



Annimaria Lehtonen

Mikrobiologisten analyysimenetelmien verifiointi ja matriisilaajennus elintarvikeanalyysissä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

10.10.2024

Tiivistelmä

Tekijä:	Annimaria Lehtonen
Otsikko:	Mikrobiologisten analyysimenetelmien verifiointi ja matriisilaajennus elintarvikeanalyysissä.
Sivumäärä:	38 sivua + 1 liite
Aika:	10.10.2024
Tutkinto:	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine:	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat:	Lehtori Markus Räsänen Laboratoriovastaava Jaana Vuorela Kehitysvastaava Heli Karjalainen

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli toteuttaa matriisilaajennus mikrobiologian pätevyysalueeseen siten, että se kattoi hedelmät, marjat, kasvikset ja niistä valmistetut tuotteet kaikilla Valion Seinäjoen laboratoriossa käytössä olevilla akkreditoituilla menetelmillä. Laajennus toteutettiin SFS-EN ISO 16140-3:2021-standardin mukaan, ja se perustui nykyiseen pätevyysalueeseen, joka keskittyi maitoon ja siitä valmistettuihin tuotteisiin. Työssä verifioitiin kasvipohjaisten tuotteiden analyysimenetelmät kontaminoimalla näytteet keinotekoisesti mikrobeilla, kuten *Escherichia coli* ja *Staphylococcus aureus*. Tulosten luotettavuus varmistettiin eBias-luvun laskennalla.

Työssä käsiteltiin kvantitatiivisia ja kvalitatiivisia menetelmiä, jotka verifioitiin standardin mukaan. Verifiointin tulokset hyväksyttiin Suomen akkreditointipalvelulla, joka varmistaa organisaatioiden luotettavuuden ja standardien täyttymisen. Validointi varmistaa menetelmien toimivuuden alkuperäisessä ympäristössä, kun taas verifiointi laajensi niiden soveltamisalaa uusiin matriiseihin ja tarkistaa niiden johdonmukaisuuden ja tarkkuuden uusilla raaka-aineilla.

Opinnäytetyössä korostettiin verifiointin merkitystä elintarvikelaboratorioiden toiminnassa. Työ edisti luotettavien ja toistettavien analyysitulosten saamista, mikä oli välttämätöntä elintarviketurvallisuuden kannalta. Tulokset tarjosivat myös pohjan jatkuvalle kehittämiselle ja elintarvikkeiden laadunvarmistukselle tulevaisuudessa.

Avainsanat: *Escherichia coli*, elintarviketurvallisuus, enterobakteeri, koagulaasipositiivinen, kokonaispesäkemäärä, kvalitatiivinen, kvantitatiivinen, *Listeria monocytogenes*, mittausepävarmuus, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, standardi, validointi, verifiointi

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author: Annimaria Lehtonen
Title: Verification and Matrix Extension of Microbiological Analysis Methods for Food Testing
Number of Pages: 38 pages + 1 appendix
Date: 10 October 2024

Degree: Bachelor of Engineering
Degree Programme: Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major: Biotechnology and Food Engineering
Supervisors: Markus Räsänen, Senior Lecturer
Jaana Vuorela, Laboratory Supervisor
Heli Karjalainen, Development Specialist

The purpose of this thesis was to implement a matrix extension to the microbiological competency area to cover fruits, berries, vegetables, and products derived from them, using all accredited methods employed at Valio's Seinäjoki laboratory. The extension was carried out in accordance with the SFS-EN ISO 16140-3:2021 standard and it was based on the current competency area, which focused on milk and dairy products. The thesis verified the analytical methods for plant-based products were verified by artificially contaminating samples with microbes such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The reliability of the results was ensured through eBias calculation.

The thesis addresses both quantitative and qualitative methods, which were verified according to the standard. The results of the verification were submitted for approval to the Finnish Accreditation Service, which ensured the reliability of organizations and compliance with standards. Validation ensured the functionality of the methods in their original environment, while verification expanded their applicability to new matrices and checked their consistency and accuracy with new raw materials.

The thesis emphasizes the importance of verification in food laboratory operations. It promotes obtaining reliable and reproducible analytical results, which was essential for food safety. The results also provide a foundation for ongoing development and quality assurance for food products in the future.

Keywords: *Escherichia coli*, food safety, *enterobacteria*, coagulase-positive, total colony count, qualitative, quantitative, *Listeria monocytogenes*, measurement uncertainty, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, standard, validation, verification

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Matriisilaajennuksen tausta ja teoria	2
2.1	Akkreditointipalvelun merkitys ja toiminta	2
2.2	Validoinnin ja verifiointin tarkoitus ja tavoitteet	4
2.3	SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardin käsittely	6
2.4	Kvalitatiiviset menetelmät mikrobiologisessa laboratoriossa	8
2.5	Kvantitatiiviset menetelmät elintarviketurvallisuudessa	12
2.6	LOD50 ja sen merkitys elintarviketurvallisuuden analyysimenetelmien herkkyyden arvioinnissa	14
2.7	Mittausten tarkkuus ja raja-arvojen määrittäminen	15
2.8	Mittausepävarmuus	17
2.9	Juurisyysanalyysi	19
3	Työn kokeellinen osio	20
3.1	Kvantitatiivisten menetelmien työvaiheet	20
3.2	Kvalitatiivisten menetelmien työvaiheet	23
3.3	Kvantitatiivisten ja kvalitatiivisten menetelmien tarvittavat jatkotutkimukset	25
3.4	Pesäkemäärien logaritminen muuntaminen, vertailuarvojen ja eBias-arvon määrittäminen	28
4	Tulosten tarkastelu	32
4.1	Kvantitatiivisten menetelmien tulokset	32
4.2	Kvantitatiivisten menetelmien varmistusmenetelmien tulokset	35
4.3	Kvalitatiivisten menetelmien tulokset	35
5	Yhteenveto	37
	Lähteet	39
	Liite 1: Pesäkemäärät maljoilla	

Lyhenteet

- ALOA: Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti medium. *Listeria monocytogenes* -bakteerin selektiivinen kasvualusta.
- BHI: Brain heart infusion -kasvatusliemi.
- DNA: Deoksiribonukleiinihappo. Sisältää tiedon perintötekijöistä.
- eBias: Estimated Bias. Eksperimentaalinen vinouma, joka kuvaa tulosten poikkeamaa todellisista arvoista mittausprosessissa. Absoluuttinen ero vertailuarvojen välillä.
- eLOD50: Estimated Limit of Detection. Arvioitu havaintaraja, joka kuvaa pienintä määrää analysoitavaa ainetta, joka voidaan luotettavasti havaita.
- LOD50: Level of detection. Alhaisin pitoisuus analysoitavaa ainetta, jonka pystytään luotettavasti havaitsemaan.
- LEB: Listeria Enrichment Broth on rikastusliemi, jota käytetään *Listeria*-bakteerin havaitsemiseen elintarvikenäytteissä.
- LTLNB: Lactose-tryptone-lauryl sulphate broth. Laktoosi-tryptoni-lauryylisulfaatti-liemi.
- MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight. Massaspektrometriaan perustuva tekniikka mikro-organismien tunnistamiseen.
- MPCA: Milk plate count agar. Kasvatusalusta, jota käytetään mm. maitotuotteissa olevien bakteerien kokonaismäärän laskemiseen ja arviointiin.

- MPN: Most probable number. Todennäköisin lukumäärä on tilastollinen menetelmä, jolla arvioidaan todennäköisin mikrobien lukumäärä näytteessä.
- PALCAM: Polymyxin acriflavine lithium chloride ceftazidime aesculin mannitol agar, selektiivinen kasvualusta *Listeria monocytogenes* -bakteerille.
- PCR: Polymerase chain reaction. Polymeraasiketjureaktio, jota käytetään DNA:n monistamiseen.
- pmy: Pesäkettä muodostavaa yksikköä.
- SLV: Svenska Livsmedelverket. Ruotsin elintarvikevirasto.
- TSA: Tryptone Soy Agar. Tryptoni-soija-agar, yleiskäyttöinen kasvatusalusta.
- VRBG: Violet red bile glucose agar. Kristallivioletti-puna-sappiglukoosi-agar, jota käytetään *Enterobacteriaceae*-bakteerien havaitsemiseen ja laskemiseen elintarvikkeista ja maitotuotteista.
- VRB: Violet red bile agar. Kristallivioletti-puna-sappi-agar, jota käytetään laktoosia fermentoivien koliformibakteerien havaitsemiseen ja laskemiseen elintarvikkeissa ja maitotuotteissa.
- XLD: Ksyloosi-lysiini-deoksikolaatti -agar. *Salmonella*-bakteerin selektiivinen kasvualusta.

1 Johdanto

Opinnäytetyö toteutettiin Valio Oy:n toimeksiantona Valion akkreditoitussa aluelaboratoriossa Seinäjoella. Työn tarkoituksena oli toteuttaa matriisilaajennus mikrobiologian pätevyysalueeseen ”hedelmät-, marjat-, kasvikset- ja viljat ja niistä tehdyt valmisteet” kaikilla laboratoriola käytössä olevilla akkreditoituilla menetelmillä nykyisestä pätevyysalueesta ”maito ja siitä tehdyt valmisteet” käyttäen SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardia. Tämä edellytti analyysimenetelmien verifiointia kyseisen tuoteryhmän osalta.

Projektissa käytettiin apuna standardeja, jotta voitiin varmistaa, että projektin tulokset olivat vertailukelpoisia muiden vastaavien tutkimusten kanssa ja että ne täyttivät alan hyväksytyjen käytäntöjen vaatimukset. Yhteenvetona projektin tekemisen taustalla ollut ajattelumalli noudatti tieteellistä lähestymistapaa, joka sisälsi analyysi- ja mittausmenetelmien varmistamisen, akkreditoitujen menetelmien pätevyysalueen laajentamisen, mittausepävarmuuksien arvioinnin ja standardien hyödyntämisen.

Toimeksiantajayritys Valio Oy on suomalainen meijeriyritys, joka perustettiin vuonna 1905. Se on tunnettu korkealaatuisista elintarvikkeistaan ja innovatiivisesta tuotekehityksestään. Valio tarjoaa mm. monipuolisen valikoiman maitotuotteita kuluttajille. Valio kehittää jatkuvasti hallintajärjestelmiä konserni- ja tehdastasolla ja panostaa voimakkaasti tutkimukseen, kehitykseen ja teknologian hyödyntämiseen tuotteidensa kehittämisessä. [1; 2.]

Valion toimintatapa perustuu sisäisiin menettelyihin ja ohjeistuksiin, jotka ottavat huomioon lainsäädännön, standardit ja asiakkaiden vaatimukset. Sertifikaatit varmistavat tuotteiden turvallisuuden ja laadun. Yritys on sitoutunut vastuulliseen ja kestävään toimintaan, mikä ilmenee tuotantoprosessien kehittämisessä ja ympäristöystävällisissä toimintatavoissa. Valion vahva brändi tunnetaan sekä Suomessa että kansainvälisillä markkinoilla. Yritys tekee tiivistä yhteistyötä omistajiensa, suomalaisten maidontuottajien, kanssa ja edistää aktiivisesti

maidontuotannon kestävyttä sekä eläinten hyvinvointia. Lisäksi yritys valvoo taudinaiheuttajien esiintymistä raaka-aineissa, tuotteissa sekä tuotantoprosesseissa. [1; 2.]

2 Matriisilajennuksen tausta ja teoria

Tässä työssä suoritetaan verifiointi, jonka tarkoituksena on toteuttaa matriisilajennus mikrobiologian pätevyysalueeseen ”hedelmät-, marjat-, kasvikset- ja viljat ja niistä tehdyt valmisteet” laboratorion kaikilla käytössä olevilla akkreditoituilla menetelmillä nykyisen pätevyysalueen ”maito ja siitä tehdyt valmisteet” rinnalle. Matriisilajennus suoritetaan laboratoriossa, dokumentoidaan ja lähetetään akkreditointipalvelulle, joka hyväksyy menetelmän verifiointin. Verifiointi tehdään SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardin mukaisesti. Lisäksi työssä käsitellään validointia, verifiointia, akkreditoitun laboratorion ja akkreditointipalvelun toimintaa sekä mittausepävarmuutta ja LOD50-arvoa (Level of detection), joita hyödynnetään tarkan verifiointisuunnitelman laatimisessa ja projektin onnistumisen varmistamisessa.

2.1 Akkreditointipalvelun merkitys ja toiminta

Akkreditointi on prosessi, jossa ulkopuolinen akkreditointielin arvioi laboratorion toimintaa ja varmentaa sen kyvyn tuottaa luotettavia ja päteviä testaus- tai kalibrointituloksia. Tämä varmistetaan tarkastamalla laboratorion laitteisto, henkilöstön pätevyys, laadunvarmistusjärjestelmät ja toimintatavat, jotka täytyy dokumentoida. Akkreditointi vahvistaa, että laboratorio noudattaa kansainvälisiä standardeja ja että sen tuottamat tulokset ovat luotettavia ja vertailukelpoisia. [3.]

Akkreditointipalvelut ovat keskeisiä organisaatioiden pätevyyden ja luotettavuuden varmistamisessa eri toimialoilla Suomessa. Akkreditointipalvelut tarjoavat arviointeja laboratorioille, testauslaitoksille, sertifiointielimille ja tarkastuslaitoksille, jotta varmistetaan niiden toiminnan täyttävän kansainvälisten ja kansallisten standardien asettamat vaatimukset. Akkreditointipalveluiden tarkoituksena

on edistää organisaatioiden toiminnan laatua ja turvallisuutta, mikä lisää luottamusta niiden palveluihin ja tuotteisiin. Akkreditointipalvelut myös päivittävät jatkuvasti omia prosessejaan ja menettelyjään vastaamaan alan muuttuvia tarpeita ja standardeja. Lisäksi akkreditointipalvelut tekevät kansainvälistä yhteistyötä muiden maiden vastaavien tahojen kanssa edistääkseen yhtenäisiä käytäntöjä ja varmistaakseen akkreditoinnin tunnustamisen kansainvälisesti. Tämä yhteistyö tukee myös kansainvälistä kauppaa ja varmistaa, että akkreditoidut organisaatiot voivat toimia laatu- ja turvallisuusvaatimusten mukaisesti globaalilla tasolla. [4; 5.]

Akkreditointiprosessi alkaa hakemuksen jättämisellä ja esitarkastuksella, jossa arvioidaan yrityksen dokumentaatiota ja laadunhallintajärjestelmiä. Tämän jälkeen akkreditointielin suorittaa arviointikäynnin organisaatiossa ja raportoi tulokset. Organisaatio tekee tarvittavat korjaavat toimenpiteet havaittujen puutteiden perusteella. Lopuksi akkreditointielin tekee päätöksen akkreditoinnista ja valvoo sen ylläpitoa varmistaakseen standardien mukaisuuden. Prosessissa käytetään SFS-EN ISO/IEC 17011:2017 -standardia akkreditoinnin ja sen ylläpidon vaatimusten määrittämiseen. [3; 6, s. 4–7.] Seinäjoen laboratorio on testauslaboratorio, jonka akkreditointivaatimuksena on SFS-EN ISO/IEC 17025:2017 -standardi [7]. Akkreditointi antaa virallisen tunnustuksen organisaation kyvystä täyttää tietyt standardit, kun taas auditointi on prosessi, jolla arvioidaan ja varmennetaan, että organisaatio toimii näiden standardien mukaisesti [3; 8].

Auditoinnissa tarkastetaan organisaation toimintaa, järjestelmiä tai prosesseja, ja se voi olla sisäinen, jossa oma organisaatio arvioi itseään, tai ulkoinen, jossa riippumaton taho suorittaa tarkastuksen, jolloin auditointi voi johtaa sertifiointiin. Auditoinnin tarkoituksena on tunnistaa organisaation vahvuudet, heikkoudet ja mahdolliset parannuskohteet sekä varmistaa, että sovittuja toimintatapoja ja standardeja noudatetaan. [8.]

2.2 Validoinnin ja verifiointin tarkoitus ja tavoitteet

Validointi tarkoittaa menetelmän tai prosessin arviointia ja todentamista, että se täyttää sille asetetut vaatimukset ja on sopiva käyttötarkoitukseensa. Tämä prosessi varmistaa, että menetelmä antaa luotettavia ja tarkkoja tuloksia halutuissa olosuhteissa ja että se on käytettävissä turvallisesti ja tehokkaasti. Validoinnilla tuotetaan vertailuarvoja menetelmän suorituskyvylle ja osoitetaan, että se on yhdenmukainen lainsäädännön ja sääntöjen kanssa. Validoinnin laajuus ja vaatimukset määräytyvät tutkittavan analyysimenetelmän ja sen käyttötarkoituksen mukaan. [9; 10, s. 7.]

Validoinnin suunnittelu on keskeinen vaihe menetelmän käyttöönotossa, sillä se mahdollistaa mittausmenetelmän suorituskyvyn arvioinnin sekä sen soveltuvuuden käyttötarkoitukseensa. Validoinnin aikana suoritetaan sarja ennalta suunniteltuja testejä, joilla määritetään valittujen validointiparametrien arvot tapauskohtaisesti. Tilastollisia menetelmiä hyödyntämällä pystytään tunnistamaan ne menetelmän osa-alueet, jotka ovat kriittisiä tulosten luotettavuuden kannalta. Menetelmä tai laite otetaan käyttöön vasta, kun validointi on hyväksytty ja validoinnista tehdyt päätelmät on arvioitu. Validoinnin laajuus riippuu mm. siitä, onko kyseessä aivan uusi menetelmä vai onko se jo laajasti käytössä kansallisesti tai kansainvälisesti ja täytyykö ainoastaan varmistaa menetelmän soveltuvuus omiin olosuhteisiin. [10, s. 9.]

Menetelmän vaatimuksilla on vaikutusta esimerkiksi siihen, miten tarkkoja tulosten on oltava ja kuinka pieniä pitoisuuksia menetelmällä on kyettävä määrittämään. Validoinnin tulee kattaa kaikki testauksen osa-alueet, näytteenotosta alkaen ja päättyen tulosten tulkintaan ja raportointiin. Menetelmän validointi koskee ainoastaan niitä käyttöalueita, parametreja, näytematriiseja, yhdisteitä, pitoisuusalueita ja laitteita, joilla se on testattu. Jos validoinnin jälkeen menetelmään tulee muutoksia tai sitä laajennetaan uusille näytematriiseille, tietyt menetelmän osat validoidaan uudelleen. Validoidun menetelmän toimivuutta seurataan käyttöönoton jälkeen jatkuvasti laadunvarmistustoimenpiteillä, joita voivat olla mm. laadunohjaus ja -arviointi. [10, s. 11–12.]

Joskus analyysimenetelmien tarkistamiseen riittää verifiointi, joka on yksinkertaisempi menettely. Verifiointi eroaa validoinnista siinä, että validointi tapahtuu yleensä menetelmän kehittämisen yhteydessä, kun taas verifiointi on prosessi, jolla laboratorio varmistaa, että se kykenee soveltamaan validoitua menetelmää käytännössä omassa ympäristössään, laitteillaan ja elintarvike- tai näytemateriaaleillaan. Verifiointi on tarpeen, kun käytetään standardimenetelmää tai kun jo käytössä olevaa menetelmää sovelletaan uusiin olosuhteisiin tai näytetyyppeihin. [10, s. 7, 12.]

Verifiointi on keskeinen osa laboratorion toimintaa ja sillä tarkoitetaan prosessia, jossa validoinnin aikana määritetyt menetelmän spesifikaatiot toteutetaan laboratorion toimesta. Tämä tarkoittaa sitä, että laboratorion on varmistettava, että se pystyy toistamaan validoinnissa saavutetut tulokset omilla laitteillaan ja elintarvikkeillaan. Verifiointin päätavoitteena on osoittaa, että laboratorio pystyy soveltamaan validointimenetelmää käytännössä ja saamaan luotettavia ja tarkkoja tuloksia. Tämä on erityisen tärkeää elintarvikeanalytiikassa, jossa virheelliset tulokset voivat johtaa vakaviin seurauksiin, kuten elintarviketurvallisuuden vaarantumiseen. [11, s. 5–7.]

Elintarvikealan mikrobiologisen laadunvarmistuksen verifiointi jakautuu kahteen keskeiseen osa-alueeseen: menetelmän verifiointiin ja elintarvikkeen verifiointiin. Menetelmän verifiointissa keskitytään siihen, että laboratorio kykenee suorittamaan validoinnissa määritellyn menetelmän oikein ja saavuttamaan odotetut tulokset. Tämä edellyttää, että laboratorio ymmärtää validointidatan ja osaa soveltaa sitä omassa toiminnassaan. Lisäksi laboratorion on valittava oikeat elintarvike- tai selektiiviset agaralustat, jotta menetelmä toimii tarkoitetulla tavalla. Laboratorio suorittaa kokeita ja testejä varmistaakseen menetelmän toimivuuden laboratoriossa. Elintarvikkeen verifiointissa huomio kiinnitetään siihen, että laboratorio pystyy suorittamaan menetelmän oikein erilaisilla elintarvikkeilla, jotka kuuluvat laboratorion soveltamisalaan. Tämä osa-alue on erityisen tärkeä, koska erilaiset elintarvikkeet voivat sisältää erilaisia ainesosia ja ominaisuuksia, jotka vaikuttavat analyysin lopputulokseen. Elintarvikkeen verifiointin

tavoitteena on varmistaa, että menetelmä toimii luotettavasti myös haastavilla elintarvikkeilla, joissa analyysiin voi liittyä erityisiä vaikeuksia. [11. s. 5–6.]

Tuoteverifiointia ei tarvitse aina tehdä, koska se keskittyy erityisesti tilanteisiin, joissa laboratorio ottaa käyttöön uuden menetelmän tai analysoi uuden matriisin, joka poikkeaa merkittävästi aikaisemmin testatuista. Verifiointi on tarpeen, kun käytetään menetelmää uusissa olosuhteissa tai matriiseissa, jotta varmistetaan, että se toimii luotettavasti ja tarkasti myös näissä uusissa konteksteissa. Jos menetelmä on jo hyvin tunnettu, eli aiemmin validoitu ja käytetty samantyyppisissä matriiseissa tai olosuhteissa ilman merkittäviä muutoksia, aikaisemmat validointi- ja verifiointitulokset voivat riittää, jolloin uutta verifiointia ei yleensä tarvita. Verifiointin tarve määräytyy siis menetelmän ja matriisin muutujien perusteella. [10, s. 7, 12.]

2.3 SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardin käsittely

SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardi määrittelee vaatimukset ja ohjeet mikrobien määritysmenetelmien verifiointille ja on osa laajempaa ISO 16140 -standardisarjaa. SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardi soveltuu olemassa olevien menetelmien verifiointiin ja sisältää keskeiset termit ja määritelmät, kuten validoinnin, verifiointin, referenssimateriaalin ja matriisin, varmistaen yhtenäisen käsitteiden ymmärryksen kaikkien käyttäjien kesken. SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardi tarjoaa yleiset ohjeet mm. kvalitatiivisten ja kvantitatiivisten menetelmien verifiointille, mukaan lukien suunnittelu, toteutus ja tulosten arviointi. Se korostaa kontrollien ja vertailumenetelmien käyttöä verifiointiprosessissa sekä ohjeistaa, miten uusia menetelmiä verrataan jo olemassa oleviin ja hyväksytyihin referenssimenetelmiin käyttäen tilastollisia menetelmiä mm. tulosten analysoimiseksi, jotta varmistetaan menetelmien luotettavuus ja käytökelpoisuus elintarvikeanalytiikassa. [11, s. 1.]

SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardi tarjoaa ohjeet eri näytetyyppien käytöstä tarkkuuden arvioinnissa ja määrittelee, miten menetelmän herkkyyttä ja spesifisyyttä arvioidaan ja raportoidaan. Se myös määrittelee, mitä tietoja validointi-

ja verifiointiraportteihin tulee sisällyttää, ja korostaa raportoinnin selkeyttä, yksityiskohtaisuutta ja jäljitettävyyttä, jotta tulokset ovat toistettavissa ja tarkistettavissa. Standardi sisältää myös yksityiskohtaiset ohjeet kvalitatiivisten ja kvantitatiivisten menetelmien verifiointiin, kuten laboratorion sisäisen uusittavuuden standardipoikkeaman ja arvioidun harhan eli eBias-arvon (Estimated bias) määrittämisen, arvioidun havaintorajan LOD50 määrittämisen, kokeellisen suunnittelun, tuotteiden valinnan, keinotekoisen kontaminaation, tulosten arvioinnin ja hyväksyttävyyssrajat. [11, s- 1–5.]

SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardi painottaa validointi- ja verifiointiprosessien huolellista suunnittelua ja toteutusta sekä selkeää ja yksityiskohtaista raportointia. Näin varmistetaan, että mikrobiologiset menetelmät ovat luotettavia ja täyttävät korkeimmat laatuksiteerit käytännön sovelluksissa. Standardin soveltaminen käytännön laboratorio-olosuhteissa voi olla monimutkaista, joten on tärkeää tarkastella sitä myös käytännön näkökulmasta. Laboratorioiden on hallittava resurssejaan tehokkaasti varmistaakseen, että menetelmien validointi ja verifiointi suoritetaan asianmukaisesti. Tämä sisältää resurssien, kuten henkilöstön ja laitteiden hallinnan ja aikataulutuksen, optimoinnin, jotta prosessi sujuu suunnitellusti ja tehokkaasti. Lisäksi henkilöstön koulutus on olennainen osa standardin toteuttamista laboratorioissa. Standardi voi antaa suuntaviivoja koulutusohjelmien kehittämiseen ja toteuttamiseen varmistaen, että henkilöstöllä on tarvittavat tiedot ja taidot menetelmien asianmukaiseen validointiin ja verifiointiin. [11, s. 5.]

Käytännön esimerkit tai tapaukset voivat havainnollistaa standardin ohjeiden soveltamista ja niiden vaikutusta laboratorioiden toimintaan. Esimerkiksi voidaan kuvata, miten laboratorio on noudattanut standardin ohjeita menetelmien validoinnissa ja verifiointissa ja miten tämä on parantanut menetelmien luotettavuutta ja laadunvarmistusta. Laboratorioiden, jotka noudattavat standardia, on todennäköisemmin helpompi saavuttaa akkreditointivaatimukset ja osallistua menestyksekkäästi vertailutestauksiin. Standardi tarjoaa rakenteellisen kehyksen menetelmien verifiointille, mikä helpottaa laboratorioiden valmistautumista akkreditointiin. Luotettavuuden ja laadunvarmistuksen parantaminen voi myös

vaikuttaa myönteisesti laboratorioiden maineeseen ja asiakkaiden luottamukseen. Viranomaiset ja asiakkaat voivat luottaa siihen, että laboratorio tuottaa luotettavia tuloksia. Standardin noudattaminen voi edistää tiedonvaihtoa, luottamusta ja yhteistyötä elintarvike-, rehu- ja ympäristöalan sidosryhmien välillä. [11, s. 5.]

2.4 Kvalitatiiviset menetelmät mikrobiologisessa laboratoriossa

Kvalitatiiviset menetelmät ovat keskeisiä mikrobiologisessa analytiikassa, sillä niiden avulla voidaan määrittää, sisältääkö näyte mikrobeja vai ei, ilman mikrobien määrällistä arviota. Tällaisia menetelmiä käytetään erityisesti osoittamistarkoituksiin, ja niiden verifiointiprosessi koostuu kahdesta pääosasta: menetelmän verifioinnista ja elintarvikkeen verifioinnista, jotka on käsitelty luvussa 2.2. Tekninen protokolla kvalitatiivisten menetelmien verifiointia varten on monivaiheinen ja sisältää mm. arvioidun LOD50 eli eLOD50 (estimated limit of detection) -arvon määrittämisen. Kokeellinen suunnittelu alkaa sopivien ruokatuotteiden valinnalla ja niiden keinotekoisella kontaminoinnilla tunnettujen mikrobikantojen avulla. Tuloksia arvioidaan SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardissa määritettyjen protokollien avulla. [11, s. 9.]

Protokollassa 1 määritetään eLOD50-arvo analysoimalla testinäytteitä, joihin on lisätty mikrobeja eri kontaminaatiotasolla, mukaan lukien korkea taso, keskitaso, matala taso ja negatiivinen kontrolli. Tässä protokollassa on tärkeää kirjata positiivisten tulosten määrä kunkin kontaminaatiotason kohdalla, sillä näitä tuloksia käytetään eLOD50-arvon laskemiseen. Negatiivisessa kontrollinäytteessä ei saa esiintyä positiivisia tuloksia. Jos näin tapahtuu, koe on toistettava. Protokolla 2 puolestaan keskittyy verifiointiin ja analysoi useampia testinäytteitä sekä yhden negatiivisen kontrollin. Tämä protokolla noudattaa samoja periaatteita kuin protokolla 1, mutta käyttää erilaisia inokulaatiotasoa ja arviointitauluja. Inokulaatiotasot ovat näytteisiin lisättyjä mikro-organismien määriä, joita käytetään testattaessa analyysimenetelmien herkkyyttä ja tarkkuutta eri kontaminaatiotasolla, ja arviointitaulut ovat taulukoita, joihin kirjataan positiivisten tulosten lukumäärä kullakin inokulaatiotasolla. Protokollassa 2 positiivisten tulosten

kirjaaminen tehdään vain keski- ja matalilla inokulaatiotasolla, ja näitä tuloksia käytetään eLOD50-arvon laskentaan. Myös tässä protokollassa varmistetaan, ettei positiivisia tuloksia esiinny negatiivisessa kontrollissa. Jos kaikki tulokset ovat negatiivisia tai jos tulokset poikkeavat odotetusta, koe on toistettava. [11, s.10.]

Protokolla 3 SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardissa tarjoaa ohjeet mikrobiologisten testimenetelmien arvioimiseksi saavuttamalla määritetyn mikrobikontaminaatiotason, joka on 3–5 pmy/näyte. Eli tässä työssä käytettävä protokolla 3 ei vaadi LOD50- tai eLOD-arvojen määrittämistä, vaan kohdistuu tiettyyn mikrobikonsentraatioon ja keskittyy arvioimaan, kuinka hyvin testimenetelmä pystyy tunnistamaan mikrobeja täsmällisesti annetulla kontaminaatiotasolla, mikä voi olla käytännöllisempää tietyissä sovelluksissa. [11, s. 17.]

Protokollassa 3 keskitytään ensin näytteiden valmisteluun. Tässä vaiheessa valmistetaan testinäytteitä, joihin lisätään tarkasti mitattu määrä mikrobeja, jotta saavutetaan haluttu kontaminaatiotaso, joka on siis 3–5 pmy/näyte. Tämä prosessi vaatii huolellista mittausta ja valmistelua, jotta mikrobien määrä on tarkasti määritetty. Lisäksi valmistetaan negatiivisia kontrollinäytteitä, jotka eivät sisällä mikrobeja. Kontrollinäytteet ovat tärkeitä, koska niiden avulla varmistetaan, ettei testimenetelmä anna vääriä positiivisia tuloksia, mikä voisi vaikuttaa arvioinnin tarkkuuteen. [11, s. 17.]

Seuraavaksi Protokollaa 3 sovelletaan valmisteltuihin testinäytteisiin. Testausvaiheessa käytetään valmisteltuja näytteitä, jotka sisältävät sekä tavoitellut mikrobikontaminaatiotasot että negatiiviset kontrollit. Testimenetelmää käytetään arvioimaan, pystyykö se havaitsemaan ja tunnistamaan mikrobeja suunnitellulla tasolla. Tässä vaiheessa kirjataan huolellisesti, kuinka hyvin menetelmä onnistuu havaitsemaan mikrobeja kussakin näytteessä. Tulosten tarkka dokumentointi on oleellista, jotta voidaan arvioida, täyttääkö testimenetelmä asetetut vaatimukset. Tulokset arvioidaan ja verifioidaan. Arviointi sisältää tarkastelun, kuinka hyvin testimenetelmä onnistuu tunnistamaan mikrobeja tavoitellulla kontaminaatiotasolla. Positiivisten tulosten määrää verrataan odotettuihin tuloksiin.

Verifioinnissa varmistetaan, että testimenetelmä toimii odotetusti kaikissa testinäytteissä ja että negatiivisten kontrollien tulokset pysyvät negatiivisina. Positiivisten tulosten tulee vastata ennakoituja arvoja, mikä varmistaa menetelmän tarkkuuden. [11, s. 17.]

Protokollan 3 mukaan mahdolliset poikkeamat käsitellään ja tarvittaessa testit toistetaan. Jos negatiivisten kontrollien tulokset ovat positiivisia tai jos testimenetelmällä ei saavuteta tavoiteltuja kontaminaatiotasoja, koe on toistettava. Tämä vaihe varmistaa virheiden tunnistamisen ja korjaamisen. Toistaminen voi sisältää testinäytteiden valmistuksen, testimenetelmän soveltamisen ja tulosten kirjaamisen. Poikkeamien huolellinen käsittely on tärkeää testimenetelmän luotettavuuden ja tarkkuuden varmistamiseksi. Ruokatuotteiden valinta kokeellisessa suunnittelussa perustuu niiden merkitykseen verifioitavan menetelmän kannalta. Keinotekoinen kontaminaatio on olennainen vaihe, jossa valitaan sopivat kannat ja inokuloidaan näytteet kontrolloitujen ja mitattavien kontaminaatiotasojen varmistamiseksi. Tämä prosessi varmistaa, että menetelmä pystyy havaitsemaan kohdemikrobin eri pitoisuuksilla ja erilaisissa näytetyypeissä. [11, s. 17–18.]

Tulosten arviointi ja hyväksyttävyyssrajat ovat keskeisiä kvalitatiivisten menetelmien verifioinnissa. Menetelmän luotettavuutta varmistetaan arvioimalla tuloksia eLOD50-arvon määrittämiseksi ja asettamalla hyväksyttävyyssrajat. Jos tulokset eivät täytä odotettuja arvoja, tehdään juurisyyanalyysi ongelmien tunnistamiseksi ja korjaamiseksi. Verifiointi on tärkeä osa menetelmän vahvistusta, ja standardit ohjeistavat, kuinka menetelmiä verifioidaan. [11, s. 18.]

PCR (polymeraasiketjureaktio) on yksi yleisesti käytetyistä kvalitatiivisista menetelmistä mikrobiologisessa analytiikassa. PCR:n avulla voidaan analysoida mikrobien läsnäolo näytteessä nopeasti ja tarkasti. Elintarvikenäytteen valmistus PCR-ajoa varten alkaa näytteen keräyksellä, joka voi olla peräisin esim. ruoka-aineista. Ensimmäiseksi elintarvikenäyte homogenoidaan erityislaitteilla, kuten homogenisaattoreilla, jotta näyte saadaan tasalaatuiseksi. Tämä vaihe on kriittinen, koska homogeeninen näyte lisää todennäköisyyttä, että jokainen osa-

alue edustaa koko näytettä tasapuolisesti. Näytteestä eristetään DNA:ta käyttäen usein kaupallista eristämissarjaa. Tämä vaihe sisältää solujen hajottamisen sekä DNA:n saostamisen ja puhdistamisen. Erityisesti elintarvikenäytteissä on tärkeää poistaa kaikki ylimääräiset aineet, jotka voivat vaikuttaa PCR:n tuloksiin. [12.]

PCR-ajo koostuu kolmesta päävaiheesta, jotka toistuvat useita kertoja varmistaen DNA:n eksponentiaalisen monistumisen. Ensimmäinen vaihe, denaturointi (engl. denaturation), tapahtuu kuumentamalla DNA-näyte noin 90–95 °C:seen. Tämä kuumennus rikkoo DNA:n kaksoiskierteen vetysidokset, jolloin se avautuu yksijuosteiseksi. Tämä on välttämätöntä, jotta alukkeet, eli primerit (engl. primers) pääsevät sitoutumaan kohde-DNA:han seuraavassa vaiheessa. Primerit ovat lyhyitä DNA-pätkiä, jotka on suunniteltu kiinnittymään tarkasti määritettyihin kohtiin DNA:ssa. Denaturointi on lyhyt, mutta kriittinen vaihe, joka valmisteleo DNA:n seuraavia reaktioita varten. [13; 14.]

Toinen vaihe, alukkeiden kiinnittyminen (engl. annealing), tapahtuu lämpötilan laskun myötä noin 40–60 °C:ssa. Tässä lämpötilassa spesifiset primerit voivat kiinnittyä kohde-DNA:n yksijuosteisiin. Tämä vaihe määrittää, mistä DNA-sekvenssin monistaminen alkaa, ja sen tarkkuus on olennaista PCR:n spesifisyydelle. Kolmannessa vaiheessa, pidentymisvaiheessa eli elongaatiossa (engl. elongation), lämpötila säädetään 70–75 °C:seen. DNA-polymeraasi-entsyymi lisää uusia nukleotideja primereiden loppuun ja pidentää DNA-juostetta, muodostaen näin uuden kaksoiskierteen. Tämä vaihe jatkuu, kunnes koko kohde-DNA on monistettu. Prosessin toistuessa useita kertoja, DNA:n määrä kasvaa eksponentiaalisesti, mikä mahdollistaa tarkkojen ja luotettavien tulosten saamisen elintarvikeanalyseissä. [14.]

Reaaliaikainen PCR eli kvantitatiivinen PCR (qPCR) mahdollistaa DNA:n määrän seuraamisen PCR-prosessin aikana, mikä tekee siitä tehokkaan työkalun elintarvikeanalyseissä. Tämä menetelmä käyttää fluoresenssia, joka voi perustua joko spesifisiin väriaineisiin, kuten SYBR Greeniin, jotka sitoutuvat DNA:han, tai geenispesifisiin fluoresoiviin koettiin, kuten TaqMan-probeihin.

Fluoresenssin intensiteetti kasvaa eksponentiaalisesti DNA:n monistuessa, mikä mahdollistaa DNA:n määrän reaaliaikaisen seurannan. [14.] Reaaliaikaisen PCR:n aikana kerätään dataa fluoresenssisignaalista jokaisessa sykli-vaiheessa. Näiden signaalien perusteella voidaan määrittää, kuinka paljon kohde-DNA:ta on alkuperäisessä näytteessä. Kynnysarvo (Ct-arvo) kertoo, kuinka monta PCR-sykliä tarvitaan tietyn DNA-määrän havaitsemiseksi. Alhaisempi Ct-arvo tarkoittaa, että DNA:ta on enemmän näytteessä ja se havaitaan aikaisemmassa vaiheessa, kun taas korkeampi Ct-arvo viittaa siihen, että DNA:ta on vähemmän ja se havaitaan myöhemmin. Ct-arvo on siis käänteisesti suhteessa alkuperäisen DNA-määrän määrään näytteessä. Data-analyysin avulla saatua Ct-arvoa verrataan standardikäyrään tai referenssiin, mikä mahdollistaa DNA:n tarkan kvantifioinnin ja näytteen sisällön arvioinnin. [15.]

2.5 Kvantitatiiviset menetelmät elintarviketurvallisuudessa

Kvantitatiiviset menetelmät mittaavat mikro-organismien määrää näytteessä ja ovat tärkeitä mikrobiologisissa analyyseissä, erityisesti elintarvike- ja ympäristötutkimuksissa. Näiden menetelmien luotettavuuden ja tarkkuuden varmistamiseksi verifiointiprosessi on keskeinen. Verifiointiprotokollassa keskitytään laboratorion toistettavuuden keskihajonnan määrittämiseen, jotta menetelmä tuottaa luotettavia tuloksia. Toistettavuus arvioidaan suorittamalla useita mittauksia saman laboratorion sisällä ja toistettavuuden keskihajonta määrittää teknisen epävarmuuden ja menetelmän tarkkuuden. Verifiointiprosessi kattaa koko SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardin mukaisen menetelmän, mukaan lukien kaikki tarvittavat vaiheet ja verifiointimenettelyt. [11, s. 5.]

On myös tärkeää arvioida menetelmän herkkyys ja mahdolliset rajoitteet, kuten havaitsemisraja, joka voi vaikuttaa tulosten tarkkuuteen ja luotettavuuteen. Verifiointinissa tulisi selvittää, missä määrin menetelmä pystyy erottamaan pienet mikrobimäärät ja kuinka hyvin se kestää mahdollisia häiritseviä tekijöitä. SFS-EN ISO 16140-3:2021-standardin mukaisessa verifiointinissa kannattaa käyttää sertifioituja viiteaineistoja ja vertailumenetelmiä. Sertifioitu viiteaineisto on materiaali, jolle on määritetty tarkat ja jäljitettävät pitoisuusarvot, jotka on varmistettu

akkreditoidun sertifiointiprosessin kautta. Vertailumenetelmät ovat kansainvälisesti tai kansallisesti standardoituja ja hyväksytyjä menetelmiä. Näitä käytetään referenssinä silloin, kun uusia menetelmiä testataan tai verifioidaan. [16.] Näitä käytetään mittausten vertailukohteina, ja ne tarjoavat luotettavan perustan testimenetelmän tarkkuuden arvioimiseksi. Näiden aineistojen ja menetelmien käyttö auttaa varmistamaan, että kvantitatiiviset mittaukset ovat vertailukelpoisia ja standardoituja. [11, s 19.]

Protokollan suorittaminen edellyttää useiden vaiheiden huomioimista. Näytteitä samasta elintarvikkeesta tulee olla riittävästi, ja ne voivat olla eri eristä tai eri valmistajilta. Jokainen näyte tulee sekoittaa tai homogenisoida ennen pipetointia maljoille, jotta mikrobit jakautuvat tasaisesti näytteessä. Nestemäisissä tuotteissa sekoitus tapahtuu käsin ravistamalla, ja kiinteissä tuotteissa voidaan käyttää mekaanisia laitteita, kuten stomacher-homogenisaattoria tai tehosekoitinta. [11, s. 21.]

Käytettävien kontaminaatiotasojen tulee edustaa kontaminaatiotasojen vaihtelua laboratorioissa testatuissa näytteissä. Mikäli käytetään keinotekoista kontaminaatiota, testinäytteen alkuperäinen suspensio inokuloidaan tunnetulla määrällä mikrobeja. Tämä tarkoittaa, että testinäytteeseen lisätään ennalta määrätty määrä mikrobeja, jotta voidaan testata, miten hyvin testattava aine tai menetelmä voi tunnistaa nämä mikrobit. Kontaminoidut näytteet voidaan analysoida suoraan homogenoinnin jälkeen. Vähintään yksi yksittäinen testinäyte jokaisella inokulaatiotasolla tulee vahvistaa. Vahvistukseen käytettävien pesäkkeiden määrää voidaan vähentää yhteen, mikä auttaa yksinkertaistamaan prosessia ilman merkittävää tarkkuuden menetystä. [11, s. 21–22.]

Kvantitatiivisissa menetelmissä käytetään tilastollisia menetelmiä tulosten analysointiin ja saatujen tulosten vertaamiseen referenssimenetelmiin validoinnin aikana. Verifiointissa taas ei käytetä tilastollisia menetelmiä. Tämä auttaa arvioimaan menetelmän suorituskykyä ja tarkkuutta. Jos tulokset eivät täytä odotettuja standardeja, suoritetaan juurisyyanalyysi, jonka tarkoituksena on tunnistaa ja korjata mahdolliset ongelmat. Arvioidun harhan eli eBias-arvon määrittäminen on

myös olennainen osa vahvistusprosessia. Tämä prosessi sisältää kokeellisen suunnittelun, sopivien ruokatuotteiden valinnan ja keinotekoisen kontaminaation. EBias edustaa havaittujen tulosten ja todellisten arvojen välistä eroa. Tuloksia arvioidaan eBias-arvon määrittämiseksi, ja erityiset hyväksyttävyyssrajat asetetaan tarkkuuden varmistamiseksi. EBias tarkoittaa absoluuttista eroa keinotekoisesti kontaminoidun näytteen ja viljelyllä määritetyn mikrobisuspension tulosten välillä ja lasketaan seuraavasti:

$$eBias = |\text{Vertailuarvo } y - \text{Vertailuarvo } x| \quad (1)$$

Vertailuarvo x on mikrobisuspensionäyte, eli näyte sisältää ainoastaan mikrobisuspension ilman elintarviketta. Vertailuarvo y puolestaan on keinotekoisesti kontaminoitu elintarvike. Nämä mittarit ovat kriittisiä, sillä ne varmistavat, että menetelmät tuottavat luotettavia ja tarkkoja tuloksia, jotka ovat elintarvike- ja ympäristöanalyseissä välttämättömiä. [11, s. 25.]

Verifiointiprotokollassa on myös tärkeää arvioida menetelmän herkkyys ja mahdolliset rajoitteet, käyttää sertifioituja viiteaineistoja ja noudattaa standardoitujen menetelmien käytäntöjä. Koko testimenetelmä tulee suorittaa kaikilta osin, mukaan lukien esikäsittelyvaiheet ja vahvistusmenettelyt, jotta kaikki osat prosessista ovat tarkasti validoituja. Lisäksi poikkeamien käsittely ja dokumentointi ovat olennaisia, jotta voidaan ymmärtää, miksi tulokset poikkesivat odotetusta ja miten ongelmat on ratkaistu. [11, s. 28.]

2.6 LOD50 ja sen merkitys elintarviketurvallisuuden analyysimenetelmien herkkyuden arvioinnissa

LOD50-arvo on yksi yleisesti käytetyistä mittareista herkkyuden arvioimiseksi analyysimenetelmässä. Tämä arvo ilmaisee pienimmän pitoisuuden tai määrän analysoitavaa ainetta, joka voidaan havaita tietyllä tarkkuudella. LOD50-arvon tunteminen on erittäin tärkeää esimerkiksi elintarvikealan turvallisuuden ja laadunvalvonnan kannalta. Se auttaa laboratorioita ja elintarvikevalmistajia varmistamaan, että analyysimenetelmät ovat riittävän herkkiä havaitsemaan mahdolliset mikrobiologiset kontaminaatiot tai patogeeniset mikrobit elintarvikkeissa.

Lisäksi se auttaa määrittelemään analyysimenetelmän soveltuvuuden eri tarkoituksiin ja varmistamaan, että lopputulokset ovat luotettavia ja tarkkoja. [11, s. 9.]

LOD50-arvon määrittäminen vaatii usein kokeellista arviointia ja tilastollisia menetelmiä, jotka perustuvat useiden mittausten tuloksiin analyysin taustalla olevasta näytteestä, jossa analysoitavaa ainetta on tunnetulla pitoisuusalueella. LOD50-arvo voi vaihdella eri analyysimenetelmien ja -laitteiden välillä, ja se voi myös vaihdella eri aineiden ja näytematriisien välillä. LOD50-arvo on lisäksi tärkeä tieto raportoida ja dokumentoida analyysimenetelmän validoinnin yhteydessä, kuten standardissa SFS-EN ISO 16140-3:2021, jotta käyttäjät voivat arvioida menetelmän soveltuvuutta omiin tarpeisiinsa. [11, s. 9, 11.]

eLOD50-arvoa, joka on määritetty protokollien 1 tai 2 mukaisesti, vertaillaan validointitutkimuksen LOD50-arvoon. Implementointiverifiointissa käytetään LOD50-arvoa, joka vastaa testattua elintarviketta. Implementointiverifiointi tarkoittaa prosessia, jossa laboratorio osoittaa kykynsä suorittaa validoitu menetelmä oikein ja tuottaa odotettuja tuloksia valitulla näytteellä tai elintarvikkeella. Elintarvikkeiden validoinnissa eLOD50-arvo ei saa ylittää nelinkertaisesti validointitutkimuksen LOD50-arvoa tai, jos vastaavaa LOD50-arvoa ei ole, eLOD50-arvo ei saa ylittää 4 pmy/testinäyte. Validointitutkimuksissa LOD50-arvo voidaan ilmaista eri yksiköissä (pmy/g, pmy/ml, pmy/näyte), mutta se on muunnettava pmy/testinäyte yksikköön vertailua varten verifiointitulosten kanssa. eLOD50-arvo on hyväksyttävä vain, jos se on saatu samankokoisella tai pienemmällä testinäytteellä kuin validointitutkimuksessa. [11, s. 68.] Vaikka tässä työssä ei määritetty LOD50-arvoa, sen merkitys on silti tärkeä ymmärtää validoinnin ja elintarviketurvallisuuden kannalta.

2.7 Mittausten tarkkuus ja raja-arvojen määrittäminen

Laskennan raja-arvojen määrittämisen ja tulosten käsittelyn standardointi on kriittinen osa laadunvarmistusta ja luotettavien tulosten tuottamista. Standardit tarjoavat ohjeita ja menetelmiä, jotka auttavat varmistamaan, että mittaustulokset ovat tarkkoja, luotettavia ja vertailukelpoisia. Laskentamenetelmiä käsitellään

standardeissa kattavasti. Tarkkuus on keskeinen tekijä, joka vaikuttaa mittaus-tulosten luotettavuuteen. Mittausmenetelmät vaihtelevat sovelluksesta riippuen, mutta kaikille yhteistä on tarve minimoida systemaattiset virheet ja satunnaisvirheet. [11, s. 30.]

Raja-arvojen määrittämisessä SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardi asettaa tarkat kriteerit, jotka perustuvat tilastollisiin menetelmiin ja aiempaan tutkimustietoon. Raja-arvot asetetaan niin, että ne kattavat mittausten vaihteluvälin ja ottavat huomioon mahdolliset mittausvirheet. Näiden arvojen määrittelyssä käytetään usein aiemmin kerättyä dataa vertailuarvoina ja tilastollisia analyysejä, jotka auttavat ymmärtämään, missä rajoissa mittaustulosten tulisi olla. Kun raja-arvot on asetettu, ne tulee validoida ja todentaa kontrolloitujen kokeiden ja vertailumittausten avulla. [11, s. 30.]

Mittauksen jälkeen saadut tulokset analysoidaan tilastollisin menetelmin. Tulosten dokumentointi on keskeinen vaihe mittausprosessissa, jotta mittaukset voidaan jäljittää, arvioida ja tulkita luotettavasti ja systemaattisesti. Dokumentoinnin tulee sisältää tiedot mittausmenetelmistä, käytetyistä laitteista, mittausajankohdasta, mittaustilanteesta sekä mahdollisista häiriötekijöistä. Tämä sisältää keskiarvojen, varianssien ja muiden tilastollisten tunnuslukujen laskemisen. Näiden avulla voidaan arvioida mittausten luotettavuutta ja toistettavuutta. SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardi ohjeistaa myös, miten mittausvirheitä arvioidaan ja korjataan. Virheiden analysointi on olennainen osa mittausprosessia. [11, s. 28–30.]

Tulosten virherajat on arvioitava ja esitettävä selkeästi. Virherajojen laskenta perustuu tilastollisiin menetelmiin ja analyysiin, ja se antaa mittaajalle käsityksen tulosten luotettavuudesta. Virherajojen arviointi on erityisen tärkeää silloin, kun tuloksia käytetään päätöksenteon pohjana, sillä se vaikuttaa merkittävästi tulosten tulkintaan ja hyväksyttävyyteen. Jos mittaustulokset poikkeavat odotetusta tai asetetuista raja-arvoista, standardi määrää, että poikkeamien syyt on tutkittava ja tarvittaessa mittaukset on toistettava. Poikkeamien käsittelyprosessiin kuuluu dokumentointi ja mahdollisten korjaavien toimenpiteiden

suorittaminen. Tämä varmistaa, etteivät poikkeamat johda virheellisiin johtopäätöksiin. [11, s. 19.]

Mittauksien tarkkuus ja raja-arvojen määrittäminen ovat olennaisia mikrobiologisessa analytiikassa, sillä ne varmistavat analyysien luotettavuuden ja päätöksenteon perustan. Mittauksien tarkkuuden ja raja-arvojen määrittämisen standardointi on välttämätöntä luotettavien ja tarkkojen analyysien varmistamiseksi. Tilastollisten menetelmien ja aiemman tutkimustiedon käyttö auttaa asettamaan ja validoimaan raja-arvot, mikä takaa tulosten luotettavuuden ja toistettavuuden. Virherajojen arviointi ja tulosten dokumentointi ovat keskeisiä prosesseja, jotka tukevat päätöksentekoa ja varmistavat, että mittaustulokset ovat tarkkoja ja käytökelpoisia. [11, s. 18–19.]

2.8 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on keskeinen käsite, joka mikrobiologisessa analytiikassa liittyy analyysien tulosten luotettavuuteen ja tarkkuuteen. Se kuvaa tuloksen hajontaa ja arvioitua eroa tarkan arvon ja saadun tuloksen välillä. Mittausepävarmuuden asianmukainen arviointi on tärkeää, koska se auttaa käyttäjiä ymmärtämään tulosten luotettavuutta ja mahdollisia virheiden vaikutuksia analyysin tuloksiin. Mikrobiologisten määrittämisen mittausepävarmuuteen vaikuttavat monet tekijät, mukaan lukien näytteen käsittely, mittausmenetelmä, laboratorio-olosuhteet ja ympäristötekijät. Näiden tekijöiden yhteisvaikutus voi johtaa mittausepävarmuuteen, joka voi olla joko satunnaista tai systemaattista. [17, s. 5.]

Satunnainen mittausepävarmuus johtuu sattumanvaraisista virheistä, kuten mittauslaitteiston tarkkuudesta, näytteenotto- ja valmistusvaiheiden vaihtelusta tai laboratorio-olosuhteiden muutoksista. Systemaattinen mittausepävarmuus taas johtuu järjestelmällisistä virheistä, jotka voivat aiheutua esimerkiksi mittausmenetelmän kalibroinnista, näytteenkäsittelyprosessista tai ympäristötekijöistä. Täsmäntyyppinen epävarmuus voi olla vaikeampi arvioida ja vaatii usein erityisiä menetelmiä, kuten vertailua referenssikokeisiin tai käyttövalmiiden standardien käyttöä. [17, s. 10.]

SFS-EN ISO 19036:2019 on standardi, joka koskee elintarvikkeiden ja eläinten ruokinnan mikrobiologisten määritysten mittausepävarmuuden arviointia. Tämä standardi tarjoaa kattavat ohjeet ja menetelmät mittausepävarmuuden arvioimiseksi kvantitatiivisissa mikrobiologisissa analyysissä, mukaan lukien pesäkelaskentatekniikat, MPN, (Most probable number), eli todennäköisimmän lukumäärän tekniikat, instrumentaaliset menetelmät ja molekyyliomenetelmät. Standardi soveltuu pääasiassa mikro-organismien määrittämiseen. [17, s. 5.]

SFS-EN ISO 19036:2019 -standardi on otanut käyttöön lähestymistavan, jossa mittausepävarmuus arvioidaan kolmen epävarmuuskomponentin perusteella. Ensimmäinen näistä on tekninen epävarmuus, joka arvioidaan uusittavuuden standardipoikkeaman perusteella. Tämän osalta vaihtoehtoina ovat laboratorikohtainen uusittavuuden standardipoikkeama, laboratorioden välinen uusittavuuden standardipoikkeama menetelmän validointitutkimuksesta sekä laboratorioden välinen uusittavuuden standardipoikkeama pätevyyskokeesta. [17, s. 17.]

Toinen epävarmuuskomponentti on matriisin epävarmuus, joka johtuu matriisin kontaminaation heterogeenisyydestä, aiheuttaen vaihtelua mikrobimäärissä testinäytteiden välillä. Matriisin epävarmuus otetaan huomioon kiinteänä arvona homogeenisille matriiseille, ja se arvioidaan mm. toistettavuuskokeella. Kolmas epävarmuuskomponentti on jakautumiseen liittyvä epävarmuus, joka johtuu mikrobien satunnaisesta jakautumisesta. Tämä lasketaan matemaattisesti analyysimenetelmän ominaisuuksien mukaan ja sitä tarkastellaan kolmessa mahdollisessa tapauksessa: Poissonin epävarmuus, varmistusepävarmuus pesäkelaskentatekniikoissa ja MPN-epävarmuus MPN-tekniikoissa. [17, s. 18]

Poissonin epävarmuus liittyy satunnaiseen tapahtumien jakautumiseen, kuten mikro-organismien pesäkkeiden laskemiseen kasvualustalta. Varmistusepävarmuus pesäkelaskentatekniikoissa kattaa virhelähteet, kuten kontaminaation ja näytteenoton virheet, kun varmistetaan, että lasketut pesäkkeet ovat tiettyä mikro-organismia. Se arvioidaan kontrollimenetelmien ja vertailumittausten avulla. MPN-epävarmuus liittyy mikro-organismien lukumäärän arviointiin

nestemäisissä näytteissä, käyttäen todennäköisyyslaskentaa ja sarjassa suoritettavia kokeita. Epävarmuus arvioidaan tilastollisin menetelmin ja erityisten taulukoiden avulla. [17, s. 21.]

Mittausepävarmuus vaikuttaa merkittävästi päätöksentekoon ja riskienarviointiin elintarvikeketjussa. Elintarviketeollisuudessa mittausepävarmuus voi vaikuttaa tuotteiden turvallisuuden arviointiin. Jos epävarmuutta ei oteta huomioon, saattaa syntyä riski, että kontaminoituneet tuotteet päätyvät markkinoille tai turvalliset tuotteet hylätään tarpeettomasti. Oikein hallittuna mittausepävarmuus edistää päätöksentekoa perustuen luotettavaan tietoon, varmistaen terveyden, turvallisuuden ja laadun. Laboratoriotulosten luotettavuus ja toistettavuus varmistetaan mittausepävarmuuden hallinnalla, joka sisältää laadunvarmistusmenetelmät, henkilöstön koulutuksen ja pätevyyden sekä laitteistojen säännöllisen tarkastuksen ja kalibroinnin. SFS-EN ISO 19036:2019 -standardi tarjoaa ohjeita mittausepävarmuuden hallintaan ja parantamiseen, tukien laboratorioita tulosten luotettavuuden varmistamisessa. [17, s. 5.]

2.9 Juurisyyanalyysi

Juurisyyanalyysiä käytetään, jotta löydetään ongelmien perimmäiset syyt sopivien ratkaisujen löytämiseksi. Juurisyyanalyysi olettaa, että taustalla olevien ongelmien järjestelmällinen ennaltaehkäisy ja ratkaiseminen on paljon tehokkaampaa kuin vain tapauskohtaisten ongelmien korjaaminen ja hoitaminen. Juurisyyanalyysi voidaan suorittaa kokoelmalla periaatteita, tekniikoita ja menetelmiä, joita voidaan käyttää tunnistamaan tapahtuman perimmäiset syyt. Pinnallisia syitä ja seurauksia pidemmälle katsoen juurisyyanalyysi voi näyttää, missä prosessit tai järjestelmät epäonnistuivat tai aiheuttivat ongelman alun perin. [18.]

Varmennustutkimukset ja niiden tulosten analysointi ovat keskeisiä osia mikrobiologisten analyysimenetelmien luotettavuuden varmistamisessa. Jos varmennustulokset ylittävät hyväksyttävyyksrajat, juurisyyanalyysin tekeminen on tarpeen. Sen avulla pyritään tunnistamaan syvemmät syyt havaituille poikkeamille.

On suositeltavaa suorittaa varmennus samanaikaisesti sekä validoidulla vaihtoehtoisella menetelmällä että vertailumenetelmällä kyseiselle elintarvikkeelle. Tällöin voidaan arvioida, suoriutuvatko molemmat menetelmät samalla tavalla käyttäjälaboratoriossa. Juurisyyanalyysin tulee kattaa muun muassa analyytiset virheet laboratoriokäytännöissä, protokollan soveltamisessa ja elintarvikkeen erityispiirteissä, kuten haastavat tuotteet, jotka vaativat korkeamman laimennusasteen. Kun ongelmat on tunnistettu, toteutetaan korjaavia toimenpiteitä ja koe suoritetaan uudelleen. Raporttiin tulee sisällyttää juurisyyanalyysin tulokset, jotta voidaan tarjota ymmärrystä havaittuihin löydöksiin. [11, s. 18.]

3 Työn kokeellinen osio

Näytematriisilaajennus tehtiin tuoteverifiointina SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardin mukaisesti. Verifiointiin valittiin näytematriisiksi kasvipohjainen tuote, joka edusti kasvipohjaisia lihankorvikkeita, jotta voitiin varmistaa ”hedelmät, marjat, kasvikset ja viljat ja niistä tehdyt valmisteet” -kategoria. Verifiointi toteutettiin vuoden 2024 helmi–toukokuun aikana Valion akkreditoidussa aluelaboratoriossa Seinäjoella.

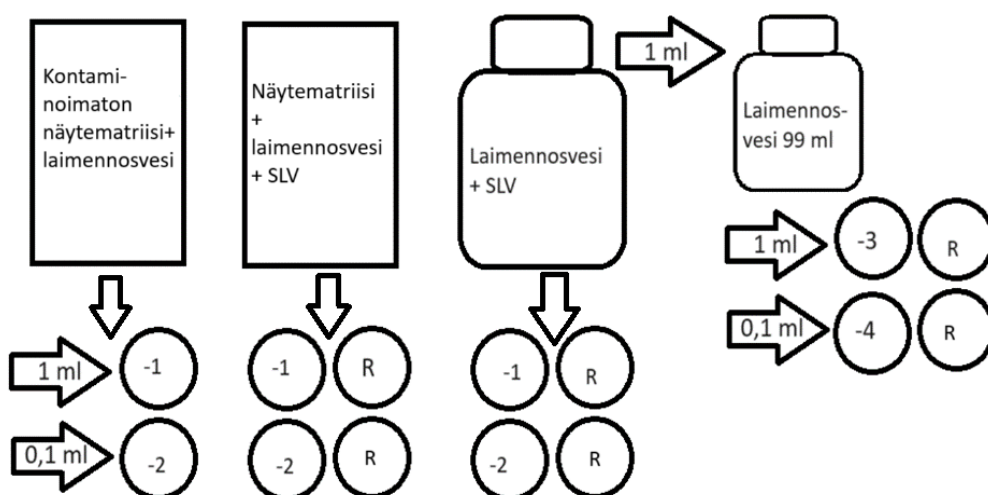
Kokeellisessa osiossa käytettiin sekä kvantitatiivisia että kvalitatiivisia menetelmiä näytteiden analysointiin. Kvantitatiivisissa menetelmissä keskityttiin pesäkemäärien logaritmiseen muuntamiseen ja eBias-arvojen määrittämiseen, mikä mahdollisti menetelmien tarkkuuden arvioinnin suhteessa vertailuarvoihin. Kvalitatiivisissa menetelmissä puolestaan arvioitiin menetelmän herkkyyttä ja tavoiteltiin tiettyä mikrobikonsentraatiota. Jatkotutkimuksissa tarkasteltiin testitulosten toistettavuutta sekä menetelmien soveltuvuutta laboratorio-olosuhteisiin.

3.1 Kvantitatiivisten menetelmien työvaiheet

Kvantitatiivisten menetelmien suorittamiseksi näytteet kontaminoitiin kolmella tasolla. Standardissa määritellään, kuinka paljon kontaminoitavaa ainetta tulee lisätä näytteisiin, jotta menetelmä pystyy havaitsemaan analysoitavat mikro-organismit luotettavasti. Kvantitatiivisten menetelmien kontaminaatitasot

jakautuvat kolmeen pääkategoriaan: matalaan, korkeaan ja keskitasoon. Kontaminaatiotasoa 1 arvioi menetelmän herkkyyttä pienillä, kontaminaatiotasoa 2 keskikorkeilla ja kontaminaatiotasoa 3 korkeilla mikrobimäärillä.

Jokaisesta kontaminaatiotasosta tehtiin kaksi rinnakkaisnäytettä, jolloin analysoitiin kuusi kontaminoitua näytettä ja yksi kontaminoimaton näyte (nollanäyte). Näytematriisi kontaminoitiin keinotekoisesti käyttäen Svenska Livsmedelverket, SLV-ampulleja, joissa oli mikrobiseos mm. bakteerilajeista *Escherichia coli* ja *Staphylococcus aureus* [19, s. 11]. Lisäksi SLV-näytteestä tehtiin viljelyt kasvualustoille vertailuarvoa (pmy/ml) varten. Vertailuarvot saatiin SLV:n tarjoamasta aineistosta. SLV-näytteestä ja näytematriisista tehtiin laimennossarjat kuvan 1 mukaisella tavalla, jotta saatiin laimennokset 10^{-1} – 10^{-4} jokaiselle käytetylle kasvualustalle. Laimennossarjat valmistettiin pipetoimalla mikrobiseosta eri pitoisuuksilla laimennosliuoksesta. Laimennossarjan valmistamisen jälkeen näytematriisi kontaminoitiin suunnitellulla tavalla. Kontaminoimattomat ja kontaminoituvat näytteet viljeltiin eri laimennoksilla rinnakkaisten (R) maljojen kanssa, mikä mahdollisti kontaminaatiotilanteiden simuloinnin ja mikro-organismien esiintymisen arvioinnin. Kuvan avulla voitiin seurata, miten laimennossarjat valmistettiin ja viljeltiin kokeellisten asetelmien mukaisesti.



Kuva 1. Laimennossarjan valmistusprosessi SLV-näytteille ja näytematriiseille mukaan lukien pipetointimäärät maljoille. Laimennokset viljeltiin suunnitelman mukaisesti, jolloin voitiin simuloida kontaminaatiotilannetta ja arvioida mikrobien esiintymistä näytteissä.

SLV-ampulli valmistettiin liuottamalla 4 ml steriiliä laimennosliuosta kylmäkuivattuun mikrobiseokseen, ja liuos siirrettiin steriiliin 250 ml:n laimennosliuospulloon, jolloin valmista seosta oli 254 ml. Näytematriisia punnittiin steriiliin pussiin 10 g, ja Dilumat-laimennin lisäsi automaattisesti steriilin laimennosnesteen punnitun näytematriisin painon mukaan. Näytematriisi homogenisoitiin Smasher-homogenisaattorilla. Ensin viljeltiin kontaminoimattomasta näytematriisista (nollanäyte) laimennokset 10^{-1} – 10^{-2} . Sitten näytematriisi kontaminoitiin ja viljeltiin laimennokset 10^{-1} – 10^{-2} ja lisäksi viljeltiin rinnakkaiset maljat. Näytematriisin kontaminoimiseksi SLV-laimennosliuospullostsa pipetoitiin mikrobiseosta suunniteltujen kontaminaatiotasojen mukaisesti laimennetun näytematriisin kanssa steriiliin pussiin. Sitten laimennosliuospullostsa viljeltiin SLV-näytteistä laimennokset 10^{-1} – 10^{-4} ja lisäksi viljeltiin rinnakkaiset maljat.

Enterobakteerien, *E. coli*, koagulaasipositiivisten stafylokokkien ja *Staphylococcus aureuksen* sekä aerobisten mikro-organismien esiintymistä tutkittiin käyttäen erilaisia kasvualustoja ja menetelmiä, kuten maljavaluna Milk plate count agar (MPCA), Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA), Violet Red Bile Agar (VRBA) -alustoille ja pintaviljelynä Baird Parker -agarille. Nämä kasvualustat tarjoavat optimaaliset olosuhteet eri mikrobien kasvulle ja niiden tunnistamiselle. Mikro-organismien esiintymisen tutkiminen on keskeinen osa elintarvikkeiden turvallisuuden ja laadun varmistamista. Näiden mikrobien läsnäolo elintarvikkeissa voi olla merkki hygieniakäytäntöjen puutteista tai prosessivirheistä, jotka voivat aiheuttaa terveystarpeita kuluttajille.

MPCA-alustan kohdemikrobeina olivat *E. coli*, *Serratia marcescens* ja *S. aureus* -bakteerin kokonaispesäkemäärä ja maljoja inkuboitiin 72 tuntia 30 °C:ssa [20]. VRBGA-alustan kohdemikrobeina olivat *E. coli* ja *S. marcescens* ja maljoja inkuboitiin 22–24 tuntia 37 °C:ssa [21]. VRBA-alustan kohdemikrobina oli *E. coli* ja maljoja inkuboitiin 24 tuntia 44 °C:ssa. [22.] Baird Parker -alustan kohdemikrobina oli *S. aureus*. Maljoja inkuboitiin 48 tuntia 37 °C:ssa. [23.]

3.2 Kvalitatiivisten menetelmien työvaiheet

Kvalitatiivisten menetelmien suorittamiseksi näytteet kontaminoitiin vain yhdellä tasolla, 3–5 pmy/25 g näyte, SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardissa käsitellyn protokollan 3 mukaisesti. Näytteestä tehtiin seitsemän rinnakkaista kontaminoitua näytettä, jolloin jokaisella kvalitatiivisella menetelmällä analysoitiin seitsemän kontaminoitua näytettä ja yksi kontaminoimaton näyte.

Kohdemikrobeina olivat *Listeria monocytogenes* ja *Salmonella* Tranaroa. Näytteiden kontaminoimiseen käytettiin laboratorion omia mikrobikantoja, joita säilytettiin omissa ampulleissaan. Ensin tarkistettiin salmonella- ja listeria-ampullien mikrobipitoisuudet viljelemällä mikrobit erityisillä kasvualustoilla. Salmonella-ampulleille käytettiin XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) -agarmaljoja ja listeria-ampulleille käytettiin ALOA (Agar Listeria according to Ottaviani & Agosti) -maljoja. Viljelyn jälkeen saatiin laskennallinen arvo, joka kertoi, kuinka paljon ampulleista piti pipetoida näytteisiin halutun kontaminaatiotason saavuttamiseksi. Molempien *L. monocytogenes* ja *Salmonella* Tranaroa kasvualustatestauksen ampullien pitoisuudet olivat n. 100 pmy/μl, ja näytteisiin pipetoitiin 5 pmy:ä vastaava määrä.

Ampulleista tehtiin laimennokset Eppendorf-putkiin taulukon 1 mukaisesti, ja valmista laimennuksesta pipetoitiin 100 μl sekä näytepulloihin että maljoille. Salmonella-näytteet viljeltiin XLD- ja Salmonella Brilliance -maljoille ja listeria-näytteet viljeltiin ALOA- ja Palcam-maljoille. Palcam (Polymyxin acriflavine lithium chloride ceftazidime aesculin mannitol agar) on selektiivinen kasvualusta *L. monocytogenes* -bakteerin valikoivaan eristämiseen ja tunnistamiseen elintarvikenäytteissä. XLD- ja Salmonella Brilliance maljoja inkuboitiin 37 °C:ssa 24 tuntia, ja ALOA- ja Palcam-maljoja 37 °C:ssa 48 tuntia, jotta saatiin kasvatettua tyypilliset pesäkkeet, jotka siirrostettiin edelleen Tryptoni-soija agar (TSA) -maljalle ja siitä MALDI-TOF:lle (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) mikrobilajien tunnistamiseksi ja varmistamiseksi.

Taulukko 1. Näytteiden bakteerien tavoitekonsentraatiot ja laskennalliset pitoisuudet sekä mikrobiseoksen valmistuksessa käytetyt tilavuudet. Laimennokset tehtiin ampulleista haluttujen bakteeripitoisuuksien saavuttamiseksi näytteissä.

Bakteeri	Tavoite (pmy/25 g näyte)	Laskennallinen (pmy/25 g näyte)	Mikrobiseos ampullista + laimennosvesi µl
<i>Listeria monocytogenes</i>	3–5	3	120 + 1380
<i>Salmonella</i> Tranaroa	3–5	3	45 + 1455

Matriisiavusteinen laserdesorptio/ionisaatio (MALDI) yhdistettynä lentoaikamassaspektrometriaan (TOF) on analyttinen tekniikka, jossa näytteet ionisoidaan varatuiksi molekyyleiksi ja niiden massa-varaussuhde mitataan. MALDI käyttää laseria ionisoimaan näytteen matriisin avulla, jolloin analyytit siirtyvät kaasufaasiin ilman fragmentoitumista. TOF-analysaattori mittaa ionien saapumisajat, jolloin kevyemmät ionit saapuvat detektoriin aikaisemmin kuin raskaammat. [24.]

MALDI-TOF soveltuu erityisesti biomolekyylien, kuten proteiinien, lipidien, sakkariidien ja muiden orgaanisten makromolekyylien analysointiin. Se on tärkeä työkalu proteomiikassa, metabolomiikassa, lipidomiikassa ja glykomiikassa. Sitä käytetään muun muassa proteiinien molekyylipainon määrittämisessä, proteiinisekvenssien tunnistamisessa, proteiinirakenteiden analysoinnissa ja glykaanien rakenteiden tutkimisessa. [24.]

Analyysiä varten näyte liuotetaan ja sekoitetaan matriisin kanssa, minkä jälkeen seos tiputetaan metalliselle kohdelevylle ja kuivataan. Levy asetetaan MALDI-TOF-laitteeseen, jossa näyte ionisoidaan laserilla ja syntyneet ionit analysoidaan TOF-analysaattorissa. Tuloksena saadaan spektri, joka analysoidaan ohjelmiston avulla ja verrataan näytekirjastoon. [24.]

Näytepulloihin punnittiin 25 g näytematriisia ja lisättiin 225 ml steriiliä peptonivettä. Listerianäytteisiin lisättiin Listeria Enrichment Broth (LEB) -rikastusliettä. LEB-rikastusliemi on tarkoitettu *L. monocytogenes* -bakteerin valikoivaan

kasvatukseen näytteistä. Se sisältää ravinteita ja aineita, jotka tukevat *Listeria*-bakteerien kasvua ja estävät muiden mikro-organismien lisääntymistä, jotta patogeenit voidaan havaita tehokkaasti.

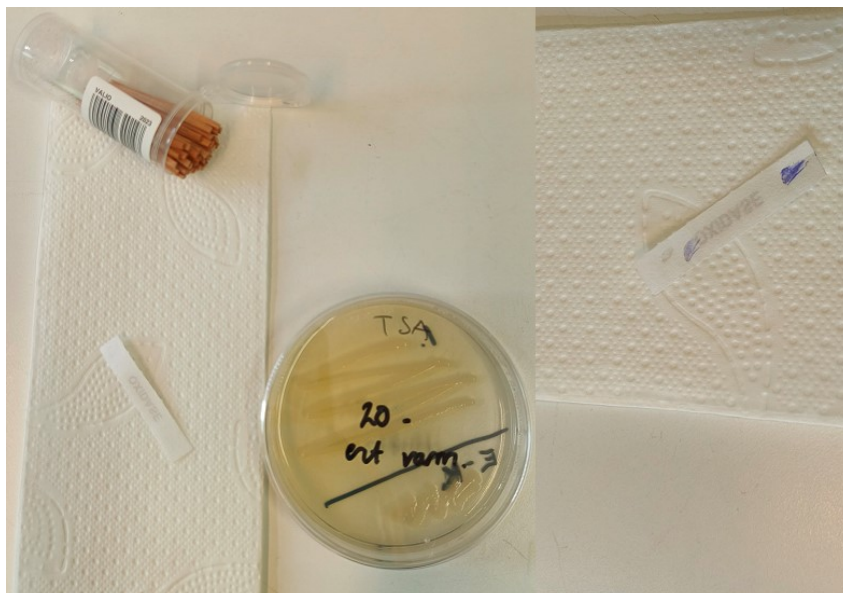
Näytepulloja inkuboitii 22–24 tuntia 37 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen näytteet pipetoitiin PCR-menetelmän erityisputkiin. PCR-menetelmässä käytettiin kaupallista SureTect™ PCR -kittiä, joka sisältää eristysputket, joiden avulla näytteen DNA eristetään. Sen jälkeen eristetty DNA pipetoidaan PCR-putkiin, jotka laiteetaan PCR-laitteeseen. DNA monistuu ja mahdollistaa *L. monocytogenes* ja *Salmonella* -bakteerien havaitsemisen. Kitit ovat erittäin herkkiä ja spesifisiä, ja ne on suunniteltu erityisesti elintarviketurvallisuuden varmistamiseen. Ne mahdollistavat patogeenien tarkan havaitsemisen matalilla pitoisuuksilla erilaisista näytematriiseista. [25.]

3.3 Kvantitatiivisten ja kvalitatiivisten menetelmien tarvittavat jatkotutkimukset

Jatkotutkimuksia tarvittiin, koska ne auttoivat selvittämään, kuinka paljon ja mitä bakteereja näytteissä kasvoi, ja varmistamaan, että bakteerit olivat odotetun kaltaisia. Näiden tutkimusten avulla voitiin tarkentaa, kuinka tarkasti kvantitatiiviset menetelmät mittasivat mikrobipitoisuuksia ja kuinka hyvin kvalitatiiviset menetelmät tunnistivat tutkittuja bakteerilajeja. MPCA-alustoilta haluttiin selvittää vain kokonaispesäkemäärät, joten inkuboiduilta maljoilta laskettiin kaikki pesäkkeet. Enterobakteerien kasvu VRBGA-maljoilta varmennettiin yhdeltä maljalta valitsemalla viisi tyypillistä pesäkettä oksidaasitestistä varten. Myös nollanäytteestä varmistettiin viisi tyypillistä pesäkettä, mikäli kasvua esiintyi. Valitut pesäkkeet siirrostettiin TSA-maljalle, inkuboitii 24 tuntia 37 °C:ssa, minkä jälkeen tehtiin oksidaasitesti.

Oksidaasitesti tehtiin hankaamalla bakteerimassaa oksidaasireagenssia sisältävän testiliuskan pintaan. Oksidaasitesti havaitsee sytokromioksideasi-entsyymin läsnäolon. Oksidaasiposiitivinen bakteeri muuttaa pinnan tummanvioletiksi ja oksidaasinegatiivinen bakteeri ei muuta pinnan väriä. Kuvassa 2 nähdään tulos

oksideasipositiivisesta enterobakteerista. Oksidaasitestiä käytetään mm. *Pseudomonas*-bakteerien tunnistamiseen, sillä se tuottaa sytokromioksideasi-entsyymiä. *E. coli* on puolestaan oksidaasinegatiivinen [26.]



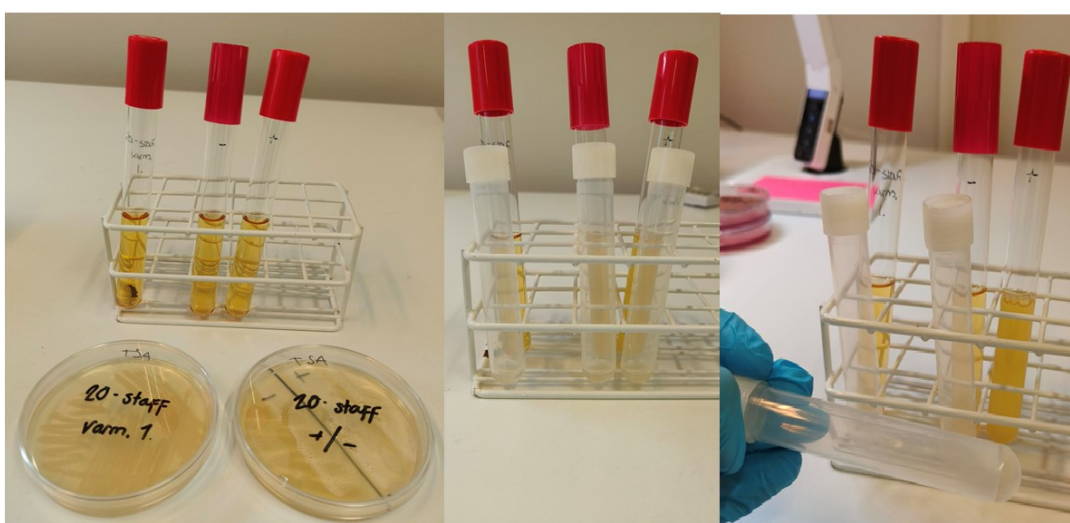
Kuva 2. Enterobakteerin puhtasviljelmästä tehty oksidaasitesti. Oikealla oksidaasitesti on muuttunut siniseksi, joka viittaa oksidaasipositiiviseen bakteeriin. Tämä osoittaa sytokromioksideasi-entsyymien läsnäolon, mikä on tyypillistä esimerkiksi *Pseudomonas*-suvun bakteereille.

E. coli -bakteerin kasvu varmennettiin VRB-agarilta varmistamalla viisi tyypillistä pesäkettä oksidaasitestillä, indolitestillä, laktoosi-tryptoni-lauryylisulfaatti-liemellä (LTLSB) ja viisi pesäkettä varmistettiin MALDI-TOF:lla, mikäli pesäkkeet olivat morfologisesti samannäköisiä. Nollanäytteestä varmistettiin viisi tyypillistä pesäkettä, mikäli kasvua esiintyi.

Indolitestiä varten maljoilta siirrostettiin viisi tyypillistä pesäkettä TSA-alustalle ja inkuboitiiin 24 tuntia 37 °C:ssa. Puhtasviljelmästä siirrostettiin bakteerikasvustoa LTLSB-liemeen laktoosin käytön varmistamiseksi. LTLSB-liemi oli koeputkessa, joka sisälsi Durham-putken. Durham-putket ovat pieniä koeputkia, jotka on asetettu ylösalaisin isompaan koeputkeen, ja koeputket täytettiin LTLSB-kasvatusliuoksella. LTLSB-putkia inkuboitiiin 44 °C:ssa 24 tuntia. Jos Durham-putkeen muodostui kaasukupla, tehtiin indolitesti pipetoimalla Kovacin reagenssia

koeputkiin. Tulos laskettiin positiiviseksi, jos punainen rengas muodostui lie-meen.

Baird Parker -agareilta varmistettiin viisi tyypillistä pesäkettä siten, että yhdestä pesäkkeestä tehtiin kuvassa 3 näkyvä koagulaasitesti ja viisi pesäkettä varmistettiin MALDI-TOF:lla, jos pesäkkeet olivat morfologisesti samannäköisiä. Nollanäytteestä varmistettiin viisi tyypillistä pesäkettä, jos kasvua esiintyi. Baird Parker alustalta siirrostettiin bakteerimassaa TSA-alustalle puhtasviljelmää varten ja maljoja inkuboitettiin 24 tuntia 37 °C:ssa.



Kuva 3. Koagulaasitesti. TSA-maljalta siirrostettiin bakteerimassaa koeputkiin, jotka sisälsivät BHI-lientä. Keskellä edessä olevat koeputket sisälsivät pienen määrän kaninveriplasmaa ja oikealla positiivinen kontrolli oli hyytynyt 4 tunnin inkuboinnin aikana, mikä viittaa koagulaasipositiiviseen *S. aureus*-bakteerin läsnäoloon. Koagulaasitesti tunnistaa koagulaasia tuottavat bakteerit, ja positiivinen tulos havaitaan plasman hyytymisenä koeputkessa.

Koagulaasitesti tehtiin tunnistamaan koagulaasipositiivisia *S. aureus*-bakteereja. Koagulaasitestiä varten pesäkkeitä siirrostettiin TSA-alustalta koeputkiin, jotka sisälsivät BHI (Brain heart infusion) -lientä, ja putkia inkuboitettiin 24 tuntia 37 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen putkista siirrostettiin bakteeriviljelmää kaninveriplasmaan. Jos bakteeri pystyy tuottamaan koagulaasia, kaninveriplasma hyytyy koeputkessa. Putkia inkuboitettiin 37 °C:ssa ja koagulaation muodostuminen tarkistettiin noin 4–6 tunnin kuluttua. Jos testi oli negatiivinen, putkien inkubointia

jatkettiin 24 tuntia. Positiiviseksi luettiin putket, joissa hyytymä oli yli puolet alkuperäisestä nestetilavuudesta.

Kvalitatiivisten tutkimusten lopuksi PCR-ajon jälkeen salmonellaputkista siirrotettiin XLD- ja Salmonella Brilliance -maljoille, ja maljoja inkuboitiin 37 °C:ssa 24 tuntia. Listeriaputkista siirrostettiin ALOA- ja Palcam-maljoille, ja maljoja inkuboitiin 37 °C:ssa ja 48 tuntia. Inkuboinnin jälkeen kaikilta maljoilta varmistettiin yksi pesäke MALDI-TOF:lla.

3.4 Pesäkemäärien logaritminen muuntaminen, vertailuarvojen ja eBias-arvon määrittäminen

Pesäkkeet laskettiin sopivilta maljoilta. Esimerkiksi kokonaispesäkkeiden sopivien maljojen laskentaratajat olivat 15–300 pesäkettä maljalla. [18.] Jokaiselle bakteerille oli annettu omat vertailuarvot, jonka perusteella laskettiin näytteiden mikrobiologisia tuloksia. SLV-ampullin valmistajan antama vertailuarvo kokonaispesäkemäärälle oli 46 500 pmy/ml, [19] jonka mukaan laskettiin, kuinka paljon siirrostettiin mikrobiseosta näytteisiin. SLV:n tarjoamat vertailutulokset olivat muiden laboratorioden mittaamia tuloksia, joita käytettiin omien tulosten vertailuarvoina niiden luotettavuuden varmistamisessa. Vertailuarvoja käytettiin varmistamaan, että tulokset olivat yhdenmukaisia muiden laboratorioden kanssa, mikä toi luotettavuutta tuloksiin ja täytti laatuvaatimukset.

Taulukossa 2 on esitetty kontaminaatiotasot, pesäkkeiden tavoitemäärät maljoille sekä SLV-siirrostuksen laskennalliset tavoitteet. Kontaminaatiotason 1 pesäkkeiden tavoitemäärä oli 500–1 000 pmy/g ja SLV-siirrostuksen tilavuus oli 0,2 ml. Kokonaispesäkemäärän laskennallinen arvo laskettiin kaavan 2 mukaisesti.

$$46500 \text{ pmy/ml} * 0,2 \text{ ml} = 9\,300 \text{ pmy/ml} \quad (2)$$

Tämä luku kertoi pesäkkeiden määrä siirrostetussa näytteessä 9 300 pmy/ml. Tämän jälkeen pesäkemäärä skaalattiin 10 gramman näytettä vastaavaksi jakamalla tulos 10:llä, jolloin laskennalliseksi arvoksi saatiin 930 pmy/10 g.

Taulukko 2. Kontaminaatiotasot, pesäkemäärien (pmy/g) tavoite ja pesäkemäärien laskennallinen tavoite maljalle ja kuinka paljon SLV mikrobiseosta tuli pipetoida näytteisiin kunkin kontaminaatiotason kohdalla oikean pesäkemäärän tavoittamiseksi.

Bakteeri	Kontaminaatiotaso	Tavoite (pmy/g)	Laskennallinen (pmy/10 g)	SLV siirros (µl)
Kokonaispesäkemäärä	1	500–1 000	930	200
	2	1 500–2 000	1 860	400
	3	2 000–7 000	4 650	1 000
Enterobakteerit	1	100–500	310	200
	2	500–1 000	620	400
	3	1000–1 500	1 550	1 000
<i>E. coli</i>	1	100–500	310	200
	2	500–1 000	620	400
	3	1 000–1 500	1 550	1 000
Koagulaasipositiiviset stafylokokit	1	500–1 000	530	200
	2	1 500–2 000	1 060	400
	3	2 000–7 000	2 640	1 000

Taulukossa 3 on esitetty viljelyiden pesäkemäärät kokonaispesäkemaljoilta eri laimennuskertoimilla, mikä auttoi vertaamaan pesäkemääriä eri kontaminaatiotasoilla, eri laimennuskertoimilla ja tulosten laskennassa. Ensin arvioitiin pesäkemäärät maljalla käytettyjen laimennuskertoimien avulla. Esimerkiksi näyte 1 A, joka oli kontaminaatiotason 1 näyte, jonka maljalla havaittiin 102 pesäkettä. Koska näyte oli laimennettu kertoimella 10^{-1} , kerrottiin pesäkemäärä 10:llä kaavan 3 mukaan. Tämä tarkoittaa, että alkuperäisessä, laimentamattomassa näytteessä oli 10 kertaa enemmän pesäkkeitä, joten kerrotaan pesäkemäärä 10:llä, jotta saadaan alkuperäistä näytettä vastaava pesäkemäärä 1:tä grammaa kohden

$$102 \text{ pesäkettä} * 10 = 1\,020 \text{ pesäkettä/g}$$

(3)

Taulukko 3. Viljelyiden pesäkemäärät (pmy) kokonaispesäkemaljoilta kullakin laimennoskertoimella ja kontaminaatiotasolla. SLV-näytteissä pesäkkeitä havaittiin runsaasti alhaisilla laimennoksilla, ja kontaminoiduissa näytteissä pesäkemäärät vaihtelivat laimennoskertoimen mukaan. Nollanäytteessä ei esiintynyt kasvu.

Kokonaispesäkemäärä Pesäkemäärät maljoilla (pmy)	Laimennoskerroin			
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
SLV	>300	>300	47	3
SLV rinnakkainen	>300	>300	46	10
Nollanäyte	0	0	-	-
1 A	102	13	-	-
1 B	134	8	-	-
2 A	196	21	-	-
2 B	234	20	-	-
3 A	-	66	5	-
3 B	-	71	3	-

Koska näyte oli 10 grammaa, koko näytteen pitoisuus laskettiin kaavan 4 mukaan.

$$1\,020 \text{ pesäkettä/g} * 10 \text{ g} = 10\,200 \text{ pesäkettä/10 g} \quad (4)$$

Tämän jälkeen tulos muunnettiin logaritmiseen muotoon käyttäen kymmenkertaisen logaritmin kaavaa kaavan 5 mukaisesti.

$$\lg(10\,200) = 4,01 \quad (5)$$

Sama laskentamenetelmä toistettiin myös muille laimennoskertoimille. Laimennoskertoimien mukaan 10⁻²-laimennokset kerrottiin sadalla ja 10⁻³-laimennokset tuhannella. Kahdesta samalla kontaminaatiotasolla keinotekoisesti kontaminoidusta näytteestä laskettiin keskiarvo. Näytteen 1 A logaritmiseksi arvoksi saatiin pesäkemäärien perusteella 4,01 ja näytteen 1 B arvoksi 4,13. Näytteistä

laskettiin keskiarvo kaavan 6 mukaisesti. Tämä arvo toimi vertailuarvona y, kun laskettiin eBias-arvo.

$$\text{Keskiarvo} = \frac{4,01+4,13}{2} = 4,07 \quad (6)$$

Tätä keskiarvoa vertailtiin SLV-näytteen laskennalliseen tavoitteeseen. SLV-näytteen laskennallinen tavoite oli 9 300 pmy/g, ja sen logaritminen arvo saatiin käyttäen kymmenkertaisen logaritmin kaavaa kaavan 5 mukaisesti, jolloin tulokseksi saatiin 3,97. Tämä arvo toimi vertailuarvona x, kun laskettiin eBias arvo. Ero vertailuarvojen laskennallisten arvojen välillä määritettiin eBias-arvolla kaavan 7 mukaan.

$$\text{eBias} = 4,07 - 3,97 = 0,1 \quad (7)$$

SLV-näytteiden ja keinotekoisesti kontaminoitujen näytteiden kontaminaatiotasojen 2 ja 3 laskennalliset pesäkemäärätavoitteet ja vertailuarvot laskettiin samalla tavalla. Liitteen 1 taulukossa 1 on esitetty kaikkien kasvualustojen pesäkemäärät. Kaikkien sopivien maljojen pesäkkeet on laskettu kasvualustojen pesäkkeiden laskentarajat huomioon ottaen. VRBGA-alustalta voitiin laskea tuloksia maljoilta, joilla kasvoi 15–150 pesäkettä [21], VRBA-alustalta 10–150 pesäkettä [27] ja Baird Parker -alustalta 10–300 pesäkettä [23].

Yllä esitetyt laskentamenetelmät ja vertailuarvot mahdollistivat luotettavat arviot mikrobien määrästä näytteissä. SLV-ampullin toimittajan vertailuarvojen ja pesäkemäärien logaritmisesta muuntamisesta avulla saatiin johdonmukaisia vertailuarvoja, jotka tukivat tulosten tarkkuutta. Tämä mahdollisti luotettavien tulosten vertailun muiden laboratorioden kanssa. EBias-arvon ja laskennallisten vertailuarvojen avulla varmistettiin menetelmän riittävä tarkkuus eri kontaminaatiotasolla, jotta menetelmää voitaisiin käyttää luotettavasti elintarvikealan laadunvalvonnassa.

4 Tulosten tarkastelu

Mikrobiologisten määritysten mittausepävarmuuteen vaikutti useita tekijöitä, kuten näytteen käsittely, mittausmenetelmä, laboratorio-olosuhteet ja ympäristötekijät. Nämä tekijät saattoivat johtaa joko satunnaisiin tai systemaattisiin epävarmuuksiin. Tulosten toistettavuus oli keskeistä mittausepävarmuuden arvioimisessa. Kvalitatiivisten menetelmien tuloksia verrattiin protokollassa 3 määritettyyn hyväksymisrajaan ja kvantitatiivisten menetelmien tuloksia verrattiin SLV:n tarjoamiin vertailuarvoihin. Hyväksymisrajat määrittivät menetelmien hyväksymisen kyseiselle kategorialle laboratoriossa.

Mahdolliset poikkeamat ja odottamattomat tulokset olisivat voineet johtua useista tekijöistä, kuten näytteen käsittelyvirheistä (esim. kontaminaatio tai virheellinen laimennus), epätarkoista inkubaatio-olosuhteista (esim. lämpötila tai inkubaatioaika) tai pesäkkeiden laskentavirheistä, (esim. väärin tunnistetut pesäkkeet). Laitteiden kalibrointi ja säännöllinen huolto, huolellinen työskentely sekä suurennuslasin käyttö olisivat voineet auttaa vähentämään virheitä, ja myös työntekijöiden tarkkuus ja taidot oli tärkeää virheiden välttämiseksi.

4.1 Kvantitatiivisten menetelmien tulokset

Kvantitatiivisten menetelmien avulla arvioitiin, kuinka hyvin verifioitava menetelmä toimi käytännössä laboratoriossa. Menetelmän toimivuutta ja luotettavuutta arvioitiin vertailemalla keinotekoisesti kontaminoidun näytteen ja SLV-näytteen viljelyiden tuloksia, joista laskettiin absoluuttinen ero. Nämä tulokset on esitetty taulukossa 4. Absoluuttisen eron määrittäminen auttoi menetelmän toimivuuden arvioinnissa laboratoriossa. Erityisesti arvioitiin, pystyikö menetelmä tuottamaan luotettavia tuloksia eri kontaminaatiotasolla ja kasvualustoilla. Lisäksi vertailu auttoi tunnistamaan mahdollisia virhelähteitä ja niiden vaikutusten minimoimisen.

Taulukko 4. Näytteiden logaritmisesti ilmaistut tulokset, vertailuarvot ja eBias-arvot eri kontaminaatiotasolla ja kasvualustoilla. Vertailuarvo y on keinotekoisesti kontaminoitu näyte ja vertailuarvo x on SLV-mikrobiseoksesta siirrostettu näyte.

	Näytematriisi tulos \log_{10} pmy/g	Vertai- luarvo y (\log_{10} pmy/10 g näyte)	Vertai- luarvo x (\log_{10} pmy/tila- vuus)	eBias [y-x] Hyväksytty (eBias <0,5)
Kokonais- pesäkemäärä	Kont.1, A: 3,01 Kont.1, B: 3,13	4,07	3,97	0,10
	Kont.2, A: 3,30 Kont.2, B: 3,36	4,33	4,27	0,06
	Kont.3, A: 3,87 Kont.3, B: 3,85	4,86	4,67	0,19
Enterobak- teerit	Kont.1, A: 2,52 Kont.1, B: 2,51	3,52	3,48	0,04
	Kont.2, A: 2,72 Kont.2, B: 2,79	3,76	3,78	0,02
	Kont.3, A: 3,13 Kont.3, B: 3,17	4,15	4,18	0,03
<i>E.coli</i>	Kont.1, A: 2,26 Kont.1, B: 2,28	3,27	2,98	0,29
	Kont.2, A: 2,63 Kont.2, B: 2,58	3,61	3,28	0,33
	Kont.3, A: 3,02 Kont.3, B: 2,94	3,98	3,68	0,30
Koagulaasi- positiiviset stafylokokit	Kont.1, A: 2,89 Kont.1, B: 2,87	3,88	3,72	0,16
	Kont.2, A: 3,11 Kont.2, B: 3,12	4,12	4,03	0,09
	Kont.3, A: 3,52 Kont.3, B: 3,54	4,53	4,42	0,11

Taulukossa 4 esitetyt tulokset osoittivat, että kaikilla kolmella kontaminaatiotasolla kahden tuloksen välinen absoluuttinen ero keinotekoisesti kontaminoidun näytteen ja SLV-näytteen tulosten välillä oli pienempi kuin 0,5 log. Lisäksi rinnakkaisten viljelynäytteiden tulosten pieni vaihteluväli vahvisti menetelmän toistettavuutta. Tämä johdonmukaisuus eri testauskierroilla tukee menetelmän soveltuvuutta kvantitatiivisiin analyyseihin.

Tulokset osoittivat, että siirrostuspitoisuudet vastasivat hyvin tavoitearvoja kaikilla kolmella kontaminaatiotasolla ja kasvualustoilla. Kaikki eBias-arvot pysyivät selvästi alle hyväksymisrajan, mikä tarkoittaa, että menetelmä täytti SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardissa määritetyn hyväksymisrajan ja toimi oikein laboratoriossa ja voidaan siten arvioida luotettavaksi. Näiden tulosten perusteella menetelmän pätevyysalueen laajentaminen ”hedelmät-, marjat-, kasvikset- ja viljat ja niistä tehdyt valmisteet” -kategoriaan on perusteltua kvantitatiivisten menetelmien osalta.

Jotta voitiin todeta, että verifioitava menetelmä toimii oikein laboratoriossa, tuli absoluuttisen eron (eBias) keinotekoisesti kontaminoidun näytteen ja SLV-näytteen viljelyllä määritetyn siirroksen tulosten välillä olla $<0,5$ (\log_{10}). Menetelmien verifiointi perustui tähän arviointiin [11, s. 30]. Kvantitatiivisten menetelmien tulokset vahvistivat menetelmän soveltuvuuden tarkkoihin ja toistettaviin mikrobiologisiin analyyseihin, ja saadut tulokset tukivat myös menetelmän laajentamista uuden näytekategorian käyttöön. Lisätutkimuksilla menetelmän herkkyyttä ja tarkkuutta eri mikro-organismien osalta voitaisiin vielä tarkentaa, mikä olisi mahdollistanut menetelmän laajemman käytön myös muilla sovellusalueilla.

Poikkeustapauksessa, jos hyväksymisraja ei olisi toteutunut (eBias olisi ollut $\geq 0,5$ log pmy/g), olisi pitänyt tehdä kvantitatiivisten menetelmien juurisyyanalyysi ongelman tunnistamiseksi. Tällöin olisi ollut tarpeen tehdä korjaavia toimenpiteitä ja mahdollisesti toistettava koe. Juurisyyanalyysissä olisi selvitetty mahdollisuus analysointi- tai kontaminointivirheelle, joka olisi voinut vaikuttaa tulosten luotettavuuteen. Juurisyyanalyysiä ei tarvinnut tehdä, koska tulokset olivat odotusten mukaisia ja hyväksymisraja täyttyi.

4.2 Kvantitatiivisten menetelmien varmistusmenetelmien tulokset

Enterobakteerit tunnistettiin oksidaasitestin ja MALDI-TOF-tulosten perusteella, jotka molemmat osoittivat positiivisia tuloksia. *E. coli* -bakteerin tunnistamisessa käytettiin MALDI-TOF-analyysiä, joka osoitti positiivisen tuloksen. Lisäksi *E. coli* -bakteerin tunnistaminen varmistettiin LTLNB-testillä ja indolitestillä, jotka molemmat olivat positiivisia. Koagulaasipositiiviset stafylokokit, kuten *S. aureus*, tunnistettiin Baird Parker -maljalla kasvatettujen pesäkkeiden perusteella sekä koagulaasitestillä, joka osoitti positiivisen tuloksen. Tulosten laskenta ja analyysimenetelmien tarkka käyttö olivat olennaisia elintarvikehygienian varmistamisessa, sillä ne mahdollistivat bakteerien, kuten enterobakteerien, *E. coli* ja koagulaasipositiivisten stafylokokkien tunnistamisen. Näiden menetelmien avulla voitiin määrittää näytteiden mikrobiologinen laatu. Nämä tulokset osoittavat, että käytetyt tunnistusmenetelmät, kuten oksidaasitesti, MALDI-TOF-analyysi, LTLNB-testi, indolitesti ja koagulaasitesti, olivat tehokkaita ja antoivat luotettavia tuloksia tunnistettaessa erilaisia bakteerikantoja. Tulosten perusteella voitiin varmistaa, että näytteissä esiintyi näitä mikro-organismeja, mikä viittaa mikrobiologisen kontaminaation mahdollisuuteen.

Kaikkien bakteerien osalta tulokset laskettiin positiivisten ja samannäköisten pesäkkeiden suhteena. Tämä tarkoittaa, että laskettiin niiden pesäkkeiden määrä, jotka näyttivät morfologisesti samanlaisilta ja osoittivat positiivisia tuloksia käytetyissä testeissä, ja vertailtiin tätä kokonaispesäkkeiden määrään. Näin saatiin tarkka arvio bakteerien esiintyvyydestä näytteissä. Näiden menetelmien käyttö ja analyysitulosten laskeminen varmistivat, että mikrobiologinen analyysi oli tarkkaa ja luotettavaa.

4.3 Kvalitatiivisten menetelmien tulokset

Protokollassa 3 ei ollut määritetty eLOD50-arvoa. Sen sijaan tulokset arvioitiin sen perusteella, kuinka monta positiivista tulosta saadaan seitsemästä rinnakkaisesta näytteestä. Protokollassa 3 vaadittiin, että vähintään kuuden seitsemästä keinotekoisesti kontaminoidusta näytteestä tuli olla positiivisia ja

nollanäytteen negatiivinen, jotta voitiin todeta menetelmän toimineen oikein verifioitavalle kategorialle laboratoriossa. [11, s. 30.]

Kontaminaatiotaso keinotekoisesti kontaminoiduille näytteille oli *L. monocytogenes* -menetelmän osalta 4,7 pmy/25 g näyte ja *Salmonella*-menetelmän osalta 3,3 pmy/25 g näyte. Taulukossa 5 on esitetty keinotekoisesti kontaminoitujen ja kontaminoimattomien näytteiden tulokset *L. monocytogenes*- ja *Salmonella*-menetelmillä. Taulukossa on eritelty positiivisten ja negatiivisten tulosten määrä kummallekin menetelmälle. Kaikki keinotekoisesti kontaminoidut näytteet osoittautuivat positiivisiksi sekä *L. monocytogenes* että *Salmonella*-menetelmillä. Kontaminoimattomat nollanäytteet olivat negatiivisia molemmilla menetelmillä, mikä vahvisti menetelmien spesifisyyden ja luotettavuuden. MALDI-TOF:in avulla varmistettiin, että keinotekoisesti kontaminoitujen näytteiden pesäkkeet olivat *Salmonella* ja *L. monocytogenes* -bakteereja. MALDI-TOF ilmoitti näytetulokset muodossa "todettu/ei-todettu" jokaiselle näytteelle.

Taulukko 5. Keinotekoisesti kontaminoitujen ja kontaminoimattomien näytteiden tulokset *L. monocytogenes* - ja *Salmonella*-menetelmillä. Molemmilla menetelmillä kaikki kontaminoidut näytteet olivat positiivisia ja kontaminoimattomat näytteet negatiivisia, mikä täytti hyväksymisrajan.

Keinotekoisesti kontaminoidut näytteet	Positiivisten lukumäärä (kontaminoitu) (Hyväksytty ≥ 6)	Negatiivisten lukumäärä (kontaminoitu) (Hyväksytty ≤ 1)	Kontaminoimaton näyte tulos (Hyväksytty negatiivinen)
<i>L. monocytogenes</i>	7	0	negatiivinen
<i>Salmonella</i>	7	0	negatiivinen

Kvalitatiivisten menetelmien tulokset osoittivat, että kohdemikrobi pystyttiin osoittamaan kaikista keinotekoisesti kontaminoiduista näytteistä ja kaikista kontaminoimattomista näytteistä saatiin negatiivinen tulos. MALDI-TOF-analyysi

vahvasti tutkittujen pesäkkeiden bakteerikannat oikeiksi. Näin ollen kvalitatiivinen menetelmä täytti SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardissa määritetyn hyväksymisrajan ja toimi oikein laboratoriossa ja pätevyysalueen laajennus kategoriaan ”hedelmät-, marjat-, kasvikset- ja viljat ja niistä tehdyt valmisteet” on perusteltu kvalitatiivisten menetelmien osalta. Näiden tulosten perusteella voidaan todeta, että käytetyt menetelmät ovat tarkkoja ja luotettavia mikrobien havaitsemisessa ja tunnistamisessa. Tämä varmistaa menetelmien soveltuvuuden elintarvikealan laadunvalvontaan, jossa tarkka mikrobiologinen analyysi on kriittisen tärkeää.

5 Yhteenveto

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli toteuttaa matriisilaajennus mikrobiologian pätevyysalueeseen siten, että se kattaa ”hedelmät, marjat, kasvikset, viljat ja niistä valmistetut tuotteet” kaikilla Valion Seinäjoen laboratoriossa käytössä olevilla akkreditoituilla menetelmillä. Laajennus toteutettiin käyttäen SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardia, ja se perustuu nykyiseen pätevyysalueeseen, joka keskittyy maitoon ja siitä valmistettuihin tuotteisiin. Työssä käsiteltiin sekä kvantitatiivisia että kvalitatiivisia menetelmiä, joille kummallekin suoritettiin erilaisia verifiointiprosesseja. Matriisilaajennus oli olennainen askel Valion Seinäjoen laboratorion mikrobiologisen analyysin kattavuuden laajentamisessa, ja se parantaa laboratoriota sen kyvyssä vastata laajemman elintarvikevalikoiman analysoimiseen. Tämä laajennus mahdollistaa elintarviketurvallisuuden valvonnan uusissa tuoteryhmissä samalla noudattaen tiukkoja verifiointivaatimuksia.

Mikrobiologisten määritysten mittausepävarmuuteen vaikuttivat näytteen käsittely, mittausmenetelmä, laboratorio-olosuhteet ja ympäristötekijät. Näiden tekijöiden yhteisvaikutus voi johtaa sekä satunnaiseen että systemaattiseen mittausepävarmuuteen. Tuloksia verrattiin etukäteen määritettyihin hyväksymisrajoihin, mikä määrittää, voidaanko menetelmä hyväksyä kyseiselle kategorialle laboratoriossa.

Työn aikana suoritettavat menetelmäverifioinnit osoittivat, että käytetyt menetelmät ovat tarkkoja ja toistettavissa. Kaikki eBias-arvot olivat hyväksyttävissä rajoissa,

mikä osoittaa menetelmän tarkkuuden ja luotettavuuden referenssimenetelmiin verrattuna. Tämä vahvistaa menetelmän suorituskyvyn uusilla tuoteryhmillä ja sen soveltuvuuden mikrobikontaminaation tason arvioimiseksi. Tutkimuksen tulokset korostavat menetelmän tarkkuutta ja toistettavuutta. Analyysimenetelmät, jotka perustuvat SFS-EN ISO 16140-3:2021 -standardin mukaiseen verifointiin, ovat välttämättömiä tarkkojen ja luotettavien tulosten saamiseksi. Näiden menetelmien yhdistelmä antaa kokonaisvaltaisen kuvan mikro-organismien esiintymisestä näytteissä ja auttaa varmistamaan, että laboratoriot pystyvät luotettavasti tunnistamaan näiden mikrobien esiintymisen erilaisissa näytteissä sekä tekemään päätöksiä elintarviketurvallisuuden varmistamiseksi.

Opinnäytetyön tuloksena todettiin, että menetelmät saatiin onnistuneesti verifioitua ja ne täyttävät pätevyysalueelle asetetut vaatimukset. Matriisilaajennus onnistui, ja menetelmien avulla voidaan valvoa myös kasvipohjaisten tuotteiden laatua. Jatkossa on tärkeää keskittyä mahdollisten virheiden minimointiin ja menetelmien jatkuvaan parantamiseen.

Lähteet

- 1 Meijeri ja ruokatalo. Verkkoaineisto. Valio <<https://www.valio.fi/yritys/>>. Luettu 30.6.2024.
- 2 Elintarviketurvallisuus ja laatu. Verkkoaineisto. Valio. <<https://www.valio.fi/vastuullisuus/vastuullisuus-tehtaila/elintarviketurvallisuus-ja-laatu/>>. Luettu 30.6.2024.
- 3 Akkreditointi. Verkkoaineisto. FINAS. <<https://www.finas.fi/akkreditointi/Sivut/default.aspx>>. Luettu 3.4.2024.
- 4 Organisaatio. Verkkoaineisto. FINAS. <<https://www.finas.fi/Tietoa/Sivut/Organisaatio-ja-henkil%C3%B6kunta.aspx>>. Luettu 3.4.2024.
- 5 Tunnustamissopimukset. Verkkoaineisto. FINAS. <<https://www.finas.fi/Tietoa/Sivut/Tunnustamissopimukset.aspx>>. Luettu 3.4.2024.
- 6 FINAS-akkreditointipalvelun menettelyt akkreditointi- ja arviointitoiminnassa. 2022. Verkkoaineisto. FINAS. <https://www.finas.fi/Tiedotot%201/Julkaisut/FINAS_Tiedote_1.pdf>. Luettu 4.4.2024.
- 7 Valio Oy, T&K, Kemia ja mikrobiologia sekä aluelaboratoriot. 2023. Verkkoaineisto. FINAS. <<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.finas.fi/Documents/T022%2520M23%25202023.pdf&ved=2ahUKEwii0cfpooOHAXUd-KBAIHb15BEsQFnoECBIQAQ&usg=AOvVaw1gFqUU2Jmt8c-nb7kkmkvD6>>. Luettu 3.4.2024.
- 8 Mitä on auditointi? 2023. Verkkoaineisto. Excellence Finland. <<https://www.excellencefinland.fi/mita-on-auditointi/>>. Luettu 2.4.2024.
- 9 Analyysimenetelmien validointi. Verkkoaineisto. Finntesting. <<https://kemi-anseurat.fi/finntesting/analyysimenetelmien-validointi/>>. Luettu 5.4.2024.
- 10 Hägg, Margareta. Validoinnin suunnittelun opas. Verkkoaineisto. 2016. VTT. <<https://publications.vtt.fi/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Luettu 5.4.2024.
- 11 SFS-EN ISO 16140-3:2021:en. Microbiology of the food chain. Method validation. Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory (ISO 16140-3:2021) Suomen Standardisoimisliitto.

- 12 PCR & Reaction Cleanup. Verkkoaineisto. New England Biolabs. <<https://www.neb.com/en/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/pcr-and-reaction-cleanup>>. Luettu 18.7.2024.
- 13 Polymerase Chain Reaction (PCR) Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>>. Luettu 18.7.2024.
- 14 Polymerase Chain Reaction (PCR) Basics. Verkkoaineisto. Merck. <<https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/routine-amplification>>. Luettu 18.7.2024.
- 15 What is Real-Time PCR (Qpcr)? Verkkoaineisto. Bio Rad. <<https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>>. Luettu 18.7.2024.
- 16 What are Certified Reference Materials? Verkkoaineisto. XRF Scientific. <<https://www.xrfscientific.com/certified-reference-materials/>>. Luettu 13.9.2024.
- 17 SFS-EN ISO 19036:2019:en. Microbiology of the food chain. Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations (ISO 19036:2019). Suomen Standardisoimisliitto.
- 18 Root Cause Analysis Explained: Definition, Examples, and Methods. Verkkoaineisto. Tableau. <<https://www.tableau.com/learn/articles/root-cause-analysis#definition>>. Luettu 13.9.2024.
- 19 Ilbäck, Jonas. 2022. Proficiency testing Food Microbiology. Verkkoaineisto. Swedish Food Agency. <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.livsmedelsverket.se/globalassets/publikationsdatabas/rapporter/2022/2022-kompetensprovning-av-laboratorier-mikrobiologi-rapport-livsmedel-oktober-2022.pdf&ved=2ahUKEwiQ_pzLx8WIAxUS-GBAIH5kkEacQFnoECBkQAQ&usg=AOv-Vaw0p5LdwKfLFC4RI7Z9s8oXw>. Luettu 13.7.2024.
- 20 Milk Plate Count Agar. 2015 Verkkoaineisto. Humeau Laboratories. <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_Milk-Plate-count-Agar_EN_280618.pdf&ved=2ahUKEwj6mbH564KHAXU2FRAIHVo5AXYQFnoECBEQAQ&usg=AOvVaw3CbG-VvQ3U5ZYm_PcrNn9c>. Luettu 12.4.2024.
- 21 Agar medium F. 2011 VRBG/Crystal Violet-Neutral Red-Bile-Glucose agar medium. Verkkoaineisto. Bio-Rad.

- <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/fsd/literature/Technical_Sheets/TS_Agar%2520medium%2520F%2520-%2520VRBG_V2_06-06-11.pdf&ved=2ahUKEwjJsBWUucWIAxWclhAIHamkKoMQFnoECBcQAQ&usg=AOvVaw1EAUT8dkB_uvK00krzQtnF>. Luettu 12.4.2024.
- 22 Aryal, Sagar. 2022. VRBA- Composition, Principle, Preparation, Results, Uses. Verkkoaineisto. Microbe Notes. <<https://microbenotes.com/violet-red-bile-agar-vrba/>>. Luettu 12.4.2024.
- 23 Baird Parker Agar Base. 2016. Verkkoaineisto. Humeau Laboratories. <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_Baird-Parker-Agar-Base_55015010054_420110_EN_150518.pdf&ved=2ahUKEwjBs_Lb16mHAxXGKBAIHaP2Bp0QFnoECDEQAQ&usg=AOvVaw2ZXE7KdApxx-OidFB9VQjZH>. Luettu 12.4.2024.
- 24 MALDI-TOF Mass Spectrometry. Verkkoaineisto. Creative Proteomics. <<https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>>. Luettu 20.5.2024.
- 25 Thermo Scientific SureTect PCR System. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/industrial/food-beverage/food-microbiology-testing/food-microbiology-detection-quantification/pcr-food-testing-pathogen-detection/suretect-pcr-food-pathogen-testing.html>>. Luettu 20.7.2024.
- 26 Ayal, Sagar. Oxidase Test- Principle, Uses, Procedure, Types, Result Interpretation, Examples and Limitations. Verkkoaineisto. Microbiology Info.com. <<https://microbiologyinfo.com/oxidase-test-principle-uses-procedure-types-result-interpretation-examples-and-limitations/>>. Päivitetty 10.8.2022. Luettu 15.4.2024.
- 27 Violet Red bile Agar (VRB). 2013. Verkkoaineisto. VWR. <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://de.vwr.com/assetsvc/asset/de_DE/id/11237815/contents&ved=2ahUKEwjV9vCnvsWIAxWJI-RAIHZOYNxgQFnoECBYQAQ&usg=AOvVaw3xVsZHsQTE7ck7yJvbYj0w>. Luettu 12.4.2024.

Pesäkemäärät maljoilla

Taulukko 1. Viljelyiden pesäkemäärät (pmy) eri kasvualustoilla, laimennosker-toimilla ja kontaminaatiotasolla.

	SLV	SLV (R)	Nolla-näyte	1A	1B	2A	2B	3A	3B
Enterobakteerit	(pmy)								
10 ⁻¹	>150	>150	0	33	32	52	62	135	147
10 ⁻²	132	134	0	3	1	6	6	14	11
10 ⁻³	15	4	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁴	1	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>									
10 ⁻¹	>150	>150	0	18	19	43	38	105	88
10 ⁻²	44	52	0	3	6	3	3	6	4
10 ⁻³	1	4	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁴	1	0	-	-	-	-	-	-	-
Koagulaasipositiiviset stafylokokit									
10 ⁻¹	>1500	>1500	0	77	74	130	131		
10 ⁻²	>150	>150	0	7	9	7	14	33	35
10 ⁻³	28	25	-	-	-	-	-	4	2
10 ⁻⁴	5	1	-	-	-	-	-	-	-
Kokonaispesäkemäärä									
10 ⁻¹	>300	>300	0	102	134	196	234		
10 ⁻²	>300	>300	0	13	8	21	20	66	71
10 ⁻³	47	46	-	-	-	-	-	5	3
10 ⁻⁴	3	10	-	-	-	-	-	-	-