

Abdishakur Roble

Pseudalert-menetelmän validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Insinööri (AMK)
Bio- ja elintarviketekniikka
Insinöörityö 1.2.2016

Tekijä Otsikko	Roble Abdishakur Pseudalert-menetelmän validointi
Sivumäärä Aika	36 sivua + lähteet ja liitteet 1.2.2016
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaajat	Eeva Klemettilä-kirjavainen, mikrobiologi Veli-Matti Taavitsainen, yliopettaja Carola Fortelius, koulutusvastaava
<p>Insinööriyön aiheena oli Pseudalert-menetelmän validointi. Tavoitteena oli selvittää Pseudalert-menetelmän soveltuvuutta <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -bakteerin määrittämiseen uima-allasvedestä, pullotetusta vedestä sekä verkostovedestä vaihtoehtoisena menetelmänä standardin mukaiselle nykyisin käytetylle kalvosuodatusmenetelmälle.</p> <p>Molemmille menetelmille määritettiin validointisuureet sensitiivisyys (herkkyys), spesifisyys, selektiivisyys, virhepositiivimäärä, virhenegatiivimäärä, tehokkuus, uusittavuus ja toistettavuus. Menetelmien vastaavuutta määritettiin myös tilastollisten testien avulla.</p> <p>Pseudalert on IDEXX laboratories -yrityksen kehittämä kaupallinen menetelmä, joka on tällä hetkellä käytössä olevaa menetelmää huomattavasti nopeampi. Tilastollisilla menetelmien ja validointisuureiden avulla todennettiin Pseudalert-menetelmän ja kalvosuodatusmenetelmän vastaavan toisiaan.</p>	
Avainsanat	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Validointi, Pseudalert

Author Title	Abdishakur Roble validation of pseudalert method
Number of Pages Date	36 pages + sources and appendices 1.2.2016
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructors	Carola Fortelius, Head of Biotech and Food Eng. Dept. Veli-Matti Taavitsainen, Principal Lecturer Eeva Klemettilä-Kirjavainen, Microbiologist
<p>The aim of this, was to study how suitable the pseudalert method is determining <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bacteria from swimming pool water, bottled water and tap water and to compare this method to the membrane filtration method, which is the standard and currently used method.</p> <p>The quantities of validation such as sensitivity, specificity, selectivity, false negative, true negative, repeatability and reproducibility were determined for both the methods. The equivalency of the methods was also determined by statistical tests.</p> <p>Pseudalert is a commercial method that has been developed by IDEXX Laboratories Company, and it is significantly faster than the currently used method. The methods were found to be comparable by means of statistical tests and the quantities of validation. The analyses were done in the Metropolilab, Helsinki</p>	
Keywords	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , validation, Pseudalert

Sisällys

Tiivistelmä

Abstract

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	MetropoliLab	2
3	Validointi	3
4	Kvantitatiivinen tutkimus	3
5	Mikrobiologisen menetelmän validointi	3
	5.1 Oikeellisuus	4
	5.2 Virhepositiivimäärä	4
	5.3 Virhenegatiivimäärä	4
	5.4 Toistettavuus	5
	5.5 Uusittavuus	6
	5.6 Spesifisyys	6
	5.7 Sensitiivisyys eli herkkyys	6
	5.8 Pesäkelaskennan toistettavuus	7
	5.9 Tehokkuus	7
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ja <i>Pseudomonas</i> -suvun -bakteerit	7
7	Mikrobien valinta	10
	7.1 Mikrobien hankinta	11
	7.2 <i>Burkholderia cepacia</i>	11
	7.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	11
	7.4 <i>Pseudomonas putida</i>	12

8	Kylmäkuivaus ja kantojen säilytys	12
9	Validointisuunnitelma	14
10	Materiaalit ja menetelmät	16
11	Mikrobipitoisuuden valinta	18
12	Pseudalert	19
	12.1 IDEXX laboratories	20
	12.2 Pseudalertin käyttö	20
13	IDEXX yrityksen Pseudalert tutkimusraportit	21
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -bakteerin määrittäminen kalvosuodatuksella	23
	14.1 CN-maljan luku ja tulkinta	24
	14.2 CN-agar	25
15	Varmennukset	25
	15.1 API 20 NE	26
	15.2 API 20 NE käyttö	26
16	Tilastolliset analyysit	27

17 Toteamis- ja määritysraja	29
18 MPN	29
19 Studentin t-testi	30
20 Menetelmäepävarmuus	31
21 Suhteellinen erotus	31
21.1 Suhteellinen keskihajonta	31
21.2 Peittokerroin	32
22 Tuloksien arviointi	32
23 Validointisuureiden arviointi	33
23.1 Tulosten lukemistoistettavuus	33
23.2 Uusittavuus	34
23.3 Muut validointisuureet	34
24 Laajennettu epävarmuus	36
25 Johtopäätökset	36

Liitteet

Liite 1. Tulokset ja taulukot

Liite 2. Agarit ja BHI- liemi

1 Johdanto

Sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen 177/2008 mukaan uimavedestä ei saa aiheuttaa terveyshaittaa uimareille. Asetuksen mukaan allasvedessä ei saa olla pieneliöitä, loisia tai sellaisia määriä aineita, joista voi olla haittaa ihmisen terveydelle. Allasveden on myös muutoin oltava käyttötarkoitukseen sopiva. Allasvesi ei saa sisältää kiinteitä epäpuhtauksia, saostumia tai taudinaiheuttajia. Uimaveden laatuvalvonta on lakisääteinen. Aistinvaraisen arvioinnin lisäksi laatuvalvontaan kuuluvat mikrobiologiset ja fysikaalis-kemialliset tutkimukset. Mikrobiologiset tutkimukset käsittävät heterotrofisen pesäkeluvun; yleisen bakteeripitoisuuden määrittämisen kahdessa eri lämpötilassa sekä *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin määrittämisen.

Pseudomonas aeruginosa on merkittävin uima-allasveden välityksellä tauteja aiheuttava bakteeri. Uimavedessä ei saa olla osoitettavissa *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria. Vaatimus on myös sama pulloitetulle vedelle, eli bakteeria ei saa olla osoitettavissa näyte-erässä (250 ml).

Tutkimuksessa on tarkoitus selvittää Pseudalert-menetelmän soveltuvuutta *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin määrittämiseen uima-allasvedestä, pulloitetusta vedestä sekä verkostovedestä, vaihtoehtoisena menetelmänä standardin mukaiselle nykyisin käytetylle kalvosuodatusmenetelmälle. Pseudalert on IDEXX laboratories -yrityksen kehittämä kaupallinen menetelmä, joka on tällä hetkellä käytössä olevaa menetelmää huomattavasti nopeampi menetelmä. Tämän insinööriyön tutkimukset on suoritettu MetropoliLab:illa Helsingissä.

2 MetropoliLab Oy

MetropoliLab Oy on Helsingin, Espoon, Vantaan ja Kauniaisten omistama elintarvike-, vesi- ja ympäristönäytteitä tutkiva laboratorioalan yritys. Yritys sijaitsee Helsingin yritys- ja tiedepuistossa (Helsinki Business and Science Park) Viikin kampusalueella.

MetropoliLab:lla on pitkä historia ja yrityksen juuret yltävät vuoteen 1884 asti, kun Helsingin kaupunginvaltuusto perusti Elintarvikkeiden tutkimusasema-nimisen laboratorion. Vuonna 2008 Vantaan elintarvike- ja ympäristölaboratorio yhdistyi Helsingin ympäristölaboratorion kanssa MetropoliLab -nimiseksi Helsingin kaupungin liikelaitokseksi. MetropoliLab muuttui osakeyhtiöksi vuonna 2010.

MetropoliLab tarjoaa laboratoriopalvelua kunnille, valtion viranomaisille, laitoksille, yhteisöille, yrityksille sekä yksityisille henkilöille. Yritys tarjoaa myös tutkimuksiin liittyvää raportointia, erilaisia asiantuntijapalveluita sekä näytteenotto- ja hakupalvelua.

MetropoliLab Oy on Finas-akkreditoitu puolueeton ja riippumaton laboratorio, jolla on laaja viranomaishyväksyntä käyttämilleen määritysmenetelmille. MetropoliLab käyttää ensisijaisesti määrityksissään standardisoituja menetelmiä (SFS, SFS-EN, SFS-EN ISO ja ISO), kansainvälisten menetelmäkokoelmien menetelmiä (NMKL, IDF) ja mahdollisesti myös virallisia menetelmiä (ETY-menetelmät ja muut lainsäädännössä asetetut menetelmät). Hyväksyntä kattaa elintarvikelain mukaiset ja asumisterveyteen liittyvät tutkimukset. Hyväksyntä kattaa myös kaikki talousvesiasetuksien sekä uima-allas ja uimaraanta-asetuksien mukaiset tutkimukset. MetropoliLab:n perustutkimusalueita ovat elintarvikkeiden mikrobiologiset ja kemialliset laatututkimukset sekä vesi- ja ilmanäytteiden monipuoliset tutkimukset [5].

3 Validointi

Validointi on menettely, jossa tutkittavan tutkimusmenetelmän kelpoisuus ja luotettavuus osoitetaan soveltuvan haluttuun käyttötarkoitukseen. Validoinnin pitää olla niin kattava ja laaja, että se täyttää menetelmän sovellusalueen asettamat vaatimukset. Analyysipalveluita tuottavat laboratoriot käyttävät ensisijaisesti määrityksissään standardisoituja menetelmiä (SFS, SFS-EN, SFS-EN ISO ja ISO), kansainvälisiä menetelmäkokoelmien menetelmiä (NMKL, IDF) ja mahdollisesti myös virallisia menetelmiä (ETY- menetelmiä ja muut lainsäädännössä asetetut menetelmät). Laboratorioiden tulee validoida uusi käyttöön otettava menetelmä, jos se on standardisoimaton tai laboratorion itse kehittämä menetelmä [6].

4 Kvantitatiivinen tutkimus

Kvantitatiivinen tutkimus perustuu määrälliseen tai tilastolliseen tutkimukseen. Kvantitatiivinen tutkimus muodostuu tutkimuksen valtamuodoksi luonnontieteiden antaman mallin ja tilastotieteen menetelmien kehittymisen myötä. Tämä insinööriyö perustuu kvantitatiiviseen tutkimusmenetelmään [28].

5 Mikrobiologisen menetelmän validointi

Mikrobiologisissa menetelmissä on täsmällisen oikean tuloksen saaminen erittäin vaikeaa, sillä prosessissa ollaan tekemisissä elävän organismin kanssa. Mikrobiologiset menetelmät laboratoriossa ovat käsin tehtäviä, tästä syystä tulee todennäköisesti inhimillisistä pienistä epätarkkuuksista johtuvaa vaihtelua. Maljan pesäkkeiden tarkan lukumäärän laskenta voi joissakin tilanteissa olla todella vaikea, etenkin suurilla pesäkemäärillä.

Mikrobiologista validointia tehtäessä on otettava tiettyjä suureita huomioon. Mikrobiologiassa keskeisimpiä validoinnin käsitteitä ovat tarkkuus, toistuvuus, oikeellisuus ja uusittavuus [6].

5.1 Oikeellisuus

Oikeellisuudessa on kyse tutkimustulosten ja todellisen arvon keskimääräisestä poikkeamasta. Todellisella arvolla tarkoitetaan halutun referenssimateriaalin tai siirrostuksen antamaa tulosta.

Oikeellisuus tulisi määrittää käyttämällä sertifioituja referenssimateriaaleja, joiden ilmoitettua pitoisuutta pidetään oikeana tuloksena. Käytännössä oikeellisuus joudutaan usein määrittämään käyttämällä sertifioimattomia referenssimateriaaleja tai siirrostettuja näytteitä, koska sertifioituja materiaaleja on toistaiseksi rajoitetusti saatavissa [6].

5.2 Virhepositiivimäärä

Virhepositiivimäärä on mikrobiologiassa käytettävä validointisuure, joka kuvaa alustavien positiivisten osuutta, jotka varmennusten jälkeen varmistuvat negatiivisiksi [6].

Virhepositiivimäärä määritetään kaavan $c/(a + c)$ mukaan. Luku c kuvaa alustavien positiivisten määrä, jotka varmistuivat negatiivisiksi (virhepositiiviset) ja a kuvaa kaikkien alustavien positiivisten lukumäärää, jotka varmistuivat positiivisiksi (oikeat positiiviset).[27, s.24]

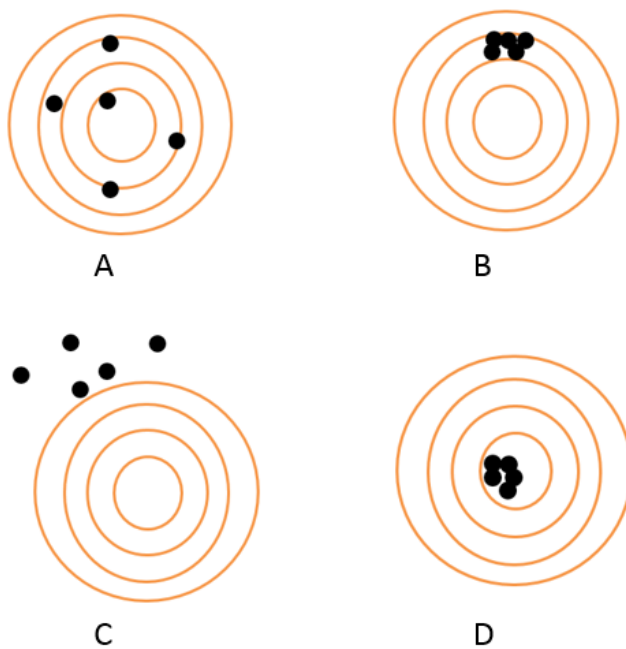
5.3 Virhenegatiivimäärä

Virhenegatiivimäärä kuvaa alustavien negatiivisten osuutta, jotka varmennusten jälkeen varmistuvat positiivisiksi [6].

Virhenegatiivimäärä määritetään kaavan $b/(b + d)$ mukaan. Luku b kuvaa alustavien negatiivisten määrä, jotka varmistuivat positiivisiksi (virhenegatiiviset) ja d alustavien negatiivisten määrä, jotka varmistuivat negatiivisiksi eli oikeat negatiiviset [27, s.24].

5.4 Toistettavuus

Toistettavuus on peräkkäisten toistojen antamien tulosten lähekkäisyys (kuvio 1) tutkittaessa identtisiä näytteitä, kun määrittäminen on suoritettu samalla menetelmällä, samoissa olosuhteissa ja samojen henkilöiden toimesta lyhyellä aikavälillä [6].



Kuvio 1.

Toistettavuus

A kohta: huono toistettavuus, alhainen oikeellisuus

B kohta: hyvä toistettavuus, huono oikeellisuus

C kohta: huono toistettavuus ja oikeellisuus

D kohta: hyvä toistettavuus ja oikeellisuus

5.5 Uusittavuus

Uusittavuus kuvaa saman mittaussuureen yhtäpitävyyttä eri olosuhteissa. Uusittavuutta voi tutkia muun muassa eri matriiseilla. Matriiseilla tarkoitetaan tutkimuksessa käytettyjä eri vesinäytteitä [6].

5.6 Spesifisyys

Spesifisyys tarkoittaa sekä kvantitatiivisten että kvalitatiivisten menetelmien kykyä löytää tutkittava tai tutkittavat mikrobit näytteessä olevien häiritsevien tekijöiden vaikutuksesta huolimatta [6]. Menetelmä on spesifinen, jos sillä pystytään määrittämään analyytti riittävän tarkasti silloinkin, kun kaikki mahdolliset häiritsevät tekijät ovat läsnä [29, s.95].

Spesifisyys määritetään kaavan $d/(c + d)$ mukaan. Luku d kuvaa alustavien negatiivisten määrä, jotka varmistuivat negatiivisiksi (oikeat negatiiviset) ja c on alustavien positiivisten määrä, jotka varmistuivat negatiivisiksi (virhepositiiviset) [27, s. 24].

5.7 Sensitiivisyys eli herkkyys

Mikrobiologiassa herkkyys kuvaa menetelmän kykyä todeta vähäiset vaihtelut määritettävien mikrobien pitoisuuksia tutkittavassa näytteessä. Menetelmän herkkyys määrittää menetelmän kykyä löytää alhaisin mikrobipitoisuus, tämä tarkoittaa yleensä alle 10 solua [6].

Herkkyys määritetään kaavan $a/(a + b)$ mukaan, jossa a kuvaa alustavien positiivisten lukumäärä, jotka varmistuivat positiivisiksi (oikeat positiiviset) ja b taas alustavien negatiivisten määrä, jotka varmistuivat positiivisiksi (virhenegatiiviset) [27, s. 24].

5.8 Pesäkelaskennan toistettavuus

Pesäkelaskentaan liittyvää epävarmuutta selvitetään laboratorion sisäisin pesäkelaskennan toistoin. Kohdepesäkkeiden peittymisen tai taustakasvun aiheuttaman naamioitumisen perusteella voidaan arvioida pesäkelaskennan ylärajaa, joka voi olla näytetyypikohtainen [6].

5.9 Tehokkuus

Tehokkuus kuvaa menetelmän kykyä löytää positiiviset ja negatiiviset tulokset.

Tehokkuus E määritetään kaavan $E = (a + d)/n$ mukaan, jossa a on alustavien positiivisten lukumäärä, jotka varmistuivat positiivisiksi (oikeat positiiviset) ja d alustavien negatiivisten määrä, jotka varmistuivat negatiivisiksi (oikeat negatiiviset). luku n kuvaa testien kokonaismäärää [27, s. 24].

6 *Pseudomonas*-suvun -bakteerit ja *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas-suvun -bakteerit ovat laajalti esiintyviä Gram-negatiivisia sauvabakteereja, jotka pystyvät elämään ja sopeutumaan erilaisissa ympäristöissä. Niitä esiintyvät yleisesti maaperässä, vesissä ja kasveissa. Suvun bakteereja esiintyy myös eläinten ja ihmisten suolistossa [2, s. 485].

Bakteerisuvun solut ovat sauvamaisia, joko suoria tai taipuneita. Solut liikkuvat nopeasti yhden tai usean flagellan avulla. *Pseudomonas* -bakteerit eivät muodosta itiöitä. Kaikki suvun lajit käyttävät orgaanista ainetta energialähteenään, mutta eräät lajit käyttävät vaihtoehtoisena energialähteenä joko vetyä (H_2) tai hiilimonoksidia (CO) [1, s. 31].

Pseudomonas-suvun -bakteerien kasvuvaatimus on todella alhainen, ne pystyvät elämään ja kasvamaan erittäin alhaisella orgaanisen aineen määrällä. Ne ovat erittäin sitkeitä ja kestävät hyvin klooria ja muita desinfiointiaineita ja jopa voivat kasvaa niissä. Bakteerit ovat resistenttejä monille antibiooteille ja sopeutuvat hyvin rajuihin fysikaalisiin ja kemiallisiin muutoksiin. Suurin osa *Pseudomonas*-suvun -bakteereista oli sellaisia bakteereja, jotka eivät pysty aiheuttamaan infektiota taikka sairauksia terveelle ihmiselle. Osa bakteerisuvun jäsenistä on kuitenkin opportunistisia patogeenejä eli ne voivat aiheuttaa taudin vastustuskyvyltään heikentyneille [2, s. 485].

Pseudomonas aeruginosa on standardin SFS-EN ISO 16266 määrittäksen mukaan *Pseudomonas*-suvun jäsen, joka kasvaa setrimidiä (heksadekyylimetyyliammoniumbromidia) sisältävällä kasvualustalla tuottaen sinistä pyosyaniinia (C₁₃H₁₀N₂O).

Pseudomonas aeruginosa on oksidaasi- ja katalaasipositivinen mikro-organismi, joka fluorisoi uv-valossa (340–380 nm) ja pystyy tuottamaan asetamidista (CH₃CONH₂) ammoniakkaa (NH₃).

Pseudomonas aeruginosa -bakteerin optimaalinen kasvulämpötila on +37 °C, mutta se tulee kuitenkin toimeen vaihtelevissa lämpötiloissa (+4 - 42 °C). Aerobisena bakteerina *Pseudomonas aeruginosa* pystyy kasvamaan nitraattia (NO₃) hyödyntäen myös anaerobisessa ympäristössä.

Pseudomonas aeruginosa kuuluu ihmisen normaalimikrobistoon suolistossa, limakalvolla ja iholla. *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerilla on geneettinen DNA:sta muodostuva tekijä, jonka avulla bakteeri pystyy välittämään perinnöllistä resistanssia monia lääkkeitä vastaan [3, s.201]. Antibiooteille vastustuskyvystä *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria kutsutaan nimellä multiresistentti *Pseudomonas aeruginosaksi* tai helpommin MRPA. MRPA kuuluu suolistomikrobistoon, eikä aiheuta terveelle ihmiselle sairauksia.

Pseudomonas aeruginosa -bakteerin aiheuttamaa infektiota eli oireellista tautia saavat yleensä sairaalapotilaat, iäkkäät ja sellaiset ihmiset, joilla immuunijärjestelmä on muuten heikentynyt. Ihmisillä, joilla on avoimia haavoja tai palovammoja on suurempi todennäköisyys saada infektiota. *Pseudomonas aeruginosa* on suurimpia sairaalainfektioiden aiheuttajia. Bakteerin infektiota leviää muun muassa kirurgisissa toimenpiteissä, pitkityneissä sairaalahoidoissa ja yleisemmin kosketuksesta henkilöstä toiseen. Sairaaloissa

infektion saaneet eristetään hoidon ajaksi. Vaikeampi mutta onneksi harvinainen, *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin aiheuttama infektio on silmän pintahaavaumien infektoituminen. Infektiossa bakteerin tuottamat entsyymit voivat puhkaista sarveiskalvon nopeasti ja näkökyvyn menetys on mahdollinen. [2, s. 485–486]

Pseudomonas aeruginosa on myös merkittävin uima-allasvesien välityksellä tauteja aiheuttavin bakteeri (kuvio 2). Bakteeri aiheuttaa uimaveden välityksellä silmä, korva, iho- ja suolistoinfektioita. *Pseudomonas aeruginosa* aiheuttaa uimavesien välityksellä myös ihottumaa ja virtsatietulehduksia [11].

Sosiaali- ja terveysministeriön asetusten mukaan uimavedessä olevia eläviä bakteereja, hiivoja ja homeita (Heterotrofinen pesäkeluku) ei saa olla enemmän kuin 100 pesäkettä muodostavaa yksikköä litrassa tutkittavaa näytettä kohti.

Heterotrofinen pesäkeluku ei kuvaa kuitenkaan veden tauteja aiheuttavien bakteerien määrää vaan pikemminkin veden ja ympäristön yleistä hygieniatasoa. Heterotrofien pesäkeluku määritetään kahdessa eri lämpötilassa 22 °C ja 36 °C. Molemmissa lämpötiloissa laatuvaatimus on sama. Heterotrofinen pesäkeluku 22 °C kertoo enemmän ympäristön ja veden yleisestä hygieniatasosta ja 36 °C kertoo uimareista peräisin olevasta mikrobistosta.

Pseudomonas aeruginosa voi esiintyä vedessä vaikkakin heterotrofinen pesäkeluku on sosiaali- ja terveysministeriön edellyttämän laatuvaatimuksen tasolla. Sosiaali- ja terveysministeriön asetusten mukaan uimavesi ei saa sisältää *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria 100 ml:aa tutkittavaa näytettä kohti. Tästä syystä *Pseudomonas aeruginosa* pitää tutkia uima - ja allasvesistä erikseen.

Pseudomonas aeruginosa- bakteerin aiheuttamat tulehdukset uimavedestä	
Silmätulehdus	Pehmeät piilolinssit ja silmien kortikosteroidihoito altistavat. Silmien kirvely, punoitus ja turvotus.
Korvatulehdus	Yleisimmin sellaisilla ihmisillä, joiden korvakäytävä on ahdas (Eng. Swimmers ear). Ikääntyneillä tai vastustuskyvyn heikentyneillä ihmisillä on vakavampia tulehduksia.
Ihotulehdus	Näppyjä uimapuvun reuna-alueilla kutinaa, ja ihon punoitus. Parissa päivässä ohimenevä tulehdus ei tarvitse lääkitystä.

Kuvio 2. Yleisimpiä *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin aiheuttamia sairauksia. Lähde Jari Keinänen, STM.

7 Mikrobien valinta

Mikrobeja valittaessa on otettava sellaisia mikrobeja, jotka toimivat häiritsevinä tekijöinä analyysissä. On myös hyvä valita mikrobi tai mikrobiryhmä, joka on lähisukua tutkittavalle mikrobille. Analyysin häiritseviksi mikrobeiksi valittiin *Pseudomonas* -suvusta *fluorescens* ja *putida*. Kolmanneksi häiritseväksi mikrobiksi valittiin *Burkholderia cepacia*. *Burkholderia cepacia* on läheistä sukua *Pseudomonas* -bakteereille. Kaikki edellä mainitut mikrobit fluoresoivat uv-valossa.

7.1 Mikrobiten hankinta

Taustamikrobit *Pseudomonas fluorescens* (HAMBI 27 ATCC 13525), *Pseudomonas putida* (HAMBI 17 CCEB 520) ja *Burkholderia cepacia* (HAMBI 2496 ATCC 25416) hankittiin Helsingin yliopiston elintarvike- ja ympäristötieteiden laitokselta. Mikrobit olivat kylmäkuivattuina.

7.2 *Burkholderia cepacia*

Burkholderia cepacia on gram-negatiivisiin kuuluva uv-valossa fluoresoiva erittäin vastustuskykyinen bakteeri. Bakteeri esiintyy mullassa ja heinäessä käyttäen hyväkseen niissä olevia amino- ja muita orgaanisia happoja. *Burkholderia cepacia* esiintyy, myös paperiteollisuuden jätevesissä. Sosiaali- ja terveysministeriö on luokitellut *B. cepacia*-bakteeria vaarakategorian toiseen luokkaan. Vaarakategoria toisella luokalla tarkoitetaan sellaista tekijää, joka voi olla vaaraksi, sen kanssa tekemisessä olevalle henkilölle, mutta ei leviä väestöön. Käytettävissä on yleensä tehokas lääke, tähän kategoriaan kuuluville mikrobeille. *Burkholderia cepacia*- bakteerin optimi kasvulämpötila on 30–35 °C [4, s. 406, 698].

7.3 *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens on aerobinen gramnegatiivinen bakteeri. Bakteeri elää kasveissa, maaperässä ja vesistöissä. *P. fluorescens* kasvaa parhaiten 25–30 °C. *Pseudomonas fluorescens* on opportunistinen patogeeni, joka pystyy kasvamaan 37 °C:ssa.[12]

7.4 *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida on gram-negatiivinen sauvanmuotoinen bakteeri joka elää maaperässä ja vedessä. *Putida* pystyy käyttämään ravintonaan monenlaisia orgaanisia yhdisteitä. Bakteeria käytetäänkin biopuhdistukseen ja muihin hankaliin bioprosesseihin. Bakteeri ei ole ihmiselle patogeeni. *Putida* kasvaa parhaiten 10–30 °C [13].

8 Kylmäkuivaus ja kantojen säilytys

Lyofilisointi eli kylmäkuivaus on säilytysmenetelmä, jossa materiaali jäähdytetään ja sen jälkeen kuivataan pitkäaikaista säilytystä varten. Mikrobit kylmäkuivataan vasta mikrobin päästyä stationäärivaiheeseen

Ravintoaineita ollessa riittävästi bakteerien kasvu on räjähdysmäinen. Useat bakteerilajit jakautuvat puolen tunnin välein, silloin yhdestä solusta tulee 15 tunnin jälkeen 1 000 000 000 solua. Bakteerien kasvu on eksponentiaalinen.

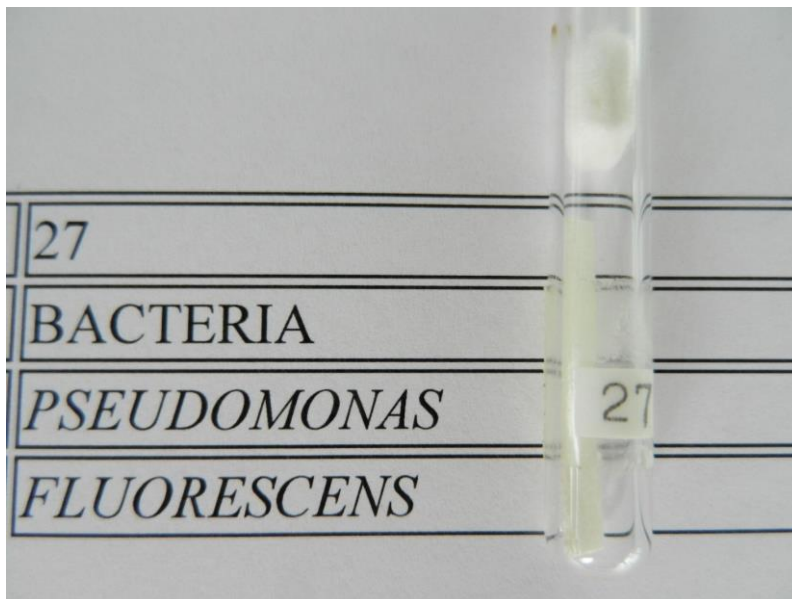
Ravinnon loputtua kasvu hidastuu ja tullaan stationäärivaiheeseen. Stationäärivaiheessa solumäärä ei lisäännä. Stationäärivaiheessa bakteerit pysyvät pitkään elinvoimaisina ja niiden sietokyky on paljon korkeampi verrattuna bakteerien ollessa kasvuvaiheella. Jotkin bakteerit eivät selviydy ilman ravinteita vaan kuolevat omien entsyymien toimesta.

Mikrobeille kylmäkuivaus tyhjiössä on rankka toimenpide, jota kaikki kannat eivät kestä. Lajitkin, jotka kestävät kylmäkuivausta tyhjiössä, menettävät suoja-aineiden (maitojauhe, hevosenseerumi, meso-inositella) ollessa käytössä yleensä 99 % soluistaan. Tämän takia kylmäkuivattavan suspension väkevyys on oltava suuri (yli 10^{10} solua / 100 µl).

Kylmäkuivaus aloitetaan imeyttämällä mikrobisuspension ja suojanesteen sekoitus paperiluiskaan. Paperiluiska laitetaan korkeakaulaiseen ja kestävään lasiputkeen. Paperiluiska kuivataan lasiputkessa -50 – -60 °C:n lämpötilassa ja yli 13 Pa:n paineessa.

Kuivauksen jälkeen lasiputkessa pitää näkyä kiinteää mikrobisuoja-ainemassaa. Kuivauksen jälkeen mikrobimassa ei saa näyttää pölyväältä, jos näin käy, on todennäköisesti käytetty liian vähän suoja-ainetta. Pölyvä mikrobimassa on myös turvallisuusriski, sillä se karkaa ympäristöön heti ampullin avauduttua.

Kuivauksen jälkeen lasiputki suljetaan sulattamalla puhalluslampun liekillä lasiputken kaulaa umpeen. Sulkemisen jälkeen ampullit tyhjiö testataan. Testin jälkeen ampullit varastoidaan pimeään viileään varastoon, vaikkakin ampullit säilyisivät huoneenlämmössä valolta suojattuina vuosia (kuva 1) [4, s. 84–90].



Kuva 1. *Pseudomonas fluorescens* on kylmäkuivattuna ampullissa.

Tämän opinnäytetyön yhteydessä ampullit avattiin viilaamalla lasiviilalla syvä naarmu ampullin kaulaan ja napsauttamalla suojaa käyttäen viilauskohdasta poikki. Paperiluiskat otettiin steriilisti ampullista ja laitettiin lasiputkiin, jossa oli määrä brain heart infusion -lientä (BHI). BHI-putket laitettiin lämpökaappiin 37 °C:een 24 tunnin ajaksi. Inkuboinnin jälkeen bakteerit siirrostettiin liemestä verimaljalle.

Veri-agarissa kasvaneet *B.cepacia*, *P.fluorescens* ja *P.putida* siirrostettiin silmukalla muoviampulleihin, joihin oli laitettu 0,5 ml maitojauhetta (skim milk powder). Ampulleihin siirrostettiin suuri määrä pesäkkeitä ja sekoitettiin hyvin. Ampullit laitettiin säilytysrasiaan hyvin merkittyinä -50 °C:seen pakkaskaappiin.

9 Valdointisuunnitelma

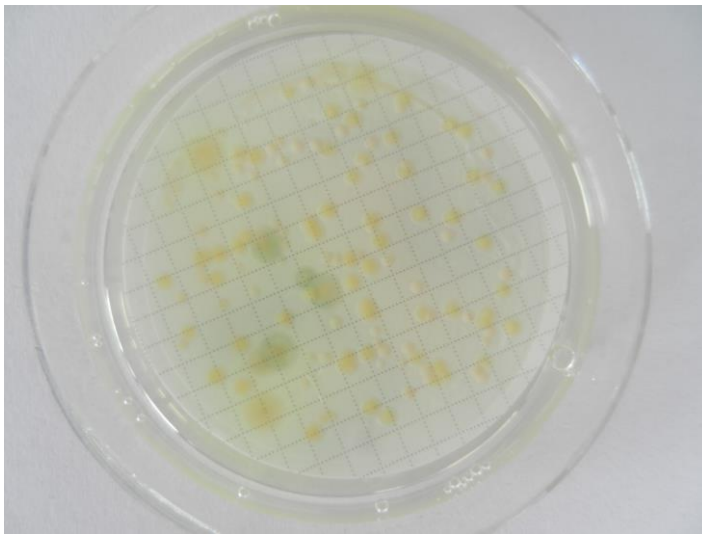
Validoinnin tarkoituksena on saada uimavesien ja veden *Pseudomonas aeruginosa* -tutkimuksissa käyttöön menetelmä, jolla tulos saadaan nykyisin käytössä olevaa standardimenetelmää SFS-EN ISO 16266 merkittävästi lyhyemmässä ajassa. Menetelmä, joka halutaan ottaa käyttöön, on Pseudalert® (IDEXX Laboratories).

Tutkimuksessa verrataan uima-allasvesien ja pakatun veden valvontaan ja käyttötarkkailuun soveltuvaa Pseudalert-menetelmää standardin SFS-EN ISO 16266 menetelmään. Standardi SFS-EN ISO 16266 toimii referenssimenetelmänä ja perustuu kalvosuodatukseen. Vastaavuuden määrittämiseksi käytetään standardin SFS-EN ISO 17994 (veden laatu). Kriteerit mikrobiologisten menetelmien vastaavuuden osoittamiseksi kriteerejä. Suurimmaksi hyväksytyksi epävarmuuden poikkeamaksi nolasta on valittu (D) 10 %, joka on standardin mukainen suositus juomavedelle. Validoinnissa otetaan huomioon IDEXX laboratoriesin tekemät tutkimukset.

Tarkoituksena on tuottaa mahdollisimman paljon vertailukelpoisia näytteitä joilla on eri mikrobipitoisuuksia. Tarkoituksena on tuottaa allasvesiä, joilla on eri mikrobipitoisuuksia, joko luonnollisina tai siirrostettuina näytteinä. Näytteet tutkitaan sekä Pseudalert-menetelmällä, että standardin SFS-EN ISO 16266 mukaisella kalvosuodatusmenetelmällä. Tutkimuksessa käytetään delfinaarioallasvettä, pullotettua vettä, verkostovettä ja uimaallasvettä. Delfinaarioallasvesi sisältää luonnollisesti *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria. Uima-allasvesiin, verkostovesiin ja pullotettuun veteen siirrostetaan *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin lisäksi häiritseviä tekijöitä. Analyysin häiritseviksi tekijöiksi valittiin *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* ja *Burkholderia cepacia*.

Näytteet tutkitaan sekä Pseudalertilla että kalvosuodatusmenetelmällä. Näytteet tutkitaan 100 ml:n erissä. Näytteet tutkitaan sekä Pseudalertilla että standardin SFS-EN ISO 16266 mukaisella kalvosuodatusmenetelmällä CN-alustalla.

CN-alustalta varmennetaan pesäkkeet, jotka ovat väriltään vihreitä, sinisiä ja punaruskeita. Varmennettaviin kuuluvat myös kaikki fluoresoivat pesäkkeet. Pesäkemäärän ollessa suuri, alustalta varmennetaan pesäketyyppikohtaisesti (kuva 2). Jos esimerkiksi malja on kolmea erinäköistä pesäkeryhmää, varmennetaan viisi pesäkettä, jokaisesta ryhmästä maito-agarilla. Kannan, jonka kaikki varmennetut pesäkkeet hydroloivat kaseiinin, pidetään positiivisina *Pseudomonas aeruginosa* pesäkkeinä, vaikkakin tehtiin vielä varmennus API 20 NE -tunnistusjärjestelmällä. Pseudalartin fluoresoivista kennoista varmistetaan mahdollisimman paljon (5–15).



Kuva 2. Maljalla on kolme erinäköistä pesäkettä, varmennuksissa varmennetaan jokaista pesäkeryhmää erikseen.

Varmistukset CN-maljalta suoritetaan viljelemällä ensin puhtasviljelmät maito-agarille kaseiinin hydrolyysin osoittamiseksi 41,5 °C:ssa. Varmistus on kolmeosainen (taulukko 1). Standardissa SFS-EN ISO16266 varmennustesteinä käytettävää Kingin B -viljelyalustaa ja asetamidilientä ei käytetä tässä tutkimuksessa. *Standardi Standard methods for the examination of water and wastewater* (17 painos) osoittaa maitoagarin soveltuvan *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin varmennusmenetelmäksi. *Pseudomonas aeruginosa* varmistetaan lisäksi oksidaasireaktiolla. Lopullinen varmistus tehdään API 20 NE -tunnistusjärjestelmällä.

Taulukko 1. CN-agarilla kasvavien pesäkkeiden varmistuksen vaiheet. Standardi SFS-EN ISO16266

Pesäkkeen ulkonäkö CN-agarilla	Ammoniakki asetam.	Oksidaasi testi	Kingin B-alusta	Varm. P.aerug
Sinivihreä	ET	ET	ET	Kyllä
Fluoresoiva, mutta ei sinivihreä	+	ET	ET	Kyllä
Punaruskea	+	+	+	Kyllä
Muu tyyppi	ET	ET	ET	Kyllä

ET: ei testata

Pseudalartin positiivisista kennoista siirretään pari pisaraa näytettä injektioneulalla maito-agarille kaseinin hydrolyysin osoittamiseksi 41,5 °C:ssa. Seuraavaksi tehdään oksidaasitesti ja lopullinen varmistus tehdään API 20 NE –tunnistusjärjestelmällä.

Verrattavat analyysit suoritetaan aina yhdestä ja samasta näytepullostasta. Tutkimuksessa kiinnitetään huomiota työjärjestykseen. Joka toisella näytteellä suoritetaan ensin analyysi referenssimenetelmällä ja joka toisella ensin tehdään Pseudalert-testi. Tutkimuksessa pyrittiin siihen, että molemmat menetelmät antaisivat 1-20 *Pseudomonas aeruginosa* positiivista tulosta

10 Materiaalit ja menetelmät

Työssä käytettiin eri matriisien lisäksi eri mikrobikantoja, analyysimenetelmiä, lämpötiloja ja agareita.

Vedet (matriisit)

Uima-allasvesi, Helsingin uimahalleista

Pullotettuvesi (hiilihapollinen ja hiilihapoton), Rainbow

Verkostovesi, Helsinki

Delfinaarion allasvesi, Särkänniemi, Tampere

Mikrobikannat

Pseudomonas fluorescens (HAMBI 27 ATCC 13525)

Pseudomonas putida (HAMBI 17 CCEB 520)

Burkholderia cepacia (HAMBI 2496 ATCC 25416)

Pseudomonas aeruginosa, MetropoliLabin oma testikanta (ATCC 27856)

Pseudalert®

Pseudalert reagenssi (IDEXX)

Vaahdon estoaine (IDEXX)

Steriili kertakäyttöinen muovipullo (100 / 250 ml)

Quanti-Tray 2000 testiliuska (IDEXX)

Quanti-Tray sulkijalaite (IDEXX)

MPN table (IDEXX)

Agarit

Veriagar

CN-agar

Maitoagar

Lämpökaapit

Kasvatuskaappi, säädetty 38 °C.

Kasvatuskaappi, säädetty 41,5 °C.

Kasvatuskaappi, säädetty 25 °C. (*Pseudomonas fluorescen*)

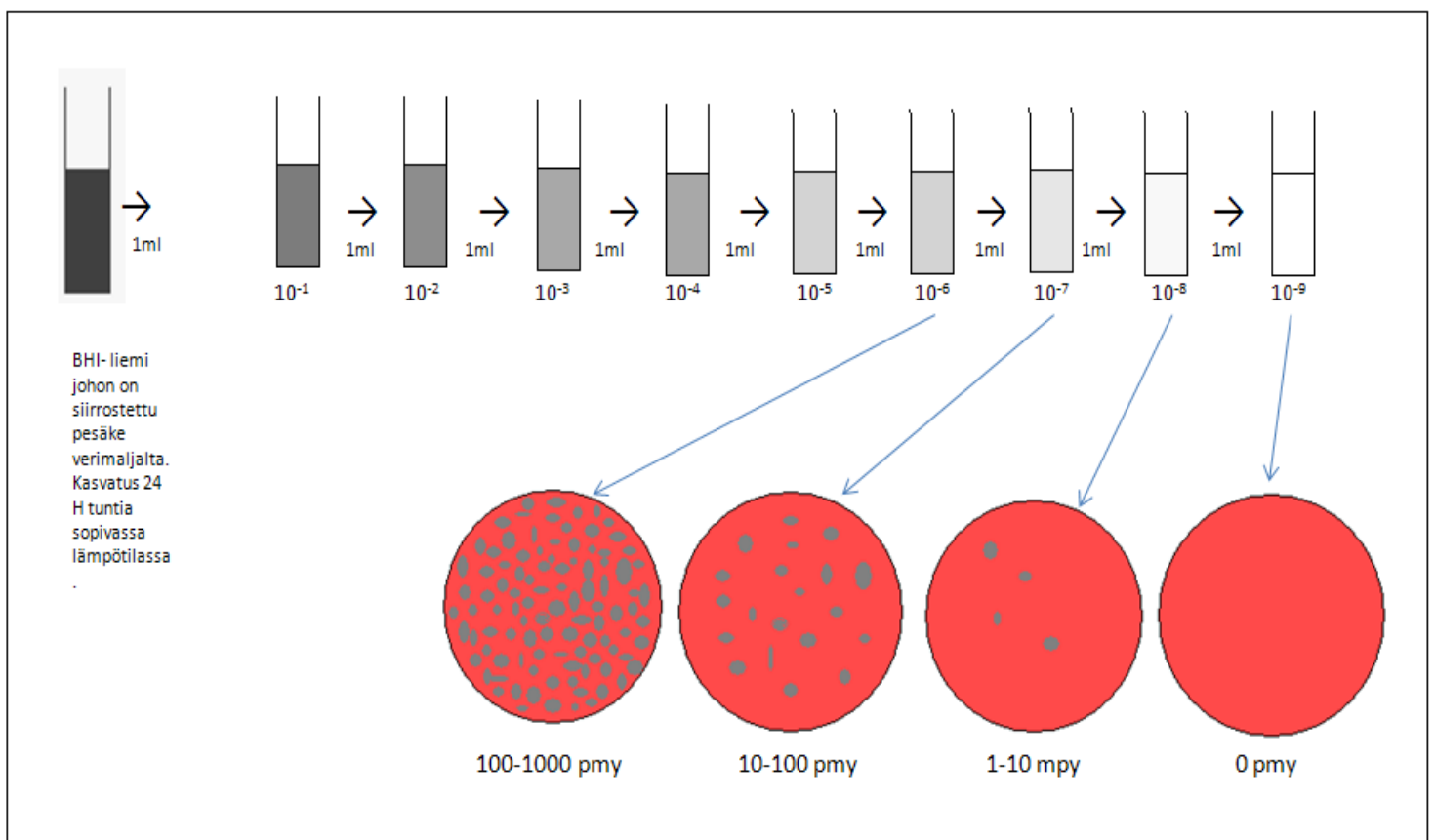
Kasvatuskaappi, säädetty 30 °C. (*Pseudomonas putida* ja API 20 NE menetelmä)

Steriilejä ruiskuja ja neuloja (1 ml)**API 20 NE menetelmä**

11 Mikrobipitoisuuden valinta

Mikrobipitoisuutta valittaessa oli otettava huomioon CN-maljan tuloksen luotettavuus raja, mikä on 40 pesäkettä muodostavaa yksikköä maljalla. Pitoisuutta valittaessa pyrittiin ihanne *Pseudomonas aeruginosa* määrään (1–40 pmy) näytettä kohti. Haluttuun pitoisuuteen päästiinkin käyttämällä laimennosta 10^7 ja 10^8 (kuvio 3). Tutkimuksessa käytettiin *P.putida*, *P.fluorescensia* ja *B.cepacia* laimennoksina 10^6 ja 10^7 .

Tutkimuksessa käytettiin näytteitä, joilla on eri mikrobipitoisuuksia. Delfinaariovesi oli ainoa matriisi, jossa oli luonnollisesti *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria. Muihin vesiin siirrostettiin mikrobeja.



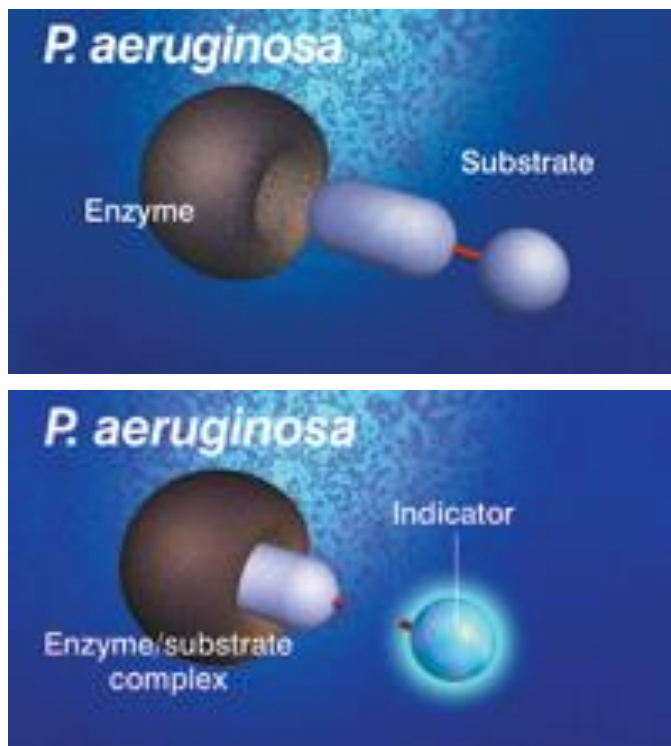
Kuvio 3. Validointi suunnitelman mukaiseen pitoisuuteen päästiin käyttämällä *P.aeruginosa* laimennosta 10^7 ja 10^8 .

12 Pseudalert®

Pseudalert on yhdysvaltalaisen IDEXX laboratories kehittämä testimenetelmä, jolla pystytään todentamaan tarkasti vesinäytteen sisältämän *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin määrää.

Menetelmä perustuu entsymitekniikkaan, jossa bakteerin tuottama entsyymi pilkkoo substraatin tuottaen ultraviolettivalossa fluoresoivaa indikaattoria. Pseudalert reagenssi sisältää runsaasti aminohappoja, vitamiineja ja paljon muita ravintoaineita. Tämä ja so- piva lämpötila (+38 °C) mahdollistavat *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin nopean kas- vun tuottaen samalla paljon substraattia pilkkovia entsyymejä (kuva 3).

Ravintoaines voi kasvattaa myös muita mikrobeja, mutta niiden tuottamat entsyymit eivät reagoi substraatin kanssa samalla tavalla.



Kuva 3. Pseudalert® entsyymi reaktio. Lähde IDEXX Laboratories

Menetelmä soveltuu parhaiten uimahalli- ja kylpylävedellä sekä myös pakatulle vedelle. IDEXX laboratoriesin mukaan Pseudalert pystyy osoittamaan *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin 1MPN / 100 ml tai 1MPN / 250 ml tarkkuudella. 1 MPN vastaa 1pmy:ä [14].

12.1 IDEXX laboratories

IDEXX laboratories -yritys kuuluu maailmanlaajuisesti johtavimpiin veden ja maidon tutkimusta ja diagnostiikkaa tuottaviin yrityksiin. Yritys kehittää myös eläinten hyvinvointia ja terveyttä. IDEXX on yhdysvaltalainen yritys, mutta yrityksellä on yli 60 konttoria ympäri maailmaa. IDEXX on maailman johtavin vesimikrobiologian testausmenetelmiä tuottavin yritys. IDEXX yrityksen menetelmiä ovat muun muassa Enterolert®, Pseudalert® ja Colilert® [16].

12.2 Pseudalertin käyttö

Pseudalert on helppokäyttöinen menetelmä. Pseudalert-menetelmän välineitä ovat Pseudalert-reagenssi, vaahdonestoaine, Quanti-tray-liuska ja näytepulloja. Aluksi 100 ml tai 250 ml näytettä kaadetaan steriiliin Pseudalert steriiliin näyte pulloon. Pulloon lisätään Pseudalert-reagenssia ja kaksi tippaa IDEXX vaahdonestoainetta. Pulloa ravistetaan, jotta reagenssi liukenisi näytteeseen. Reagenssin täysin liuettua (näyte muuttuu vaalean keltaiseksi), näyte kaadetaan Quanti-tray-liuskaan ja liuska suljetaan Quanti-tray sulkijalla. Sulkija sulkee liuskat lämmöllä (kuva 4).



Kuva 4. Quanti-tray-liuskan sulkija

Liiskaa inkuboidaan $38 \pm 0,5$ °C:ssa 24 + 4 tuntia. Inkuboinnin jälkeen liiskaa tarkastellaan ultraviolettivalossa (365 nm) ja fluoresoivat kuplat lasketaan. Tulos luotetaan MPN-taulukosta [14].

13 IDEXX yrityksen Pseudalert tutkimusraportit

IDEXX laboratories on tehnyt laajan ja kattavan tutkimuksen Psudalert -menetelmän luotettavuudesta ja tarkkuudesta verrattaessa standardimenetelmiin. Tutkimukset on tehty riippumattomissa laboratorioissa, mutta IDEXX on koonnut tulokset.

IDEXX Summary 14A raportissa ilmenee Pseudalert-menetelmän antavan samoja tuloksia standardiin SM 9313E verratessa. Tutkimuksessa tutkittiin molemmilla menetelmillä *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria uima-allasvedestä ja pullotetusta vedestä. Tutkimuksessa häiritsevinä tekijöinä käytettiin heterotrofisia -bakteereja ja eri kemikaaleja [17].

IDEXX Summary 14B raportissa ilmenee Pseudalert-menetelmän antavan samoja tuloksia standardiin EN ISO 16266:2008 verrattaessa. Tulokset perustuvat studentin t-testituloksiin, jossa ilmenee, ettei menetelmillä ole eroa 5 % merkitsevyystasolla. Standardi EN ISO 16266 perustuu kalvosuodatusmenetelmään. Tutkimustuloksista selvisi myös Pseudalert-menetelmän olevan tunnistusmenetelmistä herkempi tunnistaessa *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria vesinäytteestä.

Tutkimuksessa tutkittiin molemmilla menetelmillä *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria uima-allasvedestä ja pullotetusta vedestä. Tutkimukset tehtiin riippumattomassa laboratoriossa Saksassa. Tutkimuksessa häiritsevinä tekijöinä käytettiin *Pseudomonas putida* -bakteeria ja eri kemikaaleja [18].

IDEXX Summary 14C raportissa ilmenee Pseudalert-menetelmän antavan tarkempia tuloksia verratessa Millirote yrityksen kehittämään tunnistusmenetelmään. Millirote -yrityksen menetelmä perustuu kalvosuodatustekniikkaan. Menetelmistä Pseudalert on nopeampi ja helppokäyttöisempi. Millirote yrityksen kalvosuodatusmenetelmällä ei tutkimustuloksien perusteella pysty tunnistamaan alhaisilla pitoisuuksilla *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin kantaa ATCC27853.

Tutkimukset suoritettiin riippumattomassa laboratoriossa Venezuelassa. Tutkimuksessa tutkittiin molemmilla menetelmillä *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria uima-allasvedestä ja pullotetusta vedestä. Tutkimuksessa varmennustesteinä käytettiin muun muassa maito-agaria ja oksidaasitestiä.[19]

IDEXX Summary 14D raportissa ilmenee Pseudalert-menetelmän olevan vastaava standardiin EN ISO 16266, tutkiessa *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria pullotetusta vedestä. Standardi EN ISO 16266 perustuu kalvosuodatusmenetelmään ja tutkimuksessa varmennustestit tehtiin standardin kriteerien mukaisesti.

Tutkimus on Nestlé -yrityksen Ranskassa tekemä. Tutkimuksessa on häiritsevinä tekijänä käytetty *Pseudomonas putida* -bakteeria. Tutkimustuloksien perusteella Pseudalert on menetelmistä herkempi. [20]

IDEXX Summary 14E raportissa ilmenee Pseudalert-menetelmän olevan vastaava standardiin 9213E, tutkittaessa *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria uima-allasvedestä.

Standardi 9213E perustuu kalvosuodatusmenetelmään. Tutkimus on tehty Iowan yliopistossa.

Kaikissa edellä mainituissa raporteissa on todettu Pseudalert-menetelmän olevan soveltuva tutkiessa *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria vesinäytteistä.[21]

14 *Pseudomonas aeruginosa* määrittäminen kalvosuodatuksella

Kalvosuodatustekniikka on standardisoimisliiton SFS-EN ISO 16266 mukainen menetelmä. Menetelmä soveltuu setrimidiä sisältävillä kasvualustoilla kasvavilla ja pyosyanii-nia tuottaville mikro-organismeille. Näiden lisäksi mikro-organismien täytyy olla oksidiasii-positiivinen, fluoresoida UV-valossa sekä pystyä tuottamaan ammoniakkaa asetamidista.

Menetelmä soveltuu *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin määrittämisen pullotetusta vedestä. Menetelmä sopii myös alhaisen taustakasvun omaavien vesien, kuten desinfioitujen uima- ja talousvesien tutkimiseen. Standardin mukaan suodatetaan tutkittavaa vesinäytettä (100 ml uimavettä tai 250 ml pakattua vettä). Steriiliin selluloosaesterikalvon läpi, jonka huokoskoko on 0,45 µm.

Suodatettavan näytteen määrä määräytyy Sosiaaliministeriön asetuksiin ja myös Euroopan unionin direktiiviin, jonka mukaan pakattu vesi ei saa sisältää *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria 250 ml:ssa ja uima-allasvesi 100 ml:ssa.[22]

Suodatuksen jälkeen kalvo asetetaan varovaisesti CN-agarmaljalle, jotta agarin ja kalvon välille ei jää ilmaa. Malja inkuboidaan (36 ± 2)°C:ssa (44 ± 4) tunnin ajaksi. Malja laitetaan lämpökaappiin muoviastiaan suljettuna, jotta kosteus ei haihtuisi. Maljat asetetaan lämpökaappiin ylösalaisin käännettynä, jotta tiivistyneet vesipisarot eivät tippuisi pesäkkeiden päälle [23].

14.1 CN-maljan luku ja tulkinta

Maljat luetaan 44 ± 4 tunnin inkuboinnin jälkeen UV-valon alla. Positiivisiksi *Pseudomonas aeruginosa* pesäkkeiksi lasketaan kaikki sinivihreät pesäkkeet, jotka tuottavat py-
osyaniinia (Kuvion 4). Maljoja ei saa pitää kauan UV-valon alla, sillä ultraviolettivovalo voi tuhota mikrobeja.

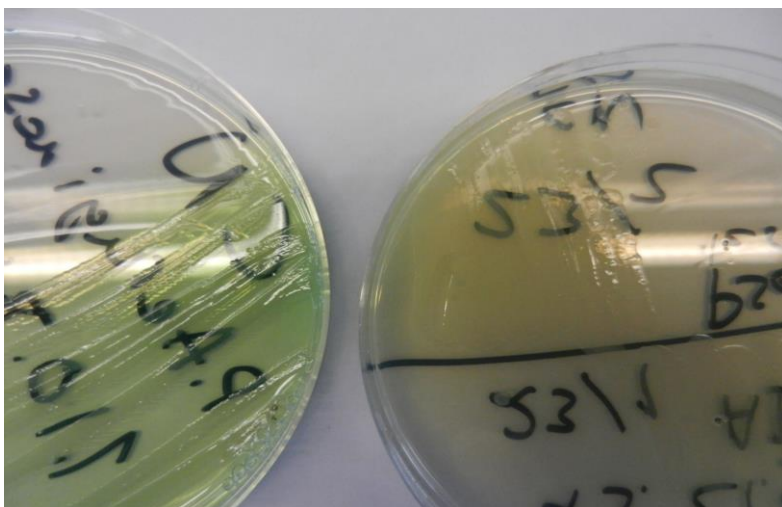
Punertavanruskeat ja vaaleankeltaiset pesäkkeet tai muut pesäkkeet, jotka fluoresoivat, mutta eivät ole tyypillisen *Pseudomonas aeruginosa* pesäkkeen näköisiä varmenne-
taan. Varmennus tehdään varmistustesteillä. Varmistustesteinä käytetään tässä tutki-
muksessa oksidaasitestiä, maito-agaria ja lopullisena testimenetelmänä API 20 NE -jär-
jestelmää. Standardisaa SFS-EN ISO16266 varmennustesteinä käytettävää Kingin B-
viljelyalustaa ja asetamidilientä ei käytetä tässä tutkimuksessa. Standardi *Standard met-
hods for the examination of water and wastewater* (17 painos) osoittaa maitoagarin so-
veltuvan *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin varmennus menetelmäksi [23].

Kuvio 4. Tutkimuksen varmennettavat CN-maljan pesäkkeet.

Pesäkkeen ulkonäkö	CN-MALJA			Varmistunut Ps.aeruginosaksi tarkistusten ollessa Positiivisia
	Oksidaasi	Kaseiinin hyd.	API NE 20	
Sinivihreät/punaruskea	T	T	T	KYLLÄ
Fluoresoiva	T	T	T	KYLLÄ
ET= Ei testata				
T= Testataan				

14.2 CN-agar

CN-agaria käytetään *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin vesimikrobiologisissa määrittäyksissä (Kuva 5). CN-agar koostuu muun muassa hydrolysoidusta kaseiinista, gelatiinipeptonista, kaliumsulfaatista ja magnesiumkloridista.[23]



Kuva 5. *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin erivärisiä kasvustoja CN-alustalla.

15 Varmennukset

CN-alustalta varmenneltiin pesäkkeet, jotka olivat väriltään vihreitä, sinisiä tai punaruskeita. Varmennettaviin kuuluivat myös kaikki fluoresoivat pesäkkeet. Varmennettaviin kuuluivat myös Pseudalartin fluoresoivat kuplat (taulukko 1). Varmennustesteinä käytettiin maito -agaria, oksidaasi -testiä ja API 20 NE -tunnistusjärjestelmää.

15.1 API 20 NE

API 20 NE -menetelmää käytetään Enterobakteereihin kuulumattomien gram-negatiivisten sauvojen tunnistaminen. API 20 NE -järjestelmä on standardoitu mikromenetelmä, joka käsittää kahdeksan entsyymaattista (värireaktio) ja 12 assimilaatiokoetta. Se on tarkoitettu gram-negatiivisten, Enterobacteriaceae-heimoon kuulumattomien sauvojen, esimerkiksi *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio* ja *Aeromonas*-sukuihin kuuluvien lajien identifiointiin.

API 20 NE on liuska, jonka 20 mikrotaskussa on kuivattuina tarvittavat substraatit. Putkiin pipetoidaan fysiologiseen suolaliuokseen valmistettua bakteerisuspensiota, johon kuivatut substraatit liukenevat. Inkuboinnin aikana muodostuneet aineenvaihduntatuotteet saavat aikaan värin muutoksia, jotka ovat joko spontaaneja tai ovat havaittavissa reagenssilisäyksen jälkeen.

API NE 20 -testi perustuu assimilaatiokokeeseen jossa testataan bakteerin kykyä käyttää tarjolla olevaa hiiliyhdistettä. Assimilaatiokokeissa API NE 20:n taskut eli näytekolot täytetään näytteellä ja bakteerit kasvavat vain, jos ne pystyvät käyttämään ainoana hiilenlähteenään kulloinkin taskussa olevaa substraattia. Kasvun alkaessa taskussa tapahtuu värireaktio eli näyte muuttuu sameaksi.

15.2 API NE 20:n käyttö

API 20 NE -testi sisältää testiliuskan lisäksi inkubointikotelon, API 20 NE reagenssi ampullin ja tuloslipukkeita. Lisäksi tarvitaan mineraaliöljyä, pasteur-pipettejä, sinkkijauhetta, muunnettu Kovacsin reagenssi TRP (James), nitraattireagenssit NIT 1 ja NIT 2.

Testi aloitetaan täyttämällä steriilillä vedellä inkubointikotelon kennon, tämä estää kuivumiselta lämpökaapissa. Kennon päälle laitetaan reagensseja sisältävä testiliuska.

Fysiologista suolaliuosta (NaCl 2 ml) sisältävään putkeen siirrostetaan tutkittavaksi haluttua pesäkettä ja sekoitetaan hyvin. Pasteur-pipetillä siirrostetaan näytettä putkesta ensimmäiseen kahdeksaan (NO₃ → PNPG) reagenssitaskuun. Pipetin kanssa on oltava tarkkana, sillä taskuihin ei saa syntyä ilmakuplia. Taskut täytetään puolittain.

Otetaan 7 ml AUX reagenssipullo ja rikotaan pullon suu. Reagenssiin lisätään jäljelle jäänyt NaCl suspensio ja sekoitetaan hyvin. Täytetään reagenssilla loput taskut (GLU → PAC). Taskut täytetään kokonaan.

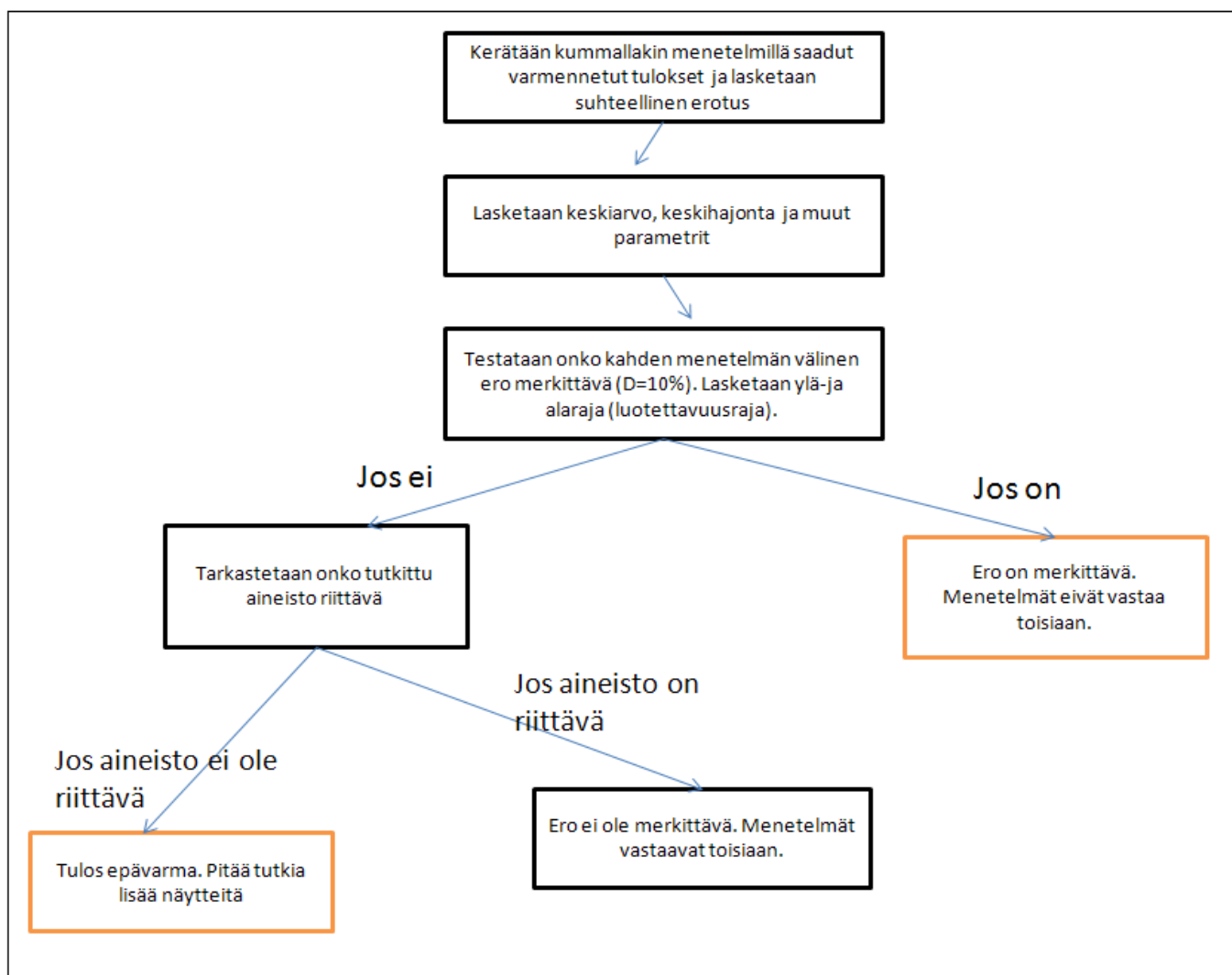
Pipetoimalla niihin mineraaliöljyä glukoosi, arginiini ja urea testit tehdään anaerobisiksi. Tämän jälkeen suljetaan liuska inkubointikotelolla ja inkuboidaan 24 tunniksi 30 °C:seen.

Inkuboinnin jälkeen NO₃-taskuun lisätään tippa nitraattireagensseja NIT ja NIT 2. Viiden minuutin jälkeen tarkastetaan, onko taskussa tapahtunut reaktiota (punaista väriä). Typpikaasun muodostuminen voi johtaa negatiiviseen tulokseen, joten lisätään taskuun vielä 2–3 mg sinkkijauhetta. Sinkki pelkistää typpikaasun. Odotetaan viisi minuuttia ja jos tasku muuttuu punertavaksi, on reaktio negatiivinen. TRP taskuun lisätään Kovacsin reagenssia. Viidessä minuutissa TRP taskuun muodostuva väri muutos (keltaisesta punaiseksi) tarkoittaa positiivista reaktiota, jos väri ei muutu on reaktio negatiivinen.

Tulokset luetaan tulkintataulukon mukaan ja tulokset kirjataan tuloslipukkeeseen. Bakteerikanta tunnistetaan syöttämällä tuloslipukkeen tulos Biomerieux tietokantaan (API WEB) joko antaa tulokset prosenttitaulukkoon [24].

16 Tilastolliset analyysit

Laskut tehdään menetelmien vastaavuuden testaamiseksi standardissa SFS-EN ISO 17994 annettujen kriteerien mukaisesti (kuvio 5). Kahden menetelmän vastaavuus määritetään myös Studentin t-testillä, joka on yksi käytetyimmistä tilastollisista testeistä. Menetelmille määritettiin myös sensitiivisyys (herkkyys), spesifisyys, selektiivisyys, virhepositiivimäärä, virhenegatiivimäärä, tehokkuus, uusittavuus ja toistettavuus. Validointisuureet ja tilastolliset on laskettu eri matriiseille ja selvitetty myös Pseudalert-menetelmän positiivisten kuplien kahden henkilön laskemisepävarmuutta.



Kuvio 5. Standardin SFS-EN ISO 17994 kriteerit

17 Toteamis- ja määritysraja

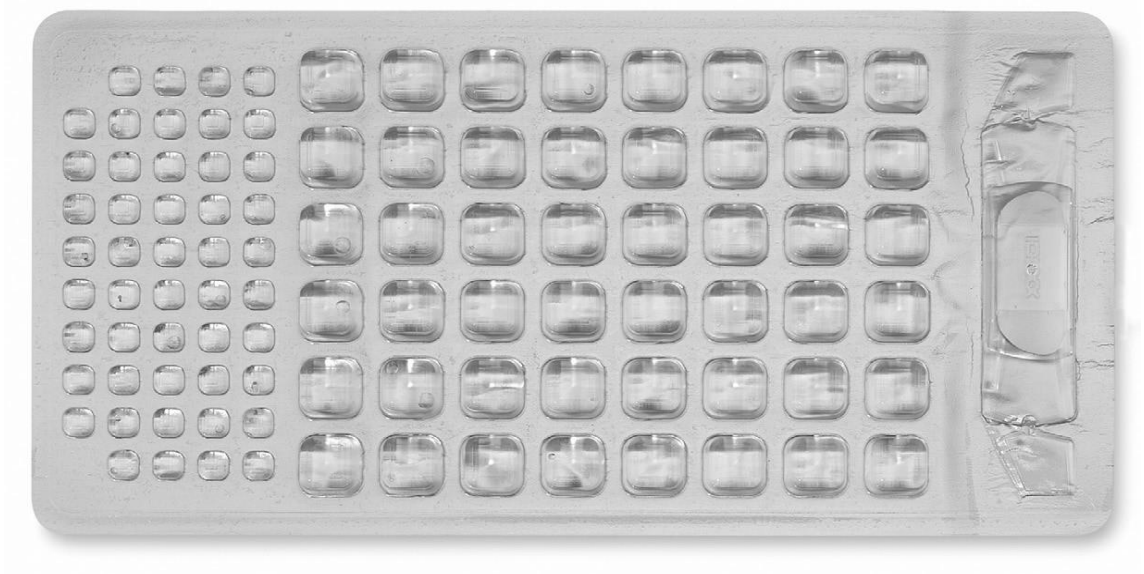
Määritysraja on alhaisin tietyissä rajoissa vaihteleva mikrobipitoisuus, joka pysytään kvantitatiivisesti määrittämään validoitavalla menetelmällä. CN-alustalla määritysraja 1–40 pesäkettä maljaa kohden. Pseudalertille alaraja on 1 pmy / 100 ml tai 1 pmy / 250 ml. Suurin osoitettavissa tulos on 2420 pmy / 100 ml tai 2420 pmy / 250 ml. Pseudalertin tulokset luetaan MPN -taulukosta.

18 MPN

MPN on lyhenne sanoista **M**ost **P**ropable **N**umber eli todennäköisin lukumäärä. Menetelmä perustuu mikrobiologiassa usein sarjalaimennoksiin, joiden avulla yritetään selvittää alkuperäisen näytteen mikrobimäärä. Näytesarja laimennetaan steriiliin kasvuliemeen ja liemessä olevat mikrobit annetaan kasvaa. Kasvatuksen jälkeen lasketaan suurin laimennos, jossa liemessä on kasvua. Laimennostiheyden ollessa suuri voidaan olettaa, että suurimmassa laimennoksessa, jossa on kasvua, oli alun perin ollut yksi mikrobi. MPN-menetelmää kutsutaan myös putkimenetelmäksi. MPN-menetelmä on yleisesti käytetty vesi- ja maitohygieenisissä tutkimuksissa [4, s. 208].

MPN on tilastollinen arvio mikrobitiheydestä. Se perustuu oletukseen Poissonin jakaumasta siirrostetuissa määrissä. MPN-arvoon voidaan liittää estimoidunluottamusvälin [15].

Pseudalartin Quanti-Tray-menetelmä perustuu MPN-menetelmään. MPN arvioiden täsmällisyys määräytyy rinnakkaisputkien lukumäärästä laimennusta kohti ja laimennuskerroimesta. Quanti-Tray/2000-liuska koostuu 97 kuplasta ja liuskaan mahtuu 100 ml vettä (kuva 6). Kuplien määrä ja kokoero antavat hyvän täsmällisyyden. Tray/2000-liuska vastaa MPN menetelmää (standardi ISO 9308-3). Liuskan suuri kuplamäärä antaa suuren määritysalueen ja hyvän estimaatin 95 %:n luottamusvälille. Tray/2000-liuska on helppokäyttöinen ja helposti luettava. Liuskan määritysalue on 1 - 2420 pmy / 100 ml. Tässä tutkimuksessa MPN tulos on luettu IDEXX Quanti-Tray/2000 MPN taulukosta [14]. MPN-laskentaan on olemassa taulukoiden lisäksi monipuolisia tietokoneohjelmia [15].



Kuva 6. Quanti-Tray®/2000-liuska koostuu 97 kuplasta ja liuskaan mahtuu 100 ml vettä

19 Studentin t-testi

Keskiarvo vertailuun perustuva t-testi on tilastotieteiden keskeisimpiä ja yleisimmin käytettyä testiä. Yleisesti t-testillä verrataan parametria tai tunnusluvun arvoa tiettyyn vakioarvoon. Parametri voi olla esimerkiksi kahden suureen odotusarvojen erotus tai regressio suoran kulmakerroin.

T-testi soveltuu hyvin kahden menetelmän keskiarvojen vastaavuuden vertailuun. Tässä tutkimuksessa tulokset on laskettu parittaisella t-testillä. Parittainen t-testiä valittiin, koska otosten välillä oli selvää riippuvuutta, sillä molemmilla menetelmillä tutkittiin samoja näytteitä [21, s. 30].

20 Menetelmän epävarmuus

Epävarmuus, joka liittyy pesäkkeiden laskemiseen, riippuu menetelmästä, näytteen mikrobistosta, henkilöstä tai henkilöistä. Laskentaepävarmuuden arvo on määritettävissä kokeellisesti keräämällä tuloksia samojen maljojen tai tässä tutkimuksessa kuplien toistuvasta laskemisesta eri tilanteissa. Lukemaepävarmuuden voi olettaa olevan samalla henkilöllä menetelmäkohtaisesti verrattain vakinainen, sillä henkilö pystyy tavallisesti toistamaan laskemisen, olkoon tulos kuinka väärä tahansa, huomattavan täsmällisesti. Eri henkilöiden tuloksista laskettu arvot on edustavampi kuin yhden henkilön toistolas-kuihin perustuva.

Kerran arvioidut arvot ovat käyttökelpoisia pitkän aikaa. Luotettavan epävarmuuden saamiseen tarvitaan paljon tutkimusaineistoa, mielellään useita kymmeniä. Tässä tutkimuksessa positiivisten kuplien lukemiseen ovat olleet osallisena minun lisäksi joku muu henkilö Metropolilabin tutkimushenkilökunnasta [25].

21 Suhteellinen erotus

Joissakin tapauksissa mikrobiologisia mittaustuloksia käsitellään logaritmisina. Huomattava osa kirjallisuudesta ja myös tässä insinööriyössä käytetty standardin SFS-EN ISO 17994 mukaisten mittaustulosten hajontaa koskevasta tulosmateriaalista on logaritmisuhteellisyydessä. Logaritmien erotus on likimain sama kuin suhteellinen ero. Tässä tutkimuksessa käytetään luonnollista logaritmia suhteellisen erotuksen laskennassa. Suhteellisen erotuksen arvo esitetään yleisesti prosenttilukuna, mikä tarkoittaa sitä, että suhteelliset erotukset kerrotaan sadalla [15].

21.1 Suhteellinen keskihajonta

Suhteellinen keskihajonta on keskihajonta jaettuna keskiarvolla. Suhteellista keskihajontaa käytetään laskiessa lukemaepävarmuutta, uusittavuutta ja toistettavuutta. Tutkimuksessa suhteellinen keskihajonta on merkitty RSD:llä .

21.2 Peittokerroin

Laajennettu epävarmuus lasketaan keskiarvon standardiepävarmuudesta peittokertoimen ($k=2$) avulla. Peittokertoimen avulla saadaan laajennetulle epävarmuudelle luotettavuusväli. Peittokertoimen ollessa 2, vastaa luotettavuusväli likimain 95 % luotettavuutta. Peittokerrointa kutsutaan myös kattavuuskertoimeksi (kuvio 6) [15].

Kuvio 6. *Kattavuuskertoimen ja luotettavuusvälin yhteys (lähde Seppo Niemelä, MIKES).*

Kattavuuskerroin	Luotettavuusväli
1	68 %
2	95 %
3	100 %

22 Tuloksien arviointi

Laskut suoritettiin menetelmien vastaavuuden testaamiseksi standardissa SFS-EN ISO 17994 annettujen kriteerien mukaisesti. Kahden menetelmän vastaavuus määritettiin Studentin t-testillä, joka on yksi käytetyimmistä tilastollisista testeistä. Tuloksissa laskettiin myös menetelmien sensitiivisyys (herkkyys), spesifisyys, selektiivisyys, virhepositiivimäärä, virhenegatiivimäärä, tehokkuus, uusittavuus sekä toistettavuus. Validointisuureet ja tilastolliset laskut laskettiin myös eri matriiseille. Selvitettiin myös Pseudalert-menetelmälle kahden henkilön laskemisepävarmuus.

Kalvosuodatus menetelmän ja Pseudalert-menetelmän vastaavuutta määritettiin myös parittaisella t-testillä. Menetelmillä tutkitaan samoja näytteitä, näin ollen tulosten välillä on selvästi riippuvuutta. Merkitsevyytasoksi valittiin 5 %.

Tulosten erotuksen keskiarvoa ja keskihajontaa apuna käyttäen laskettiin kaikkien vertailunäytteiden ($n = 59$) t-arvo. T-arvoksi saatiin 0,30 ja t-jakauman vapausaste on 58 ($f = n - 1$). Studentin t-jakauman kriittisten arvojen taulukosta saadaan $t_{0,05}(58) = 2,000$. Laskettu t-arvo(0,30) on teoreettista arvoa (2,000) pienempi, mikä tarkoittaa sitä, että menetelmien välillä ei ole eroa 5 % merkitsevyystasolla (Liite 1, s.13).

Jokaiselle matriisille laskettiin myös t-testin tulokset (liite1). Eri matriisien t-arvon tulokista käy ilmi, että suurimmalla osalla matriiseilla menetelmien välillä ei ole eroa 5 % merkitsevyystasolla. Matriisien t-testin tulokset ovat liitteenä.

23 Validointisuureiden arviointi

Validointisuunnitelman mukaisesti laskettiin myös sensitiivisyyttä (herkkyys), spesifisyyttä, selektiivisyyttä, virhepositiivimäärää, virhenegatiivimäärää, tehokkuutta, uusitavuutta ja toistettavuutta molemmille menetelmille. Tuloksia verrattiin IDEXX -laboratoriesin saamiin tuloksiin ja tulokset olivat samansuuntaiset. Pseudalartin tulokset olivat paremmat verrattuna kalvosuodatusmenetelmään. RSD^2 tarkoittaa suhteellisen keskihajonnan neliötä.

23.1 Tulosten lukemistoistettavuus

Tulosten toistettavuutta laskettiin lukemalla toisistaan riippumatta eri Pseudalert-menetelmien pesäkelukumääriä lyhyen ajan kuluessa. Tuloksille laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Suhteellisen keskihajonnan neliöiden (RSD^2) summasta lasketaan arvo toistettavuudelle (RSD_C). Tulokseksi saadaan 0,025. Standardin SFS-ENV ISO 13843 mukaan ihannearvo lukemistoistettavuudelle on 0,02. Standardin antaman arvon mukaan Pseudalert-menetelmän toistettavuus on hyvä. Saamani lukemat arvot on merkitty A:lla ja toisen henkilön lukemat arvot on merkitty M:llä (liite1, s. 18).

23.2 Uusittavuus

Uusittavuus laskettiin vertaamalla kahden eri matriisin (pullotettu ja verkostovesi) samaa pitoisuutta (liite 1, s.19). Standardin SFS-ENV ISO 13843 mukaan uusittavuus on hyvä, kun uusittavuuden arvo on alle 0,1.

23.3 Muut validointisuureet

Herkkyttä, spesifisyyttä, selektiivisyyttä, virhepositiivimäärä, virhenegatiivimäärä ja tehokkuutta selvitettiin neljän eri luokan avulla. Molemmille menetelmille selvitettiin oikeat positiiviset, virhenegatiiviset, virhepositiiviset, oikeat negatiiviset ja kaikkien edellä mainittujen kokonaismäärää (taulukko 2). Pseudalartin yläraja on 2420mpy:tä (MPN) ja alustaviksi negatiivisiksi on laskettu kaikki kuplat, jotka eivät fluoresoineet. Validointi suuret on laskettu standardin SFS-ENV ISO 13843 mukaisesti (liite 1, s.15).

Taulukko 2. Validointi suureiden vertailussa on tässä tutkimuksessa saadut tulokset ja IDEXX laboratoriesin tulokset. IDEXX tuloksien lähteenä on IDEXX Executive Summary may 2011.

Validointisuureet

	IDEXX	Verkosto vesi	Uima-allas vesi	Pullotettu vesi	Delfinaario vesi	Tämän tutkimuksen tulokset	CN-maja
herkkyys	94 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	81 %
Spesifisyys	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	_____
Virh neg.	6,50 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %
Virhe pos.	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %	28 %
Tehokkuus	97 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	72 %
Uusittavuus	0,017					0,19	
lukemistoistettavuus	0,012					0,025	

Herkkyiden arvoksi saatiin 100 %, tämä tarkoittaa sitä, että Pseudalert-menetelmä pysyy tunnistamaan kohde bakteeria tarkasti, häiritsevistä tekijöistä huolimatta. Tehokkuuden ja spesifisyyden arvoiksi saatiin myös 100 %, nämä arvot kuvaavat menetelmät tarkkuutta ja luotettavuutta. Menetelmällä ei ollut virhepositiivisia eikä virhenegatiivisia arvoja.

24 Laajennettu epävarmuus

Tutkimuksessa on laskettu menetelmien vastaavuuden testaamiseksi standardissa SFS-EN ISO 17994 annettujen kriteerien mukaisesti. Standardin mukaisesti on kahden eri menetelmän tuloksista laskettu suhteellinen erotus (liite 1, s.1), josta on saatu sitten laskettua keskiarvo ja keskihajonta. Keskihajontaa hyväksi käyttäen on laskettu laajennettu epävarmuus. Laajennetusta epävarmuudesta ja keskiarvosta on laskettu ylä- ja alaraja. Tässä tutkimuksessa suurimmaksi hyväksytyksi suhteelliseksi poikkeamaksi nollasta on valittu (D) 10 %. Laskuista on poistettu kaikki tulokset, joissa CN-maljan tulos ylittää 40 pmy:ä ja nollatuloksissa on lisätty yksi numero molempiin tuloksiin (standardin mukainen). Ylärajaksi saatiin 7,1 ja alarajaksi -6,0. Standardin SFS-EN ISO 17994 mukaan Tulos on hyväksyttävä kun $-D (-10) \leq \text{Alaraja} \leq 0$ ja $0 \leq \text{Yläraja} \leq D(10)$. Tämä tarkoittaa sitä, että Standardin SFS-EN ISO 17994 mukaan menetelmien välillä ei ole eroa ja menetelmiä voidaan pitää toisiaan vastaavina.

25 Johtopäätökset

Tutkimuksessa verrattiin uima-allasvesien viranomaisvalvontaan ja käyttötarkkailuun soveltuvaa vaihtoehtoista Pseudalert-menetelmän ja kalvosuodatusmenetelmän (standardi SFS-EN ISO 16266) vastaavuutta *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin määrittämisessä. Tilastollisilla menetelmillä ja validointisuureiden avulla todennettiin menetelmien vastaavan toisiaan. *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria määritettiin verkostovedestä, pullotetusta vedestä (hiilihapollisesta ja hiilihapottomasta), klooria sisältävästä uimavedestä ja Särkänniemen delfinaarionvedestä.

Pseudalert on kalvosuodatusmenetelmää nopeampi ja helppokäyttöisempi. Pseudalert-menetelmä on myös helppolukuisempi eikä menetelmään kuulu varmennustestejä. Tämän tutkimuksen aikana ei huomattu mitään ongelmia Pseudalert-menetelmässä. Tämän tutkimuksen ja edellä mainittujen riippumattomien laboratoriodien tekemien tutkimuksien perusteella, kokonaisuutena Pseudalert-menetelmä on referenssimenetelmää parempi, määritettäessä *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria vesinäytteistä.

Lähteet

1. Harri Seppänen. 1989. Vesihygienia ja desinfektio. Hämeenlinna: Otatieto
2. Anja S. Tiilikainen, Martti Vaara, Antti Vaeheri. 1997. Lääketieteellinen mikrobiologia. Vammala: Duodecim
3. Klaus Hedman, Terho Heikkinen, Pentti Huovinen, Asko Järvinen, Seppo Meri, Martti Vaara. 2010. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Jyväskylä: Duodecim
4. Mirja Salkinoja-Salonen. 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerus kirjanpito
5. Metropolilab.
<www.metropolilab.fi>[Luettu 5.4.2013]
6. Menettelyohje Metropolilab. 2012. Mikrobiologisten menetelmien validointi.
7. Biologisten menetelmien validointi
<http://www.mikes.fi/documents/upload/finas-paiva2008_heikkila.pdf> [Luettu 13.9.2013]
8. Validiteetti ja reliabiliteetti.
<http://www.mit.jyu.fi/ope/kurssit/Graduryhma/PDFt/validius_ja_reliabiliteetti.pdf> [Luettu 13.9.2013]
9. Kemiallisten menetelmien validointi ja mittausepävarmuus.
<http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely_toiminta_valvonta/laboratoriotoiminta/koulutus/leena_saari_13.10.10.pdf> [Luettu 20.9.2013]
10. Mikä on MRPA.
<<http://www.lshp.fi/download.aspx?ID=1133&GUID=%7B9D39158F-BA37-4D84-A570-CB69501035FD%7D>> [Luettu 21.9.2013]
11. kalso Seija. 2002. Allasveden mikrobiologia. Opetusmateriaali.
12. Effect of temperature on the shift of *Pseudomonas fluorescens* from an environmental microorganism to a potential human pathogen
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20378008>> [Luettu 17.9.2013]
13. Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analysesemi4_229.
<http://metagenomaiberico.org/pdf/fr/02_1.pdf> [Luettu 16.9.2013]
14. Pseudalert®
<http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/water/products/pseudalert.jsf?conversationId=561> [Luettu 25.9.2013]
15. Mikrobiologian kvantitatiivisten viljelymääritysten mittausepävarmuus
<http://www.mikes.fi/documents/upload/MIKES_J1_2001.pdf> [Luettu 27.9.2013]

16. IDEXX LABORATORIES
<http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/corporate/home.jsf>
[Luettu 25.9.2013]
17. IDEXX SUMMARY 14a
<<http://www.idexx.ca/resource-library/water/water-reg-article14A.pdf>>
[Luettu 25.9.2013]
18. IDEXX SUMMARY 14b
<http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/water/water-regulatory-article-form-14b.pdf> [Luettu 25.9.2013]
19. IDEXX SUMMARY 14c
<<http://www.idexx.ca/resource-library/water/water-reg-article14C.pdf>>
[Luettu 25.9.2013]
20. IDEXX SUMMARY 14d
<http://www.idexx.ca/resource-library/water/water-reg-article14D.pdf>
[Luettu 25.9.2013]
21. IDEXX SUMMARY 14e
<<http://www.idexx.ca/resource-library/water/water-reg-article14E.pdf>> [Luettu 25.9.2013]
22. NEUVOSTON DIREKTIIVI 98/83/EY
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:FI:PDF>
[Luettu 22.9.2013]
23. Veden laatu. *Pseudomonas aeruginosa* havaitseminen ja lukumäärän määrittäminen. Kalvosuodatustekniikka. SFS-EN ISO 16266
24. API 20 NE -menetelmä
<<http://www2.fiu.edu/~makemson/MCB3020Lab/API20neInstructions.pdf>>
[Luettu 25.9.2013]
25. TESTAUS- JA KALIBROINTILABORATORIOIDEN PÄTEVYYS. YLEISET VAATIMUKSET. SFS-EN ISO/IEC 17025
26. Pertti Laininen. 2001. Tilastollisen analyysin perusteet. Helsinki: Otatieto
27. VEDEN LAATU. OPAS MIKROBIOLOGISTEN MENETELMIEN VALIDOINNISTA. SFS-ENV ISO 13843
28. Ulla-Maija Koivula, Kristiina Suihko, Jari Tyrväinen. 1999. Opas opinnäytteen tekijälle. Tampere: Vammalan Kirjapaino
29. Lehtonen, P. & Sihvonen. 2006. Laboratorioalan analyttinen kemia. Helsinki: Opetushallitus.

Tulokset

Laajennettu epävarmuus

	CN-Malja (a_i)	Pseudalert (b_i)	Suhteellinen erotus
1	11	10	9,53101798
2	14	10	33,64722366
3	16	12	28,76820725
4	10	9	10,53605157
5	15	13	14,31008436
6	1	1	0
7	4	9	-81,09302162
8	5	4	22,31435513
9	4	3	28,76820725
10	1	1	0
11	16	14	13,35313926
12	12	10	18,23215568
13	2	1	69,31471806
14	1	1	0
15	15	10	40,54651081
16	11	11	0
17	27	26	3,774032798
18	16	22	-31,84537311
19	2	2	0
20	4	7	-55,96157879
21	1	1	0
22	4	3	28,76820725
23	6	6	0
24	1	1	0
25	14	12	15,41506798
26	9	8	11,77830357

27	3	3	0
28	17	13	26,82639866
29	16	15	6,453852114
30	1	1	0 #
31	1	1	0 #
32	1	1	0 #
33	1	1	0 #
34	1	1	0 #
35	1	1	0 #
36	1	1	0 #
37	1	1	0 #
38	1	1	0 #
39	37	39	-5,264373349
40	25	24	4,082199452
41	34	35	-2,898753687
42	23	20	13,97619424
43	30	28	6,899287149
44	35	37	-5,556985115
45	33	36	-8,701137699
46	28	25	11,33286853
47	28	31	-10,17826943
48	39	43	-9,763846956
49	2	2	0
50	1	1	0
51	4	5	-22,31435513
52	1	1	0
53	5	6	-18,23215568
54	1	1	0
55	6	4	40,54651081
56	1	2	-69,31471806
57	3	3	0
58	5	9	-58,77866649
59	7	11	-45,19851237

Keskiarvo(K)	0,577505865
Keskihajonta(Xi)	25,20239396

Laskusta on poistettu kaikki tulokset, joissa CN-maljan tulos ylittää 40 pmy:tä
Nollatuloksissa on lisätty yksi numero molempiin ja merkitty # (standardin mukainen)

Suhteellinen erotus = $[\ln(ai) - \ln(bi)] \times 100 \%$

Peittokertoimena on 2

$$u = \frac{2 \cdot Xi}{\sqrt{n}}$$

LAAJENNETTU EPÄVARMUUS

U= 6,562144

Alaraja =K-U

Yläraja =K+U

LUOTETTAVUUSRAJAT

ALARAJA -5,98464 %

YLÄRAJA 7,13965 %

D = 10 %

Laajennettu epävarmuus

Näyte	CN malja	Pseudalert	Tulosten suhteellinen erotus
1	11	10	9,531018
2	14	10	33,64722
3	16	12	28,76821
4	10	9	10,53605
5	15	13	14,31008
6	1	1	0
7	5	4	22,31436
8	1	1	0
9	12	10	18,23216
10	1	1	0
11	15	10	40,54651
12	37	39	-5,26437
13	25	24	4,082199
14	34	35	-2,89875
15	23	20	13,97619
16	30	28	6,899287
17	35	37	-5,55699
18	33	36	-8,70114
19	28	25	11,33287
20	14	12	15,41507
21	17	13	26,8264

Keskiarvo (K)	11,14268
Keskihajonta (Xi)	13,64076
Näytteiden määrä (n)	21

$$u = \frac{2 \cdot Xi}{\sqrt{n}}$$

U= 5,95

Luotettavuusraja ylittyy, kun D = 10 %

Tulos on suuntaa antava.

Tarkan tuloksen saamiseksi näyttemäärän on oltava suurempi.

Verkostoveden t-testi

Näyte	CN malja	Pseudalert	Tulosten erotus
1	11	10	1
2	14	10	4
3	16	12	4
4	10	9	1
5	15	13	2
6	1	1	0
7	5	4	1
8	1	1	0
9	12	10	2
10	1	1	0
11	15	10	5
12	37	39	-2
13	25	24	1
14	34	35	-1
15	23	20	3
16	30	28	2
17	35	37	-2
18	33	36	-3
19	28	25	3
20	14	12	2
21	17	13	4
Keskiarvo			1,285714286
Keskihajonta			2,171240593

$$t = \frac{x - \mu_0}{s / \sqrt{n}} \quad t = 2,71360$$

t= t-testisuureen arvo

$\mu = 0$

s= keskiarvojen erotusten keskihajonta

n= otoskoko

f=n-1(vapausaste)

Studentin t-jakauman kriittisten arvojen taulukosta saadaan $t_{0,05(20)} = 2,086$.

Laskettu t-arvo(2,714) on teoreettista arvoa (2,086) suurempi,

mikä tarkoittaa sitä että menetelmillä on eroa 5 % merkitsevyydellä.

Tämä johtuu suuremmasta pitoisuudesta (10^{-7}) luonnollisesti tulevasta heitosta.

Delfinaariovesi (T-testi)

Näyte	CN-malja	Pseudalert	Tulosten erotus
1	3	3	0
2	1	1	0
3	1	1	0
4	4	7	-3
5	1	1	0
6	4	3	1
7	6	6	0
8	3	3	0
Keskiarvo			- 0,25
Keskihajonta (s)			1,164965

$$t = \frac{x - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

$$t = -0,60698$$

t= t-testisuureen arvo

$\mu = 0$

s= keskiarvojen erotusten keskihajonta

n= otoskoko

f=n-1(vapausaste)

Studentin t-jakauman kriittisten arvojen taulukosta saadaan $t_{0,05(7)}=2,365$.

Laskettu t-arvo(-0,607) on teoreettista arvoa (2,365) pienempi,

mikä tarkoittaa sitä että menetelmillä ei ole eroa 5 % merkitsevyytasolla

Pulloitettuvesi (t-testi)				
Näyte	CN-malja	Pseudalert		Tulosten erotus
1		1	2	-1
2		2	2	0
3		28	31	-3
4		5	9	-4
5		7	11	-4
6		6	4	2
7		4	9	-5
8		16	15	1
9		16	14	2
10		2	1	1
11		11	11	0
12		27	26	1
13		1	1	0
14		1	1	0
15		4	3	1
Keskiarvo				-0,6
Keskihajonta				2,292846

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}} = 1,0135 \quad t =$$

t= t-testisuureen arvo
 $\mu = 0$
s=keskiarvojen erotusten keskihajonta
n=otoskoko
f=n-1(vapausaste)

Studentin t-jakauman kriittisten arvojen taulukosta saadaan $t_{0,05(14)} = 2,145$.
Laskettu t-arvo (-1,014) on teoreettista arvoa (2,145) pienempi,
mikä tarkoittaa sitä että menetelmillä ei ole eroa 5 % merkitsevyystasolla

Pseudalert varmennukset

Näyte	Pseudalert alustava	Isot kuplat	Pienet kuplat	Pseudalert varmennukset
1	10	9	0	5
2	10	8	1	5
3	12	10	1	5
4	9	5	4	5
5	13	9	3	5
6	1	0	1	3
7	4	4	0	4
8	1	1	0	3
9	10	8	1	5
10	1	1	0	3
11	10	4	5	5
12	39	22	4	15
13	24	16	4	12
14	35	20	7	15
15	20	14	3	12
16	28	17	6	12
17	37	21	8	15
18	36	24	3	15
19	25	17	4	12
20	12	9	2	5
21	13	7	5	5
22	0	0	0	2
23	22	14	5	10
24	2	0	2	2
25	8	5	3	5
26	43	24	8	15
27	5	3	2	5
28	6	6	0	6
29	2	1	1	2
30	2	0	2	2
31	31	19	6	15
32	9	5	4	5
33	11	8	2	5
34	0	0	0	0
35	4	2	2	4
36	9	8	0	5
37	15	9	5	5
38	14	10	3	5
39	1	0	1	1

40	11	9	1	5
41	26	16	6	10
42	0	0	0	2
43	0	0	0	0
44	0	0	0	0
45	0	0	0	0
46	1	1	0	1
47	1	1	0	1
48	3	2	1	3
49	3	3	0	3
50	1	1	0	1
51	1	0	1	1
52	0	0	0	0
53	7	3	4	5
54	1	1	0	1
55	3	0	3	3
56	6	5	1	4
57	3	2	1	3
58	0	0	0	0
59	0	0	0	0

CN varmennukset

Näyte	CN Alustava	CN varmennettu	CN Varmentuneet
1	14	5	10
2	19	10	14
3	29	15	16
4	14	10	10
5	16	8	15
6	1	1	1
7	7	4	5
8	3	3	1
9	14	5	12
10	1	1	1
11	19	10	15
12	45	15	37
13	33	15	25
14	50	15	34
15	28	15	23
16	37	15	30
17	44	15	35
18	40	15	33
19	30	15	28
20	16	8	14
21	19	10	17
22	0	0	0
23	19	10	16
24	2	2	2
25	16	5	9
26	44	15	39
27	7	3	4
28	7	4	5
29	1	1	1
30	2	1	2
31	35	10	28
32	13	5	5
33	7	4	7
34	0	0	0
35	11	4	6
36	4	2	4
37	16	5	16
38	14	5	12
39	2	2	2
40	12	5	11
41	30	10	27
42	0	0	0
43	0	0	0
44	0	0	0

45	0	0	0
46	1	1	1
47	1	1	1
48	5	3	4
49	3	3	3
50	1	1	1
51	1	1	1
52	0	0	0
53	4	2	4
54	1	1	1
55	5	3	4
56	6	4	6
57	3	3	3
58	0	0	0
59	0	0	0

Kaikkien näytteiden t-testi

Liite 1
12 (19)

Näyte	CN-Malja	Pseudalert	Tulosten erotus
1	11	10	1
2	14	10	4
3	16	12	4
4	10	9	1
5	15	13	2
6	1	1	0
7	4	9	-5
8	5	4	1
9	4	3	1
10	1	1	0
11	16	14	2
12	12	10	2
13	2	1	1
14	1	1	0
15	15	10	5
16	11	11	0
17	27	26	1
18	16	22	-6
19	2	2	0
20	4	7	-3
21	1	1	0
22	4	3	1
23	6	6	0
24	1	1	0
25	14	12	2
26	9	8	1
27	3	3	0
28	17	13	4
29	16	15	1
30	0	0	0
31	0	0	0
32	0	0	0
33	0	0	0
34	0	0	0
35	0	0	0
36	0	0	0
37	0	0	0
38	0	0	0
39	37	39	-2

40	25	24	1
41	34	35	-1
42	23	20	3
43	30	28	2
44	35	37	-2
45	33	36	-3
46	28	25	3
47	28	31	-3
48	39	43	-4
49	2	2	0
50	1	1	0
51	4	5	-1
52	1	1	0
53	5	6	-1
54	1	1	0
55	6	4	2
56	1	2	-1
57	3	3	0
58	5	9	-4
59	7	11	-4

Keskiarvo 0,084745763
Keskiahajonta 2,167853981

$$t = \frac{x - \mu_0}{s/\sqrt{n}} \quad t = 0,3003$$

t= t-testisuureen arvo

$\mu = 0$

s=keskiarvojen erotusten keskiahajonta

n=otoskoko

f=n-1(vapausaste)

Studentin t-jakauman kriittisten arvojen taulukosta saadaan $t_{0,05(58)}=2,000$.
Laskettu t-arvo(0,30) on teoreettista arvoa (2,000) pienempi, mikä tarkoittaa sitä että menetelmillä ei ole eroa 5% merkitsevyystasolla

Näytteiden validointisuureet

Näyte	CN-Malja alust.	CN-Malja Varm.	Pseudalert® alus.	Pseudalert® Varmennettu
1	14	11	10	10
2	19	14	10	10
3	29	16	12	12
4	14	10	9	9
5	16	15	13	13
6	1	1	1	1
7	7	5	4	4
8	3	1	1	1
9	14	12	10	10
10	1	1	1	1
11	19	15	10	10
12	45	37	39	39
13	33	25	24	24
14	50	34	35	35
15	28	23	20	20
16	37	30	28	28
17	44	35	37	37
18	40	33	36	36
19	30	28	25	25
20	16	14	12	12
21	19	17	13	13
22	0	0	0	0
23	19	16	22	22
24	2	2	2	2
25	16	9	8	8
26	44	39	43	43
27	7	4	5	5
28	7	5	6	6
29	1	1	2	2
30	2	2	2	2
31	35	28	31	31
32	13	5	9	9
33	7	7	11	11
34	0	0	0	0
35	11	6	4	4
36	4	4	9	9
37	16	16	15	15
38	14	16	14	14
39	2	2	1	1
40	12	11	11	11
41	30	27	26	26
42	0	0	0	0
43	0	0	0	0
44	0	0	0	0
45	0	0	0	0
46	1	1	1	1

47	1	1	1	1
48	5	4	3	3
49	3	3	3	3
50	1	1	1	1
51	1	1	1	1
52	0	0	0	0
53	4	4	7	7
54	1	1	1	1
55	5	4	3	3
56	6	6	6	6
57	3	3	3	3
58	0	0	0	0
59	0	0	0	0
Summa	752	606	601	601

- a) alustavien positiivisten lukumäärä, jotka varmistuivat positiivisiksi (oikeat positiiviset)
b) alustavien negatiivisten määrä, jotka varmistuivat positiivisiksi (virhenegatiivimäärä)
c) alustavien positiivisten määrä, jotka varmistuivat negatiivisiksi (virhepositiivimäärä)
d) alustavien negatiivisten määrä, jotka varmistuivat negatiivisiksi (oikeat negatiiviset)

n) testien kokonaismäärä on $n = a + b + c + d$

	CN	Pseudalert®
a)	377	601
b)	0	0
c)	146	0
d)	0	1819
n)	523	2420

1) herkkyys = $a/(a + b)$, osuus positiivisten kokonaismäärästä,
jotka luokiteltiin oikein alustavassa laskennassa

2) spesifisyys = $d/(c + d)$ osuus negatiivisten kokonaismäärästä,
jotka luokiteltiin oikein alustavassa laskennassa

3) virhepositiivimäärä = $c/(a + c)$, osuus alustavista positiivisista,
jotka oli luokiteltu väärin

4) virhenegatiivimäärä = $b/(b + d)$, osuus alustavista negatiivisista,
jotka oli luokiteltu väärin

5) tehokkuus E on yhteinen mittaluku,
joka antaa kaikkien (positiivisten ja negatiivisten) pesäkkeiden tai
putkien osuuden, jotka oli oikein merkitty alustavassa tarkastuksessa:

$$E = (a + d)/n.$$

Toistettavuus							
Näyte	A	M	Keskiarvo	keskihajonta	RSD		RSD ²
1	10	10	10	0	0	0	0
2	10	10	10	0	0	0	0
3	12	12	12	0	0	0	0
4	9	9	9	0	0	0	0
5	13	13	13	0	0	0	0
6	1	1	1	0	0	0	0
7	4	4	4	0	0	0	0
8	1	1	1	0	0	0	0
9	10	10	10	0	0	0	0
10	1	1	1	0	0	0	0
11	10	10	10	0	0	0	0
12	39	39	39	0	0	0	0
13	24	24	24	0	0	0	0
14	35	35	35	0	0	0	0
15	20	20	20	0	0	0	0
16	28	28	28	0	0	0	0
17	37	37	37	0	0	0	0
18	36	36	36	0	0	0	0
19	25	25	25	0	0	0	0
20	11	12	11,5	0,707107	0,061488	0,003781	
21	13	13	13	0	0	0	0
22	22	22	22	0	0	0	0
23	2	2	2	0	0	0	0
24	8	8	8	0	0	0	0
25	43	43	43	0	0	0	0
26	4	5	4,5	0,707107	0,157135	0,024691	
27	6	6	6	0	0	0	0
28	2	2	2	0	0	0	0
29	2	2	2	0	0	0	0
30	31	31	31	0	0	0	0
31	9	9	9	0	0	0	0
32	11	11	11	0	0	0	0
33	4	4	4	0	0	0	0
34	9	9	9	0	0	0	0
35	14	15	14,5	0,707107	0,048766	0,002378	
36	14	14	14	0	0	0	0
37	1	1	1	0	0	0	0
38	11	11	11	0	0	0	0
39	26	26	26	0	0	0	0
40	1	1	1	0	0	0	0
41	1	1	1	0	0	0	0
42	3	3	3	0	0	0	0
43	3	3	3	0	0	0	0
44	1	1	1	0	0	0	0
45	1	1	1	0	0	0	0

	46	7	7	7	0	0	0
	47	1	1	1	0	0	0
	48	3	3	3	0	0	0
	49	6	6	6	0	0	0
	50	3	3	3	0	0	0
Summa						0,03085	
RSDc						0,02484	
$RSD_c = \sqrt{\frac{\sum RSD^2}{n}}$							

Uusittavuus

Kaikki näytteet laimennosta -7

Näyte	Pullotettuvesi	Verkostovesi	Keskiarvo	keskihajonta	RSD	RSD ²
1	31	39	35	5,656854	0,161624	0,026122
2	11	10	10,5	0,707107	0,067344	0,004535
3	15	13	14	1,414214	0,101015	0,010204
4	9	12	10,5	2,12132	0,202031	0,040816
5	14	13	13,5	0,707107	0,052378	0,002743
6	11	20	15,5	6,363961	0,410578	0,168574
7	26	28	27	1,414214	0,052378	0,002743

RSD² Summa 0,2557

$$RSD_c = \sqrt{\frac{\sum RSD^2}{n}}$$

uusittavuus (RSDc) 0,191

Agarit, BHI-liemi ja MPN- taulukko

CN-agar

Käyttötarkoitus: *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin määrittäminen, käytetään yleensä vesimikrobiologia määrittämisissä

Tilaus: LabM/Blood pseudomonas agar base LAB108

Merck/gluserin 1.04094

LabM/X107 C.N.supplement

Elatusaineen koostumus: Pseudomonas agar base / 1l

- Gelatiinipeptoni	1 g
- Hydrolysoitu kaseiini	10 g
- Kaliumsulfaatti K_2SO_4	10 g
- Magnesiumkloridi $MgCl_2$	1,4 g
- Agar	11 g
- Glyseroli	10 ml
-vettä	1000 ml

Lisäaineet: LabM/ X107 C.N.

VERI-agar

Käyttötarkoitus: Ei-selektiivinen elatusaine, jolla voidaan tutkia mikrobien hemolyyttisiä ominaisuuksia

Tilaus: LabM/Blood agar base no2 LAB15

Elatusaineen koostumus: Blood agar base no 2/ 1l

- Proteosipeptoni 15g
- Maksauute 2,5
- Hiivauute 5g
- NaCl 5g
- Agar 12g

Lisäaineet: Defibrinoitu veri

BHI-liemi

Käyttötarkoitus: Ei-selektiivinen liemi

Elatusaineen koostumus : Bacto brain heart infusion / 1l

- Vasikan aivo-uute 200g
- Naudan sydän-uute 250g
- Peptoni 10g
- Glukoosi 2g
- Natriumkloridi 5g
- Dinatriumfosfaatti 2,5g

pH: pH 7,2–7,6

# Large Wells Positive	IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml)																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.1	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.3	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.1	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.4	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.7	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.5	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.3	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	16.0	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.5	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.6	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.4	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.8	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.5	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.2	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.5	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.1	25.3	26.6	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.5	47.8	49.2	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.5	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.9	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.8	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.3
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.5	36.8	38.3	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.7	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	52.0	53.5	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.6	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.4	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	42.0	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.3	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.2	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.7	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.4
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.9	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.2	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.8	56.5	58.3	60.2	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.6	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	67.0	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.2	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	70.0	72.2	74.4	76.7	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.4	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.6	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.8	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.3	127.4	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.4	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.4	126.7	130.1	133.6	137.2	140.8	144.5	148.3	152.2	156.1	160.2
43	87.6	90.4	93.2	96.0	99.0	101.9	105.0	108.1	111.2	114.5	117.8	121.1	124.6	128.1	131.7	135.4	139.1	143.0	147.0	151.0	155.2	159.4	163.8	168.2	172.8
44	93.1	96.1	99.1	102.2	105.4	108.6	111.9	115.3	118.7	122.3	125.9	129.6	133.4	137.4	141.4	145.5	149.7	154.1	158.5	163.1	167.9	172.7	177.7	182.9	188.2
45	99.3	102.5	105.8	109.2	112.6	116.2	119.8	123.6	127.4	131.4	135.4	139.6	143.9	148.3	152.9	157.6	162.4	167.4	172.6	178.0	183.5	189.2	195.1	201.2	207.5
46	106.3	109.8	113.4	117.2	121.0	125.0	129.1	133.3	137.6	142.1	146.7	151.5	156.5	161.6	167.0	172.5	178.2	184.2	190.4	196.8	203.5	210.5	217.8	225.4	233.3
47	114.3	118.3	122.4	126.6	130.9	135.4	140.1	145.0	150.0	155.3	160.7	166.4	172.3	178.5	185.0	191.8	198.9	206.4	214.2	222.4	231.0	240.0	249.5	259.5	270.0
48	123.9	128.4	133.1	137.9	143.0	148.3	153.9	159.7	165.8	172.2	178.9	186.0	193.5	201.4	209.8	218.7	228.2	238.2	248.9	260.3	272.3	285.1	298.7	313.0	328.2
49	135.5	140.8	146.4	152.3	158.5	165.0	172.0	179.3	187.2	195.6	204.6	214.3	224.7	235.9	248.1	261.3	275.5	290.9	307.6	325.5	344.8	365.4	387.3	410.6	435.

T-testi kriittisiä arvoja (kaksisuuntainen).

α (2 tail)	0.1	0.05	0.02	0.01	0.005	0.002	0.001
df							
1	6.3138	12.7065	31.8193	63.6551	127.3447	318.4930	636.0450
2	2.9200	4.3026	6.9646	9.9247	14.0887	22.3276	31.5989
3	2.3534	3.1824	4.5407	5.8408	7.4534	10.2145	12.9242
4	2.1319	2.7764	3.7470	4.6041	5.5976	7.1732	8.6103
5	2.0150	2.5706	3.3650	4.0322	4.7734	5.8934	6.8688
6	1.9432	2.4469	3.1426	3.7074	4.3168	5.2076	5.9589
7	1.8946	2.3646	2.9980	3.4995	4.0294	4.7852	5.4079
8	1.8595	2.3060	2.8965	3.3554	3.8325	4.5008	5.0414
9	1.8331	2.2621	2.8214	3.2498	3.6896	4.2969	4.7809
10	1.8124	2.2282	2.7638	3.1693	3.5814	4.1437	4.5869
11	1.7959	2.2010	2.7181	3.1058	3.4966	4.0247	4.4369
12	1.7823	2.1788	2.6810	3.0545	3.4284	3.9296	4.3178
13	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123	3.3725	3.8520	4.2208
14	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768	3.3257	3.7874	4.1404
15	1.7530	2.1314	2.6025	2.9467	3.2860	3.7328	4.0728
16	1.7459	2.1199	2.5835	2.9208	3.2520	3.6861	4.0150
17	1.7396	2.1098	2.5669	2.8983	3.2224	3.6458	3.9651
18	1.7341	2.1009	2.5524	2.8784	3.1966	3.6105	3.9216
19	1.7291	2.0930	2.5395	2.8609	3.1737	3.5794	3.8834
20	1.7247	2.0860	2.5280	2.8454	3.1534	3.5518	3.8495
21	1.7207	2.0796	2.5176	2.8314	3.1352	3.5272	3.8193
22	1.7172	2.0739	2.5083	2.8188	3.1188	3.5050	3.7921
23	1.7139	2.0686	2.4998	2.8073	3.1040	3.4850	3.7676
24	1.7109	2.0639	2.4922	2.7970	3.0905	3.4668	3.7454
25	1.7081	2.0596	2.4851	2.7874	3.0782	3.4502	3.7251
26	1.7056	2.0555	2.4786	2.7787	3.0669	3.4350	3.7067
27	1.7033	2.0518	2.4727	2.7707	3.0565	3.4211	3.6896
28	1.7011	2.0484	2.4671	2.7633	3.0469	3.4082	3.6739
29	1.6991	2.0452	2.4620	2.7564	3.0380	3.3962	3.6594
30	1.6973	2.0423	2.4572	2.7500	3.0298	3.3852	3.6459

31	1.6955	2.0395	2.4528	2.7440	3.0221	3.3749	3.6334
32	1.6939	2.0369	2.4487	2.7385	3.0150	3.3653	3.6218
33	1.6924	2.0345	2.4448	2.7333	3.0082	3.3563	3.6109
34	1.6909	2.0322	2.4411	2.7284	3.0019	3.3479	3.6008
35	1.6896	2.0301	2.4377	2.7238	2.9961	3.3400	3.5912
36	1.6883	2.0281	2.4345	2.7195	2.9905	3.3326	3.5822
37	1.6871	2.0262	2.4315	2.7154	2.9853	3.3256	3.5737
38	1.6859	2.0244	2.4286	2.7115	2.9803	3.3190	3.5657
39	1.6849	2.0227	2.4258	2.7079	2.9756	3.3128	3.5581
40	1.6839	2.0211	2.4233	2.7045	2.9712	3.3069	3.5510
41	1.6829	2.0196	2.4208	2.7012	2.9670	3.3013	3.5442
42	1.6820	2.0181	2.4185	2.6981	2.9630	3.2959	3.5378
43	1.6811	2.0167	2.4162	2.6951	2.9591	3.2909	3.5316
44	1.6802	2.0154	2.4142	2.6923	2.9555	3.2861	3.5258
45	1.6794	2.0141	2.4121	2.6896	2.9521	3.2815	3.5202
46	1.6787	2.0129	2.4102	2.6870	2.9488	3.2771	3.5149
47	1.6779	2.0117	2.4083	2.6846	2.9456	3.2729	3.5099
48	1.6772	2.0106	2.4066	2.6822	2.9426	3.2689	3.5051
49	1.6766	2.0096	2.4049	2.6800	2.9397	3.2651	3.5004
50	1.6759	2.0086	2.4033	2.6778	2.9370	3.2614	3.4960
51	1.6753	2.0076	2.4017	2.6757	2.9343	3.2579	3.4917
52	1.6747	2.0066	2.4002	2.6737	2.9318	3.2545	3.4877
53	1.6741	2.0057	2.3988	2.6718	2.9293	3.2513	3.4838
54	1.6736	2.0049	2.3974	2.6700	2.9270	3.2482	3.4800
55	1.6730	2.0041	2.3961	2.6682	2.9247	3.2451	3.4764
56	1.6725	2.0032	2.3948	2.6665	2.9225	3.2423	3.4730
57	1.6720	2.0025	2.3936	2.6649	2.9204	3.2394	3.4696
58	1.6715	2.0017	2.3924	2.6633	2.9184	3.2368	3.4663
59	1.6711	2.0010	2.3912	2.6618	2.9164	3.2342	3.4632
60	1.6706	2.0003	2.3901	2.6603	2.9146	3.2317	3.4602