



Joonas Myllylä

# Kvantitatiivisen mikrobiologisen menetelmän verifiointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka

Laboratorioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

29.5.2024

## Tiivistelmä

Tekijä: Joonas Myllylä  
Otsikko: Kvantitatiivisen mikrobiologisen menetelmän verifiointi  
Sivumäärä: 40 sivua + 2 liitettä  
Aika: 29.5.2024

Tutkinto: Laboratorioanalyttikko (AMK)  
Tutkinto-ohjelma: Laboratorioanalytiikka  
Ohjaajat: Lehtori Mia Ruismäki  
Lehtori Jarmo Palm

---

Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda menettelyohje kvantitatiivisen mikrobiologisen menetelmän verifiointia varten Metropolia Ammattikorkeakoulun käyttöön. Menettelyohjeesta haluttiin selkeä ja työmäärältään maltillinen ja kaikki verifiointia varten tarvittava tulosten käsittely haluttiin esittää ohjeessa selkeillä esimerkeillä. Menettelyohje luotiin Metropolian menettelyohjepohjaan ja sen perustana käytettiin standardia SFS-EN ISO 13843:2017, ”Water quality - Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods” sekä VTT:n ”Validoinnin suunnittelun opas” -kirjaa. Menettelyohjeen verifiointiparametreiksi valittiin toistettavuus ja lukemaepävarmuus sekä esitettiin valinnaisia parametrejä verifiointin tueksi.

Menettelyohjetta testattiin käytännössä verifioimalla menetelmä ”Veden heterotrofisen pesäkeluvun määrittäminen juomavedestä petrifilmimenetelmällä”. Kyseistä menetelmää käytetään laboratorioanalytiikan vesianalyysiprojektikurssilla ja sillä arvioidaan juomavesien kokonaismikrobien sekä ihmis- ja eläinperäisten mikrobien määrää. Menetelmällä saadaan suuntaa antavia tuloksia veden puhtaudesta.

Verifiointi onnistui menettelyohjeen mukaisesti kokonaismikrobien osalta, jossa menetelmän toistettavuus oli 4,0 % ja lukemaepävarmuus 4,6 %. Ihmis- ja eläinperäisten bakteerien määrittämisessä toistettavuus oli 8,3 %, lukemaepävarmuutta ei pystytty määrittämään liian alhaisten pesäkemäärien takia ja verifiointi näiltä osin hylättiin. Toistettavuuden hyväksymisraja oli 7,6 % ja lukemaepävarmuuden hyväksymisraja 10 %.

Verifiointin perusteella menettelyohje täytti sille asetetut tavoitteet ja menettelyohjetta voidaan jatkossa käyttää avuksi kvantitatiivisten mikrobiologisten menetelmien verifiointiin Metropolia Ammattikorkeakoulussa.

Avainsanat: kvantitatiivinen mikrobiologia, validointi, verifiointi

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

## Abstract

Author: Joonas Myllylä  
Title: Verification of Quantitative Microbiological Analysis  
Number of Pages: 39 pages + 2 appendices  
Date: 29 May 2024

Degree: Bachelor of Laboratory Services  
Degree Programme: Laboratory Sciences  
Supervisors: Mia Ruismäki, Senior Lecturer  
Jarmo Palm, Senior Lecturer

---

Objective of the thesis work was to create a procedure instruction for method verification of quantitative microbiological methods for the use of Metropolia University of applied sciences. Requirements for the instructions were ease of use, manageable workload and clear examples of calculations involved in verification. Verification parameters were based on standard SFS-EN ISO 13843:2017, "Water quality - Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods" and general guidelines on book "Validoinnin suunnittelun opas" from VTT. Verification parameters chosen were repeatability and uncertainty of counting. Optional parameters were quantities involved in colony identification and method comparison.

Procedure instruction was tested by verifying 3M™ Petrifilm™ Aqua Plate Method. The method is used for estimation of heterotrophic plate count in drinking waters. It involves incubation in two different temperatures, offering estimation of total count for heterotrophic microorganisms, as well as estimation of bacteria of human and animal origin.

Acceptance limit for repeatability of Aqua Plate Method was 7.6 %. Repeatability for heterotrophic microbes achieved in verification was 4.0 % and for bacteria of human and animal origin 8.3 %. Ideal uncertainty of counting is considered 2.5 % and acceptance limit for the verification was 10 %. Uncertainty of counting for heterotrophic microbes achieved in verification was 4.6 % and could not be determined for bacteria of human and animal origin because of too low bacterial growth in samples used. Verification of heterotrophic microbes using 3M™ Petrifilm™ Aqua Plate Method was accepted in accordance with procedure instructions and verification of bacteria of human and animal origin was rejected.

Keywords: Validation, Verification, Quantitative microbiology

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kvantitatiivinen mikrobiologia	1
3	Mikrobiologisten menetelmien validointi ja verifiointi	2
3.1	Validointi	2
3.2	Verifiointi	2
3.3	Validointi- ja verifiointiparametrit	3
3.3.1	Toistettavuus	3
3.3.2	Lukemaepävarmuus	5
3.3.3	Suhteellinen saanto	7
3.4	Heterotrofisen pesäkeluvun määrittäminen	9
4	Työn toteutus	10
4.1	Käytetyt reagenssit ja kasvatusalustat	11
4.2	Käytetyt mittavälineet ja laboratoriolaitteet	11
4.3	Menettelyohje	11
4.4	Verifiointisuunnitelma	12
4.5	Laboratorion sisäinen toistettavuus	13
4.6	Lukemaepävarmuus	16
4.7	Suhteellinen saanto	19
5	Tulokset ja tulosten käsittely	21
5.1	Toistettavuus	21
5.2	Lukemaepävarmuus	23
5.3	Suhteellinen saanto	30
6	Lopputulokset	34
6.1	Toistettavuus	34
6.2	Lukemaepävarmuus	35
6.3	Suhteellinen saanto	35
6.4	Verifiointi	36
7	Yhteenveto	36

Liitteet

Liite 1: Verifiointisuunnitelma

Liite 2: Menettelyohje

## Lyhenteet

EN: *European standard*. Euroopassa hyväksytty ISO-standardi.

ISO: *International Organization for Standardization*. Kansainvälinen standardisoimisjärjestö.

pmy: *Pesäkkeen muodostava yksikkö*. Suure mikrobiologisen kasvun arvioimiseksi.

SFS: Suomen standardisoimisliitto. Suomalainen standardisoinnin keskusjärjestö.

## 1 Johdanto

Opinnäytetyön aiheena oli menettelyohjeen luominen kvantitatiivisten mikrobiologisten menetelmien verifiointia varten Metropolia Ammattikorkeakoululle. Menettelyohjeen pohjaksi valittiin standardi SFS-EN ISO 13843:2017, "Water quality - Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods". Vaihtoehtona olivat myös uudet 16140 -sarjan ISO-standardit, " Microbiology of the food chain", jotka käsittelevät elintarviketuotantoon liittyvien menetelmien validointia ja verifiointia. Standardiin 13843 päädyttiin, koska vesimikrobiologiset menetelmät kuuluivat opinnäytetyön aloitushetkellä laajemmin laboratorioanalytiikan opintoihin kuin elintarvikeanalyysit. Menettelyohjeen toimivuutta testattiin verifioimalla menetelmä "Heterotrofisen pesäkeluvun määrittäminen juomavedestä petrifilmimenetelmällä" (3M Petrifilm Aqua Heterotrophic Count Plate 6450/6452).

## 2 Kvantitatiivinen mikrobiologia

Kvantitatiivinen mikrobiologia keskittyy mikrobien määrälliseen arviointiin. Mikrobit ovat eläviä organismeja, joiden kasvuun liittyvät monet erilaiset faktorit. Näitä ovat esimerkiksi saatavilla oleva ravinto, ympäristön pH-arvo ja lämpötila [1]. Tällöin kasvatusalustoilla ja näytteiden inkubointiolosuhteilla on suuri vaikutus mikrobikasvuun. Mikrobien kasvun lisäksi kvantitatiivisiin menetelmiin liittyy mittausepävarmuus, joka on peräisin kolmesta eri lähteestä: tekninen epävarmuus (engl. technical uncertainty), matriisin aiheuttama epävarmuus (engl. matrix uncertainty) ja jakaumaan liittyvä epävarmuus (engl. distributional uncertainty). Tekninen epävarmuus on peräisin laboratorion sisäisestä vaihtelusta, matriisin epävarmuus näytteen epätäydellisestä sekoittumisesta ja jakauman epävarmuus mikrobien epätasaisesta jakautumisesta näytteeseen. [2.] Suuren mittausepävarmuuden takia mikrobiologisten menetelmien validointi poikkeaa esimerkiksi kemiallisten menetelmien validoinnista ja kattavan ohjeistuksen löytäminen ja laatiminen voi olla haastavaa [1].

### 3 Mikrobiologisten menetelmien validointi ja verifiointi

#### 3.1 Validointi

Validointi on menetelmän toimivuuden osoittamista sen ilmoitetulla käyttöalueella. Validoinnissa esitetään menetelmän tuottavan ennalta määrättyjen validointiparametrien mukaisia tuloksia. [3.] Käyttöalueella viitataan menetelmälle soveltuviin näytematriiseihin, määritysrajoihin ja kohdemikrobeihin. Validoinnin laajuus vaihtelee tapauskohtaisesti kymmenien laboratorioden välisestä validoinnista yksittäisen laboratorion sisäiseen validointiin. [4.]

Koska kvantitatiivisiin mikrobiologisiin menetelmiin liittyy suuri mittausepävarmuus, joka on lähtöisin useista eri muuttujista, validointiin ei ole olemassa yksittäistä kattavaa ohjetta, vaan täytyy validointi suunnitella tapauskohtaisesti [1]. Nykyisin esimerkiksi elintarvike- ja vesimikrobiologian menetelmien validointiin on saatavilla omat standardinsa [4; 5].

Validointi vaatii aina validointisuunnitelman. Validointisuunnitelmassa käydään läpi validoitava menetelmä ja sen soveltamisala. Lisäksi esitellään valitut validointiparametrit, tulosten tulkinta sekä parametrien hyväksymisrajat. Myös näytteenotto ja näytteiden käsittely tulee olla kuvattuna. Suunnitelmassa tulee lisäksi olla kuvaus käytännön suorituksesta sisältäen aikataulut, materiaalit, tarvikkeet ja työvaiheet. [3.]

#### 3.2 Verifiointi

Verifiointi on jo validoidun menetelmän toimivuuden osoittamista käyttäjälaboratoriossa [3]. Verifiointi on validointia kevyempi prosessi ja verifiointissakin parametrit vaihtelevat tapauskohtaisesti. Esimerkiksi kvantitatiivisen vesimikrobiologisen menetelmän verifiointi pitää sisällään toistettavuus- ja lukemaepävarmuusmäärityksen. Jos menetelmään kuuluu pesäkkeiden varmistus- tai identifiointimenetelmä, verifiointiparametreja voivat

lisäksi olla herkkyys (engl. sensitivity), spesifisyys (engl. specificity), väärin positiivisten määrä (eng. false positive rate), väärin negatiivisten määrä (engl. false negative rate) sekä selektiivisyys (engl. selectivity). [5.]

Elintarvikemikrobiologisen kvantitatiivisen menetelmän verifiointi taas pitää sisällään ainoastaan laboratorion sisäisen toistettavuuden määrittämisen [4].

Verifiointia varten tehdään verifiointisuunnitelma. Verifiointisuunnitelma pitää sisällään samat asiat, kuin validointisuunnitelma. Esimerkki verifiointisuunnitelmasta on esitetty liitteessä 1.

### 3.3 Validointi- ja verifiointiparametrit

Validointi- ja verifiointiparametrit valitaan tapauskohtaisesti. Alla on kuvattu standardiin SFS-EN ISO 13843:2017 perustuvat menetelmäohjeeseen valitut parametrit.

#### 3.3.1 Toistettavuus

Menetelmän toistettavuus (engl. *repeatability*) kuvaa matriisin aiheuttamaa vaihtelua. Tällöin laboratorio-olosuhteet pidetään mahdollisimman muuttumattomina näytteiden rinnakkaismäärittämisen välillä teknisen vaihtelun minimoimiseksi, mutta eri näytteiden välillä saa esiintyä vaihtelua. [2.]

Toistettavuusmäärittämisessä kolmesta näytteestä tehdään kymmenen rinnakkaismittausta. Rinnakkaismäärittämisen perusteella lasketaan keskiarvo ( $\bar{x}$ ) (kaava 1), varianssi ( $s^2$ ) (kaava 2), sekä suhteellinen toiminnallinen varianssi ( $u_0^2$ ) (kaava 3) [5]. Toistettavuutta kuvaava toistettavuuden suhteellinen keskihajonta ( $S_r$ ) (kaava 4) saadaan esitettyä prosenttilukuna ottamalla neliöjuuri näytteiden toiminnallisten varianssien keskiarvosta. [5.]

Hyväksymisrajana toistettavuudelle voidaan käyttää menetelmän validointidatasta saatua pienintä toistettavuusarvoa ( $S_r$ ) kerrottuna kahdella [4]. Esimerkiksi opinnäytetyössä verifioitavan petrifilmimenetelmän validoinnissa (Comparative Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ Aqua Plate Method vs. Multiple

Reference Methods in Bottled Water - Claims Verification Study) saavutettu pienin toistettavuus oli 3,8 %, joten hyväksymisrajana oli 7,6 % [6].

Näytteille lasketaan myös normaalijakaumasta poikkeavaa hajontaa kuvaava Poissonin hajontaindeksi (engl. *Poisson index of dispersion*) ( $X^2_{r-1}$ ) (kaava 5), joka kuvaa näytteen analyyttien hajonnasta johtuvaa vaihtelua. Poissonin hajontaindeksin arvoa verrataan  $X^2$ -jakauman kriittiseen arvoon, kun merkitsevyystaso on 0,05 ja vapausasteet 9. Tällöin saadaan arvo 16,92. Jos  $X^2_{r-1}$ -arvo on suurempi, kuin 16,92, näytteen rinnakkaismääritysten hajonta on tilastollisesti normaalijakaumasta poikkeavaa. Alla on esitetty kaikki toistettavuuden määrittämiseen käytettävät kaavat. [5.]

Kaavassa 1 on esitetty keskiarvon ( $\bar{x}$ ) laskeminen, jossa  $x_i$  on näytetulos ja  $n$  määritysten lukumäärä.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (1)$$

Kaavassa 2 on esitetty varianssin ( $s^2$ ) laskeminen, jossa  $x_i$  on näytetulos ja  $n$  on määritysten lukumäärä.

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (2)$$

Kaavassa 3 on esitetty suhteellisen toiminnallisen varianssin ( $u_0^2$ ) laskeminen.

$$u_0^2 = \frac{s^2 - \bar{x}}{\bar{x}^2} \quad (3)$$

Kaavassa 4 on esitetty toistettavuuden suhteellisen keskihajonnan ( $S_r$ ) laskeminen.

$$S_r = \sqrt{u_0^2} \quad (4)$$

Kaavassa 5 on esitetty Poissonin hajontaindeksin ( $X^2_{r-1}$ ) laskeminen, jossa  $r$  on rinnakkaismääritysten lukumäärä.

$$X_{r-1}^2 = \frac{r \sum x_i^2}{\sum x_i} - \sum x_i \quad (5)$$

### 3.3.2 Lukemaepävarmuus

Lukemaepävarmuus kuvaa menetelmän tulkintaan liittyvää vaihtelua ja on yksi merkittävä tekijä kvantitatiivisiin mikrobiologisiin menetelmiin liittyvässä epävarmuudessa. Lukemaepävarmuuden arvioimiseksi voidaan määrittää henkilökohtainen lukemaepävarmuus ja laboratorion sisäinen lukemaepävarmuus. [7.]

Henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden määrittämiseksi yksi henkilö tulkitsee vähintään 30 näytettä, joissa kasvaa yli 20 pmy. Näytteet tulkitaan toistamiseen tunnin kuluessa ensimmäisestä tulkinnasta. Henkilökohtainen lukemaepävarmuus lasketaan lukemaparien perusteella. Lopullinen tulos kuvaa laskennan epävarmuutta prosentteina. Hyvänä henkilökohtaisena lukemaepävarmuutena pidetään 2,5 % ja yleisenä ylärajana 10 %. [5.] Henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden laskeminen on esitetty kaavoissa 6 — 8.

Kaavassa 6 on esitetty lukemaparien suhteellisen varianssin ( $u_{rel,pair}^2$ ) laskeminen, jossa  $x_1$  ja  $x_2$  ovat näytteestä tulkitut lukemat.

$$u_{rel,pair}^2 = 2 \times \left( \frac{x_1 - x_2}{x_1 + x_2} \right)^2 \quad (6)$$

Kaavassa 7 on esitetty laskennan suhteellisen varianssin ( $u_{rel,L}^2$ ) laskeminen, jossa  $n$  on tulkittujen näytteiden lukumäärä.

$$u_{rel,L}^2 = \frac{\sum u_{rel,pair}^2}{n} \quad (7)$$

Kaavassa 8 on esitetty henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden laskeminen. Lukemaepävarmuus saadaan esitettävään muotoon ottamalla laskennan suhteellisesta varianssista neliöjuuri.

$$\text{Henkilökohtainen lukemaepävarmuus} = \sqrt{u_{rel,L}^2} \quad (8)$$

Laboratorion sisäinen lukemaepävarmuuden määrittämiseksi vähintään 30 näytettä tulkitsee useampi henkilö. Kukin näyte tulkitaan tunnin kuluessa ensimmäisen henkilön tulkinnasta. Laboratorion sisäisen lukemaepävarmuuden laskeminen on esitetty kaavoissa 9 — 12. [5.]

Kaavassa 9 on esitetty useampien henkilöiden laskemien tulosten tuloskohtaisen keskiarvon ( $m$ ) laskeminen, jossa  $a$  on osallistuvien henkilöiden lukumäärä.

$$m = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_a}{a} \quad (9)$$

Kaavassa 10 on esitetty keskihajonnan ( $s$ ) laskeminen, jossa  $a$  on osallistuvien henkilöiden lukumäärä.

$$s = \sqrt{\frac{(x_1 - m)^2 + (x_2 - m)^2 + \dots + (x_a - m)^2}{a - 1}} \quad (10)$$

Kaavassa 11 on esitetty suhteellisen varianssin ( $u_{rel,L}$ ) laskeminen.

$$u_{rel,L} = s/m \quad (11)$$

Kaavassa 12 on esitetty laboratorion sisäisen lukemaepävarmuuden laskeminen, jossa  $n$  on näytteiden lukumäärä.

$$\text{Laboratorion sisäinen lukemaepävarmuus} = \sqrt{\frac{U_{rel,L_1}^2 + U_{rel,L_2}^2 + \dots + U_{rel,L_n}^2}{n}} \quad (12)$$

Laboratorion sisäisen lukemaepävarmuuden vaihtelu on suurempaa, kuin henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden vaihtelu [7]. Jos laboratorion sisäinen lukemaepävarmuus ylittää suositellun kymmenen prosentin ylärajan, tulisi selvittää onko vaihtelu tietystä näytteestä, henkilöstä vai molemmista johtuvaa.

### 3.3.3 Suhteellinen saanto

Suhteellinen saanto on työkalu menetelmien väliseen vertailuun. Suhteellisen saannon määrittämisessä verifioitavaa menetelmää verrataan tunnettuun ja luotettavaksi todettuun referenssimenetelmään, kuten esimerkiksi ISO-sarjan standardimenetelmiin. [8.] Opinnäytetyössä suhteellisen saannon määrittämisellä pyrittiin vertailemaan kahta eri matriisia, pullovettä ja kaivovettä. Mahdollisen matriisiefektin oletettiin näkyvän tilastollisena erona alkuperäisen maljavalumenetelmän ja verifioitavan petrifilmimenetelmän välillä eri matriiseilla.

Suhteellisen saannon määrittäminen perustuu näytteiden parittaiseen analysointiin kahdella menetelmällä, joiden oletetaan antavan tilastollisesti samanlaisia tuloksia. Suhteellinen saanto lasketaan standardissa SFS-EN-ISO 17994:2014, ”Water quality. Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods”, esitettyjen kaavojen mukaisesti (kaavat 13-20). [8.]

Kaavassa 13 on esitetty menetelmien välisen suhteellisen eron logaritmisesti laskemisen kullekin tulosparille.  $x_1$  ja  $x_2$  ovat kahdella eri menetelmällä saadut lukemat. Jos toinen lukemista on nolla, käytetään kaavaa 14.

$$x_i = [\ln(x_1) - \ln(x_2)] \times 100 \quad (13)$$

Kaavassa 14 on esitetty suhteellisen eron arviointi, kun toinen tuloksista on nolla.  $x$  on nolosta poikkeava lukema. Tuloksia, joissa kummallakaan menetelmällä ei saada laskettua pesäkkeitä, ei oteta huomioon laskuissa.

$$x_i = [\ln(x + 1)] \times 100 \quad (14)$$

Kaavassa 15 on esitetty tulosten suhteellisten erojen keskiarvon ( $\bar{x}_i$ ) laskeminen, jossa  $n$  on näytteiden lukumäärä.

$$\bar{x}_i = \frac{x_{i_1} + x_{i_2} + \dots + x_{i_n}}{n} \quad (15)$$

Kaavassa 16 on esitetty keskihajonnan ( $s$ ) laskeminen, jossa  $\bar{x}_n$  on tulosparin keskiarvo ja  $n$  on näytteiden lukumäärä.

$$s = \sqrt{\frac{(x_{i_1} - \bar{x}_1)^2 + (x_{i_2} - \bar{x}_2)^2 + \dots + (x_{i_n} - \bar{x}_n)^2}{n-1}} \quad (16)$$

Kaavassa 17 on esitetty keskivirheen (engl. *standard uncertainty* tai *standard error*) ( $s_{\bar{x}}$ ) laskeminen, jossa  $n$  on näytteiden lukumäärä.

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (17)$$

Kaavassa 18 on esitetty luottamusvälin puolileveyden ( $W$ ) laskeminen, jossa  $k$  on t-testin merkitsevyystasoa kuvaava vakio. 95 %:n merkitsevyystasolla  $k = 2$ .

$$W = k \times s_{\bar{x}} \quad (18)$$

Kaavassa 19 on esitetty luottamusvälin alarajan laskeminen.

$$X_L = \bar{x}_i - W \quad (19)$$

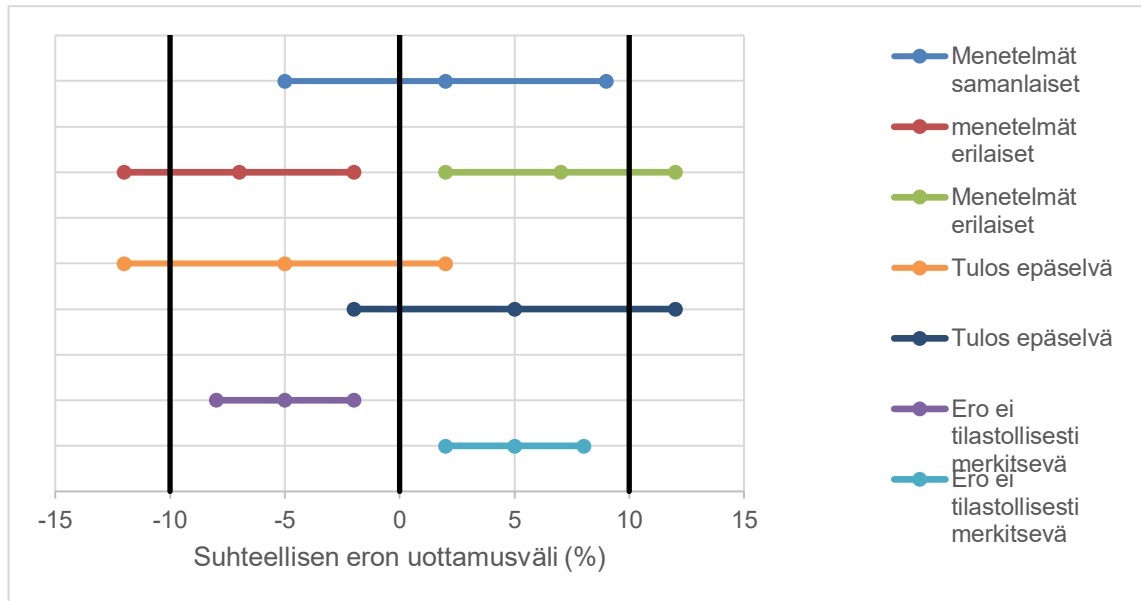
Kaavassa 20 on esitetty luottamusvälin ylärajan laskeminen.

$$X_U = \bar{x}_i + W \quad (20)$$

Luottamusvälin vaihteluvälin perusteella menetelmien eroa voidaan tulkita seuraavasti:

- Jos vaihteluväli on  $-10$  ja  $10$ :n välillä, menetelmät ovat samanlaiset.
- Jos vaihteluvälin alaraja  $> 0$  tai yläraja  $< 0$ , menetelmät ovat erilaiset.
- Jos vaihteluvälin alaraja  $< -10$  ja yläraja  $> 0$  tai alaraja  $< 0$  ja yläraja  $> 10$ , näytemäärä on liian pieni.

Tulkinta on esitetty kuvallisesti kuvassa 3.



Kuva 3. ISO-standardin 17994 esittämä tulkintatapa suhteellisen saannon tuloksille [8].

Suhteellisen saannon tuloksia voidaan arvioida myös parittaisen kaksisuuntaisen t-testin avulla esimerkiksi Excel-taulukkolaskentaohjelmalla. Tällöin voidaan verrata testissä laskettua p-arvoa alfaan eli merkitsevyystasoon. Jos p-arvo on pienempi kuin valittu merkitsevyystaso (esimerkiksi 95 %:n merkitsevyystasolla 0,05), menetelmien välinen ero on tilastollisesti merkitsevä.

### 3.4 Heterotrofisen pesäkeluvun määrittäminen

Verifioitavaksi menetelmäksi valittiin heterotrofisen pesäkeluvun määrittäminen petrifilmillä. Heterotrofisen pesäkeluku kuvaa näytteen kokonaismikrobimäärää. Heterotrofisia mikrobeja ovat kaikki mikro-organismit, jotka käyttävät hiiltä ravintonsa lähteenä eli eivät kykene tuottamaan itse tarvitsemaansa energiaa [9, s. 2]. Menetelmä antaa kvantitatiivista tietoa laajasta mikro-organismien joukosta, joten sitä käytetään indikaattorina lisääntyneestä mikrobikasvusta [10].

Erilaisia standardoituja menetelmiä heterotrofisen pesäkeluvun määrittämiselle on useita, joissa esimerkiksi inkubointiparametrit vaihtelevat ja tällöin myös

havaittavat mikrobit vaihtelevat [9, s. 2]. Opinnäytetyössä käytetään standardiin SFS-EN ISO 6222, ”Veden laatu. Viljeltävien mikro-organismien lukumäärän laskeminen. Pesäkelasku siirrostamalla agar-ravintoalustaan.” perustuvaa menetelmää, jossa näytteet inkuboidaan kahdessa eri lämpötilassa. Tällöin saadaan arvio kokonaismikrobimäärästä ja ihmis- tai eläinperäisten mikrobien määrästä [11]. Taulukossa 1 on kuvattu menetelmän inkubointiparametrit ja kohdeorganismit.

Taulukko 1. Heterotrofisten mikrobien inkubointiolosuhteet standardin SFS-EN ISO 6222 mukaisesti [11]. Vaihtoehtoisissa menetelmissä kokonaismikrobeja voidaan inkuboida jopa seitsemän vuorokautta [9].

Inkubointilämpötila (°C)	Inkubointiaika (tuntia)	Kohdeorganismit
22 ± 2	68 ± 4	bakteerit, hiivat ja homeet
36 ± 2	44 ± 4	Ihmis- ja eläinperäiset bakteerit

Pesäkeluvun määrittystä käytetään hyödyksi esimerkiksi talousvesien ja pulloitetujen vesien laadunvalvonnassa. Hyväksyttävät rajat pesäkeluvulle vaihtelevat kohteen mukaan. [10.] Suomen lainsäädännössä käyttövesien pesäkeluvulle ei ole säädetty raja-arvoa, vaan tulosta verrataan veden tavanomaisiin pesäkeluvun arvoihin ja lainsäädännön näkökulmasta tulos on hyväksyttävä, kun siinä ei ole epätavallisia muutoksia [12].

## 4 Työn toteutus

Verifiointin suoritus tehtiin Metropolia ammattikorkeakoulun mikrobiologian laboratoriossa. Näytteiksi valittiin sopivia kaivovesinäytteitä vesianalyysiprojektikurssin opiskelijoiden tulosten perusteella.

#### 4.1 Käytetyt reagenssit ja kasvatusalustat

Taulukossa 2 on esitetty työssä käytetyt reagenssit.

Taulukko 2. Työssä käytetty hiivauuteagar valmistettiin ISO-standardin 6222 mukaisesti. Myös valmiiden kaupallisten ravinneagarien käyttö on mahdollista.

Reagenssi	Valmistaja	Tuotenumero	Käyttökohde
Peptonijauhe	VWR	84600.0500	Peptonivesi
Agarjauhe	Neogen	NCM0238A	Hiivauuteagar
Kaseiini/tryptoni	Neogen	NCM0120A	Hiivauuteagar
Hiivauute	Neogen	NCM0218A	Hiivauuteagar
Heterotrophic Organisms Vitroids	Sigma Aldrich	VT025046	Näytteiden kontaminointi

Lisäksi käytettiin 3M Petrifilm Aqua -petrifilmejä (tuotenumero 6450/6452) petrifilmimenetelmän verifiointiin.

#### 4.2 Käytetyt mittavälineet ja laboratoriolaitteet

Työssä käytettiin seuraavia mittavälineitä ja laitteita:

- analyysivaaka, Mettler Toledo MS 105
- autoklaavi, Systec VE-65
- inkubaattoreita, Memmert IF 110 Plus
- pesäkelaskuri (automaattinen), Interscience Scan 4000
- pesäkelaskuri (manuaalinen), Interscience Scan 100.

#### 4.3 Menettelyohje

Menettelyohje ilman esimerkkilaskuja on esitetty liitteessä 2. Menettelyohje luotiin valmiiseen Metropolian menettelyohjepohjaan. Ohjeen luomiseen käytettiin apuna jo olemassa olevia ohjeita, jotta sisältö saatiin pidettyä linjassa

muiden menettelyohjeiden kanssa. Verifioinnin parametrit ja suoritus, sekä valinnaiset parametrit ja määritykset verifioinnin tueksi perustuivat vesimikrobiologiastandardiin SFS-EN ISO 13843:2017 [5]. Verifioinnin hyväksymisrajat perustuivat toistettavuuden osalta elintarvikemikrobiologiastandardiin SFS-EN ISO 16410–3:2021 ja muiden parametrien osalta em. vesimikrobiologiastandardiin [4; 5]. Verifiointiohjeen yleiset ohjeet perustuivat VTT Validoinnin suunnittelun opas -kirjaan, [3] sekä omaan kokemukseen laboratoriotyöskentelystä.

Ohjetta muutettiin koulun käyttöön sopivammaksi lisäämällä vesimikrobiologiastandardissa mainitut suorituskyvyn mittarit valinnaiseksi osaksi verifointia, koska kaikkien pesäkkeiden tunnistaminen ja varmistaminen lisäisi työmäärää huomattavasti eikä ole myöskään kaikissa tapauksissa mahdollista. Ohjeeseen lisättiin myös valinnainen määräys, suhteellinen saanto, avuksi menetelmien vertailuun ja uusien matriisien sopivuuden arviointiin. Uuden näytematriisin lisääminen vaatisi usein lähtökohtaisesti validoinnin, mutta koulun käyttöön haluttiin saada toinen vaihtoehto verifioinnin tueksi.

Ohjetta testattiin verifioimalla heterotrofisen pesäkeluvun määräitys petrifilmimenetelmällä. Verifioinnin tuloksista tehtiin esimerkkilaskut verifiointiohjeen tueksi.

#### 4.4 Verifointisuunnitelma

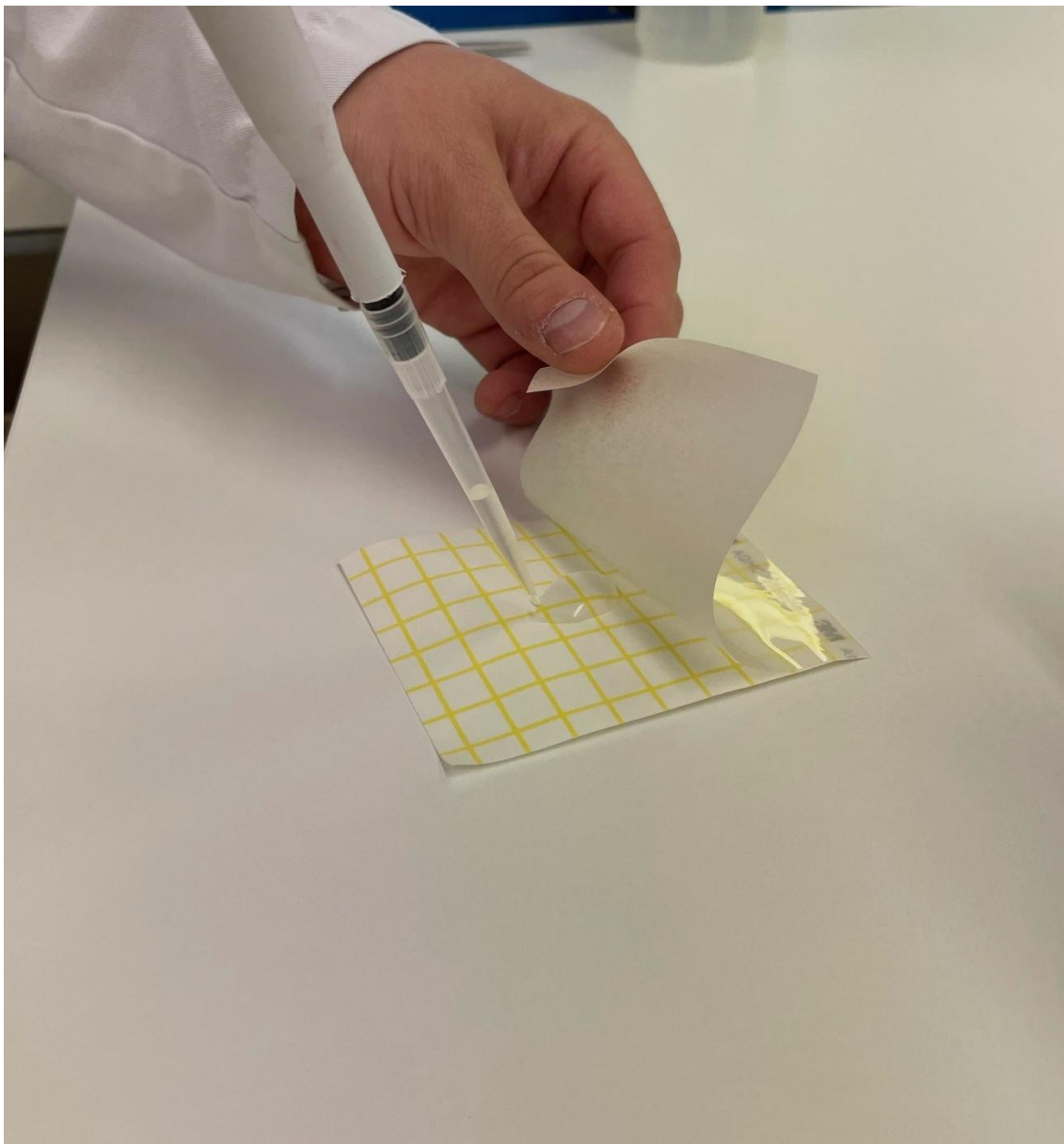
Verifointisuunnitelmassa (liite 1) kuvattiin kokonaispesäkeluvun määräitys petrifilmimenetelmällä, sekä menetelmän käyttökohde osana Metropolia ammattikorkeakoulun opetussuunnitelmaa. Kuvattiin verifointiparametrit, määritysrajat ja hyväksymisrajat, sekä suhteellisen saannon määräitys ylimääräisenä analyysinä. Lisäksi kuvattiin sopivien näytteiden hankkiminen ja valinta, työmäärä, aikataulu ja tarvikkeet.

Hyväksymisraja toistettavuudelle saatiin petrifilmimenetelmän validointidatasta, joka perustui vertailututkimukseen, jossa verrattiin useita petrifilmimenetelmiä

tunnettuihin referenssimenetelmiin [6]. Tutkimuksen tuloksissa oli esitetty toistettavuusarvoja ainoastaan korkeammassa lämpötilassa suoritettulle inkuboinnille. Toistettavuusarvojen uskottiin kuitenkin pätevän myös matalammassa lämpötilassa, koska valmistajan mukaan petrifilmit oli suunniteltu käytettäväksi molemmissa inkubointilämpötiloissa. Tämän vuoksi päätettiin käyttää toistettavuudelle samaa hyväksymisrajaa, 7,6 %, molemmissa inkubointilämpötiloissa.

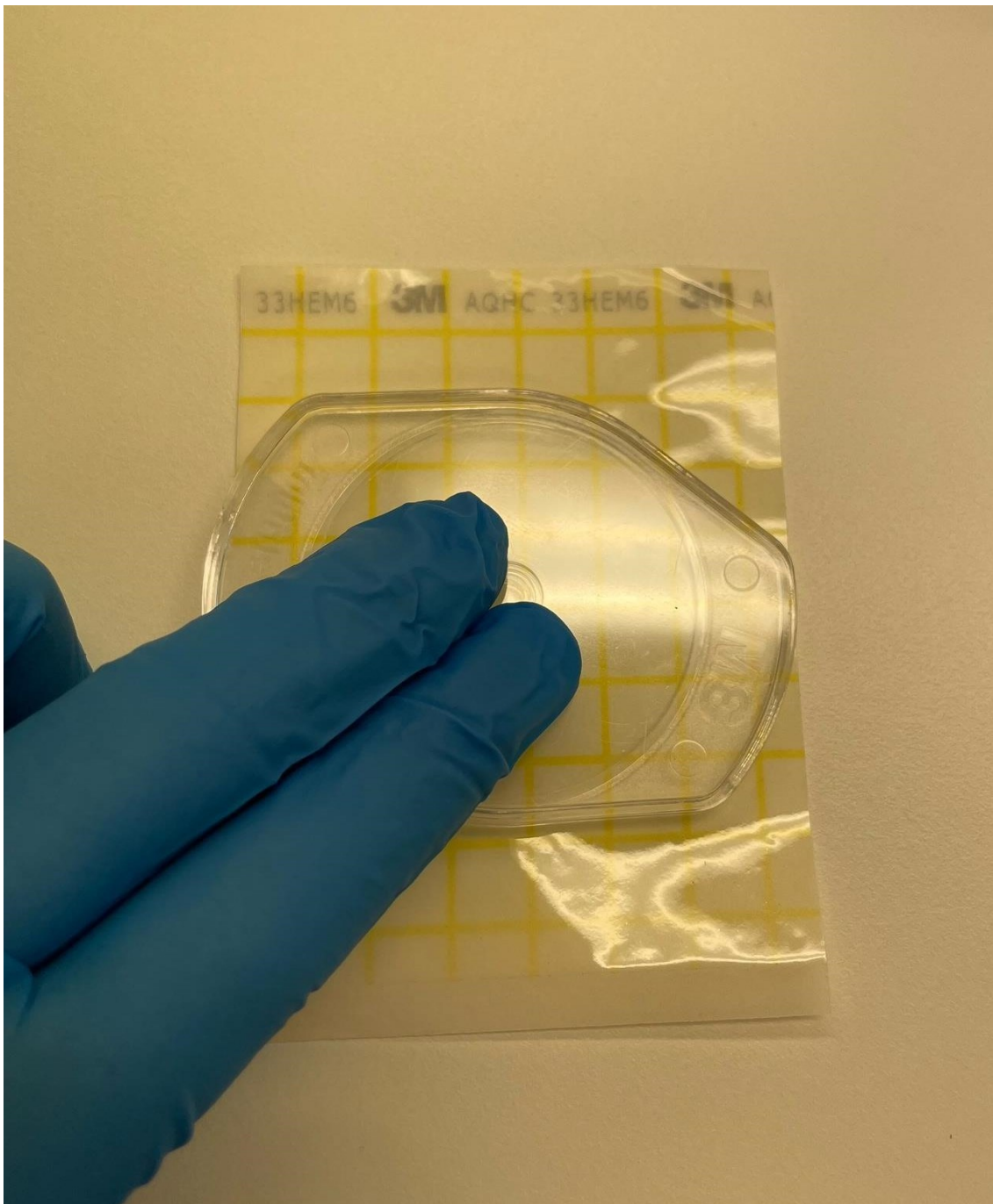
#### 4.5 Laboratorion sisäinen toistettavuus

Toistettavuusmääritykseen valittiin kolme verifioinnin mittausalueelle sopivaksi arvioitua näytettä. Kustakin näytteestä viljeltiin kaksikymmentä rinnakkaismääritystä (verifioinnin vaatimusten mukaisesti 10 rinnakkaista jokaista inkubointilämpötilaa varten) petrifilmille valmistajan ohjeiden mukaisesti [13]. Näytettä annosteltiin yksi millilitra automaattipipetillä petrifilmille kasvatusalustan ja suojamuovin väliin (kuva 4).



Kuva 4. Petrifilmille annostellaan yksi millilitra näytettä.

Suojamuovi laskettiin filmin päälle ja näyte levitettiin painamalla petrifilmiä 3M:n levitystyökalulla (kuva 5).



Kuva 5. Näytteen levitys tapahtuu painamalla filmiä kevyesti levittimellä.

Näytteet inkuboitii kahdessa inkubaattorissa pinottuna alle 20 filmin pinoihin valmistajan ohjeen mukaisesti. Inkubointi suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti kahdessa lämpötilassa, inkuboimalla puolet näytteistä 68 tuntia 22 °C:ssa ja puolet 44 tuntia 36 °C:ssa. [13.]

Inkuboinnin jälkeen näytteet tulkittiin manuaalisella pesäkkeenlaskijalla, sekä automaattisella pesäkkeenlukijalla tulosten tulkintaa varten. Uutta automaattista pesäkkeenlaskijaa haluttiin testata opinnäytetyön yhteydessä ja verrata tuloksia käsikäyttöiseen pesäkkeenlaskijaan. Kaikki työssä esitetyt tulokset (pl. laboratorion sisäisen lukemaepävarmuuden määrittäminen) on saatu käyttäen automaattista pesäkkeenlaskijaa.

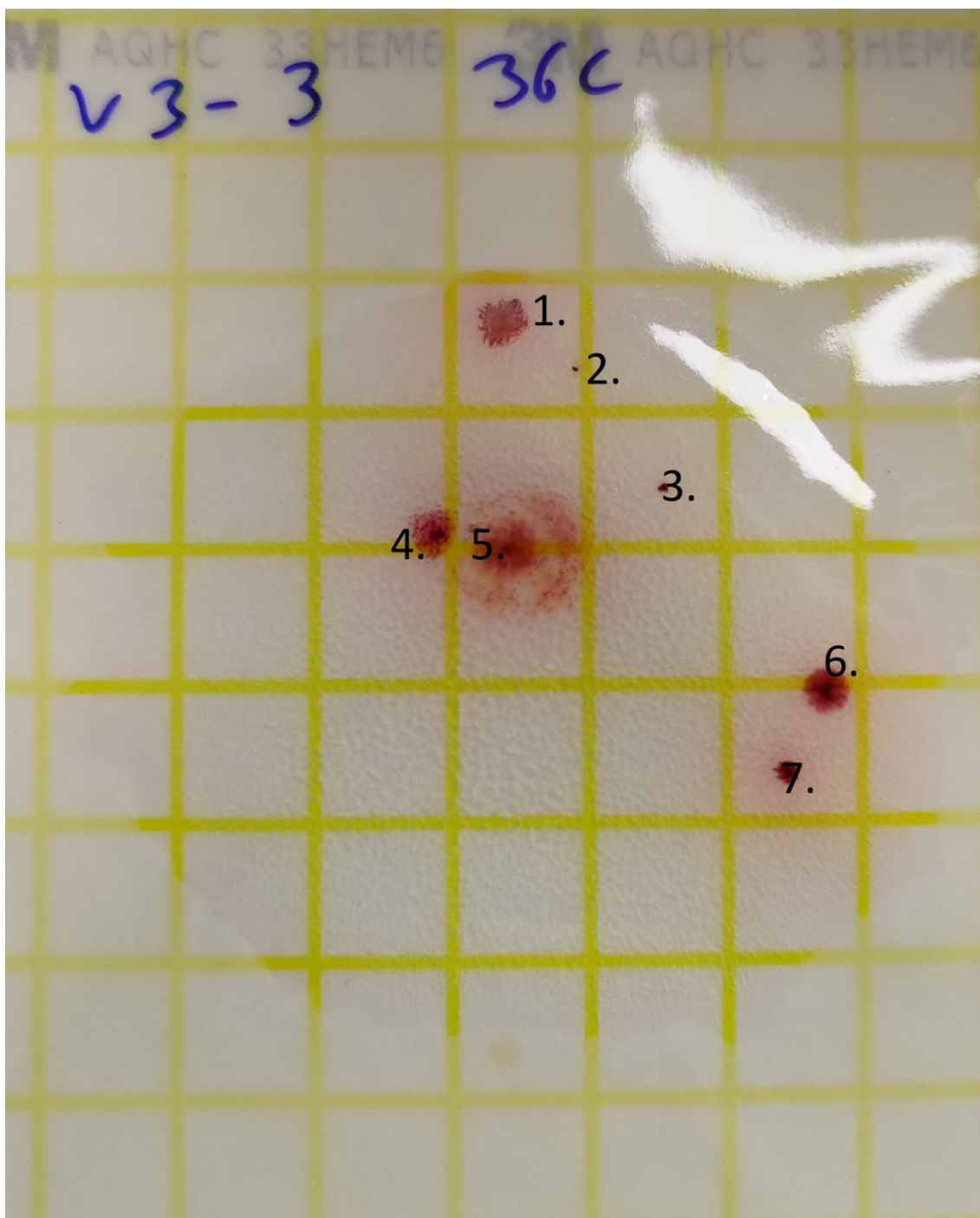
#### 4.6 Lukemaepävarmuus

Lukemaepävarmuuden määrittämistä varten kolmekymmentä toistettavuusmäärittämiseen käytettyä petrifilmiä tulkittiin automaattisella pesäkkeenlaskijalla yhden tunnin aikana kahdesti. Automaattisen pesäkkeenlaskijan tuloksia seurattiin ja korjattiin manuaalisesti selkeät virheelliset tai puuttuvat pesäkkeet. Kuvassa 6 on esimerkki manuaalisesti korjatusta petrifilmin tuloksesta.



Kuva 6. Automaattisen pesäkelaskijan resoluutiota pystyi säätämään, mutta tällöin yksittäisiä pesäkkeitä hylättiin enemmän.

Esimerkkikuvassa automaattisesti laskettu tulos on levinneen pesäkkeen takia 20 pmy. Manuaalisesti korjattuna tulos on 7 pmy. Kuvassa 7 on esitetty manuaalisesti lasketut pesäkkeet samalta petrifilmiltä.



Kuva 7. Levinneet pesäkkeet laskettiin yhtenä pesäkkeenä.

Henkilökohtainen lukemaepävarmuus laskettiin kolmenkymmenen tulkitun petrifilmin perusteella. Laboratorion sisäisen lukemaepävarmuuden määrittystä varten filmit laskettiin myös käsin ja laskettiin tulos käyttäen manuaalisesti ja

automaattisesti tulkittuja pesäkkeitä. Tämän oletettiin antavan vaihtelevia, mutta samankaltaisia tuloksia.

#### 4.7 Suhteellinen saanto

Menetelmien vertailua varten valmistettiin referenssimenetelmälle sopiva elatusaine standardin SFS-EN ISO 6222 mukaisesti [11]. Elatusaineen koostumus on kuvattu taulukossa 3. Elatusainetta valmistettiin 2,5 litraa. Lisäksi valmistettiin puoli litraa peptonivettä kaupallisesta peptonijauheesta valmistajan ohjeiden mukaisesti liuottamalla 10 g:a peptonia puoleen litraan ionivaihdettua vettä. Sekä agar että peptonivesi autoklavoitiin ennen käyttöä.

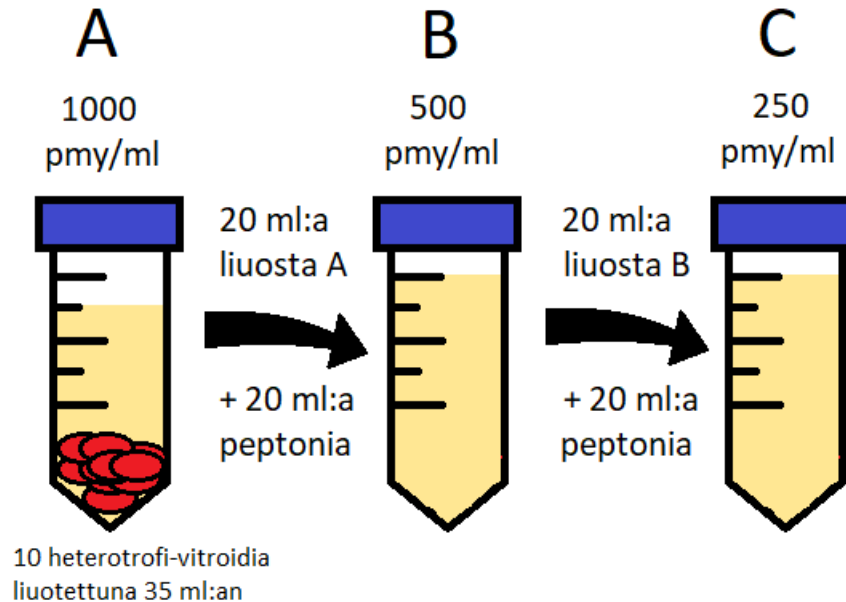
Taulukko 3. Hiivauuteagarin ainesosat referenssimenetelmänä toimineelle maljavalumenetelmälle.

<b>Ainesosa</b>	<b>Määrä (g/l)</b>
Tryptoni	6,0
Kuivattu hiivauute	3,0
Agar	15,0

Pullovesinäytteiksi hankittiin viisi kaupallista lähdevesipulloa eri valmistajilta. Lähdevesien pesäkeluvuksi oletettiin alle 10 pmy/ml, joten näytteet kontaminoitiin kaupallisella heterotrofimikrobiseoksella (taulukko 2). Matriisien välistä eroa haluttiin tutkia koko pitoisuusalueella, joten pullovedet kontaminoitiin kolmella eri pitoisuudella. Pitoisuudet on esitetty taulukossa 4.

Heterotrofi-seos rehydratoitiin peptonivedellä valmistajan ohjeiden mukaisesti, liuottamalla kymmenen heterotrofivitroidia 35 ml:aan peptonia [15]. Valmistetun referenssinäytteen (Referenssi A) pitoisuus oli tällöin valmistajan ilmoittaman pitoisuusarvion perusteella noin 1 000 pmy/ml. Referenssi A:ta siirrettiin 20 ml:a Falcon-putkeen ja laimennettiin kaksinkertaisesti lisäämällä 20 ml:a peptonia. Laimennetun referenssinäytteen (Referenssi B) pitoisuus oli tällöin noin 500 pmy/ml. Referenssi B:tä siirrettiin 20 ml:a Falcon-putkeen ja laimennettiin

kaksinkertaisesti lisäämällä 20 ml peptonia. Laimennetun referenssinäytteen (Referenssi C) pitoisuus oli tällöin noin 250 pmy/ml. Kuvassa 8 on esitetty laimennosten valmistaminen.



Kuva 8. Lopullisten kontaminoitujen näytteiden pitoisuuden haluttiin olevan n. 20 —150 pmy.

Pullovesinäytteet kontaminoitiin kolmella tasolla. Kaikki näytteet valmistettiin lisäämällä 5,5 ml:aan näytettä 0,5 ml soveltuvaa referenssinäytettä. Pullovesien kontaminointitasot on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Pitoisuuden vaihteluväli perustui näytteen valmistajan ilmoittamiin heterotrofitroidien pitoisuuksiin.

Kontaminaatiotaso	Referenssinäyte	Pitoisuus (pmy/ml)	Pitoisuuden vaihteluväli (pmy/ml)
Matala	C	25	11–56
Keskitaso	B	50	23–113
Korkea	A	100	46–226

Jokainen kontaminoitu näyte viljeltiin rinnakkaisena verifioitavalla menetelmällä ja referenssimenetelmällä. Jokaisesta näytteestä viljeltiin tällöin kaksi petrifilmiä ja kaksi maljaa. Näytteitä inkuboitiin 68 tuntia 22 °C:ssa ja tulkittiin automaattisella pesäkelaskurilla. Inkubointi suoritettiin vain yhdessä lämpötilassa työmäärän vähentämiseksi.

## 5 Tulokset ja tulosten käsittely

### 5.1 Toistettavuus

Toistettavuusmäärityksen tulokset kokonaismikroobeille on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Lasketut pesäkemäärät kolmen näytteen rinnakkaismäärityksille. Inkubointi suoritettu 22 °C:n lämpötilassa.

Mittaus	Näyte 1 (pmy/ml)	Näyte 2 (pmy/ml)	Näyte 3 (pmy/ml)
1	100	40	15
2	124	32	22
3	103	28	18
4	95	40	11
5	141	26	17
6	99	34	16
7	92	26	11
8	104	21	13
9	118	30	14
10	119	30	19

Toistettavuusmäärityksen tulokset ihmis- ja eläinperäisille bakteereille on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. Lasketut pesäkemäärät kolmen näytteen rinnakkaismäärittämiselle 37 °C:n lämpötilassa.

Rinnakkaismäärittämis	Näyte 1 (pmy/ml)	Näyte 2 (pmy/ml)	Näyte 3 (pmy/ml)
1	21	4	9
2	30	2	4
3	18	4	8
4	33	3	12
5	7	3	4
6	20	2	3
7	22	0	5
8	20	5	11
9	16	3	9
10	16	2	7

Tuloksille laskettiin luvussa 3.3.1 esitetyt parametrit. Tilastolliset parametrit kokonaismikrobimäärittämiselle on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Kokonaismikrobien toistettavuusmäärittämisparametrit pesäkelukujen perusteella.

Näyte	Keskiarvo, $\bar{x}$ (pmy/ml)	Varianssi, $s^2$	Suhteellinen toiminnallinen varianssi, $u_0^2$	Poissonin hajontaindeksi, $\chi^2_{r-1}$
1	109,5	239,4	0,01	19,7
2	30,7	36,9	0,007	10,8
3	15,6	12,5	0,011	10,2

Kolmen näytteen perusteella heterotrofisen pesäkeluvun kokonaismikrobimäärittämisparametri ( $S_r$ ), (kaava 4), saatiin 3,9 %. Tilastolliset parametrit ihmis- ja eläinperäisten bakteerien määrittämiselle on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8. Ihmis- ja eläinperäisten bakteerien toistettavuusmäärittelyn tilastolliset parametrit pesäkelukujen perusteella.

Näyte	keskiarvo, $\bar{x}$	varianssi, $s^2$	suhteellinen toiminnallinen varianssi, $u_0^2$	Poissonin hajontaindeksi, $X^2_{r-1}$
1	20,3	53,1	0,08	23,6
2	2,8	2,0	-0,01	6,3
3	7,2	9,7	0,007	12,2

Kolmen näytteen perusteella ihmis- ja eläinperäisten bakteerien heterotrofisen pesäkeluvun toistettavuudeksi ( $S_r$ ), (kaava 4), saatiin 8,3 %.

## 5.2 Lukemaepävarmuus

Toistettavuusmäärittelyssä käytettyjen petrifilmien pesäkeluku laskettiin kahdesti. Taulukossa 9 on esitetty kokonaismikrobimäärittelyn lukemaparit.

Taulukko 9. Kokonaismikrobimäärittelyn petrifilmit tulkittiin kahdesti automaattisella pesäkkeenlukijalla.

Näyte	Lukema 1 (pmy)	Lukema 2 (pmy)
1	100	101
2	124	121
3	103	102
4	95	94
5	141	138
6	99	93
7	92	94
8	104	123
9	118	118
10	119	116

<b>Näyte</b>	<b>Lukema 1 (pmy)</b>	<b>Lukema 2 (pmy)</b>
11	40	37
12	32	31
13	28	34
14	40	39
15	26	24
16	34	33
17	26	25
18	21	22
19	30	29
20	30	28
21	15	15
22	22	22
23	18	19
24	11	11
25	17	18
26	16	14
27	11	11
28	13	13
29	14	14
30	19	21

Taulukossa 10 on esitetty ihmis- ja eläinperäisten bakteerien määrittämiseen käytettyjen petrifilmien lukemaparit.

Taulukko 10. Ihmis- ja eläinperäisten bakteerien määrittämiseen käytetyt petrifilmit tulkittiin kahdesti automaattisella pesäkkeenlukijalla.

<b>Näyte</b>	<b>Lukema 1 (pmy)</b>	<b>Lukema 2 (pmy)</b>
1	21	18
2	30	24
3	18	21
4	33	13
5	7	13
6	20	15
7	22	11
8	20	12
9	16	14
10	16	11
11	4	5
12	2	2
13	4	2
14	3	3
15	3	3
16	2	2
17	0	0
18	5	5
19	3	4
20	2	2
21	9	11
22	4	5
23	8	11
24	12	7
25	4	4

Näyte	Lukema 1 (pmy)	Lukema 2 (pmy)
26	3	3
27	5	5
28	11	11
29	9	9
30	7	9
31	14	14
32	19	21

Lukemaepävarmuuden laskemisessa ei huomioitu petrifilmejä, joissa kasvoi alle 20 pesäkkeen muodostavaa yksikköä. Henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden tilastolliset parametrit laskettiin luvussa 3.3.2 esitetyllä tavalla. Taulukossa 11 on esitetty henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden tilastolliset parametrit kokonaismikrobimääritykselle.

Taulukko 11. Henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden parametrit kahdesti tulkittujen petrifilmien perusteella.

Kohdemikrobit	Laskennan suhteellinen varianssi, $U^2_{rel,L}$	Lukemaepävarmuus (%)
Kokonaismikrobit	0,02	4,6

Taulukosta 10 havaitaan lähes kaikkien ihmis- ja eläinperäisten bakteerien lukemaparien sisältävän alle 20 pmy:n lukemia. Matalien tulosten takia lukemaepävarmuutta ei pystytty määrittämään 37 °C:n inkubointilämpötilassa. Taulukossa 12 on esitetty laboratorion sisäisen lukemaepävarmuusmäärityksen tulokset kokonaismikrobeille.

Taulukko 12. Petrifilmit luettiin kahdesti käsin ja kahdesti automaattisella pesäkkeenlukijalla. Tämän oletettiin vastaavan useamman ihmisen tulkintaa.

<b>Näyte</b>	<b>Lukema 1 automaattisella laskurilla (pmy)</b>	<b>Lukema 2 automaattisella laskurilla (pmy)</b>	<b>Lukema 3 käsin (pmy)</b>	<b>Lukema 4 käsin (pmy)</b>
1	122	114	100	101
2	134	136	124	121
3	114	125	103	102
4	108	110	95	94
5	153	150	141	138
6	95	101	99	93
7	97	104	92	94
8	147	146	104	123
9	126	135	118	118
10	119	119	119	116
11	45	44	40	37
12	62	65	32	31
13	64	61	28	34
14	67	73	40	39
15	37	36	26	24
16	49	48	34	33
17	40	41	26	25
18	36	35	21	22
19	41	41	30	29
20	41	36	30	28
21	15	14	15	15
22	27	23	22	22
23	20	20	18	19
24	12	14	11	11

<b>Näyte</b>	<b>Lukema 1 automaattisella laskurilla (pmy)</b>	<b>Lukema 2 automaattisella laskurilla (pmy)</b>	<b>Lukema 3 käsini (pmy)</b>	<b>Lukema 4 käsini (pmy)</b>
25	16	16	17	18
26	12	12	16	14
27	13	12	11	11
28	14	14	13	13
29	17	16	14	14
30	26	30	19	21

Laboratorion sisäisen lukemaepävarmuusmäärityksen pesäkeluvut ihmis- ja eläinperäisille bakteereille on esitetty taulukossa 13.

Taulukko 13. Ihmis- ja eläinperäisillä bakteereilla kasvu jäi hyvin matalaksi.

<b>näyte</b>	<b>lukema 1</b>	<b>lukema 2</b>	<b>lukema k1</b>	<b>lukema k2</b>
1	21	18	16	17
2	30	24	10	11
3	18	21	9	9
4	33	13	11	12
5	7	13	8	9
6	20	15	10	8
7	22	11	9	9
8	20	12	13	13
9	16	14	8	8
10	16	11	14	13
11	4	5	4	4
12	2	2	2	2
13	4	2	2	2
14	3	3	3	3

15	3	3	2	1
16	2	2	2	2
17	0	0	0	0
18	5	5	6	7
19	3	4	4	4
20	2	2	2	2
21	9	11	7	7
22	4	5	4	4
23	8	11	7	7
24	12	7	7	7
25	4	4	4	4
26	3	3	3	3
27	5	5	5	5
28	11	11	9	9
29	9	9	9	9
30	7	9	8	7

Tulosten tilastollinen käsittely suoritettiin kappaleessa 3.3.2 esitetyllä tavalla. Kokonaismikrobimäärityksen laboratorion sisäisen lukemaepävarmuuden tilastolliset parametrit on esitetty taulukossa 14.

Taulukko 14. Laboratorion sisäisen lukemaepävarmuuden määrittämisen tulos. Kahden eri laskentamenetelmän käyttäminen näkyy korkeana lukemaepävarmuutena.

Kohdemikrobit	Laskennan suhteellinen varianssi, $U^2_{rel,L}$	Lukemaepävarmuus (%)
Kokonaismikrobit	0,09	30,0

Taulukosta 13 havaitaan lähes kaikkien ihmis- ja eläinperäisten bakteerien lukemien olevan alle 20 pmy. Matalien tulosten takia myöskään laboratorion sisäistä lukemaepävarmuutta ihmis- ja eläinperäisille bakteereille ei pystytty määrittämään.

### 5.3 Suhteellinen saanto

Taulukossa 15 on esitetty suhteellisen saannon tulokset pullovesinäytteille.

Taulukko 15. Näytteenimen ensimmäinen kirjain (P) kuvaa pullovesinäytettä ja numero näytenumeroa. Toisen osan kirjain (A, B tai C) kuvaavat kontaminaatiotasoa taulukon 4 mukaisesti ja numero (1 tai 2) kuvaavat rinnakkaismäärittystä kontaminoidusta näytteestä.

<b>Näyte</b>	<b>Lukema petrifilmi (pmy/ml)</b>	<b>Lukema maljavalu (pmy/ml)</b>
P1-A1	122	407
P1-A2	115	218
P2-A1	127	109
P2-A2	124	109
P3-A1	145	99
P3-A2	133	118
P4-A1	147	125
P4-A2	140	103
P5-A1	107	73
P5-A2	124	97
P1-B1	49	271
P1-B2	37	222
P2-B1	47	35
P2-B2	39	39
P3-B1	42	42

<b>Näyte</b>	<b>Lukema petrifilmi (pmy/ml)</b>	<b>Lukema maljavalu (pmy/ml)</b>
P3-B2	34	35
P4-B1	59	39
P4-B2	46	41
P5-B1	44	36
P5-b2	45	37
P1-C1	22	589
P1-C2	25	495
P2-C1	23	23
P2-C2	19	23
P3-C1	25	21
P3-C2	14	18
P4-C1	28	18
P4-C2	19	21
P5-C1	20	21
P5-C2	22	17

Taulukossa 16 on esitetty suhteellisen saannon tulokset kaivovesinäytteille.

Taulukko 16. Näytenimen ensimmäinen kirjain (K) kuvaa kaivovesinäytettä ja numero näytenumeroa. Toisen osan kirjain (A, B tai C) kuvaavat kontaminaatiotasoa taulukon 4 mukaisesti ja numero (1 tai 2) kuvaavat rinnakkaismäärittystä kontaminoidusta näytteestä.

<b>Näyte</b>	<b>Lukema petrifilmi (pmy)</b>	<b>Lukema maljavalu (pmy)</b>
K1-B1	41	70
K2-B1	47	56
K3-B1	48	52
K4-B1	39	44

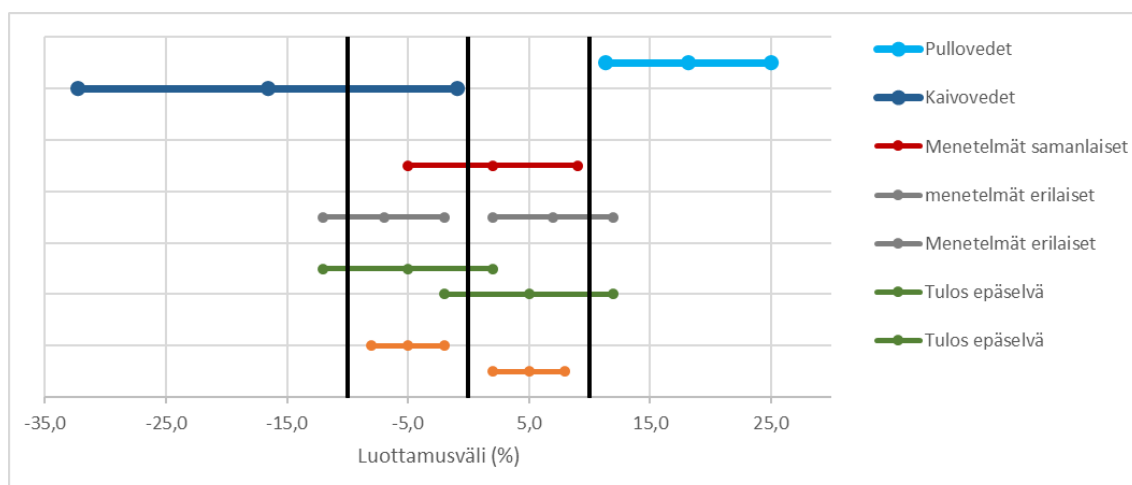
<b>Näyte</b>	<b>Lukema petrifilmi (pmy)</b>	<b>Lukema maljavalu (pmy)</b>
K5-B1	49	51
K6-B1	38	53
K7-B1	43	31
K8-B1	42	190
K9-B1	50	183
K10-B1	40	201
K1-C1	20	43
K2-C1	29	27
K3-C1	31	27
K4-C1	17	28
K5-C1	22	28
K6-C1	29	27
K7-C1	34	39
K8-C1	26	174
K9-C1	29	457
K10-C1	27	178

Suhteellisen saannon tulokset käsiteltiin kappaleen 3.3.3 mukaisesti. Näytteitä joiden parittaisissa tuloksissa oli selkeä poikkeama, kuten taulukossa 15 näytteissä P1-B1 ja P1-B2, ei otettu laskuissa huomioon. Suhteellisen saannon tilastolliset parametrit on esitetty taulukossa 17.

Taulukko 17. Suhteellisen saannon tilastolliset parametrit ovat menetelmien suhteellista eroa kuvaavia arvoja. Esimerkiksi keskiarvo ( $\bar{x}_i$ ) kuvaa menetelmien välisten suhteellisten erojen keskiarvoa logaritmisella asteikolla.

Näytematriisi	Keskiarvo $\bar{x}_i$	Keskihajonta, $s$	Keskivirhe, $s_{\bar{x}}$	Luottamusvälin puolileveys, $W$	Luottamusväli
Pulloveresi	18,2	15,3	3,4	6,8	[11,4;25,0]
Kaivoveresi	-16,6	29,3	7,8	15,7	[-32,3;-0,9]

Taulukossa 17 esitetyt luottamusvälit on esitetty kuvassa 9.



Kuva 9. Menetelmien suhteellisen eron keskiarvon vaihteluväli eri näytematriiseille on kuvattu sinisellä värillä kuvaajan vaaka-akseleilla kohdissa "Pulloveresi" ja "Kaivoveresi". Tulosten tulkinta on kuvattu vaaka-akseleilla kohdissa "Menetelmät samanlaiset", "Menetelmät erilaiset" ja "Tulos epäselvä".

Suhteellisen saannon tuloksia tutkittiin myös kaksisuuntaisen parittaisen t-testin avulla. Taulukossa 18 on esitetty tilastollisen testin tulokset molemmille näytematriiseille yksin ja yhdistettynä.

Taulukko 18. Parittaisen t-testin avulla saatiin nopea arvio menetelmien välisestä erosta eri näytematriiseilla.

Näytematriisi	p-arvo	t-kriittinen	t-laskettu	Vapausasteet
Pullovesi	0,000212	2,093	4,563	19
Kaivovesi	0,04656	2,160	2,211	13
Yhdistetty	0,0498	2,035	2,036	33

Parittaisen kaksisuuntaisen t-testin tulosten perusteella menetelmien välillä ei havaittu eroa kaivovesillä. Pullovesillä menetelmien välinen ero oli tilastollisesti merkitsevä. Molemmat matriisit yhdistettynä menetelmien välinen ero oli tilastollisesti melkein merkitsevä.

## 6 Lopputulokset

### 6.1 Toistettavuus

Toistettavuuden hyväksymisraja oli 7,6 % [6]. Kokonaismikrobimäärityksen toistettavuus osana heterotrofisen pesäkeluvun määrittystä petrifilmimenetelmällä oli 3,9 %. Ihmis- ja eläinperäisten bakteerien toistettavuus osana heterotrofisen pesäkeluvun määrittystä petrifilmimenetelmällä oli 8,3 %. Toistettavuus hyväksyttiin kokonaismikrobien osalta ja hylättiin ihmis- ja eläinperäisten bakteerien osalta.

Poissonin hajontaindeksin yläraja normaalijakautuneille rinnakkaismäärityksille oli 16,92. Näytteelle numero yksi laskettu poissonin hajontaindeksi oli 22 °C:ssa inkuboiduilla näytteillä 19,2 ja 36 °C:ssa inkuboiduilla näytteillä 23,6, joten hajonnan todettiin poikkeavan normaalijakaumasta. Kahden muun näytteen osalta rinnakkaismääritysten hajonta oli normaalijakautunutta, joten hajontaan liittyvällä epävarmuudella ei todettu olevan merkittävää vaikutusta toistettavuuteen.

## 6.2 Lukemaepävarmuus

Lukemaepävarmuuden ideaali yläraja oli 2,5 % ja hyväksymisraja 10 % [5]. Kokonaismikrobien osalta henkilökohtainen lukemaepävarmuus oli 4,6 % ja laboratorion sisäinen lukemaepävarmuus 30,0 %. Ihmis- ja eläinperäisten bakteerien osalta henkilökohtaista lukemaepävarmuutta tai laboratorion sisäistä lukemaepävarmuutta ei pystytty määrittämään liian alhaisten pesäkelukujen takia. Lukemaepävarmuus hyväksytään kokonaismikrobien osalta henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden perusteella ja hylätään kokonaisuudessaan ihmis- ja eläinperäisten bakteerien osalta.

## 6.3 Suhteellinen saanto

Kuvassa 9 havaittiin menetelmien eroavan toisistaan tilastollisesti merkitsevästi molempien näytematriisien osalta. Kaivovesien osalta tulos on myös lähellä ”epäselvää”, joka tarkoittaa näytemäärän olevan riittämätön. Parittaisen kaksisuuntaisen t-testin perusteella kaivovesillä ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroa menetelmien välillä ja pullovesissä havaittiin tilastollisesti erittäin merkitsevä ero.

Riippumattoman laboratorion vertailututkimuksen perusteella menetelmissä ei ole havaittu tilastollisesti merkittävää eroa pullovesien osalta [13].

Opinnäytetyössä havaittua eroa voidaan selittää sillä, että lopulliset näytemäärät olivat huomattavasti pienemmät, kuin standardin SFS-EN ISO 17994 mukaan tarvittavat viitteelliset näytemäärät suhteellisen saannon määrittämiseen [8]. Myös parittaisessa t-testissä näytemäärän olisi hyvä olla yli 30, johon ei päästy kummankaan yksittäisen matriisin osalta. Tämän perusteella suhteellisen saannon tulosta ei voida pitää luotettavana myöskään kaivovesien osalta. Edellä mainittujen seikkojen takia suhteellisen saannon tuloksia ei otettu verifiointissa huomioon.

## 6.4 Verifiointi

Verifiointin katsotaan onnistuneen heterotrofisen pesäkeluvun määrittämiselle kokonaismikrobimäärityksen osalta. Lukemaepävarmuus tulisi kuitenkin uusia laboratorion sisäisen toistettavuuden osalta käyttäen vain automaattista pesäkkeenlaskijaa.

Verifiointin katsotaan epäonnistuneen ihmis- ja eläinperäisten bakteerien osalta sekä toistettavuudessa, että mittausepävarmuudessa. Verifiointi suositellaan uusittavaksi käyttäen laboratorioissa kontaminoituja näytteitä riittävän mikrobikasvun takaamiseksi.

## 7 Yhteenveto

Opinnäytetyössä onnistuttiin luomaan selkeä ja yksinkertainen menettelyohje kvantitatiivisen mikrobiologisen menetelmän verifiointiin Metropolia Ammattikorkeakoulun käyttöön. Opinnäytetyön tavoitteiden mukaisesti saatiin pidettyä työmäärä varsinaisen verifiointin osalta hyvin maltillisena. Suhteellisen saannon lisääminen verifiointin tueksi ei suuren työmäärän takia osoittautunut niin käytännölliseksi ideaksi, kuin aluksi oletettiin, ja uutta matriisia lisätessä saattaisi olla mielekkäämpää suorittaa varsinainen validointi kyseiselle matriisille. Validointi voitaisiin suorittaa esimerkiksi standardin SFS-EN ISO 16140-4, "Microbiology of the food chain. Method validation. Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory", mukaisesti.

Verifiointin suoritus osoittautui haasteelliseksi 37 °C:n inkubointilämpötilassa, eikä näytteistä saatu verifiointin määrittämisalueelle sopivia tuloksia. Vaikka näytteet oli valittu opiskelijoiden aiempien tulosten perusteella, jäätin silti alle vaaditun 20 pmy:n pitoisuuden. Toisaalta oli jo aiemmassa tiedossa, että kyseisessä lämpötilassa saadaan alhaisempia tuloksia, kuin 22 °C:ssa suoritettavassa kokonaismikrobimäärityksessä, koska korkeampi inkubointilämpötila suosii ihmis- ja eläinperäisiä bakteereja, joita juomavesissä ei yleisesti ole lainkaan tai niitä on huomattavasti vähemmän. Ongelma olisi

voitu ratkaista kontaminoimalla näytteet tunnetulla pitoisuudella kohdeorganismeja, kuten suhteellisen saannon kohdalla päädyttiin tekemään. Standardissa SFS-EN ISO 13843:2017, ” Water quality. Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods” suositellaan kuitenkin mahdollisuuksien mukaan välttämään kontaminointia kaupallisilla referenssikannoilla ja sen sijaan kontaminoimaan mahdollisuuksien mukaan näyte sille ominaisilla, luonnollisista lähteistä peräisin olevilla mikrobeilla. Tällöin toinen mahdollisuus olisi ollut jätevedellä kontaminointi. Tätä ei kuitenkaan opinnäytetyötä varten tehty, sillä opinnäytetyössä verifiointin läpäisyä tärkeämpää oli esitellä verifiointi oikeilla, koulun laboratoriossa saaduilla esimerkeillä ja tuloksilla. Tällaisia tuloksia saatiin matalammassa inkubointilämpötilassa, joten tarvetta työmäärän lisäämiselle ei nähty tarpeelliseksi.

Kokonaismikrobimäärityksen näytteet soveltuivat hyvin verifiointiin. Tuloksista saatiin käyttökelpoista dataa, josta pystyttiin luomaan verifiointiohjeeseen esimerkit tulosten käsittelyn tueksi toistettavuutta ja lukemaepävarmuutta varten. Verifiointi itsessään onnistui myös hyvin toistettavuuden osalta, sekä lukemaepävarmuusmääritysten osalta yksittäisille analyytikoille. Laboratorion sisäisen lukemaepävarmuuden määrityksessä ongelmaksi muodostui kahden eri laskentamenetelmän, manuaalisen pesäkkeenlukijan ja automaattisen pesäkkeenlukijan käyttö. Molemmilla menetelmillä yksittäisen analyytikon lukemaepävarmuus oli hyvä, mutta tulokset eivät olleet tarpeeksi vertailukelpoisia keskenään. Laboratorion sisäinen lukemaepävarmuus olisi voitu määrittää uudelleen käyttäen vain jompaakumpaa laskentamenetelmää, mutta opinnäytetyön kannalta tärkeämpää oli jälleen saada esitettävää dataa esimerkkilaskuja varten. Koska yksittäisen työntekijän lukemaepävarmuus saatiin hyväksytysti läpi molemmilla laskentamenetelmillä, ei nähty syytä uusia verifiointia ja tämän perusteella verifiointi myös näiltä osin voitiin hyväksyä.

Suurin ongelma verifiointiohjetta laatiessa oli käytettävien standardien valitseminen, sekä päätösten tekeminen sen suhteen, milloin itse standardista voitiin poiketa. Erilaisia standardeja, ohjeita ja muita lähteitä yleiseen validointiin

ja sen suunnitteluun löytyi hyvin paljon. Aiheen rajaaminen mikrobiologiaan ja erityisesti kvantitatiivisiin määrittelyihin kuitenkin rajasi vaihtoehdot kahteen ISO-standardiin. Elintarvikemikrobiologiaan keskittyvä standardisarja SFS-EN ISO 16140 oli luotu nimenomaan vaatimuksesta saada yhtenäisempiä standardoituja menetelmiä validoinnin ja verifiointin tueksi mikrobiologisille analyyseille. Toisaalta vesimikrobiologiastandardi SFS-EN ISO 13843 sopi paremmin opinnäytetyötä varten valikoidulle petrifilmimenetelmälle ja myös yleisesti laboratorioanalytiikan opintokokonaisuuteen kuuluville muille mikrobiologisille analyyseille. Tämän perusteella valittiin ISO-standardi 13843, mutta 16140-sarjan standardeista oli suuri apu verifiointin käytännön suorituksen suunnittelussa ja toteutuksessa.

Verifiointin poikkeamatilanteissa, kuten validoimattomien matriisien verifiointissa, olisi standardinmukaisesti tullut suorittaa varsinainen validointi. Tästä päätettiin kuitenkin verifiointiohjeessa joustaa. Tätä perusteltiin sillä, että eri standardeissa ja lähteissä oltiin valmiita hyväksymään uusi, samankaltainen, matriisi osaksi menetelmää pelkän verifiointin perusteella tai jopa täysin ilman verifiointia [4; 3].

## Lähteet

- 1 Kuwahara, Steven S. 2005. Validation of Microbiological Tests. Verkkoaineisto. BioPharm International. <<https://www.biopharminternational.com/view/validation-microbiological-tests>>. 1.3.2005. Luettu 5.5.2024.
- 2 SFS-EN ISO 19036. Microbiology of the food chain. Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. 2019. Elintarvikemikrobiologia. Helsinki: Suomen standardisoimisliitto.
- 3 Hägg, Margareta, 2016. VTT Validoinnin suunnittelun opas. Raportti. VTT Technology, no. 276, VTT Technical Research Centre of Finland, Espoo
- 4 SFS-EN ISO 16140-3. Microbiology of the food chain. Method validation. Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. 2021. Elintarvikemikrobiologia. Helsinki: Suomen standardisoimisliitto.
- 5 SFS-EN ISO 13843. Water quality - Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods. 2017. Vesimikrobiologia. Helsinki: Suomen Standardoimisliitto.
- 6 Crowley, Erin; Bird, Patrick; Fisher, Kiel; Goetz, Katherine; Boyle, Megan; Benzinger Jr, M. Joseph; Juenger, Mark; Gibbs, Shana; Agin, James R & Goins, David G. 2010. Comparative Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ Aqua Plate Method vs. Multiple Reference Methods in Bottled Water - Claims Verification Study. Verkkoaineisto. 3M. <<https://multimedia.3m.com/mws/media/754917O/3m-petrefilm-aqua-plate-study.pdf>>. 8.10.2010. Luettu 5.5.2024.
- 7 SFS-ISO 29201. Veden laatu. Mikrobiologisten lukumäärämenetelmien testitulosten vaihtelu ja mittausepävarmuus. 2017. Veden biologisten ominaisuuksien tutkiminen. Helsinki: Suomen Standardoimisliitto.
- 8 SFS-EN ISO 17994. Water quality. Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods. 2014. Water analysis. Helsinki: Suomen Standardoimisliitto.
- 9 World Health Organization. 2003. Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety, The Significance of HPCs for Water Quality and Human Health. E-kirja. IWA Publishing.

- 10 Allen, Martin J., Edberg, Stephen C., Reasoner, Donald J. 2002. Heterotrophic plate count bacteria - what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology* 92. 2004.
- 11 SFS-EN ISO 6222. Veden laatu. Viljeltävien mikro-organismien lukumäärän laskeminen. Pesäkelasku siirrostamalla agar-ravintoalustaan. 1999. Water analysis. Helsinki: Suomen Standardoimisliitto.
- 12 Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista annetun sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen muuttamisesta. 2023. 2/2023. 3.1.2023.
- 13 Product instructions. 2018. Verkkoaineisto. 3M. <<https://multimedia.3m.com/mws/media/710302O/3m-petrefilm-aqua-heterotrophic-6450-6452-product-instructions.pdf>>. Luettu 5.5.2024.

## Verifiointisuunnitelma

Menetelmän ”Heterotrofisen pesäkeluvun määrittäminen juomavedestä”  
verifiointisuunnitelma.

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalytiikka  
18.3.2023 Joonas Myllylä

### Verifiointisuunnitelma

#### Soveltamisala

Verifiointin kohteena on heterotrofisen pesäkeluvun määrittäminen juomavedestä (kaivosvesi) petrifilmimenetelmällä (3M Petrifilm Aqua Heterotrophic Count Plates). Verifiointi suoritetaan standardin SFS-EN ISO 13843:2017 mukaisesti. Menetelmä on valmistajan toimesta verifioitu pullotetuille vesille. Koska kaivosvettä ei matriisina ole validoitu petrifilmimenetelmälle, tutkitaan matriisin sopivuutta suhteellisen saannon (Relative Recovery) avulla vertailemalla standardimenetelmän (SFS-EN ISO 6222:1999) ja verifioitavan menetelmän tuloksia validoidulle ja validoimattomalle matriisille soveltaen standardia SFS-EN ISO 17994.

#### Menetelmä

3M Petrifilm Aqua Heterotrophic Count Plates

#### Näytteet

##### Verifiointi:

Toistettavuuden määrittämiseen kolme kaivosnäytettä. Voidaan käyttää Metropolian ammattikorkeakoulun vesianalyysiprojektia varten kerättyjä näytteitä.

Laskemisen epävarmuuden (uncertainty of counting) määrittämiseen käytetään ym. näytteitä.

##### Suhteellinen saanto:

Kaivosnäytteitä, sekä pullovesinäytteitä. Voidaan käyttää ym. näytteitä.

Pullovesien hankinnasta vastaa verifiointin toteuttaja.

#### Verifiointin toteutus

**Näytteenotto:** Metropolian ammattikorkeakoulun oman ohjeen mukaisesti opiskelijoiden toimesta.

**Mittausalue:** 1–300 pmy/ml

**Toistettavuus:** Kolmesta näytteestä viljellään kymmenen rinnakkaismäärittystä (pitoisuusalueella 20–80 pmy/ml). Yksi analyttikko viljelee kaikki näytteet samalla kerralla toistettavissa olosuhteissa. Toistettavuutta arvioidaan laskemalla tuloksille: keskiarvo (arithmetic mean), varianssi (variance), suhteellinen varianssi (relative operational variance). Tuloksia verrataan validointidatassa esitettyyn pienimpään toistettavuuden arvoon ja tuloksen tulee olla pienempi, kuin validointidatan toistettavuus kerrottuna kahdella. **Hyväksymisraja 7,6 %.**

Sopivat näytteet valitaan vesianalyysiprojektin tulosten perusteella.

**Laskennan epävarmuus:** Yksi analyttikko laskee 30 maljaa (20-300 pmy) kahdesti tai useampi analyttikko laskee 30 maljaa yhden kerran. Tulosten erotusten perusteella määritetään laskennan toistettavuuden suhteellinen standardiepävarmuus (relative standard uncertainty of the repeatability of counting). Laboratorion sisäinen lukemaepävarmuus lasketaan yhden analyttikon ja pesäkkeenlaskijan rinnakkaisista tuloksista. Yleisesti pesäkkeet tulisi laskea useamman henkilön toimesta. **Hyväksymisraja 10 %.**

**Suhteellinen saanto:** Viljellään vähintään kolmekymmentä näytettä verifioitavalla menetelmällä ja standardimenetelmällä. Parittaisia tuloksia tutkitaan t-testin avulla ja määritetään eroavatko saadut tulokset tilastollisesti menetelmien välillä. Näytteiden pitoisuusalue saa olla välillä 1-300 pmy/ml, mutta tulosten laskukaavan takia hyvin matala pitoisuustaso lisää tarvittavien näytteiden määrää.

Vähimmäismäärä näytteille on 30 (SFS-EN ISO 13843:2017), mutta standardin SFS-EN ISO 17994 mukaisesti tarvittavien näytteiden määrä on usein yli 200. Opinnäytetyötä varten näytemäärää kevennetään n. 120 näytteeseen, josta 60 on kontaminoituja pullovesiä, 30 kontaminoituja kaivosvesiä ja 30 toistettavuuden määrittämiseen käytettyjä rinnakkaismäärittämiä luonnollisesti kontaminoidusta kaivovedestä.

Suhteellinen saanto lasketaan käyttäen kahta eri näytematriisia; menetelmälle validoitu pullovesi ja verifiointin kohteena oleva kaivosvesi. Laskemalla suhteellinen saanto tarvittaessa erikseen eri matriiseille, voidaan arvioida matriisin mahdollista vaikutusta.

Pullovesinäytteet kontaminoidaan referenssimateriaalilla pitoisuuksille 20, 50 ja 100 pmy/ml (pitoisuus arvioidaan valmistajan ilmoittaman pitoisuuden perusteella). Myös kaivosvesinäytteistä valmistetaan referenssimateriaalilla kontaminoituja näytteitä pitoisuuksille 20 ja 50 pmy/ml, jotta saadaan lisää datapisteitä luonnollisesti kontaminoituneiden näytteiden lisäksi. Kontaminointia varten referenssimateriaalista valmistetaan sopiva laimennossarja. Myös referenssimateriaali viljellään eri laimennoksilla, jotta referenssimateriaalin todellista pitoisuutta voidaan tarvittaessa arvioida.

**Suhteellista saantoa verrataan menetelmien välillä tilastollisesti ja tuloksia käytetään suunta-antavina.**

### **Poikkeama ISO-standardiin 13843**

**Kategoriset suorituskyvyn mittarit (Categorical performance characteristics):** Standardin SFS-EN ISO 13843:2017 mukaiseen verifiointiin kuuluvat lisäksi menetelmän suorituskykyyn liittyvät suureet **herkkyys** (sensitivity), **spesifisyys** (specificity), **väärien positiivisten määrä** (false positive rate), **väärien negatiivisten määrä** (false negative rate) sekä **selektiivisyys** (selectivity). Edellä mainitut suureet lasketaan varmistettujen pesäkkeiden avulla vertaamalla menetelmällä tutkittavien mikrobien määrää muihin menetelmällä määritettyjen mikrobien määrään. Tässä tapauksessa kaikki verifioitavan menetelmän kasvatusalustalla kasvaneet mikrobit lasketaan heterotrofeiksi, joten edellä mainittuja suureita ei menetelmälle lasketa. Tällöin myöskään tarvetta pesäkkeiden varmistamiseen ei ole.

### Työmäärä

Pääsääntöisesti viljelyt suoritetaan rinnakkaisina kahdessa inkubointilämpötilassa. Tästä voidaan poiketa, jos se nähdään perustelluksi näytemäärän vähentämiseksi. Varsinaiset analyysimäärät on esitetty alla, laskettuna kahdelle eri inkubointilämpötilalle:

Työvaihe	Näytemäärä	Analyyseiden määrä (petrifilmi)	Analyyseiden määrä (maljavalu)
toistettavuus (10 toistoa)	3 kaivovesinäytettä	60	60
suhteellinen saanto	15 kaivovesinäytettä 20 pullovesinäytettä	180*	180*

\*Kaivovesinäytteet kahdella eri pitoisuudella. Pullovesinäytteet kolmella eri pitoisuudella. (30 + 60)\*2.

Viljelyjen määrää voidaan vähentää puoleen, jos suhteellinen saanto määritetään vain yhdellä inkubointilämpötilalla.

### Aikataulu

Esivalmistelut	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3 ja 4
Tarvittavien elatusaineiden valmistus/hankkiminen.	Agarin sulattaminen	Agarin sulattaminen.	Petrifilmien tulkinta
Tarvittavien välineiden ja elatusaineiden autoklavointi.	Toistettavuus, 30 petrifilmiä, 30 maljavalua inkubointi 44 h @36 C 68 h @22 C	Suhteellinen saanto, 90 petrifilmiä, 90 maljavalua inkubointi 44 h @36 C	Jätteiden hävittäminen
Näytteiden valinta (20-80 pmy/ml) vesianalyysiprojektin tulosten perusteella.	Suhteellinen saanto, 90 petrifilmiä, 90 maljavalua inkubointi 68 h @22 C		
Referenssimateriaalin laimentaminen ja viljely petrifilmillä. inkubointi 44 h @36 C 68 h @22 C			
Pullovesi- ja kaivovesinäytteiden kontaminointi.			

Jos suhteellisen saannon osalta halutaan vähentää analyysimäärää, jätetään sen osalta viljelyt pois päivältä 1 tai 2.

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalytiikka  
18.3.2023 Joonas Myllylä

**Tarvikkeet**

- Heterotrophic Organisms Vitroids™ (1000-10000 pmy / disc)
- peptonvettä (kontrollikantojen laimennokset)
- Petrifilm Aqua
- Hiivauuteagar (n. litra / 50 maljaa)
- automaattipipetti 1000 µl
- pipetinkärkiä
- koeputkisekoittaja

Käytettävät välineet steriloidaan asianmukaisesti autoklaavissa.

# Menettelyohje

Kvantitatiivisen mikrobiologisen menetelmän verifiointi -menettelyohje.

MENETTELYOHJE		ID-koodi	
Nimi		Versio	Sivu 1 (1)
Laajitus		Päiväys 04.05.2024	Korvaa
Hyväksyjä	Vastuhenkilö		Voimassa alkaen

## Tavoite

Kvantitatiivisen mikrobiologisen menetelmän verifiointiohje Metropolian ammattikorkeakoulun käyttöön.

## Vastuu

Vastuu on verifiointin suorittajalla. Verifiointin suorittajan ollessa opiskelija, verifiointin hyväksymisestä vastaa myös ohjaava vastuuopettaja.

## Toiminta

### Yleistä

Kaikki verifiointissa tehtävät mikrobiologiset viljelyt tulee suorittaa mahdollisimman toistettavissa olosuhteissa. Mahdollisuuksien mukaan kaikki viljelyt tulee suorittaa saman analytiikan toimesta, samana päivänä, käyttäen samoja elatusaine-eriä ja inkubointikaappeja kaikille näytteille. Verifiointin suorittajalla tulee olla tarvittava kokemus ja tietämys laboratoriotyöskentelystä ja aseptisista työtapoista.

Ennen verifiointin suorittamista laaditaan verifiointisuunnitelma. Verifiointisuunnitelmassa tulee olla kuvattuna suoritettavat analyysit ja mittaukset esivalmisteluineen, sekä tulosten hyväksyttävät rajat. Lisäksi verifiointin aikataulu ja tarvittavat materiaalit ja välineet kirjataan verifiointisuunnitelmaan.

Menetelmäverifiointissa määritetään aina toistettavuus ja lukemaepävarmuus. Verifiointin tueksi voidaan määrittää lisäksi kategoriset suorituskyvyn mittarit, sekä matriisin soveltuvuutta voidaan tutkia suhteellisen saannon avulla. Verifiointin vaiheet on esitetty liitteessä 1.

### Toistettavuus

Näytteeksi valitaan kolme verifioitavalle menetelmälle tyypillistä näytettä, joiden pitoisuus on noin 20–80 pmy/ml. Näytteenotto suoritetaan Metropolian ohjeiden mukaisesti. Ensimmäiseksi tulisi suosia luonnollisesti kontaminoituneita näytteitä. Jos sopivia näytteitä ei ole saatavilla, voidaan tutkittavaan näytematriisiin lisätä kohdeorganismeja haluttu määrä esimerkiksi kaupallisesta referenssinäytteestä.

Jokaisesta näytteestä viljellään kymmenen rinnakkaismääritystä, jotka inkuboidaan verifioitavan menetelmän ohjeiden mukaisesti. Näytteet tulee tulkita heti inkuboinnin jälkeen tai säilöä kylmässä tulkintaan asti, jos tulkinta ei heti ole mahdollista. Tuloksille lasketaan



MENETTELYOHJE		ID-koodi	
Nimi		Versio	Sivu 2 (1)
Laastijat		Päiväys 04.05.2024	Korvaa
Hyväksyjä	Vastuhenkilö		Voimassa alkaen

Poissonin hajontaindeksi  $\chi^2_{r,1}$  ja toistettavuus  $S_r$ , jota verrataan menetelmän validointidatata löytyvään toistettavuusarvoon. Liitteessä 2 on esitetty toistettavuusmäärityksen tulosten käsittely ja tulkinta. [1]

#### Lukemaepävarmuus

Lukemaepävarmuuden määritykseen tulisi varata 30 näytettä, joissa pitoisuus on yli 20 pmy/ml. Tähän voidaan käyttää esimerkiksi toistettavuuden määritykseen käytettyjä rinnakkaismäärityksiä. Henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden määrittämiseksi yksi analyytikko tulkitsee kasvatusalustat kahdesti yhden tunnin aikana. Parittaisten tulosten perusteella lasketaan suhteellinen lukemaepävarmuus, jonka tulisi yksittäiselle analyytikolle olla alle 2 %, eikä saa ylittää arvoa 10 % Liitteessä 3 on esitetty lukemaepävarmuuden määrittäminen, sekä tulosten käsittely. [1]

Laboratorion sisäisen lukemaepävarmuuden määrittämiseksi voidaan käyttää samoja näytteitä, kuin henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden määrittämiseen. Useampi analyytikko lukee jokaisen kasvatusalustan kerran ja tulosten perusteella lasketaan jokaiselle näytteelle keskiarvo ja varianssi, joiden perusteella lasketaan menetelmälle laboratorion sisäinen lukemaepävarmuus (liite 3). [1]

#### Valinnaiset määritykset

Lisätietoa verifioitavan menetelmän suorituskyvystä saadaan määrittämällä kategoriset suorituskyvyn mittarit (herkkyys, spesifisyys, selektiivisyys, tehokkuus sekä väärin positiivisten ja väärin negatiivisten suhde) perustuen pesäkkeiden varmistamiseen ja tunnistamiseen. Liitteessä 4 on esitetty menetelmän suorituskyvyn mittarien määrittäminen.

Jos verifioinnin kohteena on matriisi, joka ei kuulu menetelmän validoituun soveltamisalaan, tulee tarkastella matriisin mahdollisia mikrobikasvuun vaikuttavia tekijöitä. Uusi matriisi voidaan hyväksyä osana käyttöönottoverifiointia, jos mikrobikasvuun vaikuttavia tekijöitä ei havaita. Eri matriisien sopivuutta menetelmälle voidaan tutkia määrittämällä suhteellinen saanto matriiseille vertaamalla vaihtoehtoista (verifioitavaa) menetelmää standardimenetelmään. Liitteessä 4 on esitetty suhteellisen saannon määrittäminen. [1, 2]

#### Muutoshistoria

#### Viitteet



MENETTELYOHJE		ID-koodi	
Nimi		Versio	Sivu 3 (1)
Laajat		Päiväys 04.05.2024	Korvaa
Hyväksyjä	Vastuhenkilö		Voimassa aikaa

1. SFS-EN ISO 13843. Water quality. Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods. 2017. Vesimikrobiologia. Helsinki: Suomen standardisoimisliitto.
2. SFS-EN ISO 17994. Water quality. Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods. 2014. Vesimikrobiologia. Helsinki: Suomen standardisoimisliitto.

## Liitteet

### Liite 1, Verifioinnin vaiheet

- Valitse verifioitava menetelmä.
- Tutustu menetelmään.
- Laadi verifiointisuunnitelma.
- Valmista tarvittavat elatusaineet ja steriloivat välineet.
- Hanki kolme verifioitavalle menetelmälle ominaista näytettä, joiden pitoisuus on 20-80 pmy/ml. Suorita näytteenotto Metropolian ohjeistuksen mukaisesti.
- Viijele jokaisesta näytteestä kymmenen rinnakkaismääritystä, yhteensä 30 viijelyä.
- Suorita näytteiden inkubointi verifioitavan menetelmän ohjeiden mukaisesti.
- Tulkitse inkuboidut näytteet.  
• Lukemaepävarmuutta määritettäessä, kaikkien osallistujien tulisi tulkita näytteet yhden tunnin kuluessa.
- Laske tulosten perusteella menetelmän toistettavuus ja vertaa sitä menetelmän validointidataan.
- Laske menetelmälle lukemaepävarmuus.
- Hyväksy tai hylkää verifiointi.  
• Jos verifiointi hylätään, tulee virhelähteet selvittää ja tunnistaa ennen uutta verifiointia.

