

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2015

Ellamari Kantonen

# *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* – KALVOSUODATUS- MENETELMÄN VALIDOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Ellamari Kantonen

## PSEUDOMONAS AERUGINOSA – KALVOSUODATUSMENETELMÄN VALIDOINTI

*Pseudomonas aeruginosa* on ihmisen opportunistinen patogeeni, gramnegatiivinen, oksidaasi- ja katalaasi-positiivinen sekä itiöitä muodostamaton aerobinen sauvabakteeri. *Pseudomonas aeruginosa* tuottaa fluoresoivaa väriainetta, pyosyaniinia sekä ammoniakkia asetamidista.

*Pseudomonas aeruginosa* on yleisin *Pseudomonas*-suvun taudinaiheuttaja. Sitä esiintyy kaikkialla ympäristössä, mutta vakavia infektoita se aiheuttaa erityisesti sairaaloissa ihmisillä joiden immunitetti on heikentynyt. Pahimmillaan bakteerin aiheuttama infektio voi johtaa kuolemaan.

Validoinnin tarkoituksena on osoittaa laboratorion pätevyys suorittaa kyseistä analyysia. Validoinnissa mikrobiologisen menetelmän kelpoisuus osoitetaan epävarmuustekijöiden havainnoinnilla ja suureiden vertailuarvoilla, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta.

*Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin määrittäminen validointi perustuu standardiin SFS-EN ISO 16266:2008. Validoinnissa käytettiin kolmea vesimatriisia, joihin siirrostettiin tutkittavaa sekä häiritsevää kantaa.

Tavoitteena on menetelmän validointi ja käyttöönotto laboratoriossa sekä sen lisääminen akkreditoituna laboratorion analyysitarjontaan.

### ASIASANAT:

*Pseudomonas aeruginosa*, validointi, kalvosuodatusmenetelmä, veden laatu

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2015 | 35

Instructors: Raimo Pärssinen, Principal lecturer; Tiina Hyytiäinen, MScFood

Ellamari Kantonen

## PSEUDOMONAS AERUGINOSA – VALIDATION OF MEMBRANE FILTRATION METHOD

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic human pathogen, an aerobic gram negative, oxidase and catalase positive, non-spore forming rod. *Pseudomonas aeruginosa* produces pyocyanin, which is antagonistic to other proteobacteria. It also produces ammonium from decomposition of acetamide.

*Pseudomonas aeruginosa* is commonly found in soil and water. It is the most common bacteria of the genus *Pseudomonas* causing infections. Serious infections may occur in patients whose immune resistance is weakened, especially in hospitals. At worst the infection may lead to death.

The purpose of validation is to prove the competence of the laboratory. The validity of a microbiological analysis is verified by observing the uncertainty factors and the reference values of the quantities, which describe the reliability of the procedure.

The determination of *Pseudomonas aeruginosa* is based on ISO standard 16266:2008. Three water matrices were used in the validation, which were inoculated with the target and a disruptive bacterial strain.

The objective was to validate the procedure as an accredited method for laboratory use.

### KEYWORDS:

*Pseudomonas aeruginosa*, validation, membrane filtration method, water quality

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>7</b>
<b>JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>PSEUDOMONAS</b>	<b>9</b>
2.1 <i>Pseudomonas ssp.</i>	9
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.3 <i>P. aeruginosa</i> infektioiden aiheuttajana ja infektioiden hoito	12
2.4 <i>P. aeruginosan</i> esiintyminen	13
<b>MATRIISIT</b>	<b>14</b>
3.1 Talousvesi	14
3.2 Pakattu vesi	14
3.3 Steriili vesi	15
<b>STANDARDI SFS-EN ISO 16266:2008</b>	<b>16</b>
<b>VALIDOINTI</b>	<b>17</b>
5.1 Mikrobiologisen menetelmän validointi	17
5.2 Validoinnin vaiheet	17
5.3 Mittausepävarmuus kvantitatiivisissa mikrobiologisissa määrityksissä	18
5.4 Validointiin liittyvät suureet	19
5.4.1 Mittausepävarmuus	19
5.4.2 Toistettavuus	19
5.4.3 Uusittavuus	19
5.4.4 Oikeellisuus	20
5.4.5 Lineaarisuus ja mittausalue	20
5.4.6 Saanto	20
5.4.7 Spesifisyys	21
5.4.8 Määritysraja	21
5.5 Validoinnin ja akkreditoinnin suhde	21
<b>VALIDOINNIN SUORITUS</b>	<b>22</b>
6.1 Määritettävät suureet	22
6.2 Matriisien valinta	22

6.3 Laimennussarjat ja niiden valmistus	23
6.4 Näytteiden valmistus ja suodatus	24
6.5 Lineaarisuusmäärittäminen	26
6.6 Maljojen lukeminen	27
6.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> varmistustestit	27
6.8 Osallistuminen vertailututkimukseen	28

## **TULOKSET** **30**

7.1 Toistettavuus	30
7.2 Uusittavuus	30
7.3 Oikeellisuus	31
7.4 Saanto	31
7.5 Määrittämiss raja	32
7.6 Lineaarisuus	32
7.7 Spesifisyys	32
7.8 Mittausepävarmuus	33

## **YHTEENVETO** **34**

## **LÄHTEET** **36**

## **LIITTEET**

Liite 1. Elatusaineiden sekä rikastus- ja laimennusliuosten koostumukset

## **KUVAT**

Kuva 1. Entner-Doudoroff'in reaktiotie (Salkinoja-Salonen 2002, 216).	9
Kuva 2. <i>P. aeruginosa</i> -bakteerin puhtasviljelmä CN-agarilla.	10
Kuva 3. Puhtasviljelmä kuvattuna UV-valossa aaltopituudella 366 nm.	11
Kuva 4. Ympin valmistus, laimennus ja viljely.	24
Kuva 5. Lineaarisuuden laimennuskaavio.	26
Kuva 6. Varmistettavia <i>P. aeruginosa</i> pesäkkeitä CN-agarilla.	27
Kuva 7. Värireaktio Nesslerin reagenssin lisäyksen jälkeen.	28

## TAULUKOT

Taulukko 1. Suodatettavat tilavuudet näytekohtaisesti.

25

## KÄYTETYT LYHENTEET

ISO	International Organization for Standardization
EN-ISO	European and an International Standard
FINAS	Finnish Accreditation Service
ssp.	subspecies – alalajit
pmy	pesäkkeen muodostava yksikkö
BHI	Brain Heart Infusion
PC	Plate Count agar
CN	Pseudomonas agar

## JOHDANTO

Tein opinnäytetyöni Eurofins Scientific Finland Oy:n Raision mikrobiologian laboratoriossa, jossa oli tarpeen tehdä validointi ennen uuden *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin määrittämenetelmän käyttöönottoa. *Pseudomonas aeruginosa* on ihmisen opportunistinen patogeeni, joka voi aiheuttaa vakavia infektoita henkilöille, joiden immunitetti on heikentynyt. *P. aeruginosa* tutkitaan usein vesistä, joissa bakteeria ei saa esiintyä pieninäkään pitoisuuksina. Kyseistä bakteeria voidaan pitää veden laadun indikaattorina.

Tavoitteena oli mikrobiologisen määrittämenetelmän validointi sekä saada se akkreditoituna osaksi laboratorion analyysitarjontaa. Täydelliseen validointiin ei ollut tarvetta vaan validointi voitiin suorittaa suppeampana menettelynä perustuen standardiin EN-ISO 16266: 2008 (European Committee for Standardization 2008).

Validointi suoritettiin 2014–2015 vuoden vaihteessa tarkoituksena, että uusi menetelmä ehtisi helmikuun lopussa pidettävään akkreditointitarkastukseen. Opinnäytetyön suoritus koostui kolmesta osasta, joista ensimmäinen käsitti validointisuunnitelman kirjoittamisen, toinen validoinnin suorittamisen laboratoriossa ja kolmas tulosten analysoinnin sekä raportoinnin. Validoinnissa määritettiin suureet täsmällisyys, oikeellisuus, lineaarisuus, saanto, mittausalue, määrittäraja, spesifisyys ja mittausepävarmuus.

Eurofins Scientific Finland Oy on kansainvälisen Eurofins Scientific -laboratoriokonsernin suomalainen tytäryhtiö, jonka palveluksessa työskentelee tällä hetkellä 85 henkilöä. Toimialaan kuuluvat laboratorio- ja asiantuntijapalvelut elintarvike-, maatalous- ja ympäristösektoreilla. (Eurofins 2015)

Suomessa konsernin laboratoriot toimivat testaus- ja kalibrointilaboratorioita koskevan standardin ISO 17025 mukaisesti. Raisiossa toimiva yksikkö tarjoaa elintarvikkeiden sekä rehujen kemiallisia ja mikrobiologisia analyysejä. Laboratorio on Suomen kansallisen akkreditointielimen eli FINAS:in akkreditoima testauslaboratorio. (Eurofins 2015)

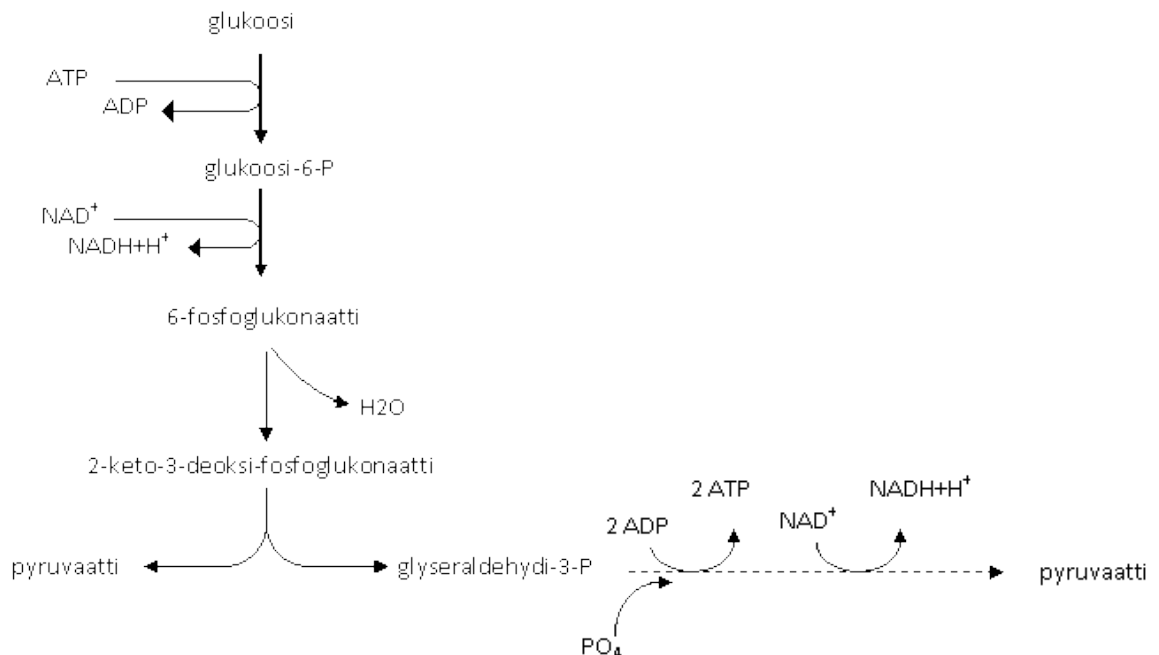


# PSEUDOMONAS

## 2.1 *Pseudomonas* ssp.

*Pseudomonas aeruginosa* kuuluu proteobakteerien kahdeksanteen luokkaan eli gammaproteobakteereihin. Se on *Pseudomonas*-suvun tyyppilaji, joka kuuluu *Pseudomonadales* lahkoon. (Salkinoja-Salonen 2002, 371) *Pseudomonas*-suvun bakteerit tuottavat muille proteobakteereille antagonistisia pyosyaniineja. Mikrobiologiassa antagonistilla tarkoitetaan mikrobia, joka häiritsee muiden mikrobien elämää erittämällä ympäristöönsä yhdisteitä, joita uhrimikrobit eivät siedä. (Salkinoja-Salonen 2002, 533, 536)

*Pseudomonas*-suvun bakteerit hyödyntävät Entner-Doudoroff -mekanismia glukoosin hajotukseen. Mekanismissa glukoosi hajoo pyruvaatiksi ja samanaikaisesti  $\text{NAD}^+$ :tä pelkistyy ( $\text{NADH}+\text{H}^+$ ):ksi. Reaktiotie on yleinen aerobisilla bakteereilla ja sille tyypilliset entsyymit ovat 6-fosfoglukonaatti dehydrataasi ja 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonaattialdolaasi. Reaktiotie on esitetty kuvassa 1. (Salkinoja-Salonen 2002, 216, 227)



Kuva 1. Entner-Doudoroff'in reaktiotie (Salkinoja-Salonen 2002, 216).

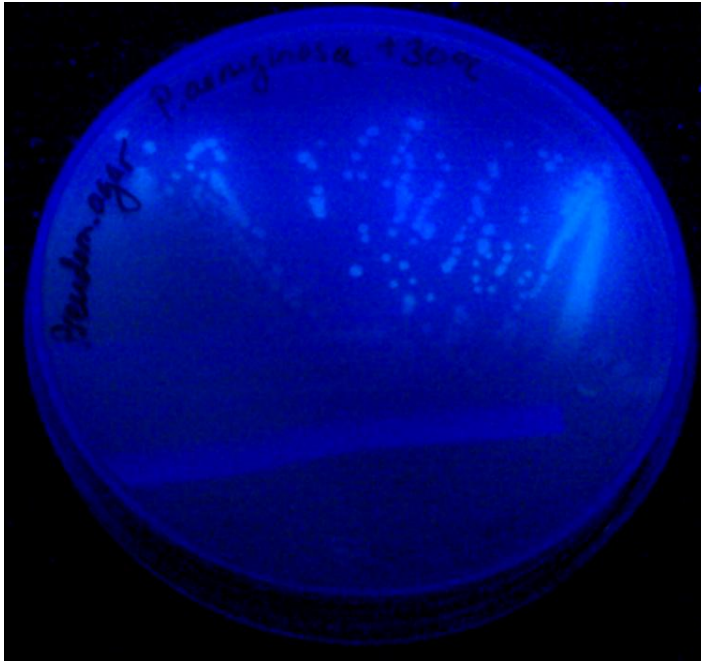
## 2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* on gramnegatiivinen, oksidaasi- ja katalaasiposiitiivinen sekä itiöitä muodostamaton aerobinen sauvabakteeri. *Pseudomonas aeruginosa* tuottaa ammoniakkia asetamidin hajotuksesta, 98 % kannoista tuottaa fluoresoivaa väriainetta ja yli 90 % kannoista tuottavaa sinivihreää väriainetta pyosyaniinia. Kuvassa 2 on puhdasviljelmä, jossa *P. aeruginosa* -pesäkkeet ovat värjäytyneet sinivihreiksi pyosyaniinin vaikutuksesta. Pesäkkeet fluoresoivat UV-valossa aaltopituudella  $360\pm 20$  nm, jota esittää kuva 3. (ISO 16266:2008, 8, 22)

Pyosyaniinia eli *P. aeruginosan* tuottamaa bakteriosiinia muodostuu korismaattihaposta biosynteesissä monimutkaisten välivaiheiden jälkeen. *P. aeruginosa* kykenee tappamaan muita samaan pääjaksoon kuuluvia bakteereita pyosyaniinin avulla ja näin valtaamaan itselleen elintilaa. *Pseudomonas aeruginosa* -infektioissa toksinen pyosyaniini on keskeisessä osassa aiheuttaen monia pahaenteisiä vaikutuksia soluissa, kuten soluhengityksen estäminen. (Lau, G. et al. 2004)



Kuva 2. *P. aeruginosa* -bakteerin puhdasviljelmä CN-agarilla.



Kuva 3. Puhdasviljelmä kuvattuna UV-valossa aaltopituudella 366 nm.

Gramnegatiiviset ja grampositiiviset bakteerit eroavat toisistaan soluseinän rakenteelta. Gramnegatiivisilla bakteereilla on peptidoglykaanin ulkopuolella kalvo, jota grampositiivisilla ei ole. Peptidoglykaani vastaa soluseinän vahvuudesta, joka on kemiallisesti lähes samanlainen sekä gramnegatiivisilla että grampositiivisilla bakteereilla. Gramvärjäyksellä bakteerit voidaan jaotella edellä mainituihin kahteen pääryhmään. Värjäyksessä gramnegatiiviset värjäytyvät punaisiksi ja grampositiiviset violeteiksi. Värjäyksen erottelukyky perustuu testissä muodostuvaan kristallivioletti-jodi kompleksiin. Soluseinät kutistetaan alkoholi tai asetonikäsittelyllä, jonka aikaansaamana kristallivioletti-jodi kompleksi ei vuoda ulos grampositiivisten solujen sisältä. (Salkinoja-Salonen 2002, 99,101)

Oksidaasiposiitivinen bakteeri kykenee hapettamaan N,N-dimetyyli-p-fenyleenidiamiinia toisin kuin oksidaasinegatiivinen (Salkinoja-Salonen 2002, 234). Oksidaasitestissä bakteerimassaa maljalta laitetaan N,N-dimetyyli-p-fenyleenidiamiinilla kyllästetylle paperiliuskalle. Oksidaasiposiitivinen bakteeri alkaa tuottaa sytokromi c:tä ja muodostuu värireaktio, jossa testiliuska muuttuu tummansiniseksi.

Katalaasipositiivinen bakteeri taas kykenee hajottamaan vetyperoksidin vedeksi ja hapeksi katalaasientsyymien avulla. Katalaasi voidaan osoittaa lisäämällä tip-pa 3 % vetyperoksidin vesiliuosta pesäkkeelle. Positiivisessa reaktiossa alkaa muodostua kuplia. (Salkinoja-Salonen 2002, 206)

Bakteerien liikuntakyky perustuu ohuisiin ja pitkiin uintisiimoihin eli flagelloihin. Flagellat mahdollistavat bakteerien liikkumisen myös kosteilla pinnoilla. Flagellat koostuvat perusrungosta, koukusta ja kierteisestä flagellavarresta. *P. aeruginosa*lla flagella on poolinen eli napaan kiinnittynyt. Bakteerien liike poolisten flagellojen aikaansaamina on nopeaa, pyörivää sekä törmäilevää. Liikkumisnopeus poolisen flagellan omaavilla bakteereilla on välillä 20–80 µm/s. Pseudomonakset muodostavat flagelloja parhaiten lämpötilassa, joka on niiden kasvu-lämpötilan alarajalla eli huoneenlämmössä. (Salkinoja-Salonen 2002, 119-123, 127)

### 2.3 *P. aeruginosa* infektioiden aiheuttajana ja infektioiden hoito

Pseudomonas-lajeista *P. aeruginosa* on yleisin infektioiden aiheuttaja ja resistentti monille antibiooteille. Bakteeri on ihmisen opportunistinen patogeeni eli se voi aiheuttaa infektioita henkilöille, joiden immuunijärjestelmä on heikentynyt. (Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics inc. 2011)

*P. aeruginosa* on yleisin sairaalabakteeri, joka löydetään yli viikon hoidossa olleilta potilailta. Infektiot ovat hankalia ja voivat aiheuttaa hengenvaaraa potilaalle. *P. aeruginosa* tuottaa lukuisia toksisia proteiineja, jotka aiheuttavat vakavia kudonvaurioita sekä häiritsevät elimistön normaalia puolustusmekanismia. *Pseudomonas*-infektioita voi esiintyä kaikissa ruumiinosissa kuten iholla, silmissä, korvissa ja virtsateissä aiheuttaen tulehduksia, hengitysteissä aiheuttaen keuhkokuumetta sekä luissa ja nivelissä aiheuttaen luuydintulehduksia. (Medscape 2014)

*Pseudomonas*-suvun aiheuttamia infektioita voidaan hoitaa kahden lääkkeen yhdistelmällä kuten Pseudomonasta vastustavalla beta-laktaamin ja aminogly-

kosidin yhdistelmällä. Mikrobeille haitallisten aineiden käyttö on lähtökohta tehoaville hoidoille. (Medscape 2014)

#### 2.4 *P. aeruginosa* esiintyminen

*Pseudomonas aeruginosa* esiintyy kaikkialla ympäristössä aina vedestä ja maaperästä ihmisen normaaliflooraan. Se on useimmin löydetty bakteeri raakaöljyn kontaminoimasta ympäristöstä. Bakteeri selviytyy ympäristössä hyvin vähällä ravinnolla, mitä kuvaa hyvin se, että bakteeri voi kasvaa jopa tislatussa vedessä pitoisuudella  $10^6$  / ml. *P. aeruginosa* kykenee käyttämään nitraattia ja nitriittiä hapen sijasta soluhengityksessä. Nitraatin pelkistymistä soluhengityksessä kutsutaan denitrifikaatioksi. Tämä vaihtoehtoinen anaerobinen soluhengitys edesauttaa bakteerin ympäristöön sopeutumista. (Chen 2005, iii, 9)

*Pseudomonas aeruginosa* voi esiintyä myös elintarvikkeita pilaavana bakteerina. Yleisimpiä tällaisia elintarvikkeita ovat liha, kala, maito, leipä sekä muut helposti pilaantuvat elintarvikkeet. Bakteerin veden aktiivisuuden vaatimus elintarvikkeissa on 0,97. Vesiaktiivisuus  $a_w$  tarkoittaa liuoksen höyrynpainetta suhteessa puhtaan veden höyrynpaineeseen samassa lämpötilassa. Puhtaan veden vesiaktiivisuus  $a_w$  on 1,00. (Salkinoja-Salonen 2000, 201–202)

## MATRIISIT

### 3.1 Talousvesi

Talousvedellä tarkoitetaan vettä, jota käytetään elintarvikkeiden valmistukseen ja juomavetenä. Talousvesi ei saa sisältää pieneliöitä, loisia taikka muita aineita sellaisina pitoisuuksina, joista saattaisi olla vaaraa terveydelle. (Finlex 2015a)

Talousvettä valmistetaan yleisimmin hyvälaatuisesta pohjavedestä vähäisellä käsittelyllä. Kun pohjavesivarat ovat riittämättömät, talousvesi valmistetaan pintavedestä. Pintavesi tarvitsee perusteellisen ja monivaiheisen puhdistusprosessin, jotta sitä voidaan käyttää talousvetenä. (Salkinoja-Salonen 2000, 429,431)

### 3.2 Pakattu vesi

Pakatulla vedellä tarkoitetaan talousvettä, kivennäisvettä sekä lähdevettä, jonka kuluttaja voi ostaa pulloon tai säiliöön pakattuna. Pakatun veden ominaisuuksia, veden käsittelyä sekä pakkauksen merkintöjä ohjaa maa- ja metsätalousministeriön laatima asetus. Pulloissa tai säiliöissä myytävän veden laatuvaatimus *Pseudomonas aeruginosalle* on 0 pmy/250 ml. (Finlex 2015b)

Luontainen kivennäisvesi on maanalaisesta vesikerrostumasta tai -varastosta kerättyä mikrobiologisesti puhdasta vettä, mikä maanpinnalla esiintyy lähteenä. Luontainen kivennäisvesi on erotettavissa tavallisesta juomavedestä sen ominaispiirteiden, kuten kivennäis- ja hivenainepitoisuuksien sekä alkuperäisen puhtauden perusteella. Luontaisista kivennäisvesistä voi spontaanisti vapautua hiilidioksidia tavallisissa lämpötila- ja paineolosuhteissa. (Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2009/54/EY 2015, 51,53)

Nimitystä lähdevesi voidaan käyttää ihmisten kulutettavaksi tarkoitettusta luonnontilaisesta vedestä, joka on pulloitettu ottopaikassaan ja täyttää kaikki vaatimukset, jotka ovat esitetty kivennäisvesiä koskevassa direktiivissä. (Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2009/54/EY 2015, 49)

### 3.3 Steriili vesi

Steriili vesi ei sisällä mikro-organismeja ja se valmistetaan keinotekoisesti. Käytännössä steriilydellä tarkoitetaan, että tutkittava tuote sisältää vähemmän kuin yhden nykyisin menetelmin kasvukykyiseksi todettavan mikrobin. Käytössä olevilla menetelmillä ei pystytä saavuttamaan absoluuttista steriiliyttä, sillä tietyssä ajassa vain osa elävistä mikrobeista kuolee. (Salkinoja-Salonen 2000, 23)

Opinnäytetyössä käytetty steriili vesi valmistettiin autoklavoimalla käänteisosmoosivettä 121°C/15 min. Autoklavointi tarkoittaa kuumentamista ylipaineessa kyllästetyn vesihöyryn avulla, ja on sterilointimenetelmistä tehokkain. Tärkeää nesteiden steriloinnissa on, että höyry syrjäyttää kaiken ilman sterilointiastian sisältä (Salkinoja-Salonen 2000, 25). Autoklavoinnin ajaksi vesipullojen korkit kierrettiin auki sen verran, että höyry pääsi pois pullosta, millä estettiin myös astioiden särkyminen.

Käänteisosmoosilla vedestä voidaan poistaa epäpuhtauksia, kuten bakteereita ja suolaa. Käänteisosmoosi on nimensä mukaisesti vastakkainen tapahtuma luontaisesti tapahtuvalle osmoosille, jossa vesi kulkee puoliläpäisevän kalvon läpi suuremmasta pitoisuudesta pienempään tasoittaen pitoisuuseroja. Käänteisosmoosiin perustuva vedenpuhdistus saadaan siis aikaan puoliläpäisevän kalvon sekä ulkopuolisen paineen avulla. Ulkopuolisen paineen tulee olla suurempi kuin luonnollisen osmoottisen paineen, jotta vesi saadaan kulkemaan vastakkaiseen suuntaan. (Oy WatMan Ab 2015) Opinnäytetyössä steriilin veden valmistukseen käytetyn käänteisosmoosiveden johtokyky oli noin 10 µS/cm.

## STANDARDI SFS-EN ISO 16266:2008

Standardien avulla pyritään luomaan yhteisiä sääntöjä, lisätään tuotteiden yhteensopivuutta sekä helpottamaan maiden sisäistä että ulkoista kauppaa. Standardit ovat standardoinnista vastaavan elimen hyväksymiä asiakirjoja, jotka ovat kaikkien hankittavissa. Standardit ovat suosituksia, mutta ihmisen terveyttä tai turvallisuutta koskevien standardien noudattaminen voidaan määrätä pakolliseksi viranomaisten toimesta. (Finatex 2015)

Standardin nimessä SFS-EN ISO tarkoittaa, että kansainvälinen standardi on hyväksytty muuttamattomana eurooppalaiseksi standardiksi, ja lisäksi se on vahvistettu Suomessa. Tunnusmerkin jälkeen ilmoitetaan standardin numero sekä vahvistus vuosi.

Standardi EN-ISO 16266: Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Method by membrane filtration ohjeistaa *Pseudomonas aeruginosan* osoittamiseen ja lukumäärän laskemiseen pakattujen vesien näytteistä kalvosuodatusmenetelmällä. Standardia voidaan käyttää soveltavasti myös muihin vesiin, joiden taustakasvusto on vähäinen, kuten talousvedet sekä uima-allasvedet.

Standardissa kuvataan menetelmän periaate, tarvittavat laitteet, välineet, kasvualustat sekä niiden valmistusohjeet ja tarvittavat reagenssit, menetelmän suoritus sekä tulosten ilmoittaminen yksityiskohtaisesti. Lisäksi standardissa on lisätietoja, joita voidaan hyödyntää menetelmän suorituksessa.



# VALIDOINTI

## 5.1 Mikrobiologisen menetelmän validointi

Validointi suoritetaan ennen kuin uusi menetelmä voidaan ottaa käyttöön laboratorioissa. Validoinnin tarkoituksena on varmistaa menetelmän toimivuus, luotettavuus ja tulosten oikeellisuus.

Mikrobiologisen menetelmän validointi perustuu lähinnä epävarmuustekijöiden havainnointiin, sillä menetelmien validoimiseksi ei ole olemassa kansainvälisesti hyväksytyjä ohjeita eikä kriteereitä tulosten arviointiin. Mikrobiologisen menetelmän kelpoisuus osoitetaan erilaisten suureiden vertailuarvojen perusteella, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Tällaisia suureita ovat oikeellisuus, saanto, täsmällisyys, määrittäysraja, lineaarisuus, spesifisyys, mittausepävarmuus sekä määrittäysalue. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 1)

Menetelmien validointivaatimukset vaihtelevat laboratorioissa menetelmän ja sen käyttötarkoituksen mukaisesti. Täydellisen validoinnin suorittaa menetelmän kehittäjä. Laboratorioissa validoinnit liittyvät yleensä standardimenetelmien sekä muiden yleisesti käytössä olevien menetelmien käyttöönottoon, joiden validointi voidaan suorittaa täydellistä validointia suppeammin. Validoinnin tarkoituksena on osoittaa, että laboratorio hallitsee menetelmän. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 1)

## 5.2 Validoinnin vaiheet

Validointi koostuu validointisuunnitelman teosta, validoinnin suorituksesta sekä tulosten laskemisesta, arvioinnista ja raportoinnista.

Validointia suunniteltaessa tulee tarkasti pohtia validoitavaa menetelmää ja validoinnin laajuutta. Validointia ei kannata tehdä liian laajasti, sillä se vie työaikaa ja tehty ylimääräinen työ ei ole tarpeen. Toisaalta validointia ei tule myöskään jättää liian suppeaksi, jolloin se ei kata laboratorion vaatimuksia. Validointisuun-

nitelmassa tulee esittää vähintäänkin validoinnin tarkoitus ja laajuus sekä menetelmälle asetettavat vaatimukset, periaatteet ja tehtävät toimenpiteet. Validoinnin suorittaa laboratoriossa työskentelevä henkilökunta, jonka tulee hallita menetelmä jatkossa. Validointi suoritetaan hyväksytyyn suunnitelman perusteella eikä siitä tule poiketa virheiden välttämiseksi.

Saatuja tuloksia sekä validoinnin suoritusta tulee arvioida, ja mikäli ne ovat hyväksyttäviä menetelmän käyttötarkoituksen huomioiden, voidaan menetelmä ottaa käyttöön. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 15)

Dokumentointi on myös tärkeä osa validointia jokaisessa sen vaiheessa. Dokumentointi takaa, että tieto käytetyistä reagensseista sekä tehdystä työstä on kaikkien saatavilla ja helposti ymmärrettävissä.

### 5.3 Mittausepävarmuus kvantitatiivisissa mikrobiologisissa määrittämissä

Mittausepävarmuus kuvaa tuloksen arvon vaihtelua, jota laboratorioden tulee arvioida testauslaboratorioita koskevan standardin ISO 17025 mukaan. Mittausepävarmuus koostuu mikrobiologiassa osatekijöistä, joita ovat siirrostilavuuden epävarmuus, pesäkelukumäärän hiukkastilastollinen hajonta ja tuloksen lukemisen epävarmuus. (Evara 2007) Keskihajonnan avulla voidaan arvioida joidenkin tekijöiden epävarmuuksien suuruutta (Mikes 2005, 18).

Mikrobiologiset analyysit perustuvat useimmiten mikrobien tunnistukseen materiaaleineen ja häiritsevine taustoineen, johon liittyy huomattavaa epävarmuutta. Mikrobiologiassa näyte usein laimennetaan pitoisuustasolle, josta yksittäiset pesäkkeet on mahdollista laskea. Tällöin solujen muodostamien pesäkkeiden lukumäärän tulee olla kymmenistä pesäkkeistä enintään muutamiin satoihin tutkittavassa näytteessä. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 2-3)

Mikrobit ovat eläviä organismeja, jonka takia niistä on mahdotonta tehdä valmiiteita, joiden todellinen pitoisuus olisi tiedossa ja muuttumaton. Tästä johtuen mikrobiologiassa täsmällisesti oikean tuloksen määrittäminen on hankalaa. Oi-

keana tuloksena mikrobiologiassa pidetään menetelmästä saadun keskiarvotuloksen sekä referenssimateriaaleilla saadun todellisen arvon lähekkäisyyttä. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 4)

#### 5.4 Validointiin liittyvät suureet

Validointi perustuu standardiin EN ISO 16266:2008, ja tähän validointiin sisällytettiin suureet: mittausepävarmuus, täsmällisyys, oikeellisuus, lineaarisuus ja mittausalue, saanto, spesifisyys sekä määrittämissuureet. Näillä suureilla validoinnin katsottiin olevan riittävän laaja Eurofins Scientific Finland Oy:n Raision mikrobiologian laboratoriolle ja täyttävän validoinnin vaatimukset.

##### 5.4.1 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus koostuu usean osatekijän mittausepävarmuudesta, jotka yhdistämällä saadaan menetelmälle kokonaisepävarmuus. Osatekijät tässä validoinnissa ovat menetelmäkohtainen lukemaepävarmuus sekä suodatussuppliloiden epävarmuus.

##### 5.4.2 Toistettavuus

Toistettavuus tarkoittaa täsmällisyyttä, joka kuvaa peräkkäisten mittaustulosten paikkansapitävyyttä, kun analyysi suoritetaan saman tekijän toimesta, lyhyellä aikavälillä samoissa mittausolosuhteissa. Toistettavuus määritetään tekemällä useita rinnakkaismäärittäyksiä erilaisista näytteistä useammalla pitoisuustasolla. (Mikes 2005, 37)

##### 5.4.3 Uusittavuus

Uusittavuus on myös täsmällisyyttä, mutta kuvaa saman analyysin tulosten lähekkäisyyttä, kun mittaukset suoritetaan muuttuneissa olosuhteissa. Uusitta-

vuus kuvaa satunnaisten tekijöiden vaikutusta menetelmän toistettavuuteen. (Mikes 2005, 37)

#### 5.4.4 Oikeellisuus

Oikeellisuus kuvaa validoitavasta menetelmästä sekä referenssimenetelmästä saatavien tulosten vastaavuutta samoja näytteitä tutkittaessa. Oikeellisuus on suotavaa määrittää käyttämällä sertifioituja referenssimateriaaleja, joiden ilmoitettu pitoisuus on todellinen tulos. Usein käytännössä oikeellisuus kuitenkin määritetään siirrostetuilla näytteillä tai sertifioimattomilla referenssimateriaaleilla, kuten myös tässä validoinnissa. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 7–8)

#### 5.4.5 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisella alueella menetelmän tulokset korreloivat suoraan tutkittavan näytteen pitoisuuteen eli mikrobipitoisuuden muuttuessa tulos muuttuu samassa suhteessa. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 10)

Mittausalue kuvaa sitä aluetta, jolla tulos voidaan luotettavasti ilmoittaa. Näytteestä valmistettavan laimennussarjan avulla pyritään pääsemään tälle laskenta-alueelle. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 10)

#### 5.4.6 Saanto

Saannolla tarkoitetaan menetelmällä saadun analyysituloksen prosenttiosuutta tunnetun lisäyksen laskennallisesta arvosta. Saanto kuvaa menetelmän tehokkuutta havaita määritettävän analyysin kokonaismäärä. Saantoon voivat vaikuttaa useat eri tekijät riippuen käytettävästä menetelmästä eikä kaikkia tekijöitä välttämättä saada selville. (Mikes 2005, 33)

#### 5.4.7 Spesifisyys

Spesifisyydellä tarkoitetaan kvantitatiivisen ja kvalitatiivisen menetelmän kykyä löytää tutkittava mikrobi häiritsevistä tekijöistä. Menetelmä on täydellisen spesifinen, jos se määrittää ainoastaan analysoitavan mikrobin. Mikrobiologiset menetelmät eivät kuitenkaan ole täysin spesifisiä käytännössä, vaan validoitaessa on opittava tunnistamaan tyypilliset pesäkkeet epätyypillisistä varmistustestien avulla. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 10)

#### 5.4.8 Määritysraja

Määritysraja on alhaisin mikrobipitoisuus, joka pystytään validoitavalla menetelmällä kvantitatiivisesti määrittämään. Nestemäisille näytteille määritysraja on yleensä < 1 pmy/ml (maljavalu) tai < 10 pmy/ml (pintalevitys) ja vastaavasti kiinteille näytteille < 10 pmy/g (maljavalu) tai < 100 pmy/g (pintalevitys). Määritysraja voidaan tarpeen mukaan alentaa lisäämällä näytemääriä ja rinnakkaisia määrityksiä. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 1997, 10)

#### 5.5 Validoinnin ja akkreditoinnin suhde

Akkreditoinnilla tarkoitetaan kolmannen osapuolen arviointia organisaation pätevydestä. Suomen kansallinen akkreditointielin on FINAS-akkreditointipalvelu, joka toimii Turvallisuus- ja kemikaaliviraston (Tukes) alaisena. Akkreditoinnin hakeminen on vapaaehtoista ja hakija saa määritellä toiminta-alueen haettavalle akkreditoinnille. (Finas 2015)

Akkreditoituilla ja sitä hakevilla laboratorioilla oletetaan olevan menettelyt testaus- ja kalibrointitulosten laadunvarmistukselle sekä selvitys vertailumittauksiin osallistumisesta ja niissä menestymisestä omalla pätevyysalueellaan. (Finas 2015) Validointi on laboratorion dokumentoitua pätevyyden osoittamista, joka on yksi vaatimus hyväksytyyn akkreditointiin.

## VALIDOINNIN SUORITUS

Validointi suoritettiin kolmella matriisilla, joista kullakin tehtiin kolme määritystä aina kolmella pitoisuustasolla. Jokaista matriisia kohden suodatettiin lisäksi siirrostamaton vesinäyte. Suodatukset kaikilla matriiseilla tehtiin kahden laborantin toimesta.

Validointi suoritettiin kolmessa osassa. Ensin suodatettiin pakatut vesinäytteet, toisella kerralla tehtiin suodatukset lineaarisuusmäärittäjä varten ja kolmannelle kerralla tehtiin suodatukset talousveden ja pakatun veden osalta. Kaikille suodatuskerroille valmistettiin ympäri ja laimennokset puhdasviljelmästä.

### 6.1 Määritettävät suureet

Validoinnissa määritetyt suureet olivat oikeellisuus, saanto, täsmällisyys, määrittäjäraja, lineaarisuus, spesifisyys, mittausepävarmuus sekä määrittäjäalue.

Menetelmän uusittavuutta, oikeellisuutta, toistettavuutta ja saantoa arvioitiin siirrostettujen näytteiden määrittäjätulosten avulla. Spesifisyys määritettiin matriisissa olevan koekannan *P. aeruginosa* ja häiritsevän kannan *E. coli* kasvun perusteella. Lineaarisuus vastaavasti määritettiin talousvedestä suodatettujen näytteiden rinnakkaisista tuloksista. Menetelmän yhdistetty mittausepävarmuus saatiin laskettua laboratoriokohtaisen lukemaepävarmuuden sekä suodatussuppiloiden epävarmuuden perusteella.

### 6.2 Matriisien valinta

Validoinnissa käytetyt kolme matriisia olivat talousvesi, pakattu vesi ja steriili vesi. Talousvesi ja pakattu vesi valittiin matriiseiksi, koska niistä laboratoriossa tullaan analysoimaan *P. aeruginosa* jatkossa. Validoinnissa pakattuna vetenä käytettiin kotimaista lähdevettä Keski-Pohjanmaalta Multilan lähteestä. Kolman-

neksi matriisiksi valittiin steriilivesi, jotta havaittaisiin sisältävätkö muut matriisit bakteerin kasvua häiritseviä yhdisteitä tai muita aineita.

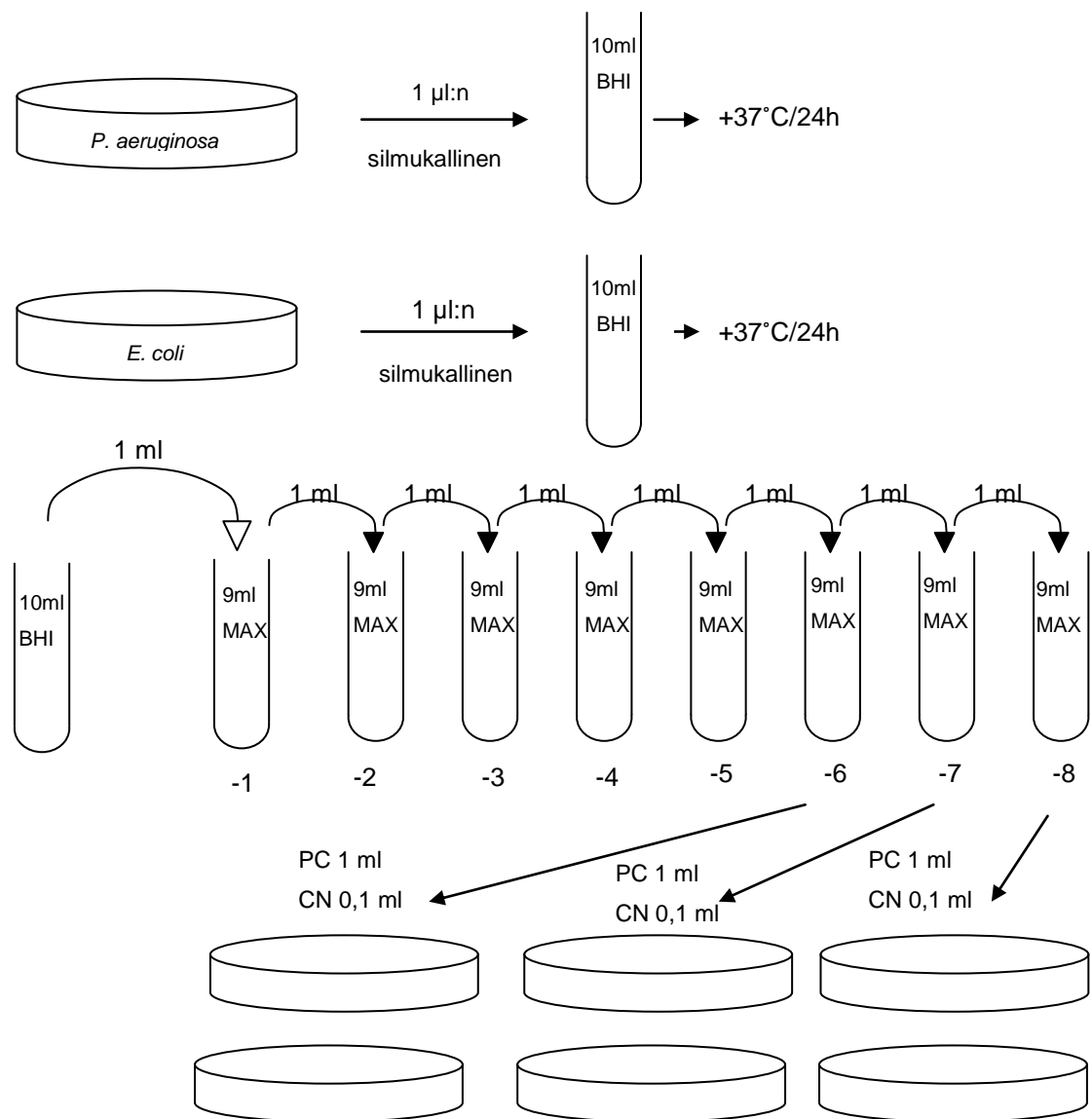
Kaikkiin matriiseihin siirrostettiin bakteerisuspensiota kolmella eri pitoisuudella. Mikrobeita lisättiin talousveteen ja steriiliin veteen siten, että tavoitepitoisuudet olivat 5 pmy/100 ml, 10 pmy/100 ml ja 100 pmy/100 ml. Vastaavasti pakatulle vedelle tavoitepitoisuudet olivat 5 pmy/250 ml, 20 pmy/250 ml ja 250 pmy/250 ml. Kussakin matriisissa kaksi pitoisuustasoista oli alhaisia sekä yksi korkeampi. Mikrobia siirrostettiin alhaisilla pitoisuuksilla kahdella tasolla, minkä avulla varmistettiin kasvun havaitseminen myös pienissä pitoisuuksissa. Talousveden sekä steriilin veden osalla korkeampi pitoisuus oli 20-kertainen ja pakatun veden osalla se oli 50-kertainen.

Siirrostuksessa kantoina käytettiin koekantana *Pseudomonas aeruginosa* ja häiritsevänä kantana *Escherichia coli*. Lisäksi jokaista matriisia kohden analysoitiin siirrostamaton vesinäyte.

### 6.3 Laimennussarjat ja niiden valmistus

Määrittäjä varten valmistettiin bakteerisuspensio siirrostamalla puhtasviljelmistä 1 µl silmukalla bakteerikasvustoa 10 ml:aan BHI-rikastuslientä (=ymppi). Putkia inkuboitii +37 °C lämpötilassa 24 tuntia. Inkuboinnin jälkeen bakteerisuspensioiden tavoitepitoisuudet olivat noin  $10^8$ – $10^9$  pmy/ml.

BHI-liemikasvatuksista valmistettiin laimennussarja  $10^{-1}$ – $10^{-8}$  peptonisuolaliemeen (MAX). *P. aeruginosan* laimennoksista  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  ja  $10^{-8}$  viljeltiin rinnakkaiset kasvatukset PC-agar ja CN-agar maljoille ja *E. coli* vastaavat laimennukset viljeltiin PC-agarille. Viljely CN-agarille tehtiin pintalevityksenä ja PC-agarille maljavaluna (Kuva 4). Maljoja inkuboitii + 37 °C lämpötilassa. PC-agar maljoilta kasvu tutkittiin vuorokauden kuluttua ja CN-agar maljojen kasvu tutkittiin  $22 \pm 2$  sekä  $44 \pm 4$  tunnin kuluttua. Maljoilla esiintyvän kasvun perusteella saatiin laskettua valmistetun ympin tarkka pitoisuus.



Kuva 4. Ympin valmistus, laimennus ja viljely.

Liitteessä 1 on esitetty kaikkien työssä käytettyjen elatusaineiden sekä rikastus- ja laimennusliuosten koostumukset.

#### 6.4 Näytteiden valmistus ja suodatus

Näytteisiin pipetoitiin tietty määrä bakteeriliemikasvatuksen laimennosta siten, että saavutettiin haluttu tavoitepitoisuus näytteelle. Tavoitepitoisuudet on esitet-



ty kohdassa 6.2 Matriisien valinta. Näytteisiin lisättävän bakteeriliemikasvatuksen määrä sekä laimennus laskettiin määrittystä varten valmistetun ympin pitoisuuden perusteella. Jokaisen näytteen tilavuus oli 1000 ml.

Näytteiden suodatuksessa käytettiin 0,45 µm kalvosuodatinta, jonka läpi suodatettiin vesinäytettä sekä korkeissa pitoisuuksissa näytteen laimennusta. Talousveden sekä steriilin veden näytteistä suodatettiin aseptisin välinein ja työtavoin 100 ml erät ja pakatusta vedestä 250 ml erät standardin ohjeistuksen mukaisesti. Suodatuskalvo asetettiin selektiiviselle CN-agar alustalle ja maljoja inkuboitii + 37 °C lämpötilassa kahden vuorokauden ajan. Taulukossa 1 suodatustilavuudet on esitetty näytekohtaisesti, jossa talousvettä, pakattua vettä ja steriiliä vettä on kuvattu kirjainkoodein T, S ja P.

Taulukko 1. Suodatettavat tilavuudet näytekohtaisesti.

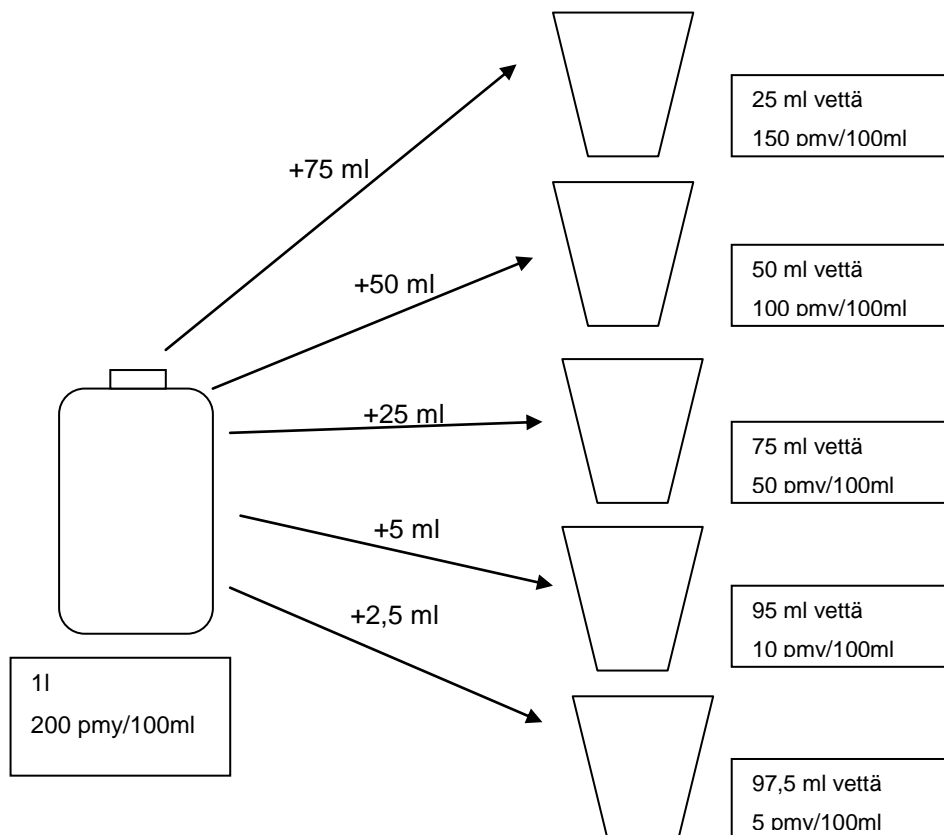
Näyte	Tavoitepitoisuus	Suodatusmäärä
1T-3T	5 pmy/100 ml	100 ml
4T-6T	10 pmy/100 ml	100 ml
7T-9T	100 pmy/100ml	100 ml + 1/10 laimennos
10T	0 -kontrolli	100 ml
1S-3S	5 pmy/100 ml	100 ml
4S-6S	10 pmy/100 ml	100 ml
7S-9S	100 pmy/100ml	100 ml + 1/10 laimennos
10S	0 -kontrolli	100 ml
1P-3P	5 pmy/250pmy	250 ml
4P-6P	20 pmy/250pmy	250 ml
7P-9P	250 pmy/250pmy	250 ml + 1/10 laimennos
10P	0 -kontrolli	250 ml

Laboratoriossa käytettävä suodatuslaitteisto on suunniteltu pääasiassa vesinäytteiden mikrobiologiseen laaduntarkkailuun. Laitteisto koostuu steriloinnin kestävästä suodatusosasta sekä erillisestä elektronisesta steriilisti pakattuja kalvosuodattimia annostelevasta osasta. Laitteistoon kuuluu lisäksi polypro-

peenista valmistettuja 250 ml suppiloita, jotka voidaan steriloida autoklavoimalla noin 50 kertaa. Validoinnissa käytetyn suodatuslaitteiston valmistaja on Schleicher & Schuell ja malli MBS I. (Schleicher&Schuell, 24)

### 6.5 Lineaarisuusmäärittäminen

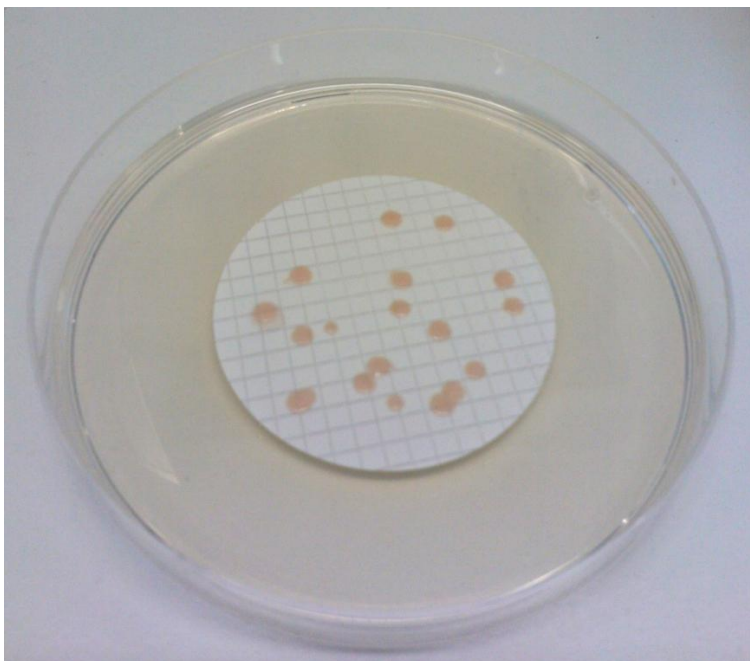
Lineaarisuusmäärittämiä varten suodatukset tehtiin talousvedestä. Suodatustilavuus oli 100 ml ja määrittäksessä käytettiin edellä mainittuja kantoja. Lineaarisuuteen otettiin mukaan nollanäytteen lisäksi kuusi muuta pitoisuutta välillä 5 pmy/100 ml – 200 pmy/100 ml. Lineaarisuutta varten valmistettiin yksi litran näyte, jonka pitoisuus oli noin 200 pmy/100 ml ja tästä laimentamalla saatiin kaikki muut pisteet. Kuvassa 5 on esitetty lineaarisuusmäärittästä varten tehty suunnitelma, jossa on kuvattu näytteen laimentaminen suodatuksen yhteydessä. Määrittästä varten ympäri valmistettiin ja liemikasvatukset viljeltiin PC-agarille kuvan 4 mukaisesti.



Kuva 5. Lineaarisuuden laimennuskaavio.

## 6.6 Maljojen lukeminen

Maljoilla tutkittiin kasvu  $22\pm 2$  h ja  $44\pm 4$  h jälkeen. Pesäkkeiden lasku tulee suorittaa  $22\pm 2$  h jälkeen, jos maljoilla näyttää olevan liikakasvua tai pesäkkeiden yhteensulautumista. Näin ei kuitenkaan ollut, joten tulokset luettiin  $44\pm 4$  h jälkeen. Tyypilliset pyosyaniinia tuottavat *P. aeruginosa* pesäkkeet kasvavat CN-agarilla sinivihreinä pesäkkeinä eikä niitä tarvitse varmistaa. Varmistettavia pesäkkeitä ovat kaikki muut fluoresoivat tai punaruskeat pesäkkeet. Kuvassa 6 on esitetty pesäkkeitä, jotka eivät ole värjäytyneet pyosyaniinin vaikutuksesta sinivihreiksi, mutta kuitenkin fluoresoivat UV-valossa. Maljat, joilla kasvoi korkeintaan 100 pesäkettä, otettiin mukaan laskentaan.



Kuva 6. Varmistettavia *P. aeruginosa* pesäkkeitä CN-agarilla.

## 6.7 *Pseudomonas aeruginosa* varmistustestit

Varmistuksia varten jatkoviljeltiin viisi ei-tyypillistä *P. aeruginosa* -pesäkettä Nutrient-ravintoagarille. Vuorokauden inkuboinnin jälkeen pesäkkeiden kyky muodostaa fluoresoivaa väriainetta tutkittiin UV-lampun alla aaltopituudella 366 nm. Fluoresoivista pesäkkeistä testattiin ammoniakkin muodostuminen asetamidi-

liemessä lisäämällä muutama tippa Nesslerin reagenssia asetamidiputkeen, johon pesäkettä oli siirrostettu edeltävänä päivänä. Värimuodostumisreaktion tapahtuessa pesäkkeet todettiin varmistuneiksi *P. aeruginosa* -pesäkkeiksi. Reaktiossa muodostuvan värin voimakkuus vaihtelee keltaisesta tiilenpunaiseen riippuen ammoniakkin pitoisuudesta (Kuva 7). Varmistustesteissä positiivisena kontrollina käytettiin *P.aeruginosaa* ja negatiivisena kontrollina *E.colia*.



Kuva 7. Värireaktio Nesslerin reagenssin lisäyksen jälkeen.

Kalvosuodattimella voi kasvaa myös punertavanruskeita ei-fluoresoivia pesäkkeitä. Tällaiset pesäkkeet varmistetaan asetamiditestin lisäksi oksidaasitestillä. Lisäksi oksidaasiposiitiviset pesäkkeet jatkoviljellään King B - alustalle ja mahdollista fluoresointia tarkkaillaan viiden vuorokauden ajan.

## 6.8 Osallistuminen vertailututkimuksiin

Validoitavalla menetelmällä osallistuttiin Eurofins Proficiency Testing - vesikierrokseen, joka sisälsi kaksi näytettä A ja B. Näyte A sisälsi *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria, kun taas näyte B ei. Laborantit eivät tieneet ennen tulosten laskemista, kumpi näytteistä oli positiivinen. Laboratorio menestyi

vertailututkimuksissa. Saaduista tuloksista lasketut z-arvot olivat hyväksyttävästi rajan ( $z = \pm 2$ ) sisällä.

Tulosten vertailussa käytetään apuna z-arvoa, jotta vertailumittaustuloksia voidaan verrata keskenään. z-arvo saadaan laskettua kaavalla  $z = \frac{x - \bar{X}}{s}$ , missä s on keskihajonta, x vertailumittauksesta saatu mittaustulos ja  $\bar{X}$  vastaavasti hyväksytty vertailuarvo. (Mikes 2005, 48)

## TULOKSET

Tulosten laskemisessa käytettiin luonnollista logaritmia, jolloin keskihajonnat kuvaavat alkuperäisten mittausten suhteellisia keskihajontoja (Kenttä E. 2009, 66).

Validointia sekä saatuja tuloksia pidettiin hyväksyttävänä, sillä ne kattoivat laboratorion laatuvaatimukset eikä validoinnin suorituksen aikana havaittu epävarmuustekijöitä. Laboratorio asettamat kriteerit menetelmälle täyttämään laatuvaatimukset olivat seuraavat: menetelmän todetaan olevan tarpeeksi herkkä ja spesifinen verrattuna laboratorion käytössä oleviin menetelmiin, laboratorion henkilökunta hallitsee menetelmän suorittamisen itsenäisesti ja laboratorio menestyy hyvin vertailututkimuksissa. Laboratoriolla ei asettanut numeerisia kriteereitä suureille.

### 7.1 Toistettavuus

Toistettavuudessa laskettiin laboranttien tekemien rinnakkaismäärittelyksen paikansapitävyys tekijäkohtaisesti jokaisella matriisilla. Tuloksista laskettiin keskihajonta kaavalla  $s = \sqrt{\frac{\sum(x-ka)^2}{n-1}}$ , jossa saadun tuloksen logaritmista arvoa kuvataan x-kirjaimella, ka on tulosten logaritminen keskiarvo ja n tulosten lukumäärä.

Toistettavuuden keskihajonnat vaihtelivat hyväksyttävästi välillä  $s = 0,05 - 0,17$  riippuen tekijästä ja matriisista.

### 7.2 Uusittavuus

Uusittavuus laskettiin kahden eri laborantin tuloksista, jotka tekivät toisiaan vastaavat rinnakkaiset suodatukset. Saaduista tuloksista laskettiin laboranttien parittaisten tulosten keskihajonta kaavalla  $s = \sqrt{\frac{(\ln A - \ln B)^2}{2n}}$ . Kaavassa A ja B ovat

laboranttien saamat tulokset ja n laborantin tekemien suodatusten lukumäärä yhtä pitoisuustasoa kohden.

Uusittavuudelle lasketut arvot olivat välillä  $s = 0,08-0,23$ . Tuloksiin otettiin mukaan kahden alimman pitoisuustason tulokset kaikilla kolmella matriisilla.

### 7.3 Oikeellisuus

Oikeellisuus määritettiin siirrostetuilla vesinäytteillä, joiden mikrobipitoisuus tunnettiin. Tulos laskettiin matriisikohtaisesti keskihajonnan kaavalla

$s = \sqrt{\frac{(\ln A - \ln B)^2}{2n}}$ . Laskennassa käytettiin logaritmisia arvoja, jolloin kaavassa A ja

B ovat laboranttien saamat tulokset ja n laborantin tekemien suodatusten lukumäärä yhtä pitoisuustasoa kohden.

Oikeellisuudeksi *Pseudomonas aeruginosa* talousvedessä laskettiin 0,18, pakatussa vedessä 0,33 ja steriilissä vedessä 0,09. Oikeellisuus oli parempi steriilissä vedessä kuin talousvedessä ja pakatussa vedessä, mikä todennäköisesti johtuu talousveden ja pakatun veden sisältämistä kemikaaleista sekä muista aineista.

Oikeellisuutta pakatun veden osalta ei voida pitää täysin luotettavana, sillä tulosta laskettaessa ympin pitoisuutena käytettiin PC-agarilla ja CN-agarilla kasvaneiden pesäkkeiden prosentuaalista eroa, joka määritettiin kolmen PC/CN -parin avulla. *P. aeruginosa* ympin pitoisuutta ei saatu määritettyä PC-agarilta pesäkkeiden levinneisyyden takia. Tästä johtuen määrittämissä saadut tulokset olivat huomattavasti suuremmat kuin PC-maljojen perusteella niiden teoreettinen arvo.

### 7.4 Saanto

Menetelmän matriisikohtaiset saannot saatiin analyysituloksen suhteesta matriisiin lisätyn tunnetun bakteeripitoisuuden laskennallisesta arvosta.

Saantoprosentit talousvedessä vaihtelivat välillä 61- 92 % ja steriilissä vedessä välillä 82- 95 %. Matriiseihin siirrostetuilla näytteillä lasketut saannot olivat hyväksyttäviä ja enimmäkseen lähellä 85 % - 95 %:ia. Poikkeamat tästä johtuivat todennäköisesti pienistä siirrostusmääristä.

Saantoprosentit pakatun veden osalta olivat yli 100 % eikä niitä voitu pitää luotettavina. Saantoa laskettaessa jouduttiin ympin pitoisuus määrittämään vastaavasti kuin kohdassa 7.3 Oikeellisuus on kuvattu.

### 7.5 Määritysraja

Määritysraja määritettiin laboranttien suodatusten perusteella. Alhaisin pitoisuus, josta bakteeri saatiin toistettavasti esiin, oli noin 1,07 pmy/100 ml. Useiden rinnakkaisten määritysten perusteella rajaksi voitiin luotettavasti ilmoittaa 1 pmy/100 ml.

### 7.6 Lineaarisuus

Lineaarisuus määritettiin talousvedestä rinnakkaisin määrityksin ja korrelaatiokertoimeksi saatiin  $R^2 = 0,98$ . Korrelaatiokerroin kuvaa tulosten riippuvuutta näytteiden pitoisuuteen, joka tässä tapauksessa oli lähes täydellistä.

### 7.7 Spesifisyys

Selektiivisyys on hyvä *Pseudomonas* agarilla, joka on suunniteltu erityisesti *P. aeruginosan* tunnistukseen. Menetelmässä häiritsevä kantana käytettiin *E.colia*, mutta sen kasvua ei maljoilla havaittu.

*Pseudomonas*-agarilla saattaa kasvaa joitakin enterobakteeri-suvun lajeja. Agarin spesifisyys *P. aeruginosaa* kohtaan perustuu magnesiumkloridiin ja kaliumsulfaattiin, jotka tehostavat sinivihreän pigmentin tuottoa. (Oxoid. 2015.)



## 7.8 Mittausepävarmuus

Yhdistetyn mittausepävarmuuden arvoksi määritettiin 21 %, joka on hyväksyttävä, ja samaa tasoa muiden laboratoriossa suoritettavien analyysien mittausepävarmuuksien kanssa. Kokonaismittausepävarmuus laskettiin suodatussuppiloiden epävarmuuden ja laboratorion lukemaepävarmuuden avulla.

## YHTEENVETO

Opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida menetelmä liittyen *Pseudomonas aeruginosa*-bakteerin havainnointiin ja lukumäärän määrittämiseen kalvosuodatus-tekniikalla. Validointi oli tarpeellista suorittaa, koska uusi menetelmä haluttiin lisätä laboratorion tarjontaan akkreditoituna menetelmänä. Validoinnissa osoitettiin *Pseudomonas aeruginosa*-bakteerin SFS-EN ISO 16266:2008 -määrittämenetelmän toimivuus talousveden ja pakatun veden analysoinnissa Eurofins Scientific Finland Oy Food & Agro:n Rasion mikrobiologisessa laboratoriossa.

Validointi suoritettiin nopeassa aikataulussa, mutta osaavan laboratoriohenkilökunnan avulla työ saatiin suoritettua aikataulun puitteissa ja menetelmä ehti seuraavaan akkreditointitarkastukseen, josta saatu palaute oli pääosin positiivista. Kalvosuodatusmenetelmä oli laboranteille jo entuudestaan tuttu, joten haastavaksi validoinnin suorituksessa koettiin *P. aeruginosa* -tunnistus ja tulosten laskeminen. Pesäkkeillä on taipumusta levitä maljalla, mikä hankaloittaa laskemista. Pesäkkeiden mahdollisen leviämisen tai ylikasvun kannalta on tärkeää käydä maljat läpi vuorokauden inkuboinnin päästä vaikka lopulliset tulokset laskettaisiinkin 48 tunnin jälkeen. Pesäkkeet kasvoivat maljalla kellertävästä väristä vihreään ja siksi pesäkkeiden värin tulkinta yhdenmukaisesti oli vaativaa. Osittain myös tämän takia uusittavuuden ja toistettavuuden tuloksissa on havaittavissa vaihtelua.

Validointi jouduttiin toistamaan yhden matriisin osalta pesäkkeiden heikon kasvun takia. Ratkaisuna puhdasviljelmät uusittiin, jonka jälkeen bakteerien elinvoimaisuus oli huomattavasti parempi. Validoinnissa saatiin hyväksyttäviä tuloksia kaikille suureille eikä määritetty väriä positiivisia tai negatiivisia tuloksia. Siirrostetuilla vesinäytteillä ja määritetyillä suureilla validoinnin todettiin täyttävän laboratorion laatuvaatimukset, ja laboratorio osoitti olevansa pätevä käyttämään menetelmää.

Opinnäytetyön aikataulun puitteissa menetelmä saatiin validoitua, jolloin sille voitiin hakea akkreditointia. FINAS-akkreditointipalvelusta esitettiin muutama poikkeama, jotka vaaditaan hyväksytyyn akkreditointiin. Validointia jatketaan opinnäytetyön jälkeen ottamalla määrittämiin mukaan toinen *Pseudomonas*-suvun bakteeri. Tällöin voidaan todentaa, että CN-agar on spesifinen vain *P. aeruginosalle*. Lisäksi voidaan olla varmoja, ettei elatusaineella kasva muita *Pseudomonas*-suvun bakteereita. Suodatukset on riittävää tehdä suppeammin vain yhdellä matriisilla.

## LÄHTEET

- Chen, F. 2005. Metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* under simultaneous aerobic respiration and denitrification. Viitattu 9.3.2015. [https://etd.ohiolink.edu/!etd.send\\_file?accession=akron1133809898&disposition=inline](https://etd.ohiolink.edu/!etd.send_file?accession=akron1133809898&disposition=inline)
- Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics inc. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*. Viitattu 9.3.2015. [http://www.pseudomonas.com/p\\_aerug.jsp](http://www.pseudomonas.com/p_aerug.jsp)
- Eurofins. 2015. Yritys. Viitattu 27.4.2015 <http://www.eurofins.fi/>
- Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2009/54/EY. 2009. Luontaisten kivennäisvesien hyödyntämisestä ja markkinoille saattamisesta. Viitattu 9.3.2015. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0054&from=FI>
- European Committee for Standardization. 2008. ISO 16266:2006 Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Method by membrane filtration. Bryssel.
- Evira. 2007. Mittausepävarmuus kvantitatiivisissa mikrobiologisissa määrittelyissä. Viitattu 28.4.2015 <http://www.evira.fi/portal/fi/tietoa+evirasta/haku/?q=Evira.%202007.%20Mittausep%C3%A4varmuus%20kvantitatiivisissa%20mikrobiologisissa%20m%C3%A4%C3%A4rityksiss%C3%A4>
- Finas. 2015. Mitä on akkreditointi? Viitattu 27.4.2015 <http://www.finas.fi/frameset.aspx?url=finas.aspx%3fcategoryID=2>
- Finatex. 2015. Standardi. Viitattu 9.3.2015. <http://www.finatex.fi/standardisointi/standardi.html#.VP13HOEprSN>
- Finlex. 2015a. Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista. Viitattu 9.3.2015. <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2000/20000461>
- Finlex. 2015b. Maa- ja metsätalousministeriön asetus pakatusta vedestä. Viitattu 16.3.2015. <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2010/20100166>
- Kenttä E. 2009. Mittausepävarmuuden kahden lähestymistavan vertailu. Opinnäytetyö. Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma. Metropolian ammattikorkeakoulu. Viitattu 16.3.2015 <http://www.theseus.fi/handle/10024/2794>
- Lau,G; Hassett,D; Ran,H; Kong,F. 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. TRENDS in molecular medicine. Vol.10 No.12. Saatavissa <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.turkuamk.fi/science/article/pii/S1471491404002606>
- Medscape. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Viitattu 9.3.2015. <http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview>
- Mikes. 2005. Kemian metrologian opas. Julkaisu J6/2005. Helsinki: Metrologian neuvottelukunta.
- Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Valvonta 13/1997. Helsinki: Elintarvikevirasto.
- Oxoid. 2015. *Pseudomonas* agar base. Viitattu 16.3.2015. [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0559](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0559)
- Oy WatMan Ab. 2015. Käänteisosmoosi. Viitattu 13.4.2015. <http://www.watman.fi/k%E4%E4nteisosmoosi/>
- Salkinoja-Salonen, M. 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Schleicher & Schuell, MicroScience. Productus. Viitattu 29.4.2015  
[http://www.elta90.com/pdf\\_docs/MiBi-Katalog%20I.pdf](http://www.elta90.com/pdf_docs/MiBi-Katalog%20I.pdf)

## Elatusaineiden sekä rikastus- ja laimennusliuosten koostumukset

### Plate Count Agar (PC-agar)

Reagenssi	Määrä (g/l)
Tryptoni	5,0
Hiivauute	2,5
Glukoosi	1,0
Agar	9,0

pH 7,0 ± 0,2 (25°C)

### Pseudomonas agar (CN-agar)

Reagenssi	Määrä (g/l)
Liivatepeptoni	16,0
Kaseiinihydrolysaatti	10,0
KSO <sub>4</sub>	10,0
MgCl <sub>2</sub>	1,4
Agar	11,0

pH 7,1 ± 0,2 (25°C)

### Nutrient agar

Reagenssi	Määrä (g/l)
"Lab-Lemco" jauhe	1,0
Hiivauute	2,0
Peptoni	5,0
NaCl	5,0
Agar	15,0

pH 7,4 ± 0,2 (25°C)

Maximum Recovery Diluent (MAX)

Reagenssi	Määrä (g/l)
Peptoni	1,0
NaCl	8,5

pH 7,0 ± 0,2 (25°C)

Brain Heart Infusion Broth

Reagenssi	Määrä (g/l)
Brain heart solids	12,5
Beef heart infusion solids	5,0
Proteose peptone	10,0
Glucose	2,0
NaCl	5,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5

pH 7,4 ± 0,2 (25°C)

Asetamidiliuos

Reagenssi	Määrä (g/l)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub>	0,2
Asetamidi	2,0
NaCl	0,2
NaMoO·2HO	0,005
FeSO·7HO	0,0005

pH 7,0 ± 0,5 (25°C)

King B

Reagenssi	Määrä (g/l)
-----------	-------------

Peptoni	20,0
---------	------

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5
---------------------------------	-----

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,5
--------------------------------------	-----

Agar	15,0
------	------

pH 7,2 ± 0,2 (25°C)