valio. 1997. Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Helsinki: Valvonta 13/1997
- 10 Niemelä, Seppo, I. 2001. Mikrobiologian kvantitatiivisten viljelymenetelmien mittausepävarmuus. Helsinki: Mittatekniikan keskus
- 11 Heinemann, Butterworth. 1992. In Vitro Cultivation of Micro-organisms. Oxford: Jordan Hill Butterworth-Heinemann Ltd.
- 12 Kay, James, M. 1992. Modern Food Biology. New York: Van Nostrand Reinhold
- 13 Valio. 2006. Valio: Koliryhmän bakteerit 5. versio.
- 14 Hurst, Christon, J., Knudsen, Guy, R., McInergy, Michael, J., Walter, Michael, V. 1997. Manual of Environmental Microbioog. USA: American society for microbiology,
- 15 Biomeriéux: TEMPO teknologiaa -esittelymateriaali.
- 16 Valio. 2003. Valio: yleiset työhjeet 30.9.2003.
- 17 Outinen. 2006. haastattelu.
- 18 Afaq Afnor. 2003. Afaq Afnor certification – validation certificate for alternative analytical method according to standard en ISO 16140:. Certificate No.: bio 12/13 -02/05.

MPN-taulukko

Positiivisten putkien lukumäärä			Todennäköisin lukumäärä (MPN-luku)
1. laimennus	2. laimennus	3. laimennus	
0	0	0	<0,3
0	0	1	0,3
0	1	0	0,3
0	1	1	0,6
0	2	0	0,6
0	3	0	0,9
1	0	0	0,4
1	0	1	0,7
1	0	2	1,1
1	1	0	0,7
1	1	1	1,1
1	2	0	1,1
1	2	1	1,5
1	3	0	1,6
2	0	0	0,9
2	0	1	1,4
2	0	2	2,0
2	1	0	1,5
2	1	1	2,0
2	1	2	2,7
2	2	0	2,1
2	2	1	2,8
2	2	2	3,5
2	3	0	2,9
2	3	1	3,6
3	0	0	2,3
3	0	1	3,8
3	0	2	6,4
3	1	0	4,3
3	1	1	7,5
3	1	2	12
3	1	3	16
3	2	0	9,3
3	2	1	15
3	2	2	21

3	2	3	29
3	3	0	24
3	3	1	46
3	3	2	110
3	3	3	>110