

---

**LUMINOMETRISEN ATP-MENETELMÄN  
SOVELTUVUUS ESL-TUOTTEIDEN  
LAADUNTARKKAILUUN**



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö  
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Hämeenlinna, syksy 2016

Kristian Kislov



HÄMEENLINNA

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma  
Elintarviketekniikan suuntautumisvaihtoehto

---

<b>Tekijä</b>	Kristian Kislov	<b>Vuosi</b> 2016
<b>Työn nimi</b>	Luminometrisen ATP-menetelmän soveltuvuus ESL-tuotteiden laaduntarkkailuun	

---

## TIIVISTELMÄ

ESL-tuotteet ovat perinteiseen pastörintiin verrattuna pidemmän säilyvyysajan tuotteita. ESL-tuotteita saadaan aikaan muun muassa korkeapastöroinnilla ja niiden pidempää säilyvyysaika edesautetaan aseptisellä pakkauksella sekä tiukoilla mikrobiologisen laadun kriteereillä.

Elintarvikkeiden mikrobiologista laatua tutkitaan usein perinteisin maljavalumenetelmin, jotka vievät aikaa sekä hidastavat tuottajan varaston kiertonopeutta. ATP-luminometrimenetelmässä bioluminesenssia hyväksikäyttäen saadaan aikaan mikrobien solunsisäisestä ATP:stä johtuva valoreaktio, jonka ATP-luminometri havaitsee ja oikein validoituna ilmaisee elintarvikkeen mikrobiologisen laadun tason.

Tämän opinnäytetyön toimeksiantajana oli Valio Oy Turengin tehdas, ja työn tutkimukset suoritettiin Valio Oy Turengin laadunvalvontalaboratoriossa kesällä 2016. Valio Turengin tehtaalla valmistetaan muun muassa UHT- sekä ESL-meijerituotteita. Tehtaan laadunvalvontalaboratoriossa on käytössä ATP-kuoppalevyluminometri, jota käytetään UHT-tuotteiden mikrobiologisessa laadunvarmistuksessa. Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia, voiko käytössä olevaa ATP-kuoppalevyluminometriä käyttää myös ESL-tuotteiden mikrobiologiseen laadunvarmistukseen vertailemalla perinteisiä maljatekniikoiden tuloksia luminometrin antamiin tuloksiin.

Tutkimuksissa määriteltiin ESL-tuotteiden soveltuvuuden kriteerit käytössä olevaa luminometriä varten. Soveltuvien tuotteiden osalta todettiin indikaattorimikrobitestissä luminometrin kykenevän erottamaan tuotteissa mikrobiperäisiä RLU-arvon kohoumia. Soveltuville tuotteille saatiin määritettyä myös luminometrin antaman RLU-arvon normaali vaihteluväli. Menetelmää ei kuitenkaan onnistuttu ottamaan käyttöön, sillä luminometrin ja referenssimenetelmän välillä oli liian paljon ristiriitaisuuksia. Kehitysehdotuksena päätettiin suurentaa otoskokoa sekä mahdollisesti muuttaa referenssimenettelyjä.

**Avainsanat** ESL, ATP, luminometri, bioluminesenssi, laaduntarkkailu

**Sivut** 32 s. + liitteet 14 s.

HÄMEENLINNA

Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering

Food Engineering

---

**Author**

Kristian Kislov

**Year** 2016

**Subject of Bachelor's thesis**

Applicability of ATP bioluminescence in the microbial quality assessment of ESL products

---

ABSTRACT

ESL products (Extended Shelf Life products) have a longer shelf life compared to traditionally pasteurized products. ESL products are produced by pasteurizing the product in higher temperatures, packaging them in aseptic conditions and with high standards for microbial quality.


The microbial quality of foods is often assessed with traditional plate count methods, which are time consuming and deter the product distribution process. The modern ATP bioluminescence method can be used to detect the light caused by the enzyme reaction with intracellular microbial ATP, the presence of which is an indicator of microbial contamination.

This Bachelor's thesis was commissioned by Valio Oy Turenki plant. The research was done in Valio Oy Turenki plant's quality assessment laboratory in the summer 2016. The products produced by the plant include UHT and ESL products. The laboratory has an ATP luminometric instrument, which is already used for the microbial quality assessment of UHT products. The aim of the thesis was to examine whether the instrument could also be used for the microbial quality assessment of ESL products by comparing the method with the results of the traditional plate count method.

The research defined the criteria to be met by the ESL products for the luminometric assessment in question. The results of the thesis showed that the luminometer proved to be capable of detecting microbial contamination in the indicator microbe test of the selected products. The normal range of RLU results was defined for the uncontaminated products. However, the luminometric method could not be validated successfully due to the differences in the results between the luminometer and the traditional plate count reference method. Further research is required with an increased sample size and a possibly altered reference method.

**Keywords** ESL, ATP, luminometer, bioluminescence, quality control

**Pages** 32 p. + appendices 14 p.



# SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	ESL-TUOTTEET .....	2
2.1	Lämpökäsittely.....	2
2.1.1	Lämpökäsittelyn määritelmä lainsäädännössä .....	2
2.1.2	Lämpökäsittelyn vaikutukset.....	3
2.2	Pakkaus ja varastointi.....	4
2.3	ESL-maitotuotteiden pilaajamikrobit ja kontaminaatiolähteet .....	4
2.4	ESL-maitotuotteita koskeva lainsäädäntö .....	6
3	ATP-LUMINOMETRIT .....	7
3.1	ATP-Bioluminesenssi.....	7
3.2	Luminometrit vs. perinteiset pesäkemääritysmenetelmät .....	9
4	LUMINOMETRISEN ATP-MENETELMÄN SOVELTUVUUS ESL-KÄSITELTYJEN MAITOTUOTTEIDEN LAADUNTARKKAILUUN .....	11
4.1	Tutkimuksen tarkoitus.....	11
4.2	Nykyiset käytännöt ESL-tuotteilla.....	11
4.3	Celsis CellScan Innovate -luminometri.....	12
5	TOTEUTUS.....	15
5.1	Tuotteiden soveltuvuus .....	15
5.2	Kontaminaatiokanta .....	16
5.3	Esikoe.....	17
5.4	Havaintorajan määrittäminen indikaattorimikrobilla.....	18
5.5	Validointikokeilu.....	20
6	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU .....	21
6.1	Esikoe.....	21
6.2	Havaintorajan määrittäminen indikaattorimikrobilla.....	22
6.3	Validointikokeilu.....	24
6.3.1	Pilaantuneet näytteet.....	25
6.3.2	RLU-arvon vaihteluvälit.....	26
7	JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA .....	27
	LÄHTEET .....	30
Liite 1	NÄYTTEENOTTO VIIKOLLA A	
Liite 2	ESIKOKEEN ATP- (RLU) JA PESÄKETULOKSET (PMY) 1 & 2 VRK JÄLKEEN	
Liite 3	TUOTTEIDEN SOVELTUVUUSTESTAUS	
Liite 4	NÄYTTEENOTTO VIIKOLLA B	
Liite 5	VALIDOINTIKOKEEN TULOKSET	

## 1 JOHDANTO

Nykyisin niin kuluttaja kuin viranomainenkin vaativat elintarvikkeilta laatua ja turvallisuutta, joten teollisuudessakin pyritään täyttämään nämä odotukset ja ennen kaikkea minimoimaan huonosta tai viallisesta tuotteesta aiheutuvat tappiot sekä nopeuttamaan tuotteidensa matkaa tuotannosta kuluttajan pöydälle. ATP-luminometritekniikka on kehittynyt viime vuosina niin nopeasti, että näillä menetelmillä on mahdollista saavuttaa tarkempi varmuus elintarvikkeiden kelpoisuudesta kuin perinteisillä menetelmillä ja jopa useita vuorokausia nopeammin kuin perinteisesti. Tämä nopeuttaa elintarvikkeita tuottavan yrityksen varastojen kiertoa nopeuksia, vähentää takaisinveitoja ja lisää luotettavuutta laadunvalvonnassa; näin säästetään luontoa, sillä nykyiset, perinteiset menetelmät ovat hitaita, usein epätarkkoja sekä aiheuttavat runsaasti muun muassa muovijätettä.

Nykyisin on kehitelty runsaasti erilaisille elintarvikkeille soveltuvia ATP-luminesenssiin perustuvia laadunvarmistusmenetelmiä, joiden kehittäjät ja laitevalmistajat lupaavat paljon menetelmien toimivuudesta. Menetelmien käyttöönottoa edeltää kuitenkin yleensä pitkä ja monivaiheinen validointiprosessi, jolla kyetään varmistamaan menetelmien sopivuus halutuille tuotteille sekä määrittämään rajat ja rajoitukset käytettäville laadunvarmistusmenetelmille. Validoinnit ovatkin täysin tuotekohtaisia, joten toimivan laadunvarmistuksen ehtona on tarkkuus, kärsivällisyys sekä määrätietoisuus.

Opinnäytetyössä perehdytään ESL-tekniikkaan, ESL-tuotteiden ominaisuuksiin sekä tarkastellaan lainsäädännön määräytyksiä ja sen asettamia rajoituksia tuotteille. Lisäksi työssä perehdytään ATP-bioluminesenssiin kemiallisena ilmiönä, ATP-luminometreihin sekä vertaillaan luminometrisiä laitteita perinteisiin mikrobiologisiin laadunvarmistusmenetelmiin. Kokeellisen osion tutkimustavoitteena oli ATP-luminometrisen laadunvarmistusmenetelmän soveltuvuuden arviointi sekä käyttöönoton selvitys Valio Turengin tehtaalla valmistettaville ESL-tuotteille. Tutkimukset tehtiin Valio Turengin laboratoriossa kesällä 2016.

## 2 ESL-TUOTTEET

ESL on lyhenne, joka tulee englannin kielen sanoista *extended shelf time*. Kirjaimellisesti tämä tarkoittaa ”pidennetty säilyvyysaika”, mikä onkin tämän käsittelymenetelmän päätavoite. (Maito ja Terveys 2016; Valio 2015; Rysstad & Kolstad 2006.)

ESL-maitotuotteita on ollut markkinoilla maailmalla (mm. Yhdysvallat sekä Kanada) jo 1960-luvun alkupuolelta, jolloin menetelmällä valmistettiin pienempivolyymisiä tuotteita, kuten vispikermaa ja kahvikermää, näiden säilyvyyden pidentämiseksi sekä kaupassa että kotona (Rysstad & Kolstad 2006). Suomessa vielä vuonna 2011 Valion internet-sivuilla kirjoitetun esittelyartikkelin mukaan ESL-tekniikkaa pidettiin verrattain uutena käsittelymenetelmänä (Valio 2011). Tästä on osoituksena myös se, etteivät ESL-tuotteet ole eurooppalaisissa ruokakaupoissa vielä kovin yleisiä ja häviävät tuotantomäärissä pastöroiduille sekä UHT-käsitellyille (engl. *ultra-high temperature processing*, iskukuumennus) tuotteille (Rysstad & Kolstad 2006).

Yleisesti ESL-tuote määritellään maailmalla tuotteeksi, jonka säilyvyysaika on pidempi kuin pastöroidun tuotteen, mutta sille ei ole tehty UHT-käsittelyä (Koutchma & Barnes 2013; Rysstad & Kolstad 2006). Pastöroidu maito säilyy valolta ja hajuilta suojattuna +2...+8 °C:ssa vähintään 6 vuorokautta pakkauspäivästä (Milk Works n.d.a). Näin ollen ESL-tuotteeksi voidaan luokitella maitotuotteet, joiden säilyvyysaika on tätä pidempi, sillä laki ei määrittele ESL-menetelmille lainsäädäntövaatimuksia, kuten pastöroinnille (Milk Works n.d.b). Rysstadin ja Kolstadin artikkelissa vuodelta 2006 ESL-tuotteet on määritelty suomennettuna sanoin: ”ESL-tuotteita ovat tuotteet, jotka on lämpökäsitelty mikrobipitoisuuden alentamiseksi pastörointia tehokkaammin, pakattu äärimmäisen hygienian vallitessa ja joiden säilyvyysaika jäähdytettynä on huomattavasti pastöroitua tuotetta pidempi.” Esimerkiksi joidenkin Valion tuotevalikoimaan kuuluvien ESL-tuotteiden säilyvyysaika on jopa 90 vuorokautta pakkaamisesta jäähdytettynä.

### 2.1 Lämpökäsittely

Kuten kaikilla maitotuotteilla yleensäkin, myös ESL-tuotteiden valmistuksessa tuotteiden lämpökäsittely ja sen seuranta ovat äärimmäisen tärkeitä parametreja. Lämpökäsittelyllä on suuri merkitys pilaajamikrobien määrän vähentämisessä sekä varsinkin patogeenimikrobien hävittämisessä, mikä parantaa näin tuotteen turvallisuutta sekä pidentää säilyvyysaikaa. (Buckenhüskes 2014.)

#### 2.1.1 Lämpökäsittelyn määritelmä lainsäädännössä

Pohjois-Amerikassa maitotuotteet luokitellaan pastöroituihin, ultrapastöroituihin (UHT) ja steriloituihin (Rysstad & Kolstad 2006). Euroopassa, mukaan lukien Suomessa, lainsäädäntö jaottelee maidot vain kahteen luokkaan: pastöroituihin ja iskukuumennettuihin (UHT) (Buckenhüskes

2014; Rysstad & Kolstad 2006; Euroopan komission asetus (EY) 2074/2005).

Euroopan komission asetuksen (EY) 2074/2005 mukaan pastöroitu tuote saadaan aikaan käsittelyllä, joka on

- a) ”lyhytkestoinen korkea lämpötila (vähintään +72 °C 15 sekunnin ajan),
- b) pitkäkestoinen matala lämpötila (vähintään +63 °C 30 sekunnin ajan), tai
- c) jokin muu aika- ja lämpötilaolosuhteiden yhdistelmä, jolla saadaan aikaa vastaava vaikutus.”

Vastaavasti asetus (EY) 2074/2005 määrittelee iskukuumennetun (UHT) tuotteen sellaiseksi, joka on saanut käsittelyn,

- a) ”johon kuuluu jatkuva lämpövirta korkeassa lämpötilassa lyhyen ajan (vähintään 135 °C asianmukaiseen käsittelyaikaan yhdistettynä) siten, että käsitellyssä tuotteessa ei ole eläviä pieneliöitä tai kasvukykyisiä itiöitä, kun se säilytetään aseptisissä suljetuissa säiliöissä huoneenlämmössä; ja
- b) joka on riittävä sen varmistamiseksi, että tuotteet pysyvät mikrobiologisesti stabiileina sen jälkeen, kun niitä on inkuboitu 15 päivän ajan +30 °C:ssa suljetuissa säiliöissä tai 7 päivän ajan +55 °C:ssa suljetuissa säiliöissä, tai jonkin muun menetelmän jälkeen, jolla osoitetaan, että tuotteille on tehty asianmukainen lämpökäsittely.”

## 2.1.2 Lämpökäsittelyn vaikutukset

Lämpökäsittelyn, eritoten hallitsemattoman lämpökäsittelyn, seurauksena maitotuotteessa saattaa ilmetä myös ei-toivottuja muutoksia. Näistä huomattavimpia ovat ravintoarvojen huononeminen, ei-toivottu maun muutos (esimerkiksi keitetyn maku), värimuutokset, viskositeettimuutokset sekä kermoutuminen. (Walstra, Wouters & Geurts 2006, 228.)

Pastörointi on maitoteollisuudessa yleisessä käytössä oleva, suhteellisen lievä lämpökäsittely. Pastöroinnin tarkoituksena on tuhota tuotteesta patogeenit, eli terveydelle haitalliset mikrobit. Pastörointiprosessissa maito kuumennetaan pastöörissä vähintään +72 °C:een 15 sekunnin ajaksi, minkä jälkeen se jäähdytetään nopeasti alle +6 °C (Arla 2016; Valio 2015). Tällainen pastöroinnin lämpötilan nosto ei aiheuta maidon kemialliseen koostumukseen, ravintoarvoon eikä makuun haitallisia muutoksia (Valio 2015).

Pastöroinnissa käytettävä lämpökäsittelylämpötila ei kuitenkaan riitä tuhoamaan kaikkia mikrobeja, minkä vuoksi myös sen säilyvyysaika on rajallinen, eli melko lyhyt. Tästä syystä UHT- eli iskukuumennuskäsittelyllä pyritään hävittämään tuotteesta kaikki mahdollisen mikrobit, jolloin säilyvyysaika pitenee huomattavasti. Tuote kuumennetaan vähintään +135 °C:een 1–4 sekunniksi ja pakataan aseptisesti, jolloin tuote säilyy huoneenlämmössä jopa useita kuukausia. (Arla 2016; Valio 2015.)

UHT-käsittelyn kääntöpuolena on tuotteen kemiallisen koostumuksen mahdollinen muuttuminen korkean lämpötilan vuoksi, mikä saattaa heikentää esimerkiksi aistittua makua (keitetyn maku) (Buckenhüskes 2014). Tästä syystä ESL-tuotteisiin käytetään lämpökäsittelyä niin sanottua korkeapastörintimenetelmää. Korkeapastörinti osuu lämpötilansa puolesta pastöroinnin ja UHT-käsittelyn väliin. Korkeapastöroinnissa tuotetta kuumennetaan +125...+135 °C:een 0,5–2 sekunnin ajan (Arla 2016; Valio 2015; Buckenhüskes 2014). Käytetyt lämpötilat vaihtelevat myös sen mukaan, käytetäänkö suoraa vai epäsuoraa lämpökäsittelyä (Rysstad & Kolstad 2006; Walstra ym. 2006, 430).

Suomen suurimpien maidontuottajien Arlan sekä Valion info-sivuilla korkeapastörinti on tulkittu termiksi ”ESL-käsittely” (Arla 2016; Valio 2015), mutta ESL-tuotteiden valmistukseen liittyy paljon muutakin huomioitavaa kuin vain lämpökäsittely, joka yksinään on riittämätön takaamaan pidemmän säilyvyyden tuotteelle (Buckenhüskes 2014).

### 2.2 Pakkaus ja varastointi

Yksi tärkeimmistä vaiheista ESL-tuotteiden valmistuksessa on tuotteen pakkaus, sillä riippumatta suoritetuista lämpökäsittelyistä, kontaminaatio pakkauksen yhteydessä johtaa pilaantuneeseen lopputuotteeseen (Rysstad & Kolstad 2006). ESL-tuotteiden pakkaukseen käytetään aseptisiä täyttökoneita, joiden käyttö varmistaa myös purkitetun tuotteen puhtauden.

Nykyään käytössä olevia aseptisen täytön metodeja ovat muun muassa pakkausmateriaalin desinfiointi vetyperoksidilla ( $H_2O_2$ ), UV-valolla tai molemmilla (Tetra Pak 2016; Rysstad & Kolstad 2006). Käytettäessä matalakonsentraatiollista vetyperoksidia yhdessä UV-valon kanssa, niiden yhteisvaikutus on hyvin tehokas desinfioija, eikä vetyperoksidia näin päädy lopputuotteeseen kuumuudella tehostetun haihtumisen vuoksi (Rysstad & Kolstad 2006). Mikäli pakkaus on esimerkiksi lämpöherkkää muovia, eikä UV-valoa voida täten käyttää, on myös mahdollista käyttää peretikkahappoa ( $C_2H_4O_3$ ) yhdessä vetyperoksidin kanssa, jolloin saavutetaan samanlainen desinfiointiteho (Rysstad & Kolstad 2006). Paineilmallisissa täyttökoneissa on myös riskinä, että puhdistamaton ilma saattaa sisältää kontaminaatiolähteitä. Näin ollen on varmistuttava, että pakkauskoneen ottama ilma on steriiliä, ja muun muassa koneen ottaman ilman HEPA-suodatus laskee ilmaperäisen kontaminaation riskiä. (Tetra Pak 2016.)

### 2.3 ESL-maitotuotteiden pilaajamikrobit ja kontaminaatiolähteet

ESL-tuotteet, kuten maito ja maitotuotteet yleensäkin, ovat erinomainen ravinnonlähde maidon pilaajamikrobeille, jotka ovat bakteereita, homeita tai hiivoja. Toiset mikrobit eivät ole ihmiselle vaarallisia, mutta pilaavat tuotteen käyttökelvottomaksi. Itse maitotuotteen pilaantumisen lisäksi vaarana on, että mikrobi on esimerkiksi myrkkijä tuottava tai sairastumista aiheuttava eli patogeeninen, mikäli se kykenee kasvamaan maidossa. (Walstra ym. 2006, 190.)



Lämpökäsittely on ensisijaisen tärkeä keino hävittää mahdolliset patogeeniset mikrobit maitotuotteista ja taata turvallinen tuote kuluttajalle, ja sama pätee myös ESL-tuotteisiin. Korkeapastörintilämpötila (+125...+135 °C) riittää siihen, että suurin osa yleisistä patogeenisista mikrobeista, kuten *Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ja *Campylobacter jejuni* tuhoutuu, mutta itiöt ovat silti vaarana. Näissä lämpötiloissa myös bakteerit, kuten *Bacillus cereus*, jotka ovat myrkyllisiä suurissa konsentraatioissa, tuhoutuvat. Jotkut mikrobin tuottamat myrkyt ovat lämpökestävämpiä kuin itse mikrobi, esimerkiksi *Staphylococcus* spp., joten raaka-ainemaidon mikrobipitoisuutta on tarkkailtava myös ennen lämpökäsittelyä, sillä mitä mittavampi kontaminaatio on tapahtunut ennen lämpökäsittelyä, sitä suurempi on riski, että osa mikrobeista jää eloon lämpökäsittelyn jälkeen. (Walstra ym. 2006, 202, 225.)

Suurin riskitekijä ESL-prosessin kontaminoitumisessa lämpökäsittelyn epäonnistumisen ohella on jälkikontaminoituminen. Valmiin tuotteen pakkauksen yhteydessä tapahtuva kontaminaatio on johtaa pilaantuneeseen ja mahdollisesti vaaralliseen tuotteeseen riippumatta siitä, onnistuiko lämpökäsittely tai ei. Syitä jälkikontaminaatioon pakkauksen yhteydessä voivat olla esimerkiksi

- pakkauskoneelle vievän putkiston peseytymättömyys
- puutteellinen koneenhoitajan hygienia
- pakkausmateriaalien asiaton säilytys
- pakkauskoneen viat tai vuodot
- pakkauskoneen käyttämän paineilman epäpuhtaus
- viemäristä, lattialta yms. ilmaan lähtevät aerosolit
- riittämätön vetyperoksidin konsentraatio tai UV-valon teho
- pakkausmateriaalin viat tai vuodot.

(Walstra ym. 2006, 416.)

Kun tuote on pakattu, on tärkeää, että pakkaus jäädytetään varastointilämpötilaan nopeasti, eikä lämpötila muutu enää merkittävästi tuotteen elinkaaren aikana. Näin vältetään pilaajamikrobien optimilämpötilat ja mahdollinen selviytyneen mikrobin herääminen lämpökäsittelyn aiheuttamasta shokista. (Rysstad & Kolstad 2006.)

Kirjallisuudessa mainitaan, että aseptisen pakkauksen yhteydessä on erityisen tärkeää ottaa tuotannon aikana mahdollisimman paljon näytteitä mikrobiologisen laadun varmistamiseksi, erityisesti silloin, kun kontaminaatoriski on suurin (esimerkiksi pakkausmateriaalin vaihto, koneen häiriötilat jne.). Näitä näytteitä tulisi inkuboida +30 °C:ssa riittävän pitkään, jotta mahdolliset lämpökäsittelystä henkiin jääneet mikrobit ehtisivät herätä ja monistua havaittaviin pitoisuuksiin, siltä varalta, että pakkaus niitä sisältää. Äärimmäisellä huolellisuudella taataan tuotteen turvallisuus kuluttajalle. (Walstra ym. 2006, 417.)

## 2.4 ESL-maitotuotteita koskeva lainsäädäntö

ESL-tuotteet ovat suhteellisen uusi tuoteryhmä markkinoilla. Siinä missä Pohjois-Amerikassa niitä on ollut saatavilla kaupassa jo 1960-luvulta asti, Euroopassa tuotteita ei ole ollut saatavilla suurissa määrin. Euroopan markkinoilla UHT-käsitellyt maitotuotteet ovat pidennetyn säilyvyysajan maitotuotteista suosituimpia. (Rysstad & Kolstad 2006.)

Komission asetuksessa (EY) n:o 2074/2005 ei mainita korkeapastörintia tai ESL-tuotteita lainkaan, eivätkä tuotteet ominaisuuksiltaan sovi pitkän säilyvyysajan omaavaan UHT-tuotekategoriaan. Lähin kategoria korkeapastöroiduille tuotteille on pastöroinnin kohta c), eli tuote on saanut jonkun muun aika- ja lämpötilaolosuhteiden yhdistelmän, joilla taataan tuotteen mikrobiologinen puhtaus asianmukaisesti pakattuna, jäädytettynä ja varastoituna.

Maitotuotteilla on muiden elintarvikkeiden tapaan lainsäädäntövaatimukset, jotka koskevat niiden mikrobiologista laatua, mikä takaa kuluttajille turvallisen elintarvikkeen. Elintarvikkeissa ei komission asetuksen (EY) n:o 2073/2005 mukaan saa olla mikrobeja tai niiden tuottamia myrkkyjä tai aineenvaihduntatuotteita sellaisissa pitoisuuksissa, että ne niistä olisi vaaraa ihmisen terveydelle. Asetuksessa mainitaan, että elintarvikealan toimijat päättävät itse osana HACCP-omavalvontasuunnitelmaansa tuotteidensa tarvitsemat näytteenotto- ja testaustiheyden mikrobiologisille testeille. Asetuksessa todetaan, että eri käytettävät määritysmenetelmät antavat erilaisia tuloksia, joten kaikilla mikrobiologisilla vaatimuksilla on tietty standardivertailumenetelmä. Elintarvikkeen tuottajien ei kuitenkaan ole välttämätöntä käyttää asetuksessa määrättyjä vertailumenetelmiä, vaan menetelmien käyttö on tuottajan harkinnan varaisena, kunhan se tuottaa vastaavia tuloksia kuin vertailumenetelmä.

Komission asetuksen (EY) n:o 2073/2005 mukaan pastöroidun maidon ja muiden pastöroitujen nestemäisten maitotuotteiden enterobakteeripitoisuus valmistusprosessin lopussa pitää olla <1 pmy/ml.

Erillinen lausunto on annettu erityisesti *Listeria monocytogenes* -bakteerin pitoisuudesta elintarvikkeissa. Sen mukaan kaikissa elintarvikkeissa pitoisuus pitäisi olla alle 100 pesäkettä muodostavaa yksikköä grammaa tai millilitraa kohden (pmy/ml), eikä sitä saa esiintyä 25 grammassa lainkaan, ennen kuin tuote on poistunut tuottajan valvonnasta. (Komission asetus (EY) n:o 2073/2005.)

ESL-tuotteilla ei ole omaa kategoriaa lainsäädännössä, joten ESL-tuotteet noudattavat pitkälti pastöroitujen tuotteiden vaatimuksia, eli tuotteista ei tulisi löytyä lainkaan *Listeria monocytogenesiä* ja enterobakteerien pitoisuus tulee olla <1 pmy/ml. Lisäksi elintarviketuottajan on valvottava, että raaka-aineiden hankinta, käsittely ja jalostaminen toteutuvat hygieniavaatimukset täyttäen. (Komission asetus (EY) n:o 2073/2005). Näiden lisäksi voidaan määrittää tuotteesta esimerkiksi kokonaispesäkemäärä per millilitra, mikä antaa yleiskuvan voimakkaasti lämpökäsitellyn tuotteen laadusta ja lämpökäsittelyn onnistumisesta. Esimerkiksi UHT-tuotteet ovat voimakkaan lämpökäsittelynsä vuoksi käytännössä steriilejä, jolloin niiden

pmy/ml tulisi olla  $<1$  pmy/ml. Samaa käytäntöä toteutetaan myös ESL-tuotteille elintarviketuottajan omavalvontasuunnitelmassa sekä riskianalyysissä (Valio 2016).

On myös huomioitavaa, että ESL-tuotteen ei tarvitse välttämättä olla korkeapastöroitu eivätkä lainsäädökset määrittele nimenomaan ESL-tuotteiden lämpökäsittelyä millään tavalla, vaan termi liittyy yksinomaan pidempään säilyvyysaikaan. Näin ollen ESL-tuotteena voi myydä myös tuotetta, joka on saanut UHT-lämpökäsittelyn ja aseptisesti pakattu. Tuote on tällöin käytännössä mikrobivapaa ja omaa selvästi pidemmän säilyvyysajan. (Walstra ym. 2006, 430.)

### 3 ATP-LUMINOMETRIT

Termi ATP-luminometri tulee sanoista ATP eli adenosiinitrifosfaatti, sekä luminometri, joka tarkoittaa käytännössä samaa kuin fotometri, eli suomeksi valonmittauslaite. ATP-luminometrien havaitsema valonlähde on peräisin nimenomaan bioluminesenssi-ilmioista.

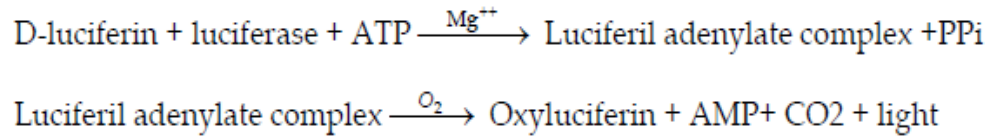
ATP-luminometrit ovat alun perin 1950-luvun aikoihin NASAn (National Aeronautics and Space Administration) kehittämä menetelmä avaruusalusten puhtauden tarkkailuun, tarkoituksenaan myös Maan ulkopuolisen mikrobiologisen elämän havaitseminen (AIB International 2013; Valigra 2010). Avaruusaluksista ja avaruudesta menetelmää kehitettiin elintarviketeollisuuteen, missä enenevässä määrin kuluttaja sekä valvontaviranomaiset vaativat laatua ja elintarvikkeiden turvallisuutta, sekä elintarvikkeita valmistavat tahot pidempää säilyvyysaikaa (Griffiths 1993).

ATP-luminometrit ovat nykyään jo laajalti yleistyneitä laitteita, jotka tähtäävät muun muassa nestemäisten elintarvikkeiden, erilaisten pintojen, kuten teollisuuslaitteiden ja työtasojen, ilman ja veden mikrobiologiseen puhtaustarkkailuun ja laadunvarmistukseen sekä tuoteturvallisuuteen (AIB International 2013; Shama & Malik 2013; Valigra 2010). Laitteita on perinteisistä injektioivista pöytämalleista taskukokoisiin ja kannettaviin malleihin, joissa näytteen ottaminen tapahtuu pyyhkäisemällä tutkittavaa pintaa esimerkiksi pumpulipuikolla (Valigra 2010).

ATP-luminometrien toiminta perustuu biologiseen valoilmioon, jota kutsutaan termillä bioluminesenssi (AIB International 2013).

#### 3.1 ATP-Bioluminesenssi

Bioluminesenssi on eläin-, kasvi-, sieni- ja mikrobimaailmassa usein tavattu ilmiö, jossa kemiallisten reaktioiden kautta organismi kykenee muuntamaan energiaansa valoksi. ATP-luminometreissä toimintaperiaatteena selvästi yleisin käytetty kemiallinen reaktio perustuu alun perin kiiltomaadoista eristettyyn entsyymiin, lusiferaasiin. Bioluminesenssireaktio tapahtuu useassa vaiheessa kuvan 1 (s. 8) mukaisesti. (Chollet & Ribault 2012.)



Kuva 1. Lusiferiinin/lusiferaasin aiheuttamat ATP-bioluminesenssiin pohjautuvat kemialliset reaktiot. (Chollet & Ribault 2012)

Reaktio vaatii lusiferiinisubstraatin, happea, magnesium-kationin sekä ATP-molekyylin. Reaktioissa lusiferiini hapettuu lusiferaasin vaikutuksesta. Reaktion lopputuloksena on luminometrin toiminnan kannalta tärkeintä valon syntyminen, minkä luminometri havaitsee. Valon voimakkuus on suoraan verrannollinen reaktiossa käytettävissä olevan ATP:n määrään. (Chollet & Ribault 2012.) Luminometrin mittaama valon määrä ilmoitetaan yksikössä RLU (*relative light units*, suom. suhteellinen valon mittayksikkö) (AIB International 2013).

Reaktiossa pääosassa on ATP-molekyyli. Kaikki toistaiseksi tunnetut elävät solut, niin eläinten, kasvien, bakteerien, hiivojen kuin homeidenkin, sisältävät ATP:tä, jota ne käyttävät energianlähteenään (AIB International 2013). Solunsisäinen ATP hajoaa nopeasti solun kuollessa (Bottari, Santarelli & Neviani 2015). Lähes kaikki elintarvikkeet kuitenkin sisältävät ATP:tä, joka ei ole peräisin mikrobeista, kuten esimerkiksi lihatuotteet, joissa saattaa olla lihassolujen sisältämää ATP:tä tai hedelmälihaa sisältävät mehut. Tämä johtaa siihen, että mikäli tuotetta, joka sisältää ei-mikrobiperäistä ATP:tä testataan luminometrillä, saadaan tuloksesta positiivinen, mikä ei näytteen mikrobiologisesta laadusta kerro mitään, sillä tavallinen luminometri ei kykene erottamaan mikrobi-ATP:stä peräisin olevaa valoa muista lähteistä (Dostálek & Brányik 2005.) Ennen näytteen mikrobiologisen laadun selvittämistä, on siitä poistettava ns. taustahäly-ATP (*background ATP*), eli ei-mikrobiperäinen ATP, mitä varten on kehitetty erilaisia liuottimia (Bottari ym. 2015). Taustahäly-ATP:n poisto onnistuu tämän jälkeen esimerkiksi entsyymein, jolloin ei-solunsisäinen ATP hajoaa kemiallisten reaktioiden seurauksena eikä aiheuta häiriötä, jolloin laite mittaa vain halutusta ATP:stä johtuvan valon (Dostálek & Brányik 2005). Esimerkkinä tällaisesta teollisuudessa käytetystä entsyymistä myydään nimikkeellä *ATX lyophilized ATP depletion enzyme*, joka on suomenmennettuna ”kylmäkuivattu ATP:n loppuunkuluttajaentsyymi” (Celsis 2011). Mikäli luminometrillä laadunvarmistusta käytetään tuotteille, jotka sisältävät runsaasti ei-mikrobiperäistä ATP:tä, kuten esimerkiksi hedelmälihaa sisältävät mehut, tulisi tuote esimerkiksi suodattaa tai sentrifugoida taustahäly-ATP:n vähentämiseksi (Bottari ym. 2015).

Bakteereilla, hiivoilla ja homeilla, joita mikrobiologiset elintarvikkeiden pilaajat yleisimmin ovat, omaavat kovan ja suojaavan solurakenteen, soluseinän. Taustahäly-ATP:n hajottua, on mikrobi-ATP:n havaitsemiseksi hajotettava mikrobien solurakenteet, jotta solujen sisäinen ATP vapautuisi, mikä onnistuu erilaisilla kemiallisilla liuottimilla tai mekaanisella solujen rikkomisella. Liuottimien käytössä on kuitenkin vältettävä kemikaaleja, jotka kykenevät vahvistamaan valoreaktiota ja vääristävät näin mitattua

RLU:ta. (Chollet & Ribault 2012.) On huomattava, että mikäli kontaminoivat bakteerit ovat muodostaneet itiöitä, on niitä luminometrillä erittäin hankalaa havaita, sillä itiöiden sisältämä ATP:n määrä jää usein erittäin vähäiseksi. Mikäli testattavan tuotteen esi-inkubointi on lyhyt tai tapahtuu väärässä lämpötilassa mikrobien kannalta, itiöt eivät välttämättä ehdi herätä ja monistua ajoissa, eikä itiöperäistä kontaminaatiota havaita. (Shama & Malik 2013.)

Mikrobisolujen rikkoutuessa niiden sisältämät ATP-molekyylit vapautuvat, jolloin ne pääsevät reagoimaan liuokseen lisätyn lusiferaasi-entsyymin kanssa, mikä aiheuttaa luminometriä havaitseman valoreaktion (Celsis 2011). Luminometri havaitsee aallonpituudeltaan 550–570 nm valon, ja muuntaa sen RLU-yksikköön sen intensiteetin perusteella, joka riippuu käytettävissä olevan ATP:n määrästä (Chollet & Ribault 2012).

### 3.2 Luminometrit vs. perinteiset pesäkemääritysmenetelmät

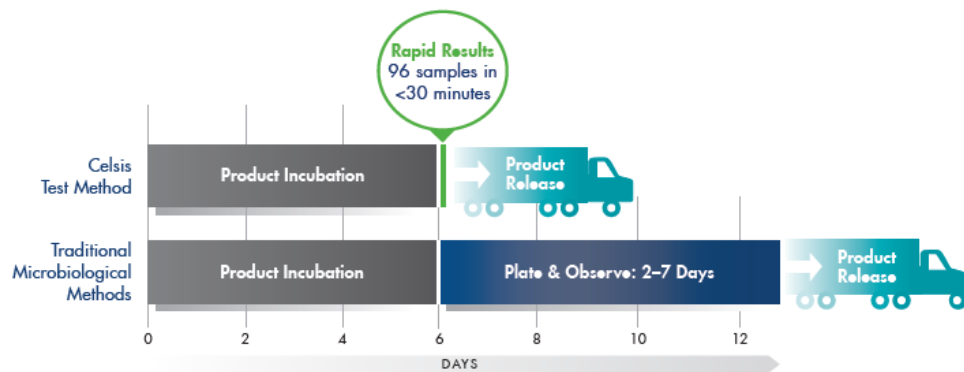
ATP-bioluminesenssimenetelmän kehityksen alkuvaiheessa luminometrit olivat isoja laitteita, joissa näytteet piti esikäsitellä manuaalisesti ja lisätä reagenssit itse pipetoiden (Valigra 2010). Nykyään luminometrit ovat kehittyneet huomattavasti niin kokonsa puolesta kuin automaationkin: pöytämallin luminometri annostelee usein tarvittavat reagenssit itse ohjelmoidussa järjestyksessä, sekoittaa tarvittavan ajan asianmukaisella nopeudella ja antaa tulokset RLU-muodossa suoraan näyttöpäätteelle laitteiden toimittajien kehittämällä ohjelmistolla (Celsis 2015). Pienemmät, esimerkiksi taskukokoiset pintahygienialuminometrit, toimivat pumpulipuikkokapsleilla, jotka sisältävät kaikki tarpeelliset reagenssit, eivätkä vaadi sen monimutkaisempaa asiantuntijakoulutusta. Pintahygienialuminometrit myös antavat tulokset muutamassa minuutissa, verrattuna jopa useamman vuorokauden odotukseen perinteisillä mikrobien kasvatusmenetelmillä. (Hygiena 2016.)

Monet elintarvikkeet ovat herkkiä pilaantumaan tai niiden kontaminaatiovaara on suuri niiden tuotantoprosessin tai pakkauksen yhteydessä. Tuotantoyrityksen asiakkailta on kuitenkin oletettavasti, että kaikki tuotantoerät testataan kontaminaation varalta, ja tuote säilyy ilmoitetun ajan, eikä ole asiakkaan terveydelle vaarallinen, ennen kuin tuote siirtyy tehtaalta jakeiluun. Tuotantolaitoksella on oltava HACCP-omavalvontasuunnitelmat (Hazard Analysis and Critical Control Points, vaarojen arviointi ja kriittiset hallintapisteet) kunnossa, mikä takaa tuotteen lainsäädännöllisen minimilaadun, sillä elintarvikkeilla on lainsäädännössä määritellyt mikrobiologiset rajat. Tämä tarkoittaa, että eristä on otettava omavalvontasuunnitelman mukaisesti säännöllisin ajoin näytteet, ja testattava ne kontaminanttien varalta. (Evira 2016.)

Perinteisiin mikrobiologisiin testausmenetelmiin elintarvikkeille kuuluu muun muassa agarmaljamenetelmä, jossa esimerkiksi UHT-tuotteilla määrätyn pituisen esi-inkuboinnin jälkeen puhdasta tuotetta levitetään eri valuikeille levitystekniikoilla maljoille, ja maljoja inkuboidaan lämpökaapissa jopa useamman vuorokauden ajan, minkä jälkeen lasketaan muodostuneet pesäkkeet (pmy). Luminometrimenetelmällä tuote vaatii ainoastaan esi-

inkuboinnin, minkä jälkeen laite antaa oikein validoituna luotettavan ja usein tarkemman tuloksen tuotteen mikrobiologisesta laadusta kuin mihin perinteisillä tekniikoilla päästään. (Celsis 2015.)

Kuvassa 2 on erään ATP-luminometrilaitevalmistajan realistinen esitys luminometrimenetelmien nopeudesta verrattuna perinteisiin maljavalutekniikoihin. Tällöin sillä aikaa kun maljavaletut näytteet inkuboituvat ja mahdollisesti kasvavat, on luminometriä käyttäen tuote jo lähtenyt eteenpäin jakeluun tai sijaitsee usein jo jakeluvastastolla. Kuvan 2 mukaisesti luminometriset tuotteiden tutkimiset ovat myös melko nopeita, sillä kerralla on mahdollista tutkia kymmeniä, jopa satoja tuotteita luminometrimaljasta riippuen.



Kuva 2. Celsisin näkemys luminometrimääritykseen menevästä ajasta vs. perinteiset menetelmät. (Celsis 2015)

Spesifisten elintarvikkeiden luminometrisellä testauksella on vaatimuksena, että luminometrin antamat tulokset validoidaan yksittäiselle tuotteelle käyttämällä rinnakkaismenetelmänä perinteistä agarmaljaa tai muuta toimivaksi todettua referenssimenetelmää, jolloin varmistetaan, että luminometri soveltuu tuotteen testaukseen. Lisäksi on varmistuttava, että tuote on fysikaalisilta ominaisuuksiltaan sopiva käytettyyn luminometriin. Tuotteen rakenteessa ei saa olla muun muassa isoja, valoa absorboivia partikkeleja eikä tuote voi olla hyvin korkeaviskositeettinen, jolloin reagenssien sekoittumisessa tuotteen kanssa saattaa ilmetä ongelmia, eikä tuotteen tarkka annostelu onnistu. Korkeaviskoosista tai vaimentavia partikkeleita sisältävää tuotetta olisi myös mahdollista laimentaa HEPES-puskurilla häiriöiden poistamiseksi. Tuotteen tulisi myös olla mikrobiologisesti hyvin puhdas: esimerkiksi pelkästään pastöroitujen tuotteiden luminometrin testaus ei näin ollen onnistu, sillä pastöroinnissa lämpökäsittely on sen verran heikko, että esi-inkuboinnin jälkeen mikrobimäärä (pmy/ml) on jo erittäin korkea. Tästä syystä muun muassa ESL- ja UHT-maitotuotteet ovat lämpökäsittelensä ja aseptisen pakkauksensa vuoksi sopivia. (Virtalaine, haastattelu 29.3.2016.)

## 4 LUMINOMETRISEN ATP-MENETELMÄN SOVELTUVUUS ESL-KÄSITELTYJEN MAITOTUOTTEIDEN LAADUNTARKKAILUUN

Työn kokeellinen osuus suoritettiin Valion Turengin tehtaalla laboratoriossa, jossa kaikki tehtaan nykyiset tuotteiden kemialliset ja mikrobiologiset laadunvarmistukset suoritetaan.

Turengin tehdas valmistaa sekä UHT- että ESL-tuotteita. Suurin osa UHT-tuotteiden mikrobiologisesta laadusta mitataan säännöllisesti ATP-luminometrillä. Laboratorion käytössä oleva ATP-luminometri oli merkkiä Celsis CellScan Innovate.

### 4.1 Tutkimuksen tarkoitus

Työn kokeellisen osuuden tarkoituksena oli

- ottaa selvää, voiko ESL-tuotteiden mikrobiologista laatua mitata käytössä olevalla ATP-luminometrillä, ja mitkä tekijät mahdollisesti estävät luminometrin käytön
- määrittää sopiva inkubointiaika tuotteille
- selvittää mahdollisuuksia validoida luminometrinen menetelmä ESL-tuotteille.

Testattavien tuotteiden nimikkeet on toimeksiantajan pyynnöstä muutettu ja tuotteet numeroitiin sattumanvaraisessa järjestyksessä (tuote 1, tuote 2, jne.).

### 4.2 Nykyiset käytännöt ESL-tuotteilla

Valio Turengin laboratoriossa normaalit ESL-tuotteiden mikrobiologisen laadun varmistusmenetelmät ovat perinteisiä maljamenetelmiä. Valio Turengin ESL-tuotteiden laatusuunnitelmien mukaisesti pakkauksen yhteydessä otetaan näytteenottosuunnitelmaa seuraten tuotepurkkeja säännöllisin väliajoin.

Pakkauksen alussa näytteitä otetaan lisäksi kahdeksan kappaletta peräkäistä purkkia molemmilta linjoilta. Tämä takaa sen, että pakkauksessa käytetyn Tetra Pak® TT/3 XH -koneen kaikki pakkausten muotoilutuurnat (kahdeksan kappaletta) tutkitaan tarkemmin mikrobiologisten kontaminaatioiden varalta.

Pakkaustiloista tuodut ESL-tuotepurkit inkuboidaan huoneenlämmössä yhden vuorokauden ajan (24 tuntia), tai useamman, mikäli ajankohta osuu viikonlopulle. Lisäksi osa pakkauksista viedään kylmiöön ja tutkitaan eräpäivän umpeutuessa tuotteen säilymisen laatu. Pakkaukset (kuva 3, s. 12) avataan mahdollisimman aseptisesti, ja aloituspurkeista pipetoidaan steriileillä pipetin kärjillä 1 ml tuotetta kahdelle petrimaljalle. Toiselle maljalle kaadetaan maljavaluna kokonaispesäkemäärän tutkimiseksi mPCA:ta (*Milk Plate Count Agar*, kasvatusalusta) ja toiselle enterobakteerien tutkimiseksi VRBGA:ta (*Violet Red Bile Glucose Agar*, enterobakteerispesifinen kasvatusalusta). Kokonaispesäkemaljoja inkuboidaan yhteensä viisi

vuorokautta huoneenlämmössä (+22 °C), mutta alustava tulos saadaan jo kolmen vuorokauden kuluttua. Enterobakteereista saadaan tulos jo yhden vuorokauden kuluttua +35 °C:ssa.



Kuva 3. Tetra Pak® TT/3 XH -pakkaus koneen muovaaman ja täyttämän pakkauskokoon malli. (Tetra Pak 2016)

Muista kuin pakkauksen aloitusnäytteistä tutkitaan mikrobiininen laatu silmukaviljelyllä. Jaetulle, esivaletulle petrimaljalle levitetään pieni määrä tuotetta steriilillä silmukalla, ja inkuboidaan viisi vuorokautta huoneenlämmössä. Tuloksena tästä on joko positiivinen tai negatiivinen tulos, eli näyte on joko puhdas mikrobeista tai kontaminoitunut. Alustava tulos saadaan jo kolmen vuorokauden kuluttua. Kylmiössä säilytettävien viimeisen käyttöpäivän tuotteista tarkastetaan silmukaviljelyllä mikrobiologinen taso viimeisen käyttöpäivän umpeutuessa samalla tavoin.

Valion asettamat mikrobiologisen kasvun rajat näille ESL-tuotteille ovat äärimmäisen tiukat. Sallitut rajat aloituspurkeille ovat kokonaispesäkemäärän osalta <1 pmy/ml (pesäkkeen muodostava yksikkö yhtä millilitraa kohden) ja enterobakteerien osalta samoin <1 pmy/ml. Silmukaviljelyissä tuloksen on oltava negatiivinen. Muussa tapauksessa epäillyt kontaminoituneet pakkaukset poistetaan ajanjaksolta huuhteisiin ja tarkistetaan tehostetusti ajallisesti seuraavat pakkaukset maljavaluna. Lukuun ottamatta selvästi pilaantuneita purkkeja, kaikki näytteet arvioidaan aistinvaraisesti (haju, maku, ulkonäkö) ennen vapauttamista karanteenivarastosta. (Valio 2016.)

Valio Turengissa maljavaluin ja pintaviljelyin tehdyt ESL-tuotteiden mikrobiologiset varmistukset vievät yhteensä siis 1+5 vuorokautta (1 vrk esiinkubointi + 5 vrk maljojen inkubointi), ennen kuin lopulliset tulokset tuotteiden laadusta saadaan. Tästä syystä luminometrinen laadunvarmistus nopeuttaisi huomattavasti tuotteiden saantia jakeluvarastolle ja eteenpäin.

### 4.3 Celsis CellScan Innovate -luminometri

Valio Turengin laboratorion käytössä oleva ATP-luminometri oli Celsis CellScan Innovate -kuoppalevyluminometri (kuva 4, s. 13). Laite koostui

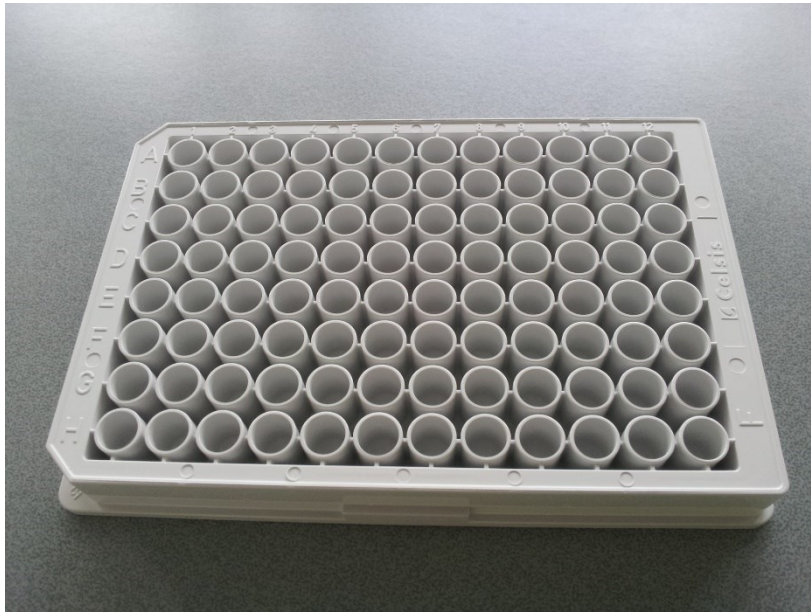


itse luminometriyksiköstä, reagenssien jäädytysalustasta sekä laitteeseen kytketystä tietokoneesta (Windows 7 Enterprise Edition Service Pack 1, 64-bit).



Kuva 4. Celsis CellScan Innovate -kuoppalevyluminometri.

Laitteen käyttäjältä vaadittava toiminta rajoittuu luminometrin virran kytkentään, reagenssien ennallistamiseen sekoittamalla kylmäkuivattu reagenssi ja sen liuotin, reagenssien injektoriputkien pesujen alullepanoon sekä näytteiden pipetointiin luminometrin kuoppalevylle (kuva 5, s. 14). Yhdelle kuoppalevylle mahtuu yhteensä 96 kappaletta näytteitä, kuhunkin kuoppaan pipetoidaan 50  $\mu$ l yhtä näytettä. Kuoppalevy asetetaan luminometriin ja valitaan Innovaten omasta ohjelmasta kullekin kuopalle sisältöä vastaava menettelyprotokolla, jolloin laite suorittaa itse ohjelmoidun mukaisen näytteiden käsittelyn.



Kuva 5. Luminometrin kuoppalevy.

Celsis CellScan Innovate -kuoppalevyluminometri käyttää kolmea eri reagenssia:

- *ATX, lyophilized ATP depletion enzyme*, jonka tehtävänä on kuluttaa mahdollisen ei-mikrobiperäisen taustahäly-ATP:n loppuun.
- *CellSolver, microbial extractant*, jonka tehtävänä on hajottaa näytteissä mahdollisesti olevan kontaminanttimikrobit ja vapauttaa niiden solunsisäiset ATP-molekyylit. *CellSolver*-liuotin on valmistajan mukaan epäspesifinen, ja liuottaa kaikki mahdolliset solut näytteestä.
- *Sensilux, lyophilized luciferase enzyme*, joka on itse lusiferaasientsymyminenkoitus, jonka lisäyksen seurauksena aiheutuu ATP:stä johdettu ja luminometrin havaitsema valoreaktio.

Luminometrin analyysiprosessi oli alun perin kalibroitu ja validoitu ainoastaan tehtaalla tuotettavien UHT-tuotteiden mittaukseen. Luminometrin laitetoimittajan ammattilaisarvion mukaan UHT-tuotteet eivät kuitenkaan teoriassa poikkea merkittävästi tehtaalla valmistettavista ESL-tuotteista rakenteensa eivätkä mahdollisen mikrobisisältönsä puolesta, joten luminometrin käytölle halutuille tuotteille ei olisi estettä. Näin ESL-tuotteiden validoinnissa käytettäisiin samoja analyysiparametrejä kuin UHT-tuotteilla. Celsis CellScan Innovate -kuoppalevyluminometrin UHT-tuotteille ohjelmoitu analyysiprosessi etenee seuraavassa järjestyksessä:

1. Reagenssi 1:n (*ATX*; 60  $\mu$ l) injektointi kuoppalevyyn näytteiden päälle, minkä jälkeen 600 sekunnin pituinen ravistelu neliömäisellä liikkeellä keskivaiheen nopeudella.
2. Reagenssi 2:n (*CellSolver*; 60  $\mu$ l) injektointi kuoppalevyn kuoppiin, minkä jälkeen laite suorittaa taustan mittauksen, johon luminenssin voimakkuutta verrataan.

3. Reagenssi 3:n (*Sensilux*; 60 µl) injektointi kuoppalevyn kuoppiin yksitellen, minkä jälkeen laite mittaa välittömästi tapahtuvan valo-reaktion voimakkuuden.

Laitetoimittajan mukaan 2. ja 3. vaiheen aikana reagenssien injektointinopeus kuoppalevyyn on riittävän voimakas siihen, että reagenssit ja kuoppalevyssä olevan näyteliuos sekoittuvat perusteellisesti, jolloin ravistelusekoitus ei näiden vaiheiden välissä ole tarpeellinen.

Kolmannen vaiheen edetessä, laite antaa ohjelmansa kautta näyttöpäätteelle kutakin kuoppaa vastaavan RLU-arvon, jonka suuruus riippuu valoreaktion voimakkuudesta. Tuotteen fysikaalisista ominaisuuksista riippuen, tuotteilla on oma tuotekohtainen RLU-vaihteluväli ja jokaisella tuotteella on oma tyypillinen pohja-RLU-taso, joka voi vaihdella suurestikin tuotteesta riippuen. Tämä vaihteluväli tulisi määrittää erikseen jokaiselle tuotteelle, jolloin kontaminoituineita näytteitä ovat yli ylärajan menevät. Alle tuotteen tyypillisen pohja-RLU-tason menevät mittaukset olisi yleensä hyvä suorittaa uudelleen luotettavan tuloksen takaamiseksi. Tyhjä kuoppa antaa tyypillisesti arvoksi 1–5 RLU. Laitteen antaessa näytteelle RLU-arvoksi 1 tai 0 RLU tai alle tuotteen tyypillisen pohja-RLU-tason, on tarkistettava, että taustamittaus on onnistunut. Ohjelma ilmoittaa tulostulosteissa *BckgHigh*, mikäli taustan mittaus epäonnistui. Samoin silloin, kun RLU-taso ylittää ylärajan, olisi hyvä suorittaa mittaus uudelleen, mikäli tuote muuten vaikuttaa aistinvaraisesti virheettömältä. Tällöin eliminoidaan mahdolliset kontaminaatiot esimerkiksi pipetoinnin yhteydessä, mikä takaa luotettavan tuloksen, sillä muun muassa kuoppalevyyn ilmasta laskeutunut pölyhiukkanen saattaa aiheuttaa RLU-lukeman kohoamisen.

Luminometriä käyttävä ohjelma muuttaa kaikki luminometrillä saadut tulokset muotoon, josta ne pystytään syöttämään tehtaalla käytettävään MMC-järjestelmään. Tämä mahdollistaa nopean poikkeamien tekemisen ja jäljitettävyyden, sekä poistaa inhimillisistä näppäilyvirheistä johtuvat virheet tietojen manuaalisessa siirrossa.

## 5 TOTEUTUS

Koska selvitettiin, voidaanko menetelmä validoida, halutut ESL-tuotteet seulottiin niiden fysikaalisten ominaisuuksien perusteella. Tämän jälkeen tuotteille tehtiin ympäyestetit, joilla määritettiin luminometrisen menetelmän havaintorajat indikaattorimikrobilla. Viimeisenä vaiheena tavoiteltiin jo validointia testaamalla, vastaavatko luminometrin antamat tulokset maljaviljelyin saavutettuja tuloksia.

### 5.1 Tuotteiden soveltuvuus

Ennen koejärjestelyjen aloittamista mietittiin, ovatko kaikki tehtaalla valmistettavat ESL-tuotteet soveltuvia ATP-luminometritestaukseen laboratorioissa käytettävissä olevalla luminometrillä. Luminometrin vaatimuksina on, että

- tuote ei sisällä isoja, mahdollisesti valoa absorboivia tai häiritseviä partikkeleita
- tuotteen viskositeetti mahdollistaa sen, että 50 µl näytettä kyetään pipetoimaan mahdollisimman tarkasti kuoppalevyyn ja viskositeetti ei estä reagenssien sekoittumista
- tuote on käytännössä steriili lämpökäsittelyn vuoksi.

Yksi tuotteista arvioitiin heti sopimattomaksi ATP-luminometrille, sillä se sisälsi isoja, mahdollisesti häiritseviä partikkeleita sekä sen silmämääräinen viskositeetti oli niin korkea, että hyvin pienien määrien tarkka pipetointi arvioitiin liian hankalaksi. Luminometritestaukseen hyväksyttiin yhteensä 7 erilaista tuotetta, jotka täyttivät kaikki yllä esitetyt ehdot.

Tarkoituksena soveltuvuustestauksessa oli saada tieto, miten testattava, tarkoituksella kontaminoitu tuote käyttäytyy rinnakkain maljoilla ja luminometrillä. Tavoitteena oli saastuttaa tutkittavat tuotteet tunnetulla indikaattorimikrobimäärällä (pmy/ml), ja määrittää havaintoraja, jolloin luminometrillä mitattuna RLU-arvot olivat juuri ja juuri kohonneet verrattuna puhtaisiin.

## 5.2 Kontaminaatiokanta

Kontaminaatiota varten valmistettiin mikrobeita sisältävä liuos, jonka pmy-taso arvioitiin maljavalutekniikalla, sillä laboratorion käytössä ei ollut esimerkiksi kaupallisesti saatavia tarkasti tietyn pmy-tason sisältäviä kuivattuja pellettejä. Kontaminaatiokanta valmistettiin mikrobeista, joita oli löytynyt tuotantoajosta poistetuista maitotuotepurkeista. Tällä varmistettiin, että kanta pystyi kasvamaan maitopohjaisessa alustassa. Vähintään kolme eri tunnettua mikrobia (*Enterobacter asburiae*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia liquefaciens*; Valion T&K osaston määrittämiä), sekä sekakasvustoa mPCA-maljalta, siirrostettiin puhtaaseen maitopurkkiin.

Kontaminoitua maitopurkkia sekoiteltiin hyvin ja jätettiin huoneen lämpöön vuorokaudeksi. Tämän jälkeen maidosta tehtiin laimennossarja 0:sta (laimentamaton) -7:ään ( $10^{-7}$ ). Jokaista laimennossarjan laimennosta pipetoitiin kahdelle petrimaljalle, ja asetettiin lämpökaappiin inkuboitumaan. Toisen maljoista oli määrä inkuboitua +22 °C:ssa ja toisen +30 °C:ssa kolme vuorokautta. Lisäksi kontaminoitua maitoa kaadettiin pieniin, tilavuudeltaan 1,5 ml kyvetteihin myöhempää käyttöä varten, ja laitettiin pakastimeen.

Maljojen kasvu oli erittäin runsasta. Kaikilla maljoilla, lukuunottamatta laimennosta -7, oli yli 300 pesäkettä ja maljat olivat kasvun peitossa. Maljalta laimennosta -7 laskettiin yhteensä 106 pesäkkeen muodostavaa yksikköä, mikä vastaa laimentamattomassa kontaminoidussa maidossa 1 060 000 000 pmy/ml. Lukema tarkistettiin myös kolmesta pakastetusta purkista, jotka laimennettiin samalla laimennossarjalla. Mikrobipitoisuus oli 3-kertaisella varmistuksella pakastetussa ympäristössä noin 1 000 000 000 pmy/ml. Tästä oli tarkoitus siirrostaa testattaviin tuotepurkkeihin noin 10 pmy sisältävä kontaminaatioannos, minkä arveltiin vastaavan mahdollista kontaminaatiota tuotannossa.

### 5.3 Esikoe

Esikokeessa oli tarkoitus siirrostaa tuotepurkkeihin kolme eri pmy-määrää, ja antaa purkkien inkuboitua rinnakkain sekä huoneenlämmössä (+22 °C) että laboratorion spesifisessä avaamattomien pakkausten inkubointihuoneessa (+30 °C), minkä jälkeen näiden kahden eri lämpötilojen mikrobiuloksia vertailtiin maljavaluin ja luminometrillä. Purkkien oli määrä inkuboitua yhteensä kolme vuorokautta, jolloin maljavalut sekä mittaukset luminometrillä suoritettaisiin vuorokauden välein eli kolme kertaa.

Esikokeeseen tuotteiksi valittiin tuotannosta siltä viikolta koostumukseltaan mahdollisimman erilaisia tuotteita, jotka saivat toimeksiantajan pyynnöstä raportointia varten nimet tuote 1, tuote 3 ja tuote 6. Kustakin tuotteesta pyydettiin näytteet pakkauskoneilta liitteen 1 mukaisesti (liitteestä 1 muunnettu tuotenumerot, -nimet ja pakkauspäivät). Tarkoituksena oli saada 15 peräkkäistä purkkia linjastolta satunnaiselta ajankohdalta, jolloin ei ollut esimerkiksi pakkauspaperin vaihtoa tai muuta häiriötä, jolloin tuotteiden mahdollisilta kontaminaatioilta edellä olevista lähteistä välttyttäisiin. Mahdollisen mikrobiologisen toiminnan hidastamiseksi purkit tuotiin laboratorioon, jossa ne sijoitettiin kylmiöön (+6 °C).

Ennen kontaminointia tuotepurkit otettiin huoneenlämpöön, jossa ne saivat lämmetä noin tunnin. Suunnitelmana oli siirrostaa purkkeihin 10 pmy, 20 pmy sekä 30 pmy valmistettua mikrobiymppiä, jolloin olisi teoriassa mahdollista seurata, vaikuttaako kaksin- tai kolminkertainen ympymäärä RLU-arvoon lineaarisesti. Jokaista tuotetta oli 15 purkkia, joista pareittain purkit merkittiin tussilla tunnistettavin merkinnöin:

- i10.1 ja i10.2: siirrostettiin 10 pmy ja inkuboitiin +30 °C
- i20.1 ja i20.2: siirrostettiin 20 pmy ja inkuboitiin +30 °C
- i30.1 ja i30.2: siirrostettiin 30 pmy ja inkuboitiin +30 °C
- h10.1 ja h10.2: siirrostettiin 10 pmy ja inkuboitiin +22 °C
- h20.1 ja h20.2: siirrostettiin 20 pmy ja inkuboitiin +22 °C
- h30.1 ja h30.2: siirrostettiin 30 pmy ja inkuboitiin +22 °C
- i0.1, i0.2 i0.3: puhtaita vertailupurkkeja, inkuboitiin +30 °C

Pakastettua mikrobiymppiä täytyi laimentaa runsaasti, jotta siitä saataisiin 10 pmy, 20 pmy ja 30 pmy:tä vastaavat määrät purkkeihin. Laimennossarja toteutettiin seuraavasti:

- sulatettua noin 1 000 000 000 pmy/ml mikrobiymppiä pipetoitiin steriilillä pipetinkärjellä 1 ml 99 ml:n laimennosvesipulloon ja sekoitettiin hyvin, jolloin laimennosvesipullossa mikrobipitoisuus oli noin 10 000 000 pmy/ml.
- saadusta laimennoksesta pipetoitiin 10 µl ymppiä 99 ml:n laimennosvesipulloon ja sekoitettiin erittäin hyvin, jolloin pullossa oleva mikrobipitoisuus oli noin 1 000 pmy/ml.
- tästä laimennoksesta pipetoitiin 10 µl:lla merkittyihin purkkeihin 10 µl, 20 µl:lla merkittyihin purkkeihin 20 µl ja 30 µl:lla merkittyihin purkkeihin 30 µl, jolloin lisätyt mikrobimäärät vastaisivat teoreettisesti noin 10, 20 ja 30 pmy:tä.

Kaikki purkit sekoitettiin kääntämällä suljettu purkki ylösalaisin viisi kertaa.

Pakastetun ympin mikrobipitoisuus varmistettiin myös viljelemällä laimennetuinta ymppeä 10 µl:n verran kahdella mPCA-maljavalulla (tulos 3 pmy + 1 pmy).

Inkubointihuoneeseen tarkoitetut purkit (i) vietiin inkubointihuoneeseen (+30 °C) ja huoneenlämmössä inkuboituvat purkit (h) vietiin varastoon, jonka lämpötilaa tarkkaillaan laboratorion henkilökunnan toimesta (+22 °C). Puhtaat vertailunäytteet sijoitettiin inkubointihuoneeseen. Vielä tässä vaiheessa ei ollut tiedossa, miten puhtaat ESL-tuotteet käyttäytyisivät inkubointihuoneessa, joten sekä puhtaisiin ja kontaminoituihin purkkeihin varauduttiin asettamalla ne vuodon varalta valumisastioihin.

Vuorokauden kuluttua tutkittavat purkit olivat inkuboituneet tarpeeksi kauan ensimmäisen vuorokauden mittausta varten. Purkkeja tarkasteltiin ulkonäöltä, jolloin inkubointihuoneessa olleet purkit olivat selvästi hieman pullistuneet. Huoneenlämpöisessä varastossa olleet purkit eivät olleet ulkopuolelta muuttuneet. Jokaisesta purkista pipetoitiin 50 µl näytettä luminometrin kuoppalevyihin steriileillä pipetinkärjillä, ja samalla tehtiin purkeista laimennossarja ja maljavalut. Laimennossarja tehtiin inkubointihuoneessa olleista näytteistä -1...-5, ja huoneenlämmössä olleista näytteistä samoin 0...-5. Maljojen inkubointilämpötila oli tässä vaiheessa vielä määrittelemätön, joten päädyttiin valamaan jokaista laimennosta jokaisesta purkista kahdesti, jolloin yksi malja menisi lämpötilaltaan +22 °C lämpökaappiin, ja toinen lämpötilaltaan +30 °C lämpökaappiin.

Kuoppalevyyn annostellut näytteet ajettiin luminometrillä, jolloin tulos oli liitteen 2 mukainen. Taulukossa on esitetty myös tuotteita vastaavat maljaviljelytulokset, joita kasvatettiin 3 vuorokautta.

#### 5.4 Havaintorajan määrittäminen indikaattorimikrobilla

Varsinainen (onnistunut) havaintorajan määrittäminen suoritettiin ensimmäistä mukailleen. Tarkoituksena oli edelleen kontaminoida näytepurkit samalla mikrobiympillä, mutta esi-inkubointi tapahtuisi vain +30 °C:ssa ja mittausvälejä lyhennettiin, jotta saataisiin tarkempi RLU:n kohoamisajankohta selville. Mittausvälit olivat tunnin mittaisia. Mikrobiympin siirrotamisesta puhtaaseen purkkiin mitattiin näytteestä tunnin välein luminometrillä RLU-arvo ja samalla tehtiin maljavalu mPCA:lla vertailuksi. Maljavaluihin tehtävät laimennossarjat vaihtelivat ajan mukaan niin, että aluksi maljalle laitettiin laimentamatonta näytettä ja ajan kuluessa laimennettiin -1...-4, jotta maljauksen tarkkuus paranisi. Oletuksena oli, että käytetyllä mikrobiympillä tapahtuisi näkyviä muutoksia RLU-arvossa 12–24 tunnin vaiheilla tuotteesta riippuen, vähemmän viskoosisella tuotteella todennäköisesti aiemmin kuin korkeaviskoosisella tuotteella.

Tuotepakkaajille lähetettiin samanlainen näytteenottopyyntö kuin ensimmäisellä kerralla (liite 1). Tuotannosta näytepurkit tuotiin laboratorioon,

jossa ne laitettiin kylmiöön +6 °C mikrobiologisten muutosten varalta. Kokeessa käytettiin yhteensä 4 purkkia per tuotenimike, jotka saivat tunnukset:

1. Puhdas A (pA)
2. Puhdas B (pB)
3. Kontaminoitu A (kA)
4. Kontaminoitu B (kB)

Tuotetestaus tehtiin kahtena eri kertana, ensin tuotteet 1–3, sitten tuotteet 4–7.

Näytepurkkien annettiin seistä huoneen lämmössä noin tunnin ennen kokeen aloittamista. Kontaminointiin käytettyä mikrobiymppiä laimennettiin samalla tavalla kuin ensimmäisellä kerralla:

- sulatettua noin 1 000 000 000 pmy/ml mikrobiymppiä pipetoitiin steriilillä pipetinkärjellä 1 ml 99 ml:n laimennosvesipulloon ja sekoitettiin hyvin, jolloin laimennosvesipullossa mikrobipitoisuus oli noin 10 000 000 pmy/ml.
- saadusta laimennoksesta pipetoitiin 10 µl ymppeä 99 ml:n laimennosvesipulloon ja sekoitettiin erittäin hyvin, jolloin pullossa oleva mikrobipitoisuus oli noin 1 000 pmy/ml.
- tästä laimennoksesta pipetoitiin 10 µl kontaminoituihin purkkeihin eli purkkeihin, jotka oli merkitty kA sekä kB. Mikrobiannos vastasi laskennallisesti 10 pmy:tä, mutta maljavaluin testattuna annos vaihteli välillä 1–10 pmy.

Näytepurkit sekoitettiin sulkemalla korkki ja kääntelemällä ne ylösalaisin viisi kertaa yhdenmukaisesti. Purkeista, puhtaista ja kontaminoiduista, otettiin sen jälkeen heti 0 h näytteet sekä luminometrille että maljoille. Puhtaita purkkeja käsitellessä pidettiin huolta, etteivät tuotteet kontaminoidu käyttämällä steriilejä pipetinkärkiä, kertakäyttöhanskoja, vetokaappia sekä yritettiin suorittaa pipetointi mahdollisimman nopeasti. Puhtaiden purkkien maljavalut tehtiin laimennoksella  $10^{-1}$ , jotta mahdollisten kontaminaatioiden tapahduttua olisivat niidenkin tulokset luettavissa. Oletus oli, että puhtaiden purkkien taso pysyy nollassa koko kokeen ajan. Luminometrinen mittaus ja maljavalut toistettiin tunnin välein. Näytepurkkien käsittelyiden välissä niitä pidettiin inkubointihuoneessa +30 °C lämpötilassa.

Maljavalujen maljoja inkuboitii +30 °C lämpökaapissa kolme vuorokautta, minkä jälkeen pmy-tulokset laskettiin manuaalisesti.

Tuotteiden 4–7 testaus suoritettiin tuotteiden 1–3 jälkeen. Tällöin oli huomattu, että mikrobiologiset tasot nousevat erittäin vähän ensimmäisten 10 tunnin aikana. Tästä syystä ensimmäisten 10 tunnin aikana ei otettu luke-mia. Tulokset on taulukoitu liitteessä 3.

Kokeiden päätyttyä kontaminoiduista tuotteet arvioitiin aistinvaraisesti hajun ja ulkonäön suhteen ennen asianmukaista hävittämistä. Tuotteista, tuotetta 1 lukuun ottamatta, mitattiin myös pH.

## 5.5 Validointikokeilu

Tuotteiden soveltuvuustestauksessa oli tarkoituksena ottaa selvää, havaitisiko luminometri halutuilla tuotteilla verrattain pieniä RLU-arvon kohoamia, jolloin myös orastava kontaminaatiosta johtuva mikrobimäärän kasvu paljastui. Validointikokeiluvaiheessa kaikki hyväksytyt tuotteet oli tarkoitus mitata luminometrillä niin, että saataisiin varmuus luminometrin antamien RLU-arvojen yhdenmukaisuudesta ja säännöllisyydestä kullakin tuotteella. Validointikokeilun tuloksista olisi siten mahdollista päätellä,

- onko saman tuotteen eri pakkausten välillä suuria eroavaisuuksia
- onko saman tuotteen tuotantoerien välillä suuria eroavaisuuksia
- normaalit puhtaan tuotteen RLU-arvon vaihteluvälit, eli ylä- ja alaraja RLU:lle
- kuinka hyvin perinteisten maljavalujen tulokset vastaavat luminometrin antamia tuloksia.

Tuotteita testattiin tehtaan tuotantosuunnitelmaa mukailten, eli eri tuotantoerien välillä saattoi olla pitkiäkin välejä.

Validointikokeilussa oli mukana seitsemän eri ESL-tuotetta. Validointisuunnitelma laadittiin niin, että yhtä tuotetta kohti oli määrä suorittaa noin 100 toistoa. Tämä tarkoitti käytännössä noin sadan purkin ajamista luminometrillä. Tämän sadan toiston oli tarkoitus koostua vähintään kolmesta eri tuotantoerästä, jotta erien väliset vaihtelut voitaisiin huomioida.

Inkubointi tapahtui avaamattomien tuotteiden inkubointihuoneessa +30 °C:n lämpötilassa. Tuotteet aseteltiin valumisastioihin vuotojen varalta. Tuotteiden inkubointiajaksi päätettiin asettaa kolme vuorokautta, mukailten tehtaalta käytettyjä käytäntöjä UHT-tuotteiden luminometriselle laadunvarmistukselle. Tehtaalta UHT-tuotteiden käytäntöjen mukaan inkubointiaika kuitenkin muuttui hieman sen mukaan, milloin tuotetta oli valmistettu. Maanantaina ja tiistaina valmistetut tuotteet luonnollisesti mitattiin torstaina sekä perjantaina, mutta keskiviikkona pakattujen tuotteiden kolmen vuorokauden mittaamisajankohta olisi osunut lauantaille. Tehtaalta tuotantoa on keskeytyvässä kolmivuorotyössä viitenä vuorokautena viikossa, jolloin lauantaisin ja sunnuntaisin ei kolmen vuorokauden inkubointeja pystytä mittaamaan. Näin ollen keskiviikkoisin ja torstaisin pakatut tuotteet mitattiin maanantaisin viiden sekä neljän vuorokauden ikäisinä.

Luminometrin antamia tuloksia verrattiin normikäytäntöjen mukaan tehtyihin maljatuloksiin (sivu 11). ESL-tuotteiden kohdalla tämä oli yhden vuorokauden pituinen esi-inkubointi huoneenlämmössä ja silmukaviljely, ja sitä seuraava viiden vuorokauden maljojen inkubointi +22 °C:ssa, sekä laimentamattomasta tuotteesta tehdyt maljavalut aloituspurkkien kohdalla. Maljatulos silmukaviljelyin kasvatetuilla maljoilla ilmoitettiin joko positiivisena (kasvua) tai negatiivisena (ei kasvua). Koska tuotepurkit tässä käsittelyssä avattiin ja tuotetta tökittiin pipetillä, ei näitä samoja purkkeja voinut käyttää enää kolmen vuorokauden inkuboinnissa ja luminometri-



sessä testauksessa kontaminaatoriskin vuoksi. Ongelma väistettiin käytämällä linjastolta peräkkäisiä rinnakkaispurkkeja.

Tuotepakkaajille lähetettiin liitteen 4 (muokattu) mukainen näytepyyntö. Kaikista luminometriseen testaukseen soveltuvista tuotteista tuli ottaa kaksinkertainen näytemäärä niistä näytteistä, joista mikrobiologinen määrittäminen tehdään. Lisänäytteisiin tulostettiin identtinen viivakoodilla varustettu näytetarra kuin normaaleihin näytteisiin, mikä mahdollisti lisänäytteiden sekä normaalinäytteiden tulosten nopean löytämisen MMC-järjestelmästä ja kirjaamisen. Normaalinäytteistä tehtiin normaalit nykykäytäntöjen mukaiset mikrobiologiset testit, ja näiden rinnakkaiset lisänäytteet laitettiin inkuboitumaan +30 °C:n lämpötilaan. Luminometrisiä tuloksia verrattiin näin samalta ajalta otettuihin ja normaalimenetelmien mukaan käsiteltyihin rinnakkaisten purkkien tuloksiin. Tulokset on taulukoitu liitteessä 5.

Kaikista havaituista RLU:n kohoumista ilmoitettiin laboratoriovastaavalle, joka päätti tarvittavat toimenpiteet.

## 6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

Tässä osiossa on esitetty kaikkien kokeiden tulokset sekä tarkasteltu tuloksia tarkemmin johtopäätösten tekemistä varten.

### 6.1 Esikoe

Inkubointihuoneessa olleiden näytteiden sekä RLU- että pmy-tulokset olivat niin korkeita, että koe oli pakko keskeyttää jo yhden vuorokauden jälkeen (liite 2). Kaikkien näiden maljojen pmy-tulokset olivat yli  $3 \cdot 10^5$  pmy/ml, mikä ylitti maljojen luettavuus- sekä luettavuusrajan. Myös luminometrin antamat lukemat olivat liian korkeita, kun tavoitteena oli saada lukema juuri ja juuri kohoamaan puhtaan näytteet tasosta. Huoneenlämmössä inkuboituneiden näytteiden tulokset näyttivät realistisemmilta, mutta tuotteen 6 sekä RLU- että maljatulokset eivät kohonneet lainkaan, minkä takia päätettiin odottaa tuotteen 6 kanssa vielä yksi vuorokausi ja testata luminometrillä, lähtekö RLU-arvo kohoamaan vai epäonnistuiiko kontaminointi (liite 2 alhaalla).

Myös inkubointihuoneessa vuorokauden olleet näytteet päätettiin jättää vielä toiseksi vuorokaudeksi inkuboitumaan, sillä tuotteet olivat aistinvaraisesti (ulkonäkö, haju) kunnossa. Purkit kuitenkin jätettiin varotoimenpiteenä valumisastioihin. Tuloksena oli purkkien räjähtäminen mikrobiologisen toiminnan seurauksena ja leviäminen valumisastiaansa. Räjähtämisen syynä olivat todennäköisesti mikrobiympissä olevien kaasunmuodostajabakteerien räjähdysmäinen kasvu sekä tiiviisti suljetut purkkien korkit.

Koejärjestelystä todettiin, ettei se ollut paras mahdollinen tapa tutkia kontaminaation etenemistä, sillä kohonneet lukemat olivat liian korkeita odotettuun verrattuna. Purkkeihin siirrostettava mikrobiympin pmy/ml ei myöskään ollut kovin tarkka, mistä osoituksena se, että eri määrien (10 µl, 20 µl ja 30 µl) siirrostuksella ei ollut havaittavissa mitään vaikutusta näy-

tepurkkien RLU:n tai pmy:n välillä, vaan tulokset olivat pitkälti samaa tasoa jokaisessa purkissa.

Koejärjestelyn muuttamisen pohdinnan aikana kuitenkin todettiin, että mikäli ATP-luminometrinen menetelmä otetaan käyttöön haluttujen tuotteiden myyntiinhyväksynnässä, tapahtuu niiden esi-inkubointi todennäköisesti +30 °C:ssa, kuten laiteoimittajakin suositteli. Samoin referenssimaljavalujen maljojen inkubointi +30 °C:ssa olisi todennäköistä, sillä ensimmäisessä kokeessa +22 °C:ssa inkuboituneiden ja +30 °C:ssa inkuboituneiden maljojen pmy:ssä ei ollut havaittavissa selkeitä eroja, joiden mukaan viljelylämpötilalla olisi merkitystä tässä vaiheessa.

## 6.2 Havaintorajan määrittäminen indikaattorimikrobilla

Kaikkien tuotteiden tulokset havaintorajan määrittämisessä indikaattorimikrobilla on esitetty liitteessä 3, jossa tuotteet 1–7 ovat taulukoitu numerointinsa mukaan. Taulukoissa on esitetty sekä puhtaat että kontaminoidut rinnakkaiset purkit ajan mukaan.

Taulukossa 1 on esitetty esimerkkinä tuotteen 1 pmy- sekä RLU-tulokset 16 tunnulta, eli kunnes tuotteelle saatiin huomattava RLU-arvon nousu.

Taulukko 1 Tuotteen 1 pesäkemäärät (pmy/ml) ja ATP-tulokset 16 h inkuboinnin (+ 30 °C) aikana kahdella rinnakkaisnäytteellä a ja b. Lyhenteet p a & p b tarkoittavat puhtaita näytteitä, k a & k b kontaminoituja.

tuote 1								
aika	p a		p b		k a		k b	
h	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU
0	<1	13	<1	14	<1	15	<1	14
2	<10	14	<10	15	<10	13	<10	14
4	<10	15	<10	13	<10	15	<10	15
6	<10	14	<10	12	<10	12	<10	14
7	<10	13	<10	12	<10	14	<10	14
8	<10	10	<10	11	<10	10	<10	11
9	<10	11	<10	11	<10	7	<10	8
10	<10	10	<10	11	<100	11	<100	11
11	<10	11	<10	9	40	9	150	11
12	<10	8	<10	8	200	9	1000	11
13	<10	9	<10	7	1000	11	10000	13
14	<10	7	<10	11	9000	16	16000	16
15	<10	8	<10	10	30000	31	36000	27
16	<10	8	<10	8	164000	114	484000	265

Tuotteen 1 tapauksessa puhtaat kontrollipurkit (p a & p b) ovat tarkoituksenmukaisesti pysyneet hyvinä niin pmy/ml- että RLU-tulostensa puolesta, eikä tuloksissa ole havaittavissa epämääräisiä poikkeamia. Huomattavaa on, että puhtaiden purkkien RLU-arvon kehitys ensimmäisten mitatun 16 tunnin kohdalla on laskujohtainen, mikä saattaa johtua myös siitä, että

purkit olivat jääkaappilämpötilassa ennen testien aloittamista. RLU-arvot kuitenkin pysyvät melko tasaisina koko testin ajan ja vaihtelevat myös todennäköisesti sen mukaan, miten tarkasti pipetointi kuoppalevyn kuoppaan on onnistunut, sillä kuoppalevyn pipetoitaessa 50 µl verrattain viskoosia näytettä, saattaa osa näytteestä jäädä pipetin kärkeen kiinni.

Kontaminoitujen näytteiden pmy/ml-tulokset alkavat noin yhdentoista tunnin kohdalla olemaan havaittavissa, mistä mikrobien määrä kasvaakin eksponentiaalisesti aina kokeen lopettamiseen saakka. RLU-arvot kohoavat ensimmäistä kertaa noin neljäntoista tunnin kohdalla, mutta toisaalta 16 RLU on vielä lähellä tuotteen normaalia RLU-arvon vaihteluväliä näiden tulosten perusteella. Tästä johtuen tämä ei vielä välttämättä olisi indikaattori pilaantuneesta tuotteesta. Tuotteella 1 selvä pilaantuneen tuotteen raja rikkoutuu viidentoista tunnin kohdalla, jolloin p a & p b antavat tulokset 31 RLU sekä 27 RLU. Tämä on huomattavasti korkeampi arvo kuin mitä puhtaalle tuotteelle saadaan. Koe lopetettiin tunnilla 16, sillä siitä eteenpäin sekä pmy/ml- että RLU-arvot todennäköisesti kasvaisivat eksponentiaalisesti, lopputuloksena esitestin kaltaiset räjähtävät ja luettavuusrajan ulkopuolelle menevät tulokset.

Tuotteille 2, 4, 5 ja 7 saatiin hyvin samanlaiset tulokset tuotteeseen 1 verrattuna. Tuotteella 2 kontaminoitujen purkkien RLU:ssa on huomattavissa samoin noin 15 tunnin kohdalla pieni kohoama, minkä jälkeen kuudentoista tunnin kohdalla on lukema selvästi koholla.

Tuotteilla 4–7 rinnakkainen mittaaminen aloitettiin vasta kymmenen tunnin kuluttua kontaminoinnista. Tuotteella 4 RLU:n kohouma on havaittavissa kuudentoista tunnin kohdalla, ja 17 tunnin kohdalla lukema on jo selkeästi yli puhtaan tuotteen rajojen. Tuotteella 5 RLU on hieman koholla 23 tunnin jälkeen, ja 26 tunnin kohdalla RLU-arvo on lähtenyt jo voimakkaaseen kasvuun. Samoin on käynyt tuotteen 7 kohdalla, jossa tosin jo 20 tunnin kohdalla k b -näytteessä on havaittavissa nousujohteisuutta. Kaikkien näiden tuotteiden kohdalla myös pmy/ml on selvästi nousussa, mutta pmy/ml oli ajallisesti havaittavissa aiemmin maljalta kuin luminometrillä kontaminoinnin jälkeen.

Tuotteella 3 kontaminoitujen näytteiden pmy/ml sekä RLU kasvoivat kuten tuotteella 1, mutta puhtaan purkin a (p a) kohdalla oli ilmeisesti tapahtunut jälkikontaminaatio mitä todennäköisimmin pipetoinnin seurauksena. Puhtaan purkin tulokset olivat kahdentoista tunnin kohdalla 130 pmy/ml ja RLU-arvon selvä kohouma kuudentoista tunnin kohdalla (61 RLU).

Tuotteen 6 kohdalla puhtaat näytteet olivat säilyneet puhtaina ja kontaminoidun purkin b pmy/ml- että RLU-tulokset olivat selvässä kasvussa. Kontaminoidun purkin a tulokset eivät kuitenkaan koskaan lähteneet nousuun, mikä saattoi johtua esimerkiksi kontaminaatioliuoksen pipetoinnin yhteydessä, jolloin häviävän pieni määrä (10 µl) mikrobiymppeä ei jostain syystä lähtenyt pipetin kärjestä.

Tuloksista käy myös ilmi, että eri tuotteilla on tämän kokeen mukaan hyvinkin erilaiset rajat sille, milloin pmy/ml:n kohoama havaitaan RLU-

arvon nousuna. Esimerkiksi tuotteella 1 luminometri havaitsee mikrobien toiminnan silloin, kun niiden määrä on noin 30 000–36 000 pmy/ml. Tuotteella 2 tämä lukema oli noin 26 000 pmy/ml ja tuotteella 3 noin 32 000 pmy/ml. Tuotteella 4 lukema oli noin 13 900 pmy/ml, tuotteella 5 noin 4 000 pmy/ml, tuotteella 6 noin 13 000 pmy/ml ja tuotteella 7 noin 6 000 pmy/ml. Erot saattoivat johtua muun muassa tuotteiden viskositeettien eroista tai ominaisuuksista, kuten tuotteen väri.

Kontaminoiduista purkeista mitattiin pH ja tuotteet arvioitiin aistinvaraisesti hajun ja ulkonäön osalta ennen hävittämistä kokeen jälkeen. Tulokset on taulukoitu taulukossa 2. Aistinvarainen arviointi on tehty asteikolla 1–5, missä 5 on erinomainen ja 1 kelpaamaton/selkeästi pilaantunut. Aistinvaraisen arvioinnin tarkoituksena oli pitkälti vain todeta, miten hyvin edellä saadut tulokset ovat todennettavissa aistinvaraisesti. Aistinvaraisesti ja pH:n puolesta jotkin näytteet (esimerkiksi tuote 3 ja 4) vaikuttivat moitteettomilta, mutta olivat tunnistettavissa pilaantuneiksi luminometrillä. Pilaantuneen tuotteen ominaisuudet riippuvat kuitenkin myös pilaajamikrobista.

Taulukko 2 Kontaminoitujen tuotteiden aistinvarainen arviointi ja pH luminometristen mittausten päätteeksi.

		ulkonäkö	haju	pH
<b>tuote 1</b>	a	5	1	ei mittausta
	b	5	1	ei mittausta
<b>tuote 2</b>	a	3	5	"normaali"
	b	3	5	"normaali"
<b>tuote 3</b>	a	4	5	"normaali"
	b	4	5	"normaali"
<b>tuote 4</b>	a	5	4	6,65
	b	5	4	6,60
<b>tuote 5</b>	a	5	2	6,49
	b	5	2	6,50
<b>tuote 6</b>	a	5	5	6,15
	b	5	3	6,07
<b>tuote 7</b>	a	5	1	6,12
	b	5	1	6,10

### 6.3 Validointikokeilu

Liitteessä 5 on taulukoitu validointiosiossa saadut tulokset tuotteista 1–7. Taulukoissa on esitetty tulokset niin, että näytteet on numeroitu, niistä on esitetty RLU tulokset ja niitä vastaavat maljatulokset (0/1), joita seuraa huomiokenttä, johon on selvennetty lyhyesti punaisella merkityt poikkeavuudet. Purkkien numeroinnit eivät merkitse ajallisesti mitään, sillä inkubointihuoneeseen tuodut näytteet olivat usein hyvin sekaisin eivätkä ajallisessa järjestyksessä, jolloin ne numeroitiin satunnaisessa järjestyksessä. Eri tuotantoerät on erotettu toisistaan poikkiviivalla näytteiden välillä.

### 6.3.1 Pilaantuneet näytteet

Kaikki punaisella merkityt ruudut olivat niin sanottuja aloituspurkkeja, eli tarkempaan tarkasteluun joutuvia näytteitä tuotannon aloitusvaiheesta, joita on aina joka erän alussa kahdeksan kappaletta per linja. Vain näistä aloitusnäytepurkeista löytyi pilaantuneita näytteitä tämän kokeen aikana, ja nämä purkit ovatkin niitä todennäköisimpiä kontaminoituneita purkkeja normaalisti.

Riippuen tuotannon vaiheesta sekä tuotteista, nämä purkit viljeltiin joko maljavaluna pipetoiden 1 ml laimentamatonta näytettä tai silmukkilajelynä, joista ensimmäisestä oli tulos yksikössä pmy/ml ja jälkimmäisestä joko positiivinen tai negatiivinen (0/1).

Tuotteen 1 kohdalla oli eniten poikkeavuuksia. Näytteet #17 sekä #20 olivat saman erän aloitusta. Luminometrillä havaittiin yksi poikkeavuus kahdeksasta näytepurkista, tuloksena 56 561 RLU, mikä on hyvin korkea ja normaalitasosta poikkeava tulos. Tälle vastaava maljatulos ylitti laskettavissa olevan 300 pmy/ml:n rajan, jolloin tulokseksi kirjattiin >999 pmy/ml. Näytteen #20 maljatulos oli sama, mutta tästä aloituksesta ei luminometrille todennäköisesti sattuman vuoksi osunut kontaminoitua purkkia. On huomattava, että niin maljatulosilla kuin luminometrilläkin myös pelkästään yksi positiivinen näyte aiheuttaa tuotteiden hävittämisen ajankajalta ja tehovalvonnan seuraavilta. Näyte #24 oli maljattuna myös positiivinen, mutta ajalta ei löytynyt luminometrillä pilaantuneita näytteitä. Uusi aloitus – näyte on aloitusnäytteen tapainen tarkempi näytteenotto, joka suoritetaan koneen pitkittyneen häiriötilan tai pidempien taukojen jälkeen. Myös näytteet #59 sekä #60 olivat aloitusnäytteitä toisesta valmistuserästä. Näistä kahdeksasta näytteestä yksi eli #60 oli luminometrille otetuista purkeista pilaantunut, antaen tulokseksi 12 165 RLU. Samalta ajalta maljaviljelyssä löytyi kaksi kontaminoitua purkkia, joiden tulokseksi saatiin 16 pmy/ml sekä 41 pmy/ml.

Tuotteen 2 kohdalla pilaantuneet näytteet #23, #34 sekä #39 olivat kaikki saman erän aloituksia samalta ajalta, eli kolme kahdeksasta purkista olivat pilaantuneita. Tältä ajalta ei kuitenkaan havaittu pilaantuneita näytteitä perinteisellä maljavalulla. Pilaantuneiden purkkien määrä samalta ajalta on kuitenkin kohtalaisen suuri ollakseen sattumaa. Tuotteella 2 oli myös yksi BckgHigh-tulos eli taustan RLU-arvon mittauksen epäonnistuminen näytteellä #75, sekä yksi hieman kohonnut näyte #101 ja yksi kohtuuttoman pieni RLU-lukema #105. Näistä tehtiin uusintamittaukset, joiden tulokset olivat normaalit.

Tuotteilla 3, 4 ja 5 ei löytynyt kokeen aikana yhtään positiivista tulosta maljoilta eikä luminometrillä. Näillä ei myöskään ollut muita häiriöitä tai uusintamittausten tarvetta, sillä tulokset puhtaille tuotteille olivat melko tasaisia.

Tuotteella 6 oli viimeisessä erässä kaksi positiivista tulosta näytteille #80 sekä #86. Nämä olivat samalta aloitusajalta peräkkäiset purkit (2/8 pilaantuneita), mutta maljamenetelmällä ei aloituksesta havaittu yhtään pilaantunutta näytettä.

Tuotteen 7 osalta tutkimukset keskeytettiin varhaisessa vaiheessa, sillä sitä valmistettiin tuotantosuunnitelmien mukaan niin harvoin, että noin sadan näytteen saaminen olisi vienyt kohtuuttoman kauan aikaa. Tästä johtuen tuotteesta 7 on tilastoitu vain yksi erä.

Kaikki pilaantuneet näytteet pystyttiin toteamaan pilaantuneiksi aistinvaraisesti, sillä kaikki pilaantuneet näytteet haisivat selvästi happamalle. Näin kyettiin varmistumaan, etteivät luminometrin antamat korkeat tulokset pilaantuneille tuotteille olleet pipetoinnin yhteydessä tapahtunutta kuoppalevyn kontaminaatiota.

### 6.3.2 RLU-arvon vaihteluvälit

Osana validointitestiä oli tarkoitus myös määrittää tyypilliset vaihteluvälit puhtaiden tuotteiden RLU-arvoille tutkittujen noin sadan tuotteen perusteella. Näin saataisiin jonkinlainen arvio siitä, mitä luminometri näyttää puhtaalle tuotteelle, jolloin tulosten perusteella voidaan päätellä, onko laitteen antama RLU-arvo kohonnut vai normaalien rajoissa.

Tuotteelle 1 saadaan RLU-arvojen keskiarvoksi 5,2 ja moodiksi, eli useimmin esiintyväksi arvoksi 5 RLU. RLU-arvot tuotteen 1 puhtailla tuotteilla vaihtelevat välillä 1–8 RLU. Luminometrillä tutkittavista UHT-tuotteista esimerkkinä eräs ominaisuuksiltaan samanlainen tuote, jonka RLU-vaihteluväli on 2–14 RLU. Tuotteen 1 eri tuotantoerien välillä on havaittavissa pieniä eroja (5–8 RLU, 1–5 RLU, 4–8 RLU), mutta kaikki erien vaihteluvälit ovat kuitenkin melko lähellä toisiaan.

Tuotteelle 2 RLU-arvojen keskiarvo on 7,2 ja useimmin esiintyvä arvo 7 RLU. RLU-arvojen vaihteluväli puhtaille tuotteille on 4–11 RLU. Erään UHT-tuotteen, jonka ominaisuudet ovat samanlaiset kuin tuotteen 2, RLU-vaihteluväli on 2–13, mikä osuu melko hyvin samoihin raameihin testatun tuotteen 2 kanssa. Eri erien vaihteluvälit tuotteella 2 osuvat väleille 5–11, 4–8 sekä 6–11 RLU, eli melko lähelle toisiaan.

Tuotteen 3 RLU-arvojen keskiarvo on 10,9 ja useimmin esiintyvä arvo 12 RLU. Vaihteluväli puhtaille näytteille on 7–16 RLU. Vertailuna suunnitteen samoja ominaisuuksia omaava UHT-tuote, jonka vaihteluvälinä on 3–16 RLU. Eri tuotantoerien vaihteluvälit tuotteella 3 olivat 7–12, 8–14, 8–12 sekä 9–16.

Tuotteella 4 RLU-arvojen keskiarvo on 4,2 ja useimmin esiintyvä arvo 4 RLU. Vaihteluväli puhtaille näytteille on 2–7 RLU. Erään verrattavissa olevan UHT-tuotteen vaihteluvälinä on 2–19 RLU. Eri tuotantoerien vaihteluvälit olivat 2–6, 2–6, 3–6 sekä 3–7 RLU, eli ne menevät melko tasaisesti.

Tuotteella 5 RLU-arvojen keskiarvo on 5,5 ja useimmin esiintyvä arvo on 5 RLU. Puhtaiden näytteiden vaihteluväli on 1–10 RLU. Tuotteelle 5 ei ole UHT-tuotteissa vastaavanlaista tuotetta, mutta lähimmän vastineen

RLU vaihteluväli on 1–26 RLU. Eri tuotantoerien vaihteluvälit olivat 1–7, 4–10 sekä 5–8 RLU.

Tuotteen 6 RLU-arvojen keskiarvo on 6,0 ja useimmin esiintyvä arvo 7 RLU. Puhtaiden näytteiden vaihteluväli on 1–11 RLU. Tuotteelle 6 ei ole tehtaalla valmistettavien UHT-tuotteiden joukossa ominaisuuksiltaan samanlaista tuotetta, joten vertailuvaihteluväliä ei ollut. Tuotantoerien vaihteluvälit olivat 7–11, 6–10, 1–6 sekä 2–6. Tuotteella 6 erien välillä oli enemmän vaihtelua, mutta arvot kuitenkin pysyvät melko lähellä toisiaan, varsinkin erien sisällä.

Tuotetta 7 testattiin vain yhden erän verran. Vaihteluvälinä on kahdestakymmenestä näytteestä saatu 3–5 RLU. Myöskään tuotteelle 7 ei löydy UHT-tuotteista vastaavaa vertailutuotetta.

## 7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Johtuen referenssimenetelmänä käytetystä silmukaviljelytekniikasta tulos on aina joko negatiivinen tai positiivinen. Aloituspurkeissa oli myös pmy/ml:n tarkkuudella ilmoitettuja tuloksia, mutta nekin olivat useimmiten epätarkkoja >999 pmy/ml:n tuloksia. Tästä syystä validointi näillä arvoilla on epätarkkaa ja jossain tilanteissa mahdotonta. On huomattava, ettei RLU-arvon perusteella pystytä estimoimaan tuotteen pmy/ml-lukemaa. Mikäli tavoitteena luminometrillä on kuitenkin ainoastaan saada selville, onko näyte pilaantunut tai ei silmukaviljelyn tapaan, eikä saadulla RLU-tuloksen suuruudella ole väliä, soveltuu siihen myös luminometrinen menetelmä.

Esimerkiksi tuotteen 1 kohdalla luminometrillä kyettiin löytämään kahdesta eri kontaminoituneesta aloituksesta molemmat, mutta yksi kontaminoitu uusi aloitus-näyte jäi huomaamatta. Tämä saattoi kuitenkin johtua myös sattumasta, sillä uusi aloitus-näytteistä myös maljalla löydettiin vain yhdellä kahdeksasta kasvua.

Ongelmia kuitenkin syntyy esimerkiksi tuotteen 2 kohdalla, jossa oli luminometrillä huomattu kolme pilaantunutta näytettä kahdeksasta, mutta viljelyllä näitä ei huomattu lainkaan. Jälkikäteen on vaikea arvioida, mikä tilanteeseen vaikutti. Todennäköisesti yhtenevämpiä tuloksia olisi saatu, mikäli referenssimenetelmässä käytetyt näytepurkit olisivat olleet samoja kuin mitä luminometriseen menetelmään käytettiin, mutta eri lämpötilassa tapahtuvan inkuboinnin sekä inkubointiajan erot tekevät tilanteesta mutkikkaamman, muun muassa ajallisesti haastavan ja materiaaleiltaan hintavan. Tästä herää myös jatkokysymys, onko referenssimaljamenetelmän inkubointiaika riittävän pitkä kaikkien positiivisten tulosten huomaimiseksi, ja pitäisikö ESL-tuotteiden tapauksessa luminometrisen menetelmän inkubointiaikaa kenties lyhentää. Samanlaisia pohdintoja herättävät myös tuotteen 6 tulokset.

Validointiongelmia on huomattavissa myös tuotteella 3, 4, 5 sekä 7. Tehdyn validointikokeen yhteydessä saadut RLU-arvot tuotteille menevät yksi yhteen saatujen maljatulosten kanssa. Tämä tarkoittaisi sitä, että esimer-

kiksi tuotteen 3 luminometriset tulokset ovat täysin samat maljatulosten kanssa, kun tarkastellaan tuloksia positiivisena tai negatiivisena, ja luminometrinen laaduntarkkailumenetelmä voitaisiin näin ottaa käyttöön. Tuotteella 3 toisaalta ei ole tässä tarkkailussa osunut yhtään pilaantunutta näytettä neljän tuotantoerän aikana. Tästä syystä on täysin mahdotonta ennustaa ilman lisätutkimuksia, miltä tulokset näyttäisivät, mikäli pilaantuneita näytteitä olisi löytynyt kuten tuotteen 2 kohdalla.

Validointitesteissä saadut tulokset pilaantuneille tuotteille olivat myös erittäin korkeita verrattuna tyypillisiin pilaantuneisiin UHT-tuotteisiin. Tuloksena saadut RLU-arvot nousivat kaikissa pilaantuneissa näytteissä yli 10 000 RLU:n, muutamassa tulos oli jopa yli 50 000 RLU. Näin korkeat tulokset ovat täysin eri luokkaa kuin mitä kolmen tai useamman vuorokauden inkuboinnin jälkeen on havaittavissa luminometrisessä UHT-tuotteiden testauksessa. Pilaantuneella UHT-tuotteella lukema on yleensä hieman yli normaalin RLU-arvon vaihteluvälin, harvemmin hyvin pilaantuneessa purkissa noin 1 000 RLU.

Indikaattorimikrobitesteistä on myös huomattava, että puhtaan tuotteen RLU-vaihtelee ajan mukaan jonkin verran. Vaihtelun suunta riippuu tuotteesta. Esimerkkinä tuote 1, jonka puhtaan tuotteen RLU oli ensimmäisen vuorokauden aikana välillä 8–15 RLU, mutta validointitesteissä vaihteluväli oli 1–8 RLU kolmen vuorokauden ikäisenä. Tästä syystä eri inkubointiaikoja kokeiltaessa on otettava huomioon myös puhtaan tuotteen RLU:n vaihtelut, sillä yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen puhtaan näytteen RLU-tulos ei välttämättä ole sama kuin kolmen vuorokauden jälkeinen RLU-tulos.

Tutkimuskohteina opinnäytetyössä olivat seuraavat:

- voiko ESL-tuotteiden mikrobiologista laatua mitata käytössä olevalla ATP-luminometrillä, ja mitkä tekijät mahdollisesti estävät luminometrin käytön
- määrittää sopiva inkubointiaika tuotteille
- selvittää mahdollisuuksia validoida luminometrinen menetelmä ESL-tuotteille

ESL-tuotteiden mikrobiologista laatua voidaan mitata käytössä olevalla ATP-luminometrillä, mikäli tulos negatiivinen/positiivinen riittää. Tuotteen ominaisuudet, kuten väri, viskositeetti sekä partikkelikoko, vaikuttavat yksittäisen tuotteen soveltuvuuteen. Indikaattorimikrobitesteissä kuitenkin huomattiin, että kaikkien tutkittavien tuotteiden kohdalla oli mahdollista havaita hyvin pienikin RLU-arvon kohoaminen. Kolmen vuorokauden inkubointiajalla +30 °C:ssa saadaan tulos, joka on tulkittavissa positiivisena tai negatiivisena, mutta korkeista RLU-arvoista päätellen myös vähempi, esimerkiksi kahden vuorokauden inkubointi olisi riittänyt. Asia vaatisi kuitenkin lisätutkimuksia. ATP-luminometriä ei tässä tutkimuksessa kyetty validoimaan ESL-tuotteille onnistuneesti, sillä referenssimenetelmän ja ATP-luminometrin tuloksissa oli liikaa ristiriitaisuuksia. Joidenkin tuotteiden kohdalla tutkimuksia pitäisi jatkaa, kunnes pilaantuneita näytteitä löytyy, jolloin saadaan varmistus menetelmän toimivuudesta ja



voidaan eliminoida virheelliset esiintymät. Työssä saadut RLU-arvojen vaihteluvälit toimivat kuitenkin jatkotutkimusten osviittana. Myös käytössä olevaa referenssimenetelmää pitäisi harkita niin, että samat näytepurkit olisivat käytössä sekä luminometrisessä että maljavalutestissä, jolloin varmuus tulosten vastaavuudesta paranisi merkittävästi.

## LÄHTEET

AIB International. 2013. A Q&A on ATP Bioluminescence Assay. AIB International. Viitattu 1.11.2016.  
[https://aibonline.org/aibOnline\\_/www.aibonline.org/newsletter/Magazine/Sep\\_Oct2013/5BioluminescenceAssay.pdf](https://aibonline.org/aibOnline_/www.aibonline.org/newsletter/Magazine/Sep_Oct2013/5BioluminescenceAssay.pdf)

Arla. 2016. Maidon pastörinti. Viitattu 1.11.2016.  
<http://www.arla.fi/yritys/hyvinvointi/maidon-pastorointi/>

Bottari B., Santarelli M & Neviani E. 2015. Determination of microbial load for different beverages and foodstuff by assessment of intracellular ATP. *Trends in Food Science & Technology* 44: 36 – 48. Elsevier. Viitattu 1.11.2016. Saatavissa verkossa:  
[https://www.researchgate.net/publication/273642220\\_Determination\\_of\\_microbial\\_load\\_for\\_different\\_beverages\\_and\\_foodstuff\\_by\\_assessment\\_of\\_intracellular\\_ATP](https://www.researchgate.net/publication/273642220_Determination_of_microbial_load_for_different_beverages_and_foodstuff_by_assessment_of_intracellular_ATP)

Buckenhüskes H. J. 2014. ESL milk production. DLG-Expert report 4/2014. Viitattu 1.11.2016.  
[http://www.dlg.org/fileadmin/downloads/food/Expertenwissen/Ernaehrung/e\\_2014\\_4\\_Expertenwissen\\_ESL.pdf](http://www.dlg.org/fileadmin/downloads/food/Expertenwissen/Ernaehrung/e_2014_4_Expertenwissen_ESL.pdf)

Celsius. 2011. Celsius RapiScreen™ for the CellScan™ Innovate. Laite-esitys. Viitattu 1.11.2016. Saatavissa verkossa:  
[http://www.netfood.fi/images/stories/files/Celsius\\_RapiScreen\\_Innovate.pdf](http://www.netfood.fi/images/stories/files/Celsius_RapiScreen_Innovate.pdf)

Celsius. 2015. Achieving Lean Quality for Food & Beverage Manufacturing Efficiency. Celsius International – a Charles River company. Viitattu 1.11.2016. [http://www.criver.com/files/pdfs/emd/celsius/report\\_lean-quality.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/emd/celsius/report_lean-quality.aspx)

Chollet R. & Ribault S. 2012. Use of ATP Bioluminescence for Rapid Detection and Enumeration of Contaminants: The Milliflex Rapid Microbiology Detection and Enumeration System. Teoksessa Lapota D. (toim.) *Bioluminescence - Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications*. InTech. Viitattu 1.11.2016. Saatavissa verkossa:  
<http://www.intechopen.com/books/bioluminescence-recent-advances-in-oceanic-measurements-and-laboratory-applications>

Dostálek P. & Brányik T. 2005. Prospects for rapid bioluminescent detection methods in the food industry – a review. *Czech J. Food Sci.*, 23: 85–92. Viitattu 1.11.2016. Saatavissa verkossa:  
<http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/50553.pdf>

Euroopan komission asetus (EY) 2073/2005. EUR-Lex. Viitattu 2.10.2016. Saatavissa verkossa: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:FI:PDF>

Euroopan komission asetus (EY) 2074/2005. EUR-Lex. Viitattu 15.9.2016. Saatavissa verkossa: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0027:0059:FI:PDF>

Evira. 2016. HACCP. Viitattu 1.11.2016.  
<https://www.evira.fi/yhteiset/omavalvonta/haccp/>

Griffiths, M. 1993. Applications of Bioluminescence in the Dairy Industry. *Journal of Dairy Science* 76: 3118–3125. Viitattu 1.11.2016. Saatavissa verkossa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8227636>

Hygiena. 2016. SuperSnap: The Next Level of ATP Detection. Laite-esite. Viitattu 1.11.2016. Saatavissa verkossa: <http://www.hygiena.com/supersnap-food-service.html>

Koutchma T. & Barnes G. 2013. Shelf Life Enhancement of Milk Products. *Food Technology* 10/2013. Viitattu 1.11.2016. Saatavissa verkossa: [https://www.researchgate.net/publication/258995043\\_Shelf\\_Life\\_Enhancement\\_of\\_Milk\\_Products](https://www.researchgate.net/publication/258995043_Shelf_Life_Enhancement_of_Milk_Products)

Maito ja Terveys. 2016. Tietoa maitovalmisteista. Maidon käsittely. Maitovalmisteiden lämpökäsittelyt. Viitattu 1.11.2016.  
<http://www.maitojaterveys.fi/maitotietoa/tietoa-maitovalmisteista/maidonkasittely/maitovalmisteiden-lampokasittelyt.html>

Milk Works. n.d.a. Maidon säilyvyys. Viitattu 1.11.2016.  
<http://www.milkworks.fi/oppimateriaali/pakkaaminen/maidon-sailyvyys/Sivut/default.aspx>

Milk Works. n.d.b. ESL-tuotteen pakkaaminen. Viitattu 1.11.2016.  
<http://www.milkworks.fi/oppimateriaali/pakkaaminen/esl-tuotteen-pakkaaminen/Sivut/default.aspx>

Rysstad G. & Kolstad J. 2006. Extended shelf life milk—advances in technology. *International Journal of Dairy Technology*, 59: 85–96. Viitattu 1.11.2016. Saatavissa verkossa: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0307.2006.00247.x/full>

Shama, H. ja Malik D. 2013. The Uses and Abuses of Rapid Bioluminescence-based ATP Assays. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216: 115–125. Elsevier. Viitattu 1.11.2016. Saatavissa verkossa: <https://dspace.lboro.ac.uk/dspace-jspui/handle/2134/11028>

Tetra Pak. 2016. Tetra Pak® TT/3 XH IC: Dual Filling Machine for Tetra Top® With One Step Opening. Laite-esite. Viitattu 1.11.2016. Saatavissa verkossa: <http://www.tetrapak.com/packaging/tetra-top-3-xh-ic>

Valigra L. 2010. ATP Bioluminescence Moves Mainstream. Food Quality & Safety. Viitattu 1.11.2016.  
<http://www.foodqualityandsafety.com/article/atp-bioluminescence-moves-mainstream/>

Valio. 2011. Maidon käsittely. Viitattu 1.11.2016.  
<http://www.valio.fi/tuotteet/artikkeli/maidon-kasittely-1/>

Valio. 2015. Maidon käsittely ja säilyvyys. Viitattu 1.11.2016.  
[http://www.valio.fi/ammattilaiset/ravitsemus\\_ja\\_terveys/maidon-kasittely-ja-sailyvyys/](http://www.valio.fi/ammattilaiset/ravitsemus_ja_terveys/maidon-kasittely-ja-sailyvyys/)

Valio. 2016. Valion ESL-tuotteiden laatusuunnitelmat. Valio Turenki.

Walstra P., Wouters J. & Geurts T. 2006. Dairy Science and Technology. 2. painos. Taylor & Francis Group. New York: CRC Press.

## HAASTATTELUT

Virtalaine, T. 2016. Toimitusjohtaja. Net-Foodlab Oy.  
ATP-luminometrin laitetoimittaja Valio Oy Turengille.

NÄYTTEENOTTO VIIKOLLA A

## Lisänäytteet viikolla A

Otetaan 15 peräkkäistä TTOP-purkkia yhdeltä puolelta seuraavia tuotteita:

- ##### XXX (\*\*.\*\*.\*) [nimikenumero, tuotenimi, pakkausvm.]
- ##### YYY (\*\*.\*\*.\*)
- ##### ZZZ (\*\*.\*\*.\*)

Purkit tulee ottaa ajankohdalta, joka ei ole esim. paperinjatkon tai häiriön jälkeen kontaminaatioiden välttämiseksi. Näytteisiin lisänäyte-tarra.

Purkit toimitetaan labraan, jossa ne sijoitetaan jääkaappiin.

Näytteitä tarvitaan laadunvalvontaan liittyvään opinnäytetyöhön.

t. Kristian

## ESIKOKEEN ATP- (RLU) JA PESÄKETULOKSET (PMY) 1 &amp; 2 VRK:N JÄLKEEN

+30 °C inkuboidut	tulos (RLU)	tulos +22 °C (pmy/ml)	tulos +30 °C (pmy/ml)	+22 °C inkuboidut	tulos (RLU)	tulos +22 °C (pmy/ml)	tulos +30 °C (pmy/ml)
tuote i10.1	115108	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h10.1	118	49000	44000
tuote i10.2	102331	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h10.2	150	48000	45000
tuote i20.1	125336	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h20.1	91	64000	92000
tuote i20.2	131949	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h20.2	17	59000	87000
tuote i30.1	142165	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h30.1	313	75000	70000
tuote i30.2	145385	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h30.2	286	69000	62000
tuote i0.1	8	0	0				
tuote i10.1	123945	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h10.1	3	92000	86000
tuote i10.2	103524	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h10.2	3	89000	81000
tuote i20.1	91113	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h20.1	3	3300	3200
tuote i20.2	117721	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h20.2	3	15	3100
tuote i30.1	110491	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h30.1	3	14	28000
tuote i30.2	139757	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h30.2	3	16	34000
tuote i0.1	10	0	0				
tuote i10.1	18666	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h10.1	6	<10	<10
tuote i10.2	4876	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h10.2	6	<10	<10
tuote i20.1	3735	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h20.1	6	<10	<10
tuote i20.2	7027	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h20.2	6	<10	<10
tuote i30.1	9329	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h30.1	6	<10	<10
tuote i30.2	5521	>3*10 <sup>5</sup>	>3*10 <sup>5</sup>	tuote h30.2	6	<10	<10
tuote i0.1	15	0	0				

+22 °C inkuboidut	tulos (RLU)
tuote 6 h10.1	1671
tuote 6 h10.2	5331
tuote 6 h20.1	4775
tuote 6 h20.2	4676
tuote 6 h30.1	4526
tuote 6 h30.2	4420
tuote 6 i0.2	16

## TUOTTEIDEN SOVELTUVUUSTESTAUS

Tuotteet 1 ja 2

tuote 1								
aika	p a		p b		k a		k b	
h	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU
0	<1	13	<1	14	<1	15	<1	14
2	<10	14	<10	15	<10	13	<10	14
4	<10	15	<10	13	<10	15	<10	15
6	<10	14	<10	12	<10	12	<10	14
7	<10	13	<10	12	<10	14	<10	14
8	<10	10	<10	11	<10	10	<10	11
9	<10	11	<10	11	<10	7	<10	8
10	<10	10	<10	11	<100	11	<100	11
11	<10	11	<10	9	40	9	150	11
12	<10	8	<10	8	200	9	1000	11
13	<10	9	<10	7	1000	11	10000	13
14	<10	7	<10	11	9000	16	16000	16
15	<10	8	<10	10	30000	31	36000	27
16	<10	8	<10	8	164000	114	484000	265

tuote 2								
aika	p a		p b		k a		k b	
h	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU
0	<1	9	<1	10	<1	8	<1	11
2	<10	8	<10	8	<10	9	<10	11
4	<10	11	<10	11	<10	9	<10	12
6	<10	9	<10	10	<10	9	<10	3
7	<10	9	<10	10	<10	7	10	11
8	<10	10	<10	10	<10	7	<10	9
9	<10	10	<10	9	<10	8	<10	10
10	<10	10	<10	12	<100	10	<100	9
11	<10	9	<10	11	20	9	<10	10
12	<10	7	<10	13	100	5	400	10
13	<10	9	<10	9	1000	11	2000	11
14	<10	9	<10	9	4000	9	8000	16
15	<10	10	<10	8	11000	12	26000	23
16	<10	11	<10	12	50000	90	175000	226

## TUOTTEIDEN SOVELTUVUUSTESTAUS

Tuotteet 3 ja 4

tuote 3								
aika	p a		p b		k a		k b	
h	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU
0	<1	21	<1	22	<1	24	<1	23
2	<10	22	<10	18	<10	23	<10	18
4	<10	17	<10	19	<10	21	<10	20
6	<10	15	<10	18	<10	17	<10	18
7	<10	15	<10	16	<10	17	10	18
8	<10	18	<10	17	<10	14	<10	15
9	<10	16	<10	15	<10	17	10	17
10	<10	16	<10	17	<100	18	<100	14
11	<10	14	<10	17	10	15	20	15
12	130	15	<10	17	<100	14	200	14
13	360	16	<10	15	<1000	16	2000	18
14	1310	16	<10	15	3000	14	1000	16
15	1930	17	<10	14	8000	16	4000	18
16	>3000	61	<10	14	32000	43	10000	29
17	>3000	118	<10	15	77000	61	26000	45

tuote 4								
aika	p a		p b		k a		k b	
h	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU
0	<1	8	<1	7	<1	7	<1	8
10	<10	8	<10	8	<10	7	10	7
11	<10	8	<10	6	50	8	30	8
12	<10	8	<10	7	110	7	60	6
13	<10	9	<10	10	360	7	100	6
15	<10	6	<10	7	7800	8	6000	8
16	<10	7	<10	8	23600	1	13900	28
17	<10	8	<10	9	76000	67	44000	35



## TUOTTEIDEN SOVELTUVUUSTESTAUS

Tuotteet 5 ja 6

tuote 5								
aika	p a		p b		k a		k b	
h	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU
0	<1	10	<1	12	<1	12	<1	12
10	<10	10	<10	14	<10	13	<10	13
11	<10	13	<10	13	<10	11	<10	13
12	<10	11	<10	13	<10	12	<10	11
13	<10	11	<10	9	<10	11	10	12
15	<10	14	<10	8	200	11	<100	10
16	<10	12	<10	12	100	12	100	12
17	<10	11	<10	12	190	12	10	12
18	<10	13	<10	15	230	10	40	13
19	<10	10	<10	10	280	10	30	10
20	<10	9	<10	10	400	12	200	10
23	<10	10	<10	11	4000	20	3000	16
26	<10	9	<10	6	>300000	1419	161000	124

tuote 6								
aika	p a		p b		k a		k b	
h	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU
0	<1	4	<1	5	<1	5	<1	4
10	<10	5	<10	5	<10	6	<10	4
11	<10	6	<10	6	<10	5	30	6
12	<10	5	<10	5	<10	10	20	6
13	<10	6	<10	8	<10	10	40	8
15	<10	11	<10	13	<100	13	1300	12
16	<10	16	<10	17	<100	31	900	20
17	<10	14	<10	16	<10	13	250	12
18	<10	15	<10	14	<10	14	1530	13
19	<10	15	<10	13	<10	14	4000	19
20	<10	15	<10	14	<100	13	6000	20
23	<10	14	<10	12	<100	12	13000	29
26	<10	9	<10	10	<100	8	>30000	2264

## TUOTTEIDEN SOVELTUVUUSTESTAUS

## Tuote 7

tuote 7								
aika	p a		p b		k a		k b	
h	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU	pmy/ml	RLU
0	<1	10	<1	10	<1	11	<1	9
10	<10	10	<10	11	<10	10	<10	10
11	<10	8	<10	8	<10	16	<10	8
12	<10	10	<10	9	<10	12	<10	11
13	<10	10	<10	10	<10	8	<10	11
15	<10	10	<10	7	<100	10	100	11
16	<10	10	<10	12	300	11	100	9
17	<10	11	<10	10	50	8	280	9
18	<10	8	<10	8	350	8	1540	12
19	<10	7	<10	8	540	8	2820	10
20	<10	9	<10	7	1200	10	3700	17
23	<10	11	<10	8	4000	24	6000	30
26	<10	10	<10	8	>300000	2737	>300000	11546

## NÄYTTEENOTTO VIIKOLLA B

# Lisänäytteet viikolla B

### **TTOP-Koneenhoitajat:**

Otetaan näytteitä viikolla 28 kaksinkertainen määrä kaikista TTOP-tuotteista lukuun ottamatta XXX. Eli aloitus-, uusi aloitus-, väli- ja loppunäytteet.

Ei koske OP-, laktoosi- ja kylmänäytteitä.

Extranäytepurkkeihin laitetaan samat tarrat kuin norminäytteisiin, ja näytteet toimitetaan normaalisti laboratorioon ajon päätteeksi.

### **Laboratorio:**

Lisänäytteet sijoitetaan inkubointihuoneen johonkin nurkkaan.

Näytteitä tarvitaan laadunvalvontaan liittyvään opinnäytetyöhön.

t. Kristian

## VALIDOINTIKOKEEN TULOKSET

tuote 1							
#	RLU	maljatulos (1/0)	huom	#	RLU	maljatulos (1/0)	huom
1	5	0		48	1	0	
2	6	0		49	4	0	
3	5	0		50	5	0	
4	5	0		51	4	0	
5	4	0		52	3	0	
6	6	0		53	3	0	
7	5	0		54	5	0	
8	6	0		55	4	0	
9	6	0		56	3	0	
10	7	0		57	1	0	
11	7	0		58	5	0	
12	7	0		59	4	1 aloitus, 16 pmy	
13	7	0		60	12/65	1 aloitus, 41pmy	
14	7	0		61	6	0	
15	7	0		62	6	0	
16	7	0		63	8	0	
17	56561	1 aloitus, >999 pmy		64	5	0	
18	6	0		65	6	0	
19	7	0		66	6	0	
20	8	1 aloitus, >999 pmy		67	5	0	
21	6	0		68	5	0	
22	7	0		69	7	0	
23	6	0		70	5	0	
24	7	1 uusi aloitus		71	6	0	
25	7	0		72	6	0	
26	8	0		73	7	0	
27	8	0		74	5	0	
28	5	0		75	8	0	
29	6	0		76	7	0	
30	5	0		77	4	0	
31	4	0		78	7	0	
32	2	0		79	5	0	
33	3	0		80	5	0	
34	3	0		81	3	0	
35	5	0		82	6	0	
36	5	0		83	5	0	
37	3	0		84	5	0	
38	2	0		85	5	0	
39	4	0		86	7	0	
40	2	0		87	5	0	
41	5	0		88	7	0	
42	4	0		89	5	0	
43	4	0		90	5	0	
44	4	0		91	5	0	
45	3	0		92	6	0	
46	1	0		93	7	0	
47	5	0		94	6	0	

## Luminometrisen ATP-menetelmän soveltuvuus ESL-tuotteiden laaduntarkkailuun

Liite 5/2

tuote 2							
#	RLU	maljatulos (1/0)	huom	#	RLU	maljatulos (1/0)	huom
1	7	0		52	6	0	
2	7	0		53	6	0	
3	8	0		54	6	0	
4	9	0		55	7	0	
5	8	0		56	8	0	
6	8	0		57	5	0	
7	8	0		58	6	0	
8	7	0		59	7	0	
9	8	0		60	7	0	
10	8	0		61	6	0	
11	6	0		62	4	0	
12	8	0		63	6	0	
13	11	0		64	4	0	
14	8	0		65	6	0	
15	9	0		66	6	0	
16	8	0		67	5	0	
17	8	0		68	4	0	
18	9	0		69	6	0	
19	7	0		70	7	0	
20	9	0		71	5	0	
21	9	0		72	5	0	
22	7	0		73	8	0	
23	37391	0	aloitus	74	4	0	
24	7	0		75	1	0	BckgHigh, uusinta 5
25	9	0		76	7	0	
26	7	0		77	11	0	
27	7	0		78	7	0	
28	8	0		79	7	0	
29	8	0		80	7	0	
30	8	0		81	7	0	
31	8	0		82	9	0	
32	8	0		83	8	0	
33	6	0		84	8	0	
34	18278	0	aloitus	85	7	0	
35	10	0		86	9	0	
36	7	0		87	6	0	
37	8	0		88	8	0	
38	7	0		89	9	0	
39	13558	0	aloitus	90	8	0	
40	6	0		91	7	0	
41	6	0		92	9	0	
42	8	0		93	8	0	
43	7	0		94	10	0	
44	8	0		95	7	0	
45	7	0		96	9	0	
46	8	0		97	10	0	
47	7	0		98	9	0	
48	7	0		99	7	0	
49	9	0		100	7	0	
50	6	0		101	47	0	uusinta 10
51	5	0		102	8	0	
				103	7	0	
				104	6	0	
				105	1	0	uusinta 8

## Luminometrisen ATP-menetelmän soveltuvuus ESL-tuotteiden laaduntarkkailuun

Liite 5/3

tuote 3							
#	RLU	maljatus (1/0)	huom	#	RLU	maljatus (1/0)	huom
1	7	0		53	9	0	
2	10	0		54	10	0	
3	9	0		55	10	0	
4	12	0		56	12	0	
5	10	0		57	12	0	
6	12	0		58	10	0	
7	10	0		59	10	0	
8	13	0		60	8	0	
9	13	0		61	9	0	
10	11	0		62	10	0	
11	12	0		63	10	0	
12	11	0		64	12	0	
13	11	0		65	9	0	
14	10	0		66	10	0	
15	12	0		67	10	0	
16	11	0		68	12	0	
17	12	0		69	14	0	
18	12	0		70	8	0	
19	12	0		71	13	0	
20	13	0		72	11	0	
21	12	0		73	10	0	
22	13	0		74	12	0	
23	11	0		75	12	0	
24	12	0		76	9	0	
25	11	0		77	10	0	
26	11	0		78	8	0	
27	10	0		79	10	0	
28	12	0		80	9	0	
29	13	0		81	12	0	
30	13	0		82	11	0	
31	11	0		83	9	0	
32	12	0		84	11	0	
33	11	0		85	9	0	
34	12	0		86	10	0	
35	11	0		87	10	0	
36	14	0		88	12	0	
37	12	0		89	9	0	
38	10	0		90	10	0	
39	12	0		91	16	0	
40	13	0		92	14	0	
41	11	0		93	11	0	
42	12	0		94	11	0	
43	9	0		95	14	0	
44	11	0		96	9	0	
45	11	0		97	13	0	
46	9	0		98	12	0	
47	10	0		99	13	0	
48	9	0		100	11	0	
49	11	0		101	12	0	
50	8	0		102	12	0	
51	11	0		103	11	0	
52	10	0					

tuote 4							
#	RLU	maljatus (1/0)	huom	#	RLU	maljatus (1/0)	huom
1	4	0		47	3	0	
2	6	0		48	4	0	
3	3	0		49	5	0	
4	3	0		50	5	0	
5	5	0		51	3	0	
6	2	0		52	5	0	
7	6	0		53	5	0	
8	4	0		54	4	0	
9	3	0		55	5	0	
10	3	0		56	6	0	
11	4	0		57	4	0	
12	4	0		58	5	0	
13	4	0		59	5	0	
14	4	0		60	3	0	
15	3	0		61	5	0	
16	6	0		62	3	0	
17	4	0		63	4	0	
18	4	0		64	5	0	
19	4	0		65	3	0	
20	5	0		66	5	0	
21	4	0		67	3	0	
22	5	0		68	4	0	
23	5	0		69	4	0	
24	4	0		70	5	0	
25	4	0		71	6	0	
26	4	0		72	5	0	
27	4	0		73	4	0	
28	6	0		74	5	0	
29	6	0		75	4	0	
30	3	0		76	5	0	
31	4	0		77	5	0	
32	4	0		78	3	0	
33	5	0		79	5	0	
34	2	0		80	4	0	
35	4	0		81	3	0	
36	5	0		82	5	0	
37	4	0		83	4	0	
38	2	0		84	3	0	
39	3	0		85	5	0	
40	5	0		86	3	0	
41	4	0		87	4	0	
42	4	0		88	4	0	
43	3	0		89	5	0	
44	5	0		90	4	0	
45	3	0		91	3	0	
46	3	0		92	7	0	

## Luminometrisen ATP-menetelmän soveltuvuus ESL-tuotteiden laaduntarkkailuun

Liite 5/5

tuote 5							
#	RLU	maljatulos (1/0)	huom	#	RLU	maljatulos (1/0)	huom
1	5	0		56	6	0	
2	5	0		57	5	0	
3	4	0		58	4	0	
4	7	0		59	5	0	
5	6	0		60	8	0	
6	5	0		61	5	0	
7	5	0		62	7	0	
8	7	0		63	5	0	
9	4	0		64	4	0	
10	3	0		65	8	0	
11	4	0		66	6	0	
12	6	0		67	5	0	
13	6	0		68	7	0	
14	5	0		69	7	0	
15	5	0		70	5	0	
16	4	0		71	6	0	
17	3	0		72	4	0	
18	5	0		73	5	0	
19	5	0		74	5	0	
20	4	0		75	5	0	
21	4	0		76	10	0	
22	5	0		77	5	0	
23	5	0		78	7	0	
24	4	0		79	6	0	
25	5	0		80	5	0	
26	4	0		81	6	0	
27	7	0		82	6	0	
28	5	0		83	5	0	
29	5	0		84	8	0	
30	6	0		85	6	0	
31	4	0		86	5	0	
32	5	0		87	6	0	
33	6	0		88	5	0	
34	5	0		89	5	0	
35	7	0		90	5	0	
36	1	0		91	5	0	
37	6	0		92	5	0	
38	4	0		93	5	0	
39	6	0		94	5	0	
40	6	0		95	5	0	
41	6	0		96	7	0	
42	7	0		97	6	0	
43	6	0		98	7	0	
44	5	0		99	6	0	
45	5	0		100	7	0	
46	7	0		101	5	0	
47	7	0		102	6	0	
48	6	0		103	7	0	
49	4	0		104	8	0	
50	6	0		105	6	0	
51	5	0		106	7	0	
52	5	0		107	6	0	
53	7	0		108	6	0	
54	8	0		109	5	0	
55	7	0					



tuote 6							
#	RLU	maljatus (1/0)	huom	#	RLU	maljatus (1/0)	huom
1	7	0		51	8	0	
2	8	0		52	7	0	
3	8	0		53	7	0	
4	6	0		54	8	0	
5	7	0		55	1	0	
6	10	0		56	2	0	
7	9	0		57	2	0	
8	9	0		58	2	0	
9	11	0		59	3	0	
10	9	0		60	2	0	
11	11	0		61	4	0	
12	8	0		62	3	0	
13	9	0		63	3	0	
14	8	0		64	2	0	
15	7	0		65	1	0	
16	8	0		66	4	0	
17	9	0		67	2	0	
18	10	0		68	3	0	
19	8	0		69	2	0	
20	9	0		70	3	0	
21	10	0		71	3	0	
22	11	0		72	3	0	
23	8	0		73	4	0	
24	8	0		74	6	0	
25	7	0		75	4	0	
26	10	0		76	3	0	
27	7	0		77	3	0	
28	9	0		78	2	0	
29	8	0		79	5	0	
30	7	0		80	74246	0	aloitus
31	7	0		81	6	0	
32	6	0		82	4	0	
33	9	0		83	6	0	
34	8	0		84	4	0	
35	7	0		85	4	0	
36	9	0		86	13157	0	aloitus
37	8	0		87	4	0	
38	7	0		88	5	0	
39	8	0		89	6	0	
40	6	0		90	3	0	
41	6	0		91	2	0	
42	7	0		92	4	0	
43	7	0		93	4	0	
44	8	0		94	3	0	
45	7	0		95	5	0	
46	8	0		96	5	0	
47	7	0		97	4	0	
48	9	0		98	4	0	
49	7	0		99	6	0	
50	7	0		100	4	0	

	tuote 7		
#	RLU	maljatulokset (1/0)	huom
1	4	0	
2	4	0	
3	4	0	
4	5	0	
5	5	0	
6	4	0	
7	5	0	
8	3	0	
9	5	0	
10	4	0	
11	5	0	
12	4	0	
13	5	0	
14	5	0	
15	3	0	
16	4	0	
17	3	0	
18	5	0	
19	4	0	
20	3	0	