

Heidi Kekola

***Escherichia coli* -bakteerin määrittämenetelmän verifiointi**

Valio Oy

Opinnäytetyö

Syksy 2020

SeAMK Ruoka

Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

SeAMK 

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: SeAMK Ruoka

Tutkinto-ohjelma: Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Elintarviketeknologia

Tekijä: Heidi Kekola

Työn nimi: *Escherichia coli* -bakteerin määrittämenetelmän verifiointi

Ohjaaja: Gun Wirtanen

Vuosi: 2020

Sivumäärä: 80

Liitteiden lukumäärä: 5

Seinäjoen Valion aluelaboratoriossa *Escherichia coli* -bakteerin määrittämenetelmä vaihdetaan ISO 16649-2:2001-standardin mukaiseksi ja opinnäytetyönä käyttöön-otettavalle menetelmälle tehtiin verifiointi. Menetelmä on validoitu Valion Pitäjänmäen laboratoriossa.

Verifiointissa suoritettiin koetestauksia menetelmään kuuluvalla selektiivisellä tryptoni-sappi-x-glukuronidi-agarilla, joka perustuu β -glukuronidaasin havaitsemiseen kromoforin avulla. Inkubointi tapahtui 44 °C:ssa ja *E. coli* -pesäkkeet kasvoivat tyypillisinä sinisinä pesäkkeinä. *E. coli* -bakteerista käytettiin ISO 11133:2014 kasvualustojen testaus -standardissa listattuja kantakokoelmakantoja. Verifiointilla osoitettiin kasvualustan toimivuus kyseisessä laboratoriossa ja laboratorion taito käyttää kyseistä menetelmää ja tunnistaa bakteeri uudelta alustalta. Näytteinä käytettiin valikoiden Valion omia tuotevalikoimatuotteita. Testejä tehtiin kontaminoimattomilla ja kontaminoiduilla näytteillä sekä interkalibrointi-näytteillä. Lisäksi testattiin kasvualustan tuottavuus, selektiivisyys ja spesifisyys. Tuottavuustesti tehtiin kahdella *E. coli* -kannalla ja verrattiin tuloksia yleisalustan antamiin tuloksiin. Standardin mukaan selektiivisyys testattiin *Enterococcus faecalis* -bakteerilla ja spesifisyys *Citrobacter freundii* -bakteerilla. Testauksessa käytettiin sekä kvantitatiivisia että kvalitatiivisia menetelmiä. Verifioitavan menetelmän rinnalla vertailumenetelmänä käytössä olevaa NMKL 125, 4th. 2005 -menetelmää, jossa vertailuagarina oli selektiivinen kristallivioletti-sappi-agar. Lisäksi varmistustestinä on käytetty β -glukuronidaasin tuotto testiä. Tuottavuustestauksessa vertailuagarina oli yleisalusta tryptoni-soija-agar. Kummallakaan menetelmällä ei pystytty havaitsemaan enterohemorragista *E. coli* -bakteeria (EHEC:iä) sen *E. coli* -bakteereille tyypillisen käyttäytymisen puutteen vuoksi.

E. coli havaittiin hyvin uudelta kasvualustalta ja kasvualusta toimi odotetusti. Menetelmä on nopea, selkeä eikä varmistustestejä tarvita. Bakteeripesäkkeet oli helppo tunnistaa sinisen värinsä ansiosta, vaikka näytteen joukossa olisi ollut häiritseviä elementtejä tuotteesta. Pesäkemäärissä suuria eroja ei uuden ja vanhan menetelmän välillä ollut. Tuottavuustestauksessa pakasteampulli toimi huonosti ja sen toimivuuteen tulisi jatkossa kiinnittää huomiota.

Avainsanat: *Escherichia coli*, kolibakteerit, mikrobiologia, verifiointi, testausmenetelmät, laboratoriotekniikka, elintarviketurvallisuus

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Faculty: SeAMK Food and Agriculture

Degree programme: Food Processing and Biotechnology

Specialisation: Food Technology

Author/s: Heidi Kekola

Title of thesis: Verification of the *Escherichia coli* -Enumeration Method

Supervisor(s): Gun Wirtanen

Year: 2020 Number of pages: 80 Number of appendices: 5

This thesis verifies a new *Escherichia coli* measurement method for the Seinäjoki Valio Regional Laboratory. Currently they are using NMKL 125, 4th. 2005 -method, which will be replaced by a method in accordance with ISO 16649-2:2001. The method has already been validated in the laboratory of Valio in Pitäjänmäki.

In the verification, experimental tests were performed on a selective tryptone-bile-x-glucuronide agar, based on the detection of β -glucuronidase by chromophore. Incubation was at 44°C and *E. coli* formed typical blue colonies. Two *E. coli* strains were used in the tests to comply with the ISO 11133:2014 performance testing standard for culture media. The verification demonstrated the functionality of the medium in the laboratory and the ability of the laboratory to use that method and identify the bacterium on the new medium. The sample matrix contained Valio's own products, which were tested without added bacteria, with contaminated and intercalibration samples. In addition, the productivity, selectivity, and specificity of the medium were tested. Selectivity was tested with *Enterococcus faecalis* and specificity with *Citrobacter freundii*. Quantitative and qualitative methods were used for testing. The reference method was NMKL 125, 4th. 2005, in which the reference agar was selective crystal violet bile agar. In addition, a β -glucuronidase production test was performed as a confirmatory test. Tryptone-soy agar was used as a nonspecific control agar. Neither method can detect enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) due to the lack of the above-mentioned typical reaction for *E. coli*.

Colonies of *E. coli* were detected well on the new medium and the medium functioned as expected. Confirmation tests are not required and thus results are obtained quickly. Bacterial colonies were easily found on the clear medium and were easy to identify due to their blue colour, even though there were interfering elements in some of the product samples. There were no major differences in number of colonies between the new and old methods. The verification procedure performed showed that the method worked well.

Keywords: *Escherichia coli*, microbiology, verification, testing methods, laboratory technology, food safety

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ.....	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo.....	7
Käytetyt termit ja lyhenteet.....	10
1 JOHDANTO.....	14
2 BAKTEERIT.....	16
2.1 Enterobakteerit.....	16
2.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	16
2.1.2 <i>Citrobacter freundii</i>	17
2.2 Koliformiset bakteerit.....	17
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	18
2.2.2 Tunnetut <i>Escherichia coli</i> -kannat.....	19
2.2.3 Enterohemorraginen <i>Escherichia coli</i>	20
2.3 Mikrobien kasvuun vaikuttavat tekijät elintarvikkeissa.....	22
3 MENETELMÄT JA STANDARDIT.....	24
3.1 Noudatettavat menetelmät ja standardit.....	24
3.2 Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea.....	24
3.3 Kansainvälinen standardisoimisjärjestö.....	25
3.4 SFS-EN ISO 11133:2014 Elintarvike-, rehu- ja vesimikrobiologia.....	25
3.5 NMKL no125, 4.painos 2005. Lämpökestoiset kolimuotoiset bakteerit.....	26
3.6 ISO 16649-2:2001 β -glukuronidaasi-positiivisen <i>E. coli</i> määritys.....	26
4 VERIFIOINTI.....	28
4.1 Verifioinnin määritelmä.....	28
4.1.1 Mikrobiologisiin testeihin liittyvä epävarmuus.....	28
4.1.2 Toistettavuus.....	28
4.1.3 Uusittavuus.....	29
4.1.4 Spesifisyys.....	29
4.2 Verifiointisuunnitelma.....	29
4.2.1 Valikoimassa olevat luonnolliset tuotenäytteet.....	29

4.2.2	Kontaminoidut tuotenäytteet	30
4.2.3	Kontaminoitu maito	31
4.2.4	Interkalibrointinäytteet	31
4.2.5	Laadunvarmistuskäytännöt	32
4.3	Kansallinen elintarvikevirasto ja vertailulaboratorio	32
4.4	Interkalibrointikierrokset	33
5	BAKTEERIEIN KASVATUS	34
5.1	Kasvualustat	34
5.1.1	Tryptoni-sappi-x-glukuronidi-agar	35
5.1.2	Kristallivioletti-sappi-agar	37
5.1.3	Tryptoni-soija-agar	38
5.2	Kantakokoelma	39
5.3	Rikastus	40
5.4	Puhdasviljelmä	40
5.5	Laimennossarja	41
5.6	Kontrollit	41
5.7	Näytteiden siirrostus ja kasvatus	42
6	MENETELMÄN TESTAUS	44
6.1	Menettely	44
6.2	TBX-alustan koetestausta	45
6.3	Valikoimassa olevat luonnolliset tuotenäytteet	45
6.4	Kontaminoidut tuotenäytteet	47
6.5	Kontaminoitu maito	49
6.5.1	Toistettavuus	50
6.5.2	Uusittavuus	51
6.6	Interkalibrointinäytteet	52
6.7	Tuottavuus	54
6.8	Selektiivisyys	55
6.9	Spesifisyys	56
7	TYÖN TULOKSET	57
7.1	TBX-alustan koetestauksen tulokset	57
7.2	Valikoimassa olevat luonnolliset tuotenäytteet	58
7.3	Kontaminoidut tuotenäytteet	59

7.4 Saastunut maito	64
7.5 SLV-interkalibrointinäytteiden tulokset	67
7.6 Kasvualustan tuottavuus-, selektiivisyys- ja spesifisyystestien tulokset	70
7.6.1 Tuottavuustestien tulokset	71
7.6.2 Selektiivisyystestin tulokset.....	72
7.6.3 Spesifisyystestauksen tulokset	73
8 JOHTOPÄÄTÖKSET	74
LÄHTEET	76
LIITTEET	80

Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuva 1. <i>E. coli</i> TBX-agarilla.	36
Kuva 2. <i>E. coli</i> VRB-agarilla.	38
Kuva 3. Dilumat-laite.	47
Kuva 4. Laimennossarjan tuloksia TSA-maljalla.	50
Kuva 5. Bakteerien sivelykokeilu TBX-alustalla.	58
Kuva 6. Viljely kontaminoidusta voinäytteestä.	62
Kuva 7. Viljely kontaminoidusta proteiinijauhenäytteestä (demi 50).	62
Kuva 8. Viljely kontaminoidusta jogurtinäytteestä.	63
Kuva 9. Viljely kontaminoidusta vanukasnäytteestä.	63
Kuva 10. Kontaminoimaton jogurtinäyte kummallakin alustalla.	64
Kuva 11. Laktoosin käyttökoe.	68
Kuva 12. Positiivinen tulos indolikokeessa.	68
Kuva 13. β -glukuronidaasikoe.	69
Kuva 14. Tuottavuustestaus maljat laskettu.	72
Kuva 15. Vasemmalla <i>E. coli</i> -kanta WDCM 00012 ja oikealla WDCM 00202.	73
Kuva 16. <i>C. freundii</i> (WDCM 00006) levitettyä koko alustalle.	73
Kuvio 1. Luonnolliset näytteet.	46
Kuvio 2. Näytteiden kontaminointi.	48
Kuvio 3. Havainnekuva laimennossarjasta ja maidon kontaminoinnista.	50

Kuvio 4. Toistettavuus ja uusittavuus.....	51
Kuvio 5. Havainnekuva interkalibrintinäytteen valmistuksesta.	52
Kuvio 6. Puhdasviljelmästä laktoosin käyttökoe.....	53
Kuvio 7. Tuottavuustestauksen pipetointi.....	55
Kuvio 8. Selektiivisyyden testaus.....	56
Kuvio 9. Pesäkemäärien eroja uuden ja vanhan alustan välillä	61
Kuvio 10. Yhden henkilön toistettavuustulokset.....	65
Kuvio 11. Kolmen eri henkilön tulokset uusittavuuden testauksessa.	67
Taulukko 1. Tunnetut <i>E. coli</i> -kannat.....	20
Taulukko 2. TBX-agarin resepti.....	37
Taulukko 3. VRB-agarin resepti	38
Taulukko 4. TSA-agarin resepti.....	39
Taulukko 5. ISO 16649-2-standardissa hyväksytyt vertailukannat TBX-agarille ...	40
Taulukko 6. Sivelytulokset TBX-alustalla.	57
Taulukko 7. Tuotevalikoimanäytteiden tulokset.	59
Taulukko 8. Saastuneiden tuotenäytteiden tulokset.....	60
Taulukko 9. Toistettavuustulokset.....	65
Taulukko 10. Uusittavuustulokset.	66
Taulukko 11. Omat interkalibrintinäytteiden tulokset.....	70
Taulukko 12. Valion interkalibrintinäytteiden tulokset.....	70

Taulukko 13. Kasvualustan tuottavuustestauksen tulokset.....	71
Taulukko 14. Pesäkemäärät.	1
Taulukko 15. Toistettavuustulokset pesäkemäärinä.	1
Taulukko 16. Uusittavuustulokset pesäkemäärinä.....	1
Taulukko 17. Interkalibrointinäytteiden pesäkemäärät pmy/ml.	1

Käytetyt termit ja lyhenteet

Aggregatiivinen	Kasautuva
Antigeeni	Vasta-aineen muodostusta aikaansaava aine tai rakenne
β-glukuronidaasi	Entsyymi, joka pilkkoo hiilihydraattia
BCIG	5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-β-D-glukuronidi
BHI	Brain heart infusion (Aivo-sydän-infuusioleimi) on yleisliemi bakteerien kasvatukseen, jossa mikrobeja voi rikastaa
DAEC	Diffuusisti hajanainen <i>E.coli</i>
Diffuusisti hajanainen	Hajanaisesti kiinnittynyt
EAEC	Enteroaggregatiivinen <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohemorraginen <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasiivinen <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropatogeeninen <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoksiinia tuottava <i>E. coli</i>
EURL	European Union Reference Laboratories, Euroopan Unionin vertailulaboratorio
Fakultatiivisesti anaerobinen	Elää sekä hapellisessa, että hapettomassa ympäristössä
Flagella	Bakteerin uintisiima
Fluorogeeninen	Aine, joka sitoo valoa ja palautuessaan muodostaa emissiovaloa
Gram-negatiivinen	Solu, jossa kristallivioletti väri ei pysy

Gram-positiivinen	Solu, jonka kristallivioletti värjää pysyvästi
Hemorraginen	Verenvuotoinen
Hydrolyysi	Kemiallinen reaktio, jossa yhdiste hajoaa vettä lisättäessä takaisin lähtöaineiksi
Indoli	Heterosyklinen, aromaattinen yhdiste, jota monet luonnon-yhdisteet sisältävät
Inkubointi	Kasvatuksen tai reaktion tapahtuminen valvotuissa olosuh-teissa
Interkalibrointi	Vertaileva mittaus
Invasiivinen	Leviävä, tunkeutuva
ISO	International Organization for Standardization, Kansainvälinen standardisoimisjärjestö
Katalaasi	Vetyperoksidia hajottava entsyymi
Koliformi	Ryhmä ruoansulatuselimistössä eläviä bakteereja, uloste-peräisen saastumisen indikaattori
Kontaminaatio	Saastuttaminen, pilaaminen
Kromofori	Kromofori on osa molekyylissä, joissa kahden erillisen mo-lekyyliorbitaalin energiaero sijoittuu näkyvän valon spektrin alueelle
Kromogeeninen	Aine, joka muuttuu kemiallisessa reaktiossa värilliseksi
KWIK-STIK™	Puhdasta, kuivattua mikrobikantaa sisältävä tikku; Micro-biologicsin tuote
Mesofiili	Mikrobi, jonka optimilämpötila on välillä 20 - 45 °C
Oksidaasi	Entsyymi, joka pelkistää happea vetyperoksidiksi

Patogeeni	Taudinaiheuttaja
pmy	Pesäkettä muodostava yksikkö
Resistentti	Vastustuskykyinen
Selektiivinen	Valikoiva
Selektiivisyys	Valikoiva, erottelukykyinen
Serotyyppi	Vasta-aineiden avulla määritettävä bakteerin tai viruksen alalaji
Somaattinen	Eliöiden kaikki muut paitsi sukupuolisolut ja niiden kantasolut
Spesifinen	Ominainen, erityinen
Spesifisyys	Tuottaa vasteen ainoastaan tutkittavalle mikrobille
STEC	Shigatoksiinia tuottava <i>E. coli</i>
Stx	<i>Shigella dysenteriae</i> n tuottamaa shiga-toksiini
SVL	Livsmedelsverket, Swedish Food Agency, Ruotsin elintarvikevirasto
Sytotoksiini	Solumyrkky
TBX	Tryptoni-sappi-x-glukuronidi-agar
Toksiini	Myrkky
TSA	Tryptoni-soija-agar
Tuottavuus	Suoristuskyky
Validointi	Varmentaminen, menettely, jolla arvioidaan menetelmän ja laitteen soveltuvuutta ja suoristuskykyä tiettyyn käyttötar-koitukseen

WDCM	World Data Centre for Microorganisms, maailmanlaajuinen kantakokoelman ylläpitäjä
Verifiointi	Varmentaminen, näyttö siitä, että tietty kohde täyttää määritellyt vaatimukset. Validointia suppeampi mittausmenetelmän käyttöönotto
Virulenssi	Taudinaiheuttamiskyky
VRB	Kristallivioletti-puna-sappi-agar

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Seinäjoen Valion aluelaboratoriolle, joka analysoi kemian ja mikrobiologian laadunvalvontanäytteitä. Valion mikrobiologian laboratorio palvelee tuotantoa ja tuottajia tekemällä mikrobiologisia analyysejä ja laadunvalvontaa elintarvikkeista sekä vesinäytteistä. Laboratorio on akkreditoitu eli valvottu suomalaisen akkreditointipalvelun Finnish Accreditation Servicen (FINAS) toimesta.

Opinnäytetyössä käyttöönotto testataan *E. coli* -bakteerin määritysmenetelmä, joka on tarkoitus ottaa käyttöön vuoden 2020 loppuun mennessä. *E. coli* on suolistosta peräisin oleva enterobakteeri ja se kuuluu lämpökestoisiin koliformeihin eli 44 °C:ssa kaasua muodostaviin bakteereihin. *E. coli* -bakteeria käytetään uloste-saastumisen indikaattorina ja se kertoo, onko muut koliformiset bakteerit mahdollisesti suolistosta peräisin. Osa *E. coli* -kannoista on ihmiselle tautia aiheuttavia. Suomea koskee enterobakteerien ja *E. coli* -bakteerin analysoinnin kohdalla komission asetus ((EY) No 2073/2005) kohta 2.2 maito- ja maitotuotteet, jossa on kerrottu analyysivaatimukset maitotuotteista ja bakteerien sallitut raja-arvot. Enterobakteeri -määritystä tehdään kaikista valmiista tuotteista, puolivalmisteista ja raaka-aineista. *E. coli* kuuluu enterobakteeri-määrittelyyn, mutta koska Valiolta vientiin menee paljon maitojauhetta ja voita, joista osa asiakkaista vaatii omien maiden mahdollisista lainsäädännöllisistä syistä erillistä *E. coli* -analyysiä, osasta vientiin menevistä tuotteista tehdään asiakkaan toiveen mukaan enterobakteerien lisäksi erillinen *E. coli* -analyysi.

Työn toimeksiantona oli ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feed stuffs - Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide -standardin mukaisen menetelmän verifiointi Seinäjoen Valion aluelaboratorioon. Työssä testattiin *E. coli* -bakteerin analysointiin tarkoitettua selektiivistä kasvualustaa. Nykyinen käytössä oleva NMKL 125, 4th. 2005. Thermotolerant coliform bacteria and *E. coli*. Enumeration in food and feed -menetelmä on toimiva ja hyväksytty menetelmä, mutta asiakkaiden puolelta oli tullut toiveita ISO-standardin mukaisen menetelmän käytöstä *E. coli* -bakteerin analysoinnissa, johon mikrobiologian laboratorio halusi vastata käyttöönottamalla menetelmän. Tässä

työssä suoritettiin verifiointi, jossa todennettiin bakteerin kasvualustan toimivuus, laboratorion taito käyttää kyseistä menetelmää ja tunnistaa bakteeri uudelta alustalta. Tulosten vertailussa ei ole tarkoitus osoittaa kummankaan alustan paremmuutta vaan vertailla tuloksia siitä näkökulmasta, että uudelta alustalta saataisiin samansuuntaisia ja vertailukelpoisia tuloksia vanhaan menetelmään ja interkalibrointituloksiin nähden.

Menetelmä on käytössä Valion Tutkimus & Kehitys (T&K) -yksikössä Helsingissä, jossa menetelmään on aiemmin tehty laajempi validointi. Pohjaa ja raamit saatiin aiemmin tehdystä validoinnista, jota sovelsimme Seinäjoen yksikköön sopivaksi. Myös Valion Lapinlahden aluelaboratorio ottaa uuden ISO-standardin mukaisen menetelmän käyttöönsä ja hyötyy tämän työn sisällöstä.

2 BAKTEERIT

2.1 Enterobakteerit

Enterobakteerit (*Enterobacteriaceae*-suku), kuuluvat ihmisten ja eläinten normaaliin suolistoflooraan antaen isännälleen suojaa patogeenejä, kuten salmonellaa tai shigellaa vastaan kilpailemalla ravintoaineista ja valtaamalla elintilaa haitallisilta bakteereilta. Enterobakteeri- perheeseen kuuluvat bakteerit ovat Gram-negatiivisia, flagellojen avulla liikkuvia tai liikkumattomia ja fakultatiivisesti anaerobisia. Ne muuttavat glukoosin hapoksi tai kaasuksi ja nitraatin nitriiriksi. (Robinson 2000, 605.)

Osa enterobakteereista on patogeenisia eli ihmiselle haitallisia ja sairautta aiheuttavia. Patogeenisiä ovat erityisesti mm. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Yersinia* ja *Providencia*. Ruoan pilaa- jabakteereita ovat *Proteus*, *Hafnia*, *Serratia* ja *Erwinia*. (International Food Information Service 2009, 152.)

2.1.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis (ent. *Streptococcus faecalis*) on tavallisimpia nisäkkäiden normaaliin suolistoflooraan kuuluvia kokkibakteereja, mutta ne voivat esiintyä myös muualla ympäristössä, jolloin niiden esiintyminen elintarvikkeissa ei ole välttämättä luotettava osoitus ulostesaastumisesta. (Wareing, Stuart & Fernandes 2010, 184–185.)

E. faecalis on Gram-positiivinen, liikkumaton, fakultatiivisesti anaerobinen sekä katalaasi-negatiivinen bakteeri, joka kasvaa 10–45 °C:ssa ja voi säilyä 60 °C:n lämpötilassa jopa 30 minuutin ajan. Se sisällytettiin alun perin *Streptococcus* -sukuun, ja saattaa aiheuttaa ihmisille endokardiittia, virtsatieinfektioita sekä aivokalvontulehduksen. (Barros-Velázquez 2016, 21.)

Vaikka enterokokit ovat tavallisia, terveen ihmisen suolistoon kuuluvia bakteereita, ne voivat aiheuttaa vakaviakin infektioita. Taudinaiheuttamiskyky on pieni, mutta mahdollinen potilaille, joiden vastustuskyky on heikentynyt. Hoidossa käytetään

vankomysiini-antibiotta, johon enterokokki saattaa kehittää vastustuskyvyn, jolloin puhutaan vankomysiinille resistentistä enterokokista (VRE). (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2019.)

Enterokokkeja esiintyy yleisesti maidossa ja lihatuotteissa. Niiden lämmönkesto saattaa aiheuttaa ongelmia pastöroiduissa elintarvikkeissa. On tärkeää varmistaa, että lämpöprosessit ovat riittäviä tuhoamaan bakteerit. Enterokokeilla on myös kyky kasvaa ja säilyä monenlaisissa paikoissa. Siksi puhdistus- ja desinfiointijärjestelmät ja niiden prosessien kontrollointi on tärkeää. (Wareing ym. 2010, 243.)

2.1.2 *Citrobacter freundii*

Enterobakteereihin kuuluva *Citrobacter freundii* on salmonellan ja *E. coli* -bakteerin kaltainen bakteeri, jota esiintyy ihmisten ja eläinten suolistossa ja ulosteen kautta ympäristössä, kuten vedessä, jätevedessä ja maaperässä. *C. freundii* on *Citrobacter* -heimoon kuuluva laji, joka on jaettu seitsemään biotyyppiin ja joka pystyy hyödyntämään sitraattia ainoana hiililähteenään. Epätyypillisistä *C. freundii* -kannoista on havaittu samankaltaisia biokemiallisia ja antigeenisia ominaisuuksia kuin salmonellalla ja *E. coli* -bakteerilla. Tutkimuksissa lämpöstabiileja ja shiga-tyyppisiä toksineja tuottava *C. freundii* oli identtinen lämpöstabiilin, enterotoksiineja tuottavan *E. coli* -bakteerin kanssa. (Grumezescu & Holban 2018, 288.)

2.2 Koliformiset bakteerit

Koliformit ovat tärkeä enterobakteereiden ryhmä. Koliformisiin bakteereihin kuuluvat mm. seuraavat suvut; *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* ja *Cronobacter* (International Food Information Service 2009, 103). Niiden osuus on n. 10 % suoliston mikrobifloorasta. Koliformiset bakteerit ovat fakultatiivisesti anaerobisia, Gram-negatiivisia, liikkumattomia sauvabakteereita, jotka fermentoivat laktoosia muodostamalla kaasua 35 °C:ssa 48 h kuluessa. Koliformit voidaan jakaa ulosteperäisiin ja ei-ulosteperäisiin. *E. coli* -bakteerin kaasun tuotantoa 44 °C:ssa on käytetty erottamaan ulosteen koliformit. *E. coli* -bakteerin on katsottu olevan suolistosta pe-

räisin ja sen läsnäolo kertoo, ovatko muut koliformiset bakteerit mahdollisesti ulosteperäisiä. Muita koliformeja on löydetty vedestä ja niiden puuttuminen on hyväksytty indikaattori veden juomakelpoisuuden määrittämisessä. (Robinson 2000,602–607.)

Enterobakteerit, jotka hydrolysoivat o-nitrofenyyli- β -D-galaktopyranosidia (ONPG) pidetään kolibakteereina eli laktoosin fermentoijina. Koliformisten sukujen erottaminen perustuu reaktioihin, joiden luotettavuus on vähintään 90 %. Kolibakteerin tunnistusta helpottaa sen kyky vastustaa sappea ja fermentoida laktoosia. Esimerkiksi kaasu lauryyli-tryptoniliemessä (LST) on alustava todiste koliformisista bakteereista. (Robinson 2000,602–607.)

2.2.1 *Escherichia coli*

Enterobakteeri- eli Enterobacteriaceae -heimoon ja *Escherichia* -sukuun kuuluva *E. coli* on merkittävä jäsen enterobakteerien suvussa ja luultavasti parhaiten ymmärretty organismi. Sen löysi saksalainen bakteriologi Theodar Escherich vuonna 1885 lasten ulosteesta. *E. coli* kuuluu normaaliin tasalämpöisten eläinten kuten nisäkkäiden ja lintujen suolistoflooraan ja ihmisen suolistossa sitä on alle 1 % mikrobin kokonaismäärästä. Normaalisti *E. coli* elää rauhassa isännässään, mutta joutuessaan ruoansulatuskanavasta muualle elimistöön, se saattaa aiheuttaa tulehduksen. Jotkin muunnokset ovat sairauksia aiheuttavia patogeenejä. Se ei selviä pitkiä aikoja vedessä eikä maaperässä. Sitä käytetään ulostesaastumisen indikaattorina. (Robinson 2000, 606–612.)

E. coli -bakteerin yleisiin ominaisuuksiin kuuluu sauvamainen muoto, liikkumattomuus ja se ei tuota itiöitä. *E. coli* on Gram-negatiivinen ja kuuluu fakultatiivisesti anaerobisiin bakteereihin. Se kasvaa mesofiilisessa lämpötilassa ja sen optimilämpötila on 37 °C. Ne osoittautuvat käymiskokeessa ja katalaasireaktiossa positiiviseksi ja oksidaasikokeessa negatiiviseksi. Vaikka *E. coli* voi kasvaa jopa 4,4 pH:ssa, se kasvaa myös neutraalissa kasvatusalustassa, jossa vesiaktiivisuus on 0,95. *E. coli* voidaan erottaa muista enterobakteereista laktoosin fermentointikokeella ja muilla biokemiallisilla testeillä, kuten β -glukuronidaasin tuottokokeella ja indolin tuottokokeella. (Robinson 2000, 606–612.)

E. coli -bakteerin on todettu liittyvän elintarvikkeiden saastumiseen. Se tarttuu joko suoralla kosketuksella epähygieenisen käsittelyn takia tai epäsuorasti mm. saastuneen veden kautta. Ehkäiseviä toimenpiteitä suunniteltaessa on hyvä tiedostaa, että *E. coli* -kantoja on laajasti levinnyt ympäristöön ja pieninä määrinäkin se on potentiaalinen elintarvikkeiden saastuttaja ja lisääntyy jos olosuhteet ovat suotuisat. Tiukat hygieniakäytännöt ja asianmukaiset elintarvikkeiden käsittelyolosuhteet ja varastointi ehkäisevät *E. coli* -bakteerin leviämistä ja vaaraa sairastua. (Robinson 2000, 606–612.)

E. coli -bakteerin havaitseminen perustuu laktoosi-fermentaatioon ja indolin muodostumiseen 44 °C:ssa. Alempi lämpötila voi johtaa epätarkkaan tulokseen ja korkeampi lämpötila saattaa johtaa bakteerin menettämiseen ja vääristyneeseen tulokseen. (Robinson 2000, 606–612.)

Myös selektiiviset tekniikat hyödyntävät bakteerin kykyä sietää sappea ja muita yhdisteitä sen luonnollisesta elinympäristöstä, suolesta. Monien kantojen kykyä kasvaa 44 °C:ssa käytetään myös selektiivisenä tekijänä. Eräs *E. coli* -bakteerin biokemiallisista ominaisuuksista on β -glukuronidaasiaktiivisuus, jota ilmenee 95 % *E. coli* -kannoista. Fluorogeeninen tai kromogeeninen glukuroni sekoitetaan laimennosliuokseen ja entsyymiaktiivisuus havaitaan värin tai fluoresenssin avulla. (Adams, Moss & McClure 2016, 250.)

2.2.2 Tunnetut *Escherichia coli* -kannat

Ripulia aiheuttavat *E. coli* -bakteerit ovat luokiteltu ryhmiin niiden virulenssiominaisuuksien, patogeenisyyden, lääketieteellisten oireiden ja serotyypin perusteella. *E. coli* -bakteerista on eristetty serologisesti kolme erilaista antigeeniä; O (somaattinen), H (flagella) ja K (kapseli). Ripulia aiheuttavaan *E. coli* -ryhmään kuuluvat enterotoksiinia tuottava *E. coli* (ETEC), enterohemorraginen *E. coli* (EHEC), enterovasiivinen *E. coli* (EIEC), enteropatogeeninen *E. coli* (EPEC), enteroaggregatiivinen *E. coli* (EAEC) ja diffuusisti hajanainen *E. coli* (DAEC). Kaikki kuvatut *E. coli* -ryhmät voivat levitä tartunnan saaneiden ihmisten ja eläinten ulosteista ympäristöön ja aiheuttaa sairastumista (taulukko 1). Kaikkein vakavimman taudinmuodon aiheuttaa EHEC. (Matthews, Kniel & Montville 2017, 204.)

Taulukko 1. Tunnetut *E. coli* -kannat (Matthews ym 2017, 206).

Kanta	Kuvaus	Oireet
ETEC	Lämpöstabili/muuttuva enterotoksiinin tuottaja	Akuutti vesiripuli, kuumeeton, ajoittainen. Yleinen turistiripuli ja vastasyntyneiden ripuli kehitysmaissa.
EHEC	Leviää laajalle suolistossa. Verotoksiini -nimistä myrkyä tuottavaa bakteeria kutsutaan nimityksellä VTEC. Voidaan käyttää myös nimitystä STEC (Shigatoksinen <i>E. coli</i>).	Vesiripuli, joka voi muuttua veriseksi, ulostuskipu, vatsan arkuus, esiintyy usein kuumeettomana, vaikka potilaat saattavat raportoida kuumeesta. Saattaa aiheuttaa vakavia jälkitauteja ja vaurioittaa munuaisia.
EPEC	Kiinnittyy ohutsuoleen (sekä myös paksusuoleen) ja epiteelisoluihin ja aiheuttaa mikrovillusten täydellisen tuhoutumisen.	Akuutti vesiripuli, verinen ripuli, saattaa olla pitkäkestoinen. Aiheuttaa etenkin kehitysmaissa pikkulapsille ripulia.
EIEC	Kiinnittyy ja valtaa limakalvot, aiheuttaa laajan tulehduksen suolessa.	Vesiripuli, shigelloosi (bakteeripuna-tauti), kuumeilua.
EAEC	Paikallisesti tai laajasti kiinnittyvä, tuottaa entero- ja sytotoksiinia.	Vesiripuli, veriripuli, voi muodostaa pitkittyneen ripulin lapsille.
DAEC	Hajanainen kiinnittyminen epiteelisoluihin.	Vetinen ripuli, patogeeni ei aina löydetävissä.

2.2.3 Enterohemorraginen *Escherichia coli*

Enterohemorraginen *E. coli* (EHEC) todettiin ihmiselle patogeeniseksi vuonna 1982 kun *E. coli* O157:H7 tunnistettiin tekemällä löydös kahden veriripulin yhteydessä. Sen jälkeen muitakin serotyyppejä, kuten O26 ja O111 ja sorbitolia fermentoiva O157:NM ovat viitanneet verisiin ripuleihin ja ne on luokiteltu EHEC non-O157:H7.

Kaikki EHEC-kannat tuottavat sytotoksiinia, mutta niitä kutsutaan myös verotoksiineiksi tai shiga-toksiineiksi (Stxs), koska ne muistuttavat *Shigella dysenteriae*n tuottamaa shiga-toksiinia (Stx). EHEC:iä kutsutaan myös STEC-nimityksellä (shigatoksiininen *E. coli*) tai VTEC (verotoksiininen *E. coli*) ja serotyyppejä on yli 200, mutta EHEC:ksi kutsutaan vain veriripulia aiheuttavia serotyyppejä ja usein tarkoitetaan nimenomaan serotyyppiä O157:H7. O-antigeenista tunnistaa seroryhmän kannan ja H-antigeeni kertoo serotyypin. (Matthews ym. 2017, 208.)

E. coli O157:H7-kannalla on useita ominaisuuksia, jotka ovat epätavallisia muille *E. coli* -kannoille, kuten se ei kasva tai kasvu on heikkoa 44,5 °C:ssa, se on kykenemätön fermentoimaan sorbitolia 24 tunnin sisällä ja se ei tuota β-glukuronidaasia toisin kuin muut *E. coli* -bakteerit. β-glukuronidaasin puutteen vuoksi serotyyppi O157:H7 ei pysty hydrolysoimaan 4-metyyliumbelliferyyli-D-glukuronidia. Lisäksi se kestää happamia olosuhteita hyvin. Muut EHEC non-O157-kannat eivät omaa näitä ominaisuuksia, vaikka tuottavatkin verotoksiineja. (Matthews ym. 2017, 209.)

Kun *E. coli* O157:H7-kanta löydettiin, siihen tehosi Gram-negatiivisia bakteereita tuhoavat antibiootit, mutta nyt kanta on muuttunut vastustuskykyiseksi mikrobilääkkeille. Samoin non-O157 EHEC-kannat ovat muuttuneet vastustuskykyiseksi monille ihmisille ja eläimille käytössä oleville mikrobilääkkeille. (Matthews ym. 2017, 209.) *E. coli* -kannoille voi muodostua mikrobilääkkeille resistenssi ominaisuus, jota kutsutaan extended spectrum β-lactamases (ESBL) eli laajakirjoinen β-laktamaasi. Kannat, joilla tämä ominaisuus on ovat resistenttejä β-laktaamien lisäksi useille mikrobilääkeryhmille, kuten fluorokinolonit, trimetopriimi, aminoglykosilit ja tetrasykliinit. (Gunell ym. 2012, 34.)

E. coli O157:H7 aiheuttama hemorraginen koliitti voi kestää 13–21 päivää, jopa yli kolme viikkoa. Lapsilla tauti on saattanut kestää jopa 62 päivää. Se tarttuu helposti käsistä, joten henkilökohtaiseen hygieniaan tulee kiinnittää erityistä huomiota. Tarttumiseen riittää pienikin määrä, alle 100 solua ja vain 10 solua riittää sairastumiseen. (Matthews ym. 2017, 211–212.)

2.3 Mikrobin kasvuun vaikuttavat tekijät elintarvikkeissa

Elintarvikkeet ovat otollinen kasvualusta mikrobeille, niiden sisältämien ravinteiden ja kosteuden vuoksi. Otollisia kasvuolosuhteita säätelevät elintarvikkeen luonnolliset olosuhteet ja prosessointi. Mikrobin kasvuun vaikuttavat sisäiset ja ulkoiset tekijät, jotka ollessaan epäsuotuisat vaikuttavat solun jakautumiseen hidastuvasti. Solut eivät kuole, vaan otollisen hetken tullen ne lähtevät jakautumaan eli ns. eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen. Elintarvikkeiden sisäisiä tekijöitä ovat happamuus (pH), vapaan veden määrä, joka ilmaistaan veden aktiivisuutena a_w , hapetus-pelkistyspotentiaali, antimikrobiset aineet, biologiset suojaavat rakenteet ja ravintosisältö. Ulkoisia tekijöitä ovat varastointilämpötila, ympäristön suhteellinen kosteus, kaasuatmosfääri ja mahdollinen muiden mikrobin aktiivisuus. (Björkroth 2007, 17–18.)

Lämpötilakontrolli on olennaisin seikka ruokamyrkytysten ehkäisyssä. Kuumennus tuhoaa mikrobit mm. hydyttämällä niiden valkuaisaineet. Kuumennus vähintään 70 °C:seen riittää yleensä tuhoamaan bakteerit. Riittävän kylmät säilytysolosuhteet hidastavat mikrobin kasvua. (Pönkä 1999, 236–237.)

Kylmiin olosuhteisiin sopeutuneita bakteereja kutsutaan psykrotrofeiksi ja ne lisääntyvät 0–20 °C:n lämpötilassa. Parhaiten ne kasvavat 20–25 °C:n lämpötilassa. Mesofiilisten bakteerien normaali lisääntymislämpötila on 30–37 °C, mutta ne voivat lisääntyä myös 20–45 °C:n lämpötilassa. Thermofiileihin lukeutuvat bakteerit voivat lisääntyä 45–65 °C:n lämmössä. (Ruokavirasto 2019a.)

Mikrobit lisääntyvät elintarvikkeissa ajan funktiona, joten enimmäissäilyvyysaikoja on syytä noudattaa. Ruokamyrkytysten edellytyksenä on usein aika, jolloin mikrobit ehtivät lisääntyä riittävästi, jotta sen erittämä toksini tai itse mikrobi aiheuttaisi oireita. On kuitenkin poikkeuksia, jolloin hyvin vähäinen määrä riittää sairastumiseen. Näihin kuuluu erittäin harvinainen lavantauti eli tyfus. Myös shigellabakteerin aiheuttamaan punatautiin sekä EHEC-infektioon riittää vain muutama bakteerisolukappale. (Pönkä 1999, 240–241.)

Mikrobien lisääntyminen riippuu olennaisesti elintarvikkeen happamuudesta, joten sekä elintarvikkeen happamuus, että mikrobin pH-vaatimukset ovat ratkaisevia mikrobin lisääntymisen suhteen. Useimmat taudinaiheuttajat kasvavat parhaiten neutraaleissa oloissa. Vain harvat bakteerit kasvavat pH-alueella 4.0. Pelkkä pH-arvo ei kuitenkaan kerro tarkasti, miten mikrobit elintarvikkeissa pystyvät lisääntymään, vaan samanaikaisesti muut tekijät kuten elintarvikkeen lämpötila ja suolapitoisuus vaikuttavat. (Pönkä 1999, 241–242.)

Mikrobien lisääntymiseen vaikuttaa oleellisesti vesiaktiivisuus (a_w). Tällä tarkoitetaan sen vesihöyryn paineen suhdetta puhtaan veden höyrypaineeseen samassa lämpötilassa. Useimpien tuoreiden elintarvikkeiden vesiaktiivisuus on suurempi kuin 0.99. Yleensä ruokamyrkytyksiä aiheuttavat bakteerit vaativat lisääntyäkseen yli 0.95 (mm. *E. coli*) ja useat elintarvikkeita pilaavat bakteerit vähintään 0.90. (Pönkä 1999, 245.)

Mikrobien ympäristön hapetus-pelkistypotentiaali eli redox-potentiaali (Eh) vaikuttaa niiden kasvuun. Hapetus-pelkistypotentiaali kuvaa yhdisteen tai aineen kykyä luovuttaa tai vastaanottaa elektroneja. Kun yhdiste tai aine luovuttaa elektroneja se hapettuu ja jos vastaanottaa, pelkistyy. Hapettuminen voi tapahtua myös hapen sitoutumisena. Aerobiset bakteerit vaativat kasvuympäristön positiivista hapetus-pelkistypotentiaalia, kun taas anaerobiset bakteerit lisääntyvät negatiivisessa. Mikäli ympäristö on hapettava, Eh-arvo on positiivinen. Bakteereja, jotka pystyvät lisääntymään sekä hapettomassa, että hapen läsnä ollessa, kutsutaan fakultatiivisesti anaerobiksi (esim. *E. coli*). (Pönkä 1999, 247.)

Lisäksi kasvuun vaikuttavat muut mikrobit ja biofilmit. Biofilmi on mikrobien synnyttämä kasvualusta, joita ne muodostavat kiinteille pinnoille, joissa läsnä on orgaanista tai epäorgaanista ainesta. Huonosti puhdistetuille pinnoille, joissa läsnä on kosteutta ja ravintoaineita voi muodostua biofilmi, kun lika alkaa kiinnittyä pintojen rakoihin ja halkeamiin. Niissä mikrobit pystyvät lisääntymään likamassan ja mikrobien aineenvaihduntatuotteiden suojassa ja ne ovat erittäin vastustuskykyisiä desinfektioaineille. Varsinkin erilaisissa elintarviketeollisuuden prosessilaitteissa biofilmien kehittymiselle on otolliset olosuhteet isojen prosessilaitteiden osien liitoskohdissa ja huonosti puhdistettavissa paikoissa, johon kiertopesut eivät välttämättä ole tarpeeksi tehokkaita poistaakseen biofilmejä ja (Wirtanen 1995.)

3 MENETELMÄT JA STANDARDIT

3.1 Noudatettavat menetelmät ja standardit

Tässä työssä ohjasivat standardien pohjalta laaditut menetelmäohjeet, joista ilmeivät tärkeimmät tiedot työskentelyn kannalta. Ne ovat tekijänoikeussuojattuja ja niiden käyttö on rajattua sekä niiden kopioiminen on kielletty. Käyttöoikeuden lunastamalla saa käyttöönsä standardin organisaation sisäiseen tai henkilökohtaiseen käyttöön rajoitetusti. Opiskelijat saavat käyttää standardia rajatusti.

Kummatkin menetelmät ovat hyvin samankaltaisia ja ero näiden kahden menetelmän välillä on kasvualustassa, jotka ovat vaatimuksiltaan ja ominaisuuksiltaan erilaisia. NMKL-menetelmässä kasvualustana käytetään kristallivioletti-sappi-agar (VRB). Ruokaviraston elintarvikemikrobiologisten menetelmien ja niille vaihtoehtoisten menetelmien luettelossa (Ruokavirasto 2019b, 2) NMKL-menetelmän käytössä vaaditaan lisäksi β -glukuronidaasin tuottotestaus. Muita käytettävissä olevia varmistustestejä ovat laktoosin käyttökoe ja indolin tuottokoe. ISO-standardin mukaisessa menetelmässä on käytössä tryptoni-sappi-x-glukuronidi-agar (TBX), joka on kromogeeninen kasvualusta. Tulokset ovat heti inkuboinnin jälkeen laskettavissa eikä erillisiä biokemiallisia varmistustestejä tarvita.

ISO-standardit ja NMKL-menetelmä sisältävät ohjeistuksen agarin valmistukseen, sterilointiin, näytteiden käsittelyyn, välineisiin, maljavaluun, inkubointiin ja tulosten laskentaan sekä menettelyn poikkeuksellisiin tuloksiin. Standardeilla pyritään yhtenäistämään laboratorioissa tehtäviä analyysejä vertailukelpoisiksi ja luotettaviksi.

3.2 Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea

Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea (NMKL) koostuu kemisteistä, mikrobiologeista, analytikoista ja tilastotieteilijöistä. NMKL:n tavoite on olla ruokanalyysien asiantuntija, tarjota luotettavia- ja sertifioituja menetelmiä ruoka-, rehu- ja ympäristönäytteille, kehittää ohjeita analyysitulosten käyttäjille, järjestää aihee-

seen kuuluvia kursseja, koulutuksia ja seminaareja, sekä edistää ruoan analysointiin ja turvallisuuteen liittyviä aiheita kansainvälisesti. (About NMKL, [viitattu 25.4.2020].)

3.3 Kansainvälinen standardisoimisjärjestö

International Organization for Standardization (ISO) on valtiosta riippumaton kansainvälinen standardisoimisjärjestö, johon kuuluu 164 kansallista standardointielintä. Se kokoaa jäsentensä kautta asiantuntijoita jakamaan tietoa ja kehittämään vapaaehtoisia, konsensusperusteisia, markkinoille tärkeitä kansainvälisiä standardeja, jotka tukevat innovaatiota ja tarjoavat ratkaisuja maailmanlaajuisiin haasteisiin. ISO-neuvosto koostuu 20 jäsenen elimestä. Tekniset komiteat johtavat standardien kehittämistä. ISO tekee yhteistyötä yhteensä yli 700 kansainvälisen, alueellisen ja kansallisen järjestön kanssa, jotka osallistuvat kehitysprosesseihin ja vaihtavat asiantuntemusta. (About us, ISO, [viitattu 25.4.2020].)

3.4 SFS-EN ISO 11133:2014 Elintarvike-, rehu- ja vesimikrobiologia. Viljelyalustojen valmistelu, tuotanto, varastointi ja suorituskyvyn testaus

Elintarvike-, rehu ja vesimikrobiologia. Viljelyalustojen valmistelu, tuotanto, varastointi ja suorituskyvyn testaus (ISO 11133:2014) -standardi määrittelee elatusaineiden laadunvarmistukseen liittyvät termit ja vaatimukset elatusaineiden valmistukselle, joka on tarkoitettu ruoan, eläinrehun ja elintarvikkeiden tai rehujen tuotantoympäristön näytteiden sekä kaikenlaisten vesien mikrobiologiseen analysointiin kuluksi tai käytettäväksi elintarvikkeiden tuotannossa. Standardi asettaa myös kriteerit ja kuvaa menetelmät elatusaineiden testaamiseksi. (SFS-EN ISO 11133:2014.)

3.5 NMKL no125, 4.painos 2005. Lämpökestoiset kolimuotoiset bakteerit. Määrittäminen elintarvikkeista

NMKL no125, 4th edition 2005. Thermotolerant coliform bacteria and *Escherichia coli*. Enumeration in food and feed -menetelmä määrittää lämpökestoisten *E. coli* -bakteerien todentamisen ihmisravinnosta tai rehusta. Lämmönkestoisten koliformisten bakteerien tarkemman tunnistamisen jälkeen menetelmää voidaan käyttää *E. coli* -bakteerin havaitsemiseen kaikenlaisissa elintarvikkeissa (NMKL 125,4th, 2005 [Viitattu 25.4.2020]).

Menetelmä perustuu lämpökestoisten *E. coli* -bakteerien tyypilliseen kasvuun kiinteillä kasvualustoilla sekä kaasunmuodostukseen laktoosista ja indolin tuottoon tryptonista sekä akkreditoidussa menetelmässä β -glukuronidaasin tuottoon. Menetelmä soveltuu *E. coli* -bakteerin määrittämiseen elintarvikkeista, rehuista ja ympäristönäytteistä. Joidenkin β -glukuronidaasi-negatiivisten *E. coli*-tyyppien, kuten O157:H7 (EHEC) määrittäminen ei onnistu tällä menetelmällä. Akkreditoitu menetelmä edellyttää kahden peräkkäisen laimennoksen viljelyä tai kahden rinnakkaisen maljan käyttöä sekä jokaisen VRB keittoerän toimivuus on varmistettava positiivikontrollilla ja varmistustesteissä on mukana pidettävä positiivikontrollia. Esi-inkubointia ei käytetä lähdemenetelmästä poiketen. (Ahlroos, 2019a.)

3.6 ISO 16649-2:2001 Elintarvikkeiden ja eläinrehujen mikrobiologia. β -glukuronidaasi-positiivisen *E. coli* määritys

ISO 16649-2:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs —Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* — Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide on elintarvikkeiden ja eläinrehujen mikrobiologia -menetelmä β -glukuronidaasi-positiivisen *E. coli* -bakteerin laskemiseksi. ISO 16649-2:2001-standardi määrittää β -glukuronidaasi-positiivisen *E. coli* -bakteerin todentamisen ihmisravinnoksi tai eläinten ruokintaan tarkoitetuista tuotteista. Menetelmä perustuu *E. coli* -bakteerin tyypilliseen kasvuun 44 °C:n lämpötilassa kiinteällä kromogeenisellä, tryptoni-sappi-x-glukuronidi (TBX) kasvualustalla, joka perustuu β -glukuronidaasientsyymin havaitsemiseen. Tyypilliset β -glukuronidaasiposiitiviset pesäkkeet ovat sinisiä. Pesäkkeet

voidaan laskea luotettavasti niiltä maljoilta, joilla tyypillisiä pesäkkeitä on 10–150 ja pesäkkeiden kokonaismäärä on <300 (tyypillisiä ja ei-tyypillisiä). Jotta tulos olisi pätevä, katsotaan yleensä, että pesäkettä muodostavia yksiköitä on laskettava ainakin yhdestä maljasta, joka sisältää vähintään 15 sinistä pmy:tä. (ISO 16649-2:2001.)

E. coli -tyyppejä, jotka eivät kasva 44 °C:ssa tai erityisesti niitä, jotka ovat β-glukuronidaasi-negatiivisia, kuten *E. coli* O157:H7 (EHEC), ei pystytä määrittämään tällä menetelmällä. Menetelmä soveltuu *E. coli* -bakteerien määrittämiseen elintarvikkeista, rehuista ja ympäristönäytteistä. Menetelmän periaatteena on siirrostaa näyte kasvualustalle, jota inkuboidaan 44 °C:ssa ja sen jälkeen lasketaan tyypilliset pesäkkeet. Akkreditoitu menetelmä edellyttää kahden peräkkäisen laimennoksen viljelyä tai kahden rinnakkaisen maljan käyttöä. Jokaisen TBX-erän toimivuus on varmistettava sekä positiivi- että negatiivikontrollilla. Lisäksi akkreditoitu menetelmä edellyttää kasvualustan tuottavuus-, selektiivisyys- ja spesifisyystestauksen. (Ahlu-roos 2019b.)

Maljakohtaista alarajaa ei saa käyttää, kun tulos lasketaan useammasta laimennoksesta ja rinnakkaisnäytteistä. Laskennassa käytetään painotettua keskiarvoa, koska jos pesäkkeitä on liikaa, tulos jää alakanttiin. Liian lähellä toisiaan olevia pesäkkeitä ei pysty erottelemaan yksilöiksi ja laskenta on hankalaa. Pienimmissä pesäkemäärissä pienillä laimennosvirheillä tai huolimattomalla sekoituksella taas voi olla suuri vaikutus lopputulokseen. Perusperiaate on, että laskettujen pesäkkeiden kokonaismäärä pitää jakaa alkuperäisen näytteen käytetyillä tilavuuksilla. (Sojakka & Välimäki 2011, 143.)

4 VERIFIOINTI

4.1 Verifiointin määritelmä

Ero validoinnin ja verifiointin käsitteissä on usein epäselvä ja niitä käytetään ristiin. Validoinnilla arvioidaan laitteen tai menettelyn soveltuvuus käyttötarkoitukseensa. Validointi on verifiointia laajempaa varmentamista. Verifiointi on suppeampi kuin validointi ja sen tarkoitus on osoittaa, että tietty kohde täyttää määritellyt vaatimukset. Verifiointi suoritetaan käyttöönotettaessa uusi mittausmenetelmä, joka on jo ennemmin validoitu ja käyttöönotettu muualla. Kansalliset ja kansainväliset standardimenetelmät verifioidaan. Saman laboratorion toisessa yksikössä käytössä olevalle jo ennemmin validoidulle menetelmälle riittää yleensä verifiointi osoituksena toimivuudesta. (Hägg 2016, 7–12.)

4.1.1 Mikrobiologisiin testeihin liittyvä epävarmuus

Mikrobiologiassa analysoidaan näyte mikrobeineen, materiaaleineen ja häiritsevine taustoineen. Mikrobi on elävä organismi, jolloin tuloksen epävarmuus riippuu itse mittaustuloksesta. Näin ei voida ilmoittaa menetelmäkohtaista mittausepävarmuutta vaan se voidaan arvioida erikseen kunkin tuloksen kohdalla. Mittausepävarmuus koostuu yleensä useista osista. Yksi voi olla esimerkiksi keskihajonta, jota voidaan arvioida mittaussarjan tulosten tilastollisesta jakautumasta ja niitä voidaan kuvata kokeellisen keskihajonnan avulla. (Hägg 2016, 24.)

4.1.2 Toistettavuus

Toistettavuus on toistettavan testin tuloksien yhtäläisyys, kun testaus on suoritettu samoissa olosuhteissa, samasta näytteestä, samalla menetelmällä, saman tekijän toimesta, samalla laitteella, samassa laboratoriossa ja lyhyen aikavälin sisällä (Hägg 2016, 31).

4.1.3 Uusittavuus

Uusittavuus on tulosten yhtäläisyyttä, kun tulokset saadaan samalla menetelmällä muuttaen jotain seuraavista; mittauslaite, suoristuspaikka, suorittaja tai muu oleellinen tekijä tai mittauksen aikaväli, joka on pitkä verrattuna yksittäisen mittauksen kestoajaan. Menetelmän uusittavuutta arvioidaan todellisten näytteiden ja vertailumateriaalin avulla tai osallistamalla vertailumittauksiin. (Hägg 2016, 32.)

4.1.4 Spesifisyys

Menetelmä on spesifinen, jos se tuottaa vasteen ainoastaan tutkittavalle mikrobille. Spesifinen menetelmä löytää tutkittavan mikrobin häiritsevistä mikrobeista huolimatta. Häiriötekijät ja niiden vaikutus tulee selvittää. (Hägg 2016, 31.)

4.2 Verifiointisuunnitelma

Valion Tutkimus & Kehitys laboratoriossa (T&K) on käytössä ISO 16649-2 -standardin mukainen menetelmä ja se on aiemmin validoitu Valion käyttöön T & K:ssa. Sieltä Valion ohjaajani Heli Karjalainen oli saanut hyviä tietoja, joiden pohjalta luonnos verifiointisuunnitelmasta oli olemassa. Vaikka suunnitelmassa oli mukana jo ennestään saastuneen maidon tutkiminen, toin pienen lisän suunnitelmaan kontaminoimalla tuotenäytteitä ja analysoimalla ne. Tarkoitus oli osoittaa voin, vanukkaan ja jugurtin häiritsevien aineiden osuus tulostamisessa.

4.2.1 Valikoimassa olevat luonnolliset tuotenäytteet

Näytteet, joista tehdään *E. coli* -määryksiä luonnollisestikin. Viisi eri näytettä analysoidaan molemmilla menetelmillä. Viisi näytettä on:

- voi
- rasvainen maitojauhe

- herajauhe (demi 50)
- laktoositon maitojauhe

lisäksi kokeiluluontoisesti

- rahka
- raejuusto
- vanukas

4.2.2 Kontaminoidut tuotenäytteet

Kontaminoidaan Livsmedelsverket, Swedish Food Agency (SLV) eli Ruotsin ruokaviraston lähettämällä näytteellä, jossa seassa on muitakin bakteereja, jolloin halutun bakteerin havainnoinnin merkitys korostuu.

Tuotenäytteitä valitaan mukaan vain neljä kappaletta. Perustellusta syystä mukaan valitaan mahdollisia lukuvaikeuksia maljalla tuovat tuotteet, joiden komponentit saattavat häiritä kasvatusta tai lukua. Testattavat tuotenäytteet ovat voi, herajauhe, kreikkalainen jogurtti ja vanukas. Voissa oleva rasva saattaa häiritä bakteerin kasvua ja pesäkkeiden lukua. Voista ja herajauheesta tehdään asiakkaille *E. coli* -bakteerin määrittystä. Tämä on mielestäni hyvä syy varmistaa uuden alustan toimivuus tuotteilla, mistä nimenomaan määrittäviä pyydetään. Vanukkaasta ja kreikkalaisesta jogurtista ei *E. coli* -määrittäviä tällä menetelmällä tehdä, ellei erikseen pyydetä. Mielenkiinnosta testasin kuinka kaakaohiiput saattavat häiritä pienien pesäkkeiden havainnointia ja kaakao saattaa värjätä hieman myös agarialueita. Kreikkalaisessa jogurtissa mukana oleva hillo sisältää pieniä marjasta peräisin olevia häiritseviä tekijöitä kuten siementen pienet osat tai marjan kuoriosia.

Ennen kontaminointia pipetoitiin 1 ml laimennettua tuotenäytettä ilman bakteereja maljalle, jotta saadaan yksi puhdas tuotenäyte. SLV:n A näyte lokakuun 2019 kierrokselta valittiin kontaminointiin, koska tiedossa oli, että se sisälsi *E. coli* -bakteereja muiden muassa. Pesäkkeitä muodostavia yksiköitä tiedettiin olevan 150 000 pmy/A-näyte. Tavoitepitoisuudeksi tuotenäytteeseen otettiin 150 pmy/ml. Tuotteesta tehty

näyte on tilavuudeltaan 100 ml. Laimennoksia tehtiin kaksi. Mikäli -2 laimennoksessa on paljon pesäkkeitä, oletettavasti -3 tuottaa laskettavissa olevan määrän pesäkkeitä. Ja vastaavasti mikäli -3-laimennoksesta ei muodostu tarpeeksi monta pesäkettä, laskettavia pesäkkeitä saadaan laimennoksesta -2.

Tulokset ilmoitetaan \log_{10} pmy/ml, jolloin niitä on helppo vertailla esimerkiksi interkalibrointituloksiin.

4.2.3 Kontaminoitu maito

Maito kontaminoitiin *E. coli* -bakteerilla (WDCM 00012) Tavoitepitoisuus oli 100 pmy/ml. *E. coli* -bakteerista tehdään laimennossarja ja jokainen laimennos viljellään yleisalustalle, joiden mukaan valittiin sopiva laimennos maidon kontaminointiin.

Toistettavuus

Sama henkilö teki 3 rinnakkaista määrittystä molemmilla alustoilla. Laskettiin keskiarvo ja keskihajonta. Tulos ilmoitettiin \log_{10} pmy/ml.

Uusittavuus

Uusittavuuden testausta varten kolme eri henkilöä analysoi saman näytteen molemmilla alustoilla. Laskettiin keskiarvo ja keskihajonta sekä ero keskiarvosta. Tulos ilmoitettiin \log_{10} pmy/ml.

4.2.4 Interkalibrointinäytteet

Näytteet valmistettiin SLV:n ohjeen mukaan kylmäkuivatusta mikrobiseoksesta, jotka ovat lokakuun 2019 kierrokselta. Näytteet analysoitiin molemmilla alustoilla (TBX ja VRB).

VRB alustalta varmistettiin *E. coli* -bakteerin läsnäolo eristämällä epäillyt pesäkkeet ja viljelemällä ne puhtasviljelmäksi, josta pesäkkeitä ottamalla tehtiin varmistustestaukset eli laktoosin tuotto, indolikoe ja β -glukuronidaasikoe.

Tulokset ilmoitettiin \log_{10} pmy/g. Lisäksi laskettiin keskihajonta sekä z-arvo. Näillä tuloksilla voitiin vertailla tulosta annettuun vertailutulokseen ja todeta onko laboratorio onnistunut määrittämisessä. (Hägg 2016,17).

4.2.5 Laadunvarmistuskäytännöt

Akkreditoitussa menetelmässä on testattava kasvualustan tuottavuus, selektiivisyys ja spesifisyys. Työssä noudatetaan ISO 11133:2014 -standardia.

Tuottavuustestauksessa viljellään *E. coli* -kantoja WDCM (World Data Centre for Microorganisms) 00012 ja WDCM 00202 tryptoni-soija-agarille (TSA), tryptoni-sappi-x-glukuroni-agarille (TBX) ja kristallivioletti-sappi-agarille (VRB). Bakteerilaimennosta siirrostetaan agarille 100 pmy. Inkubointi tehtiin menetelmäohjeen mukaisesti. Tuottavuussuhteen on oltava $\geq 0,5$. (FSF-EN ISO 11133:2014, 55)

Selektiivisyystestauksessa *E. faecalis*- (WDCM 00009) ja *E. coli* (WDCM 00202) -bakteereja siirrostetaan TBX-agarille 1 μ l:n silmukallinen ja inkuboidaan menetelmäohjeen mukaisesti. *E. coli* -bakteerien tulee kasvaa tyypillisenä ja saada vastaavuusarvo 2. *E. faecalis* -bakteerin kasvun tulee estyä ja saada vastaavuusarvo 0. (Vastaavuusarvot: 0 ei kasvua, 1 heikko kasvu, 2 hyvä kasvu). (FSF-EN ISO 11133:2014, 55.)

Spesifisyystestauksessa *C. freundii* -bakteereja (WDCM 00006) siirrostetaan testattavalle TBX-agarille niin, että saadaan erillisiä pesäkkeitä. Inkubointi menetelmäohjeen mukaan. *C. freundii* tulee kasvaa epätyypillisenä. Epätyypillinen kasvu on väriltään valkoisesta vihertävään tai ruskeaan vivahtavaa kasvua. (FSF-EN ISO 11133:2014, 55.)

4.3 Kansallinen elintarvikevirasto ja vertailulaboratorio

Kansallinen elintarvikevirasto ja -vertailulaboratorio, National Reference Laboratory (NRL) on osa EU:n kansallisten vertailulaboratorioiden verkostoa. Vertailulaboratorioiden ja verkoston tarkoituksena on yhteinen laadunvarmistus ja julkisen valvon-

nan alla olevien analyysialueiden kehittäminen. Tavoitteena on saada mahdollisimman samanlaisia analyysituloksia kaikissa jäsenvaltioissa. Kansalliset elintarviketurvallisuusvirastot tarjoavat tieteellistä ja teknistä tukea elintarvikkeiden kemiallisissa ja mikrobiologisissa analyysimenetelmissä. Tietoa jaetaan myös EU:n virallisille laboratorioille, jotka käyttävät hyväksytyjä analyysimenetelmiä julkiseen valvontaan. Kaikki EU:n jäsenvaltiot valitsevat kansallisen vertailulaboratorion. Ruotsissa sen valitsee hallitus. Euroopan unionin vertailulaboratorio (EURL) koordinoi vertailulaboratorioita verkossa. Ruotsin elintarvikkevirasto Livsmedelsverket (SLV) on jo vuosikymmeniä järjestänyt pätevyystestauksia eli interkalibrointikiertoja laboratorioille, jotka analysoivat juomavesiä ja elintarvikkeita. Osallistumalla PT-ohjelmiin laboratoriot saavat ulkopuolisen arvioinnin osaamisestaan verrattuna muihin osallistujiin. (National Reference Laboratory – NRL 2020.)

4.4 Interkalibrointikierrokset

SLV järjestää kaksi erilaista mikrobiologista pätevyystestausta eli nk. interkalibrointia: juomavesianalyysit (2 kierrosta/vuosi) ja elintarvikeanalyysit (3 kierrosta/vuosi). Molemmissa järjestelmissä on ulkopuolisia neuvoa antavia ryhmiä, joissa on edustajia Pohjoismaista. Molemmat järjestelmät perustuvat pakastekuivattuun mikrobiseokseen (0,5 ml), jotka sisältävät merkityksellisiä mikrobiseoksia. Pakastekuivatut mikrobiseokset lähetetään ohjeen kanssa osallistujille muutamaa viikkoa ennen testikierrosta. Lasipullossa oleva mikrobiseos on valmistettava määrättyyn tilavuuteen laimennosliuosta ennen analyysiä, jolloin niillä voidaan simuloida näytteitä luotettavasti. Kaikki rekisteröidyt laboratoriot saavat luottamuksellisen laboratorionumeron ja salasanan kirjautuakseen osallistujasivuille. Viimeisen ilmoitetun tuloksen jälkeen omia tuloksia voi verrata yleisiin tuloksiin ja alustaviin tilastoihin. Tulosten käsittelyn ja arvioinnin jälkeen SLV koostaa kattavamman raportin, joka sisältää taulukoita ja kaavioita. Tämän jälkeen jokainen laboratorio voi verrata omia tuloksia muiden laboratorioiden tuloksiin. Tulokset ovat saatavissa elintarvikkeviraston julkisella verkkosivustolla sekä osallistujille tarkoitetulla verkkosivustolla. (General information [viitattu 16.5.2020].)

5 BAKTEERIEN KASVATUS

5.1 Kasvualustat

Kasvualustana bakteerien kasvatuksessa käytetään agar-agarista valmistettua geeliytyvää ainetta, joka 1–2 %:lla pitoisuudella liukenee kuumaan, 90–100 °C-asteeseen veteen ja jäähtyessään kiinteytyy geeliksi 35–50 °C:ssa. Agar on gelatiinin kaltainen aine, jota saadaan mm. *Gelidium cartilagineum* (Linnaeus) Gaillon, *Gracilaria confervoides* (Linnaeus) Greville ja *Gelidium amansii* (J.V.Lamouroux) J.V.Lamouroux -punalevistä. Agaria esiintyy yleensä nippuina tai leikattuna, hiutaleina tai rakeisessa muodossa. Se on kellertävän oranssia, kellertävän harmaata, vaaleankeltaista tai väritöntä. Kosteana se on kovaa ja kuivana haurasta. Sillä on mieto tuoksu ja maku. Merilevien kemiallinen luonne vaihtelee merilevän lähteestä, kasvuympäristöstä ja agarin valmistustavasta riippuen. Nykytiedon mukaan agar koostuu kahdesta eri polysakkaridista, neutraalista agarosista sekä varauksellisesta agaropektiinistä. (Santos 1990.)

Kemialliset eli synteettiset kasvualustat ovat usein kirkkaita ja niiden tarkka kemiallinen koostumus tunnetaan. Kompleksiset alustat taas ovat osittain määrittelemättömiä. Agar keitetään tasaisen hyytyvän liuoksen aikaansaamiseksi. Agar voidaan keittää kattilassa, automaattisissa valulaitteissa tai autoklaavissa. Agarliemi vaatii steriloinnin ennen käyttöä, jotta mahdolliset mikrobit ja niiden itiöt eivät häiritse viljelyä. Steriloinnin jälkeen agar on temperoitava eli liemi on jäähdytettävä vesihautteessa sopivaksi, yleensä noin 47 °C:ssa. Tämän jälkeen lämmin, nestemäisessä olomuodossa oleva liemi voidaan valaa petrialjoihin. (Sojakka & Välimäki 2011, 19–22.)

Kasvualustan pH on tarkistettava jokaisesta keittoerästä. Työohjeessa, standardissa tai elatusaineen valmistajan tuoteohjeessa on annettu kullekin alustalle tarkat ohjeet valmistukseen, sterilointilämpötiloihin ja -aikoihin. (Sojakka & Välimäki 2011, 19–22.)

Kasvatusalustat sisältävät mikrobeille tärkeitä ravintoaineita. Mikrobin kuivapainosta noin 50 % on hiiltä ja se on välttämätön makroravinne. Toinen tärkeä makroravinne on typpi. Mikroravinteista raudan tarve on muita kivennäisaineita suurempi. Rauta toimii oleellisena osana eräissä hengitysketjun entsyymeissä, sytokromeissa. Suurin osa mikroravinteista on metalleja, jotka toimivat aineenvaihduntareitteinä. Suurin osa mikrobeista osaa valmistaa tarvitsemansa kasvutekijät, mutta osa on riippuvaisia ravinnon sisältämistä kasvutekijöistä, joita ovat vitamiinit, aminohapot, puriinit ja pyrimiidit. (Sojakka & Välimäki 2011, 107.)

Kromogeeniset kasvualustat ovat kiinteitä kasvualustoja, jotka ovat suunniteltu valikoimaan halutun mikrobin kasvua ja helpottamaan sen havainnointia. Kromogeeniset kasvualustat sisältävät väriä muodostavia yhdisteitä, kromogeeneja. Värimuodostus perustuu spesifiseen entsyymi-substraattireaktioon, jonka seurauksena syntyy värillinen mikrobipesäke. Substraatti valitaan halutun mikrobin tuottaman spesifisen entsyymin mukaan. Pilkkoutuessaan väriaine vapautuu ja muodostuu tyypillisen värinen pesäke. Mikrobit, jotka eivät tuota substraattia pilkkovaa entsyymiä, muodostavat joko värittömiä tai ei-tyypillisen värisiä pesäkkeitä. Mikrobin tunnistaminen voi tapahtua usean substraatti-kromogeeni-yhdisteen avulla, mutta kohdemikrobilla tulee olla kaikkia yhdisteitä hajottavia entsyymejä, jotta tyypillinen pesäke muodostuisi. (Valio Campus, [viitattu 2.2.2020].)

5.1.1 Tryptoni-sappi-x-glukuronidi-agar

Tryptoni-sappi-x-glukuronidi (TBX) agar on selektiivinen ja kromogeeninen kasvualusta β -glukuronidaasi-positiivisten *E. coli*-bakteerien havaitsemiseen ja pesäkkeiden laskemiseen elintarvikkeissa ja rehuissa. Se valmistetaan ISO 16649-2-standardin mukaisesti. Elatusaine sisältää sappisuoloja Gram-positiivisten bakteerien täydelliseksi estämiseksi ja β -glukuronidaasi-entsyymien havaitsemiseksi. Enterobakteereista vain *E. coli* yhdessä joidenkin salmonella ja shigella-kantojen kanssa on yksi harvoista β -glukuronidaasi-positiivisista lajeista, jotka maljalla viljeltäessä muodostavat sinisiä pesäkkeitä (kuva 1). β -glukuronidaasi-negatiiviset bakteerit kasvavat värittöminä. (Biolife 2011.)



Kuva 1. *E. coli* TBX-agarilla.

Kasvualusta sisältää kaseiinia hajottavia entsyymejä, jotka toimittavat typpeä ja hiiltä bakteerien kasvuun. Sappisuolat estävät kromogeenisen yhdisteen 5-bromi-4-kloori-3-indolyyli- β -D-glukuronidin (BCIG), jolloin havaitaan β -glukuronidaasi seuraavasti: bakteerin entsyymi jakaa sidoksen 5-bromi-4-kloori-3-indolyyliksi ja β -D-glukuronidiksi, jolloin vapautunut kromofori tuottaa värin, joka kerääntyy soluihin ja pesäkkeisiin. (VWR International 2015.)

Taulukossa 2 on Valion menetelmäohjeesta TBX-kasvualustan ainesosat ja määrät. Pieniä eroja voi löytyä valmistajien välillä. Valiolla on käytössä valmis kasvualustaseos, jota punnittiin mittapulloon ultrapuhtaan veden kanssa pakkauksessa olevan ohjeen mukaan. Kiehautuksen jälkeen sterilointi ja jäähditys vesihauteessa 47 °C:seen.

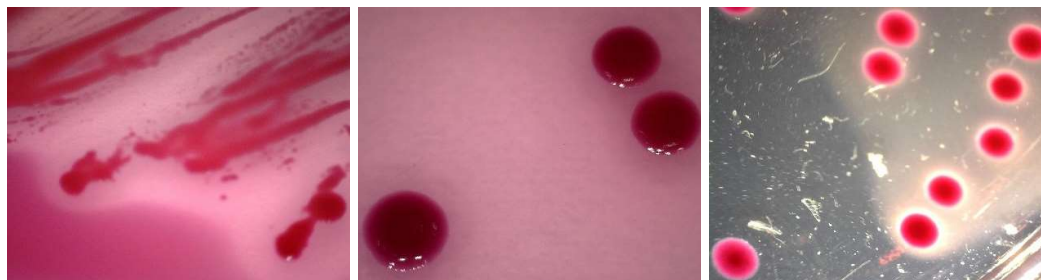
Taulukko 2. TBX-agarin resepti (ISO 16649-2:2001, 2).

Tryptoni-sappi-X-glukuronidi (TBX)	ainesosat
Entsymaattisesti pilkottu kaseiini	20,0 g
Sappisuolat No. 3	1,5 g
5-bromo-4-chloro-3-indoli β -D-glukuronihappo (BCIG)	144 μmol^a
Dimetyyli sulfoksidi (DMSO)	3 ml
Agar	9-18 g
Tislattu vesi	1000 ml
^a esim. sykloheksyyli-ammoniumsuola	0,075 g

5.1.2 Kristallivioletti-sappi-agar

Kristallivioletti-sappi-agar (VRB) on selektiivinen ja differentiaalinen kasvualusta, jota käytetään kolibakteerien eristämiseksi ja laskemiseksi elintarvikkeissa. Kristallivioletti-sappi-agar sisältää sappisuolat nro 3 ja kristalliviolettia, jotka estävät Gram-positiivisten bakteerien kasvua. Neutraalipuna sallii laktoosia fermentoivien mikro-organismien erottumisen ei-laktoosia fermentoivista. Fermentaatio aiheuttaa kasvualustan happamoitumisen, mistä seuraa indikaattorin värinmuutos violettipunaiseksi ja sappisuolojen saostuminen. (Biolife 2004.)

VRB perustuu selektiivisten, estävien komponenttien, kristallivioletti-puna-sappisuolojen, laktoosin indikaattorin ja neutraalipunan käyttöön. Siten monien ei toivotujen mikro-organismien kasvu estyy, kun taas samalla etsityt bakteerit voidaan alustavasti tunnistaa. Laktoosia nopeasti fermentoivat organismit tuottavat purppuran värisiä pesäkkeitä, joita ympäröivät violetit halogeenit (kuva 2). Ei-fermentoivat tai laktoosia hitaasti fermentoivat tuottavat vaaleita pesäkkeitä, joilla vihertäviä alueita. Jotkin Gram-negatiiviset voivat kasvaa, mutta niiden kasvu pystytään estämään. Selektiivisyyttä voidaan lisätä inkuboimalla anaerobisissa olosuhteissa ja korotetussa lämpötilassa. (Corry, Curtis & Baird 2012, 959.)



Kuva 2. *E. coli* VRB-agarilla.

Taulukossa 3 on Valion menetelmäohjeesta VRB-kasvualustan ainesosat ja määrät. Pieniä eroja voi löytyä valmistajien välillä. Valiolla käytössä valmis kasvualustaseos, jota punnittiin pulloon ja lisättiin ultrapuhdas vesi valmistajan ohjeen mukaan. Agarua keitettiin kuumalla levyllä kattilassa 25 minuuttia, jonka jälkeen jäähdytys vesihauteessa 47 °C:seen.

Taulukko 3. VRB-agarin resepti (Biolife 2004,1).

Kristallivioletti-sappi-agar (VRB)	ainesosat
Peptoni	7,0 g
Hiivauute	3,0 g
Sappisuolat No.3	1,5 g
Laktoosi	10,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Neutraalipuna	0,03 g
Kristallivioletti	0,002 g
Agar	15 g
Tislattu vesi	1000 ml

5.1.3 Tryptoni-soija-agar

Tryptoni-soija-agarin (TSA) ravinteikas koostumus (taulukko 4) on tehnyt siitä suositus yleisalustan bakteeriviljelyyn. Sitä voidaan käyttää varastoviljelmien ylläpidossa, pesäkelaskennassa ja mikro-organismien eristämisessä muista bakteereista. Tämän kasvualustan käyttö on kuitenkin rajallista, koska se tukee useiden

mikro-organismien kasvua. Tryptoni-soija-agaria voidaan käyttää myös elatusai-
neena vertailukantojen, esimerkiksi enterobakteerien ja stafylokokkien ylläpitämi-
sessä. Kaseiinien ja soijapeptonin yhdistelmä tuottaa orgaanisia aineita, kuten typ-
peä, aminohappoja ja pitkäketjuisia peptidejä ja siitä riittää ravinteita pidemmäksikin
aikaa. Natriumkloridi ylläpitää osmoottista tasapainoa. (BD 2003.)

Taulukko 4. TSA-agarin resepti (BD, 2003).

Tryptoni-soija-agar	ainesosat
Kaseiinipeptoni	15,0 g
Soijapeptoni	5,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Agar	15,0 g

5.2 Kantakokoelma

Maailman laajuista WDCM-kantakokoelmaa (WDCM = World Data Centre for Mic-
roorganism) ylläpitää Kiinan tiedeakateman mikrobiologian instituutti (IMCAS) vuo-
desta 2011. Se on Kiinan ensimmäinen biotieteenalan tietokeskus, joka edistää Kii-
nan mikrobiutkimusta kansainvälisesti ja on perustanut maailman laajuisen mikro-
biresurssien tiedonjakoalustan. (WDCM History [Viitattu 19.5.2020].)

Kantaluettelo on tuotettu mahdollistamaan laajan ja helpon pääsyn referenssikan-
toihin, jotka on lueteltu ISO TC 34 SC 9 yhteistyöryhmässä ja Elintarvikemikrobiolo-
gian- ja hygienian kansainvälisen komitean (ICFMH-WPCM) viljelyaineiden työryh-
män julkaisussa Ruoka- ja vesimikrobiologian kasvualustan käsikirja (Handbook of
Culture Media for Food and Water Microbiology). Se vastaa tarpeeseen luoda yksi-
löivä tunnistusjärjestelmä kannoille, joita suositellaan käytettäväksi laadunvalvon-
nassa. (WDCM Reference strain catalogue [Viitattu 19.5.2020].)

Kannat ovat vapaasti valittavissa, mutta vähintään yhtä kannoista on käytettävä
(taulukko 5). Lisäksi tässä ISO 11133:2014 määrittää, että *E. coli* WDCM 00202 on
vähintään käytettävä TBX-agarin testauksessa. (SFS-EN ISO 11133:2014, 55).

Taulukko 5. ISO 16649-2-standardissa hyväksytyt vertailukannat TBX-agarille. (SFS-EN ISO 11133:2015, 55).

<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. freundii</i>
WDCM 00012	WDCM 00009	WDCM 00006
WDCM 00013	WDCM 00087	WDCM 00025
WDCM 00202		

5.3 Rikastus

Rikastaminen perustuu kasvuolosuhteiden valitsemiseen sellaisiksi, että ne suosivat etsittyä bakteerilajia muiden kustannuksella. Elatusliuokseen valitaan sellaista ainetta, jota muut bakteerit eivät siedä, kuten *E. coli*-bakteerin rikastamiseen käytetty sappihappo. Kasvatustilalla voidaan sulkea pois muita ja suosia niitä bakteereja, joiden haluaa kasvavan. Myös bakteerien hapentarpeen mukaan voidaan rikastaa. (Salkinoja-Salonen 2002, 59.)

Rikastusliemet ovat nykyään valmiina tilattavia elatusaineita ja Valiolla käytössä oli aivo-sydän-infuusio-liemi (BHI) *E. coli* -bakteerin kasvatukseen, kun KWIK-STIK™ –putkesta oli siirretty bakteeria kasvamaan ensin veriagarille ja veriagarilta rikastusliemeen, jolloin saatiin tehtyä laimennossarja.

5.4 Puhdasviljelmä

Puhdasviljelmän valmistaminen perustuu steriileihin työvälineisiin, kasvatusalustoihin ja laimentamiseen. Puhdasviljelmä voidaan valmistaa hyytyneelle agarmaljalle pintalevityksenä siirrostussilmukalla tai pehmeäagarlevityksenä. Tavoitteena on saada bakteeri levitettyä ja laimennettua alustalle niin, että bakteerisolusta muodostuu erillisiä, yhtä bakteeria sisältäviä bakteeripesäkkeitä. (Salkinoja-Salonen 2002, 80–81.)

5.5 Laimennossarja

Laimennoksen tavoitteena on saada laskettavia tuloksia. Pesäkkeiden laskemisessa tehdään oletus, että pesäke on peräisin yhdestä mikrobista. Valtavan mikrobipopulaation laskemiseksi laimennossarjan teko on välttämätöntä. Laimentamisessa pieni, tarkasti tunnettu määrä (tilavuus tai massa) näytettä sekoitetaan huolellisesti suurempaan määrään laimennosliuosta. Laimennosliuoksena käytetään yleensä vettä, fysiologista suolaliuosta tai yksinkertaista ravinneliuosta. Tavallisimpia laimennossuhteita on 1:10 tai 1:100. Bakterimäärät voivat olla 10^4 – 10^9 , joten laimennos tulee tehdä sarjassa peräkkäin. Itse suunnitellussa laimennuskaaviossa painotetaan todennäköisimpiä laimennussuhteita, mutta myös epätodennäköisiä kannattaa ottaa mukaan sarjasta. (Sojakka & Välimäki 2011, 137–140)

5.6 Kontrollit

Elatusaineiden toimivuus on olennainen osa luotettavan tuloksen aikaansaamiseksi. Laadunvarmistukseksi elatusaineen käyttöön ja sen kontrollointiin tulee kiinnittää erityistä huomiota. Valmistuksessa tulee noudattaa toimittajan ohjeita liittyen valmistukseen ja sterilointiin. Lisäksi pH on aina tarkastettava jokaisesta valmistuserästä. Lopputuotteiden laatu varmistetaan aina steriiliys 0-maljalla ja toimivuuskontrolleilla (positiivi/negatiivi). Lisäksi varmistetaan asianmukaiset säilytysolosuhteet. (Ehder 2006, 7–9.)

Vertailukanta on tunnettu, kansainvälisestä kantakokoelmasta peräisin oleva tai muuten jäljitettävissä oleva bakteerin kanta. Steriiliyskontrolli otetaan valmistuserästä ja sitä inkuboidaan ilman bakteeria muiden näytteiden mukana. Mikäli kontrollissa havaitaan kasvua, koko erä hylätään, eikä luotettavia tuloksia voida saada. Toimivuuskontrolleissa periaatteena on varmistaa, että halutut mikrobit kasvavat riittävän hyvin. Selektiivisellä testataan lisäksi valikoivien ominaisuuksien toimivuus. Elatusaineella ei saa kasvaa sellaiset mikrobikannat, joiden kasvun pitäisi selektiivisten tekijöiden vuoksi estyä. Erottelevilla elatusaineilla erottelevan ominaisuuden toimivuus tarkistetaan. (Ehder 2006, 7–9.)

Mikrobikannat valitaan siten, että ne ovat sopivia ominaisuuksiltaan ja kasvuvaatimuksiltaan elatusaineeseen ja tutkittavaan mikrobiin nähden. Rikkaalla yleiselatusaineella kontrollikannaksi valitaan joku vaativista kannoista. Jos kasvu on heikkoa, elatusalustassa voi olla vikaa. Selektiivisillä alustoilla vertailukantoina käytetään sellaisia kantoja, joiden on tarkoitus kasvaa ja rikastua elatusaineessa sekä sellaisia, joiden kasvu tulisi estyä. Erottelevilla elatusaineilla käytetään erottelevien ominaisuuksien suhteen positiivista ja negatiivista vertailukantaa. (Ehder 2006, 7–9.)

Kasvualustoille ja bakteereille sopivat kontrollikannat on merkitty ISO 11133:2014 -standardiin. Siitä ilmenee, että TBX-alustan valikoivuutta voidaan testata *E. faecalis* -kannoilla WDCM 00009 tai WDCM 00087. Käytin *E. faecalis* -kantaa WDCM 00009 negatiivikontrollina. Positiivikontrollissa voidaan käyttää *E. coli* -kantaa WDCM 00012, WDCM 00013 tai WDCM 00202. Positiivikontrollina käytin kantaa WDCM 00012 ja WDCM 00202 riippuen kumpaa kantaa testattiin. Spesifisyyden testauksessa käytin *C. freundii* -bakteerin kantaa WDCM 00006. (SFS-EN ISO 11133:2014, 55.)

5.7 Näytteiden siirrostus ja kasvatus

Siirrostamisen tarkoitus on siirtää kasvustoa uudelle kasvualustalle. Siirrostaminen tehdään steriilillä muovisilmukalla, joita on saatavissa eri tilavuuskoossa. Siirrostus voidaan tehdä lasiputkesta tai maljalta poimimalla silmukalla pesäke ja siirtämällä haluttuun putkeen tai maljaan. (Sojakka & Välimäki 2011, 62.)

Bakteereja kasvatetaan usein koeputkessa tai maljalla lyhytaikaisesti, koska bakteerit alkavat reagoida ravinnon vähenemiseen ja aineenvaihduntatuotteiden kertymiseen. Bakteerit kuluttavat ravintoaineita ja erittävät aineenvaihdunnassa kuona-aineita, jolloin niiden elinolosuhteet muuttuvat koko ajan. Nämä kasvuolosuhteiden muutokset heijastuvat bakteerien kasvukäyriin. Kun ympäristö muuttuu optimaaliseksi lämpötilan, pH:n ravintorikkkauden ja oikean vesipitoisuuden johdosta, edistyy mikrobien lisääntyminen. (Sojakka & Välimäki 2011, 82.)

Bakteerit lisääntyvät suvuttomasti. Uusi solu on geneettisesti samanlainen kuin alkuperäinen solu. Bakteerin yhden kromosomin DNA kahdentuu ja tytärokromatidi siirtyy kahteen soluun. Suvuton lisääntyminen on nopeaa, aikaero voidaan laskea minuuteissa tai tunneissa. Heikkoutena on olosuhdemuutokset ympäristössä, joiden muutoksille suvuton lisääntyminen on herkkä. (Sojakka & Välimäki 2011, 82–83.)

Bakteerien kasvu on solujen lisääntymistä, ei yksittäisen bakteerin massan tai tilavuuden kasvua. Muodostuu pesäke joka ilmoitetaan lyhenteellä pesäkettä muodostavaa yksikköä (pmy; englanniksi colony-forming unit (CFU)). (Sojakka & Välimäki 2011, 83.)

6 MENETELMÄN TESTAUS

6.1 Menettely

Jotta saataisiin vertailtavia tuloksia ja voitaisiin todeta, että ISO-standardin mukainen menetelmä toimii ja sillä saadaan oikeanlaisia tuloksia kaikissa testeissä, käytettiin rinnakkaisena menetelmänä laboratorioissa käytössä olevaa NMKL-menetelmää. Käytännön eroa menetelmien välillä on vähän, mutta muutamia eroja löytyy. NMKL-menetelmässä käytössä oleva VRB-agarilla kasvavat muutkin koliformiset bakteerit, joten *E. coli* -bakteerin tunnistaminen täytyy todentaa vielä laktoosintuotto-, indolintuotto- ja β -glukuronidaasintuotto kokeella. Tämä näkyy SLV:n näytteitä tehdessä, sillä SLV:n näytteissä voi olla muitakin bakteereja kuin vain *E. coli* ja on tarpeen tehdä varmistustestit *E. coli*-bakteerin varmistamiseksi. *E. coli* näkyy heti TBX-alustalla, joka johtuu alustan kromogeenisyydestä.

VRB-agar poikkeaa myös valumenetelmässä siten, että se vaatii päällensä ohuen peittokerroksen alemman, näytettä sisältävän hyytyneen kerroksen päälle. TBX-agar on heti valmis inkubointiin hyydyttyään. Kuten Ahlroos (2018) kummassakin Valion menetelmäohjeessa toteaa, akkreditoitu menetelmä vaatii joko kahden peräkkäisen laimennoksen viljelyä tai kahden rinnakkaisen maljan käyttöä. Kaikista testeissä mukana kulkee aina kummankin menetelmän kohdalla 0- näyte, joka osoittaa, että agar on puhdas ja se ei ole saastunut missään vaiheessa, jolloin tulkinta saattaisi häiriintyä ja tulosta ei voitaisi katsoa luotettavaksi. Lisäksi tehdään aina positiivi- ja negatiivikontrolli, joista voidaan tarkistaa kasvun laatu, pesäkkeiden oikeellisuus ja tehdä vertailua bakteeria tunnistettaessa. Nämä kontrollit tehdään puhtasviljelmästä ja ne osoittavat, että kasvualustassa kasvaa haluttu bakteeri ja ei-toivottu estyy.

Työselosteita olen täydentänyt itse tekemin piirroksin Inkscape -sovelluksella, joilla pyrin havainnollistamaan pipetointeja ja maljojen käyttöä.

6.2 TBX-alustan koetestaus

Kasvatusalustaa testattiin valamalla TBX-agarista maljoja. Veriagarille kasvatetusta puhtasviljelmästä poimittiin silmukalla 1 µl pesäkettä ja siirrostettiin kevyesti sivelemällä puhtaalle TBX-alustalle. Lisäksi tehtiin 0-malja osoittamaan agarin puhtaus. Inkubointi tapahtui 44 °C:ssa, 21 tuntia.

Siirrostetut bakteerit:

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *E. faecalis*
- *E. coli*
- *Bacillus cereus*
- Hiiva

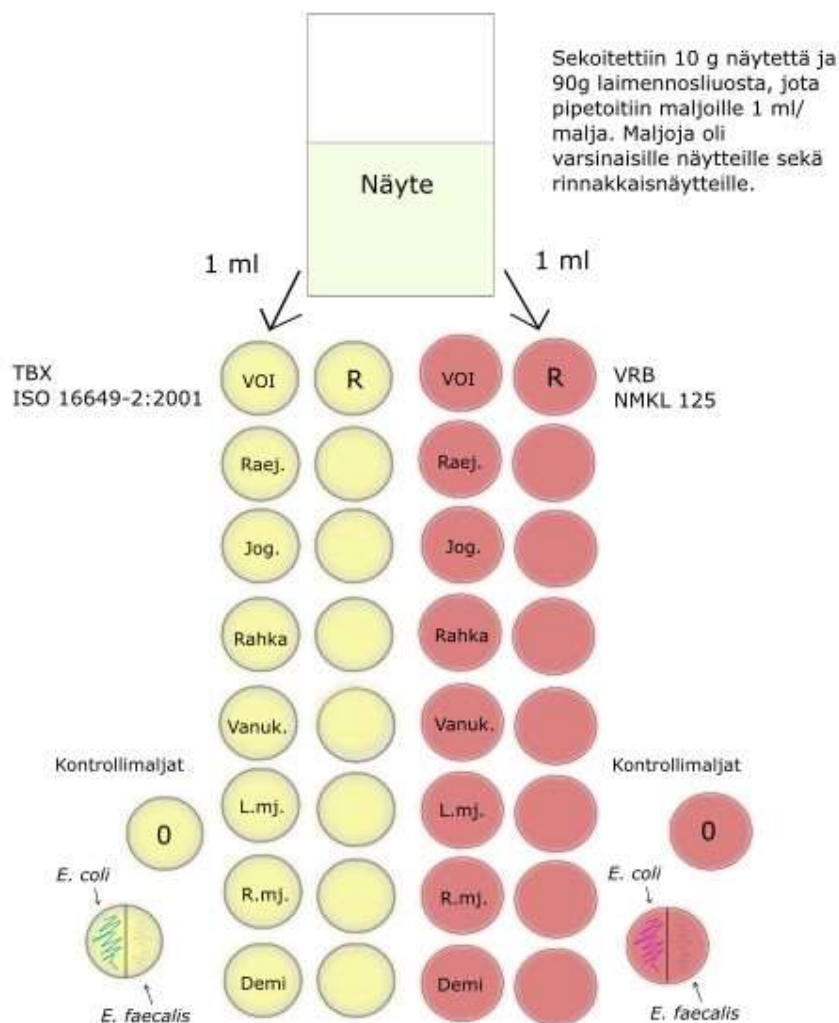
6.3 Valikoimassa olevat luonnolliset tuotenäytteet

Näytematriisi:

- suolaamaton voi
- raejuusto 2%
- kreikkalainen jogurtti mustikka – vanilja
- proteiinirahka mansikka – raparperi
- proteiinivanukas minttu - suklaa
- laktoositon maitojauhe
- rasvaton maitojauhe

- proteiinijauhe (demi 50)

Näytteet punnittiin Dilumat-laitteella (bioMérieux Industry, Ranska) (kuva 3), joka lisäsi automaattisesti laimennosliuoksen näytteen painon mukaan. Näytettä punnittiin 10 g. Voi pehmennettiin lämpökaapissa. Näytteet sekoitettiin Smasher-homogenisaattorissa (bioMérieux Industry, Ranska). Näyteliuoksia pipetoitiin maljoille 1 ml. Jokaista näytettä pipetoitiin neljälle maljalle. Puoleen näytteistä valettiin päälle TBX-agar ja toiseen puoleen näytteistä VRB-agar niin, että lopuksi jokaista näytettä oli kaksi maljaa kummallakin agarilla valettuna (kuvio 1). Lisäksi kummastakin agarista valettiin puhtaat alustat 0-maljaa sekä pos/neg-kontrollia varten. Maljojen annettiin jäähmettyä 20 min., jonka jälkeen näytteitä inkubointi tapahtui 44 °C:ssa, 24 tuntia.

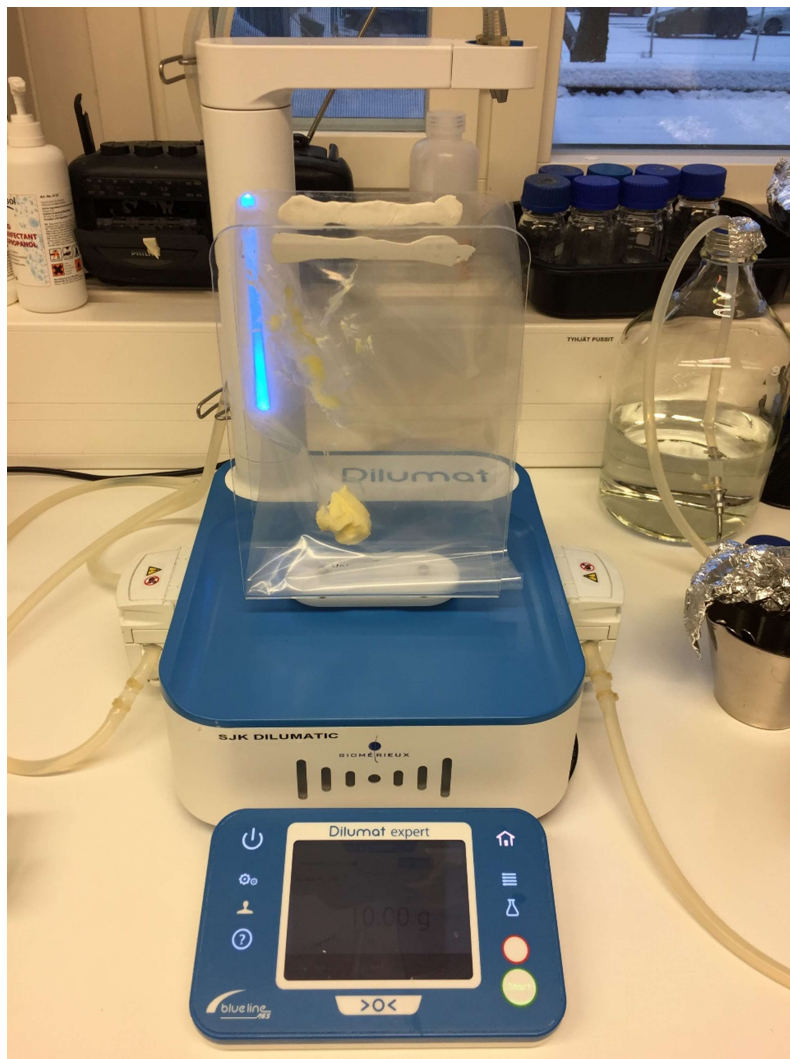


Kuvio 1. Luonnolliset näytteet. Rinnakkainen näyte (R).

6.4 Kontaminoidut tuotenäytteet

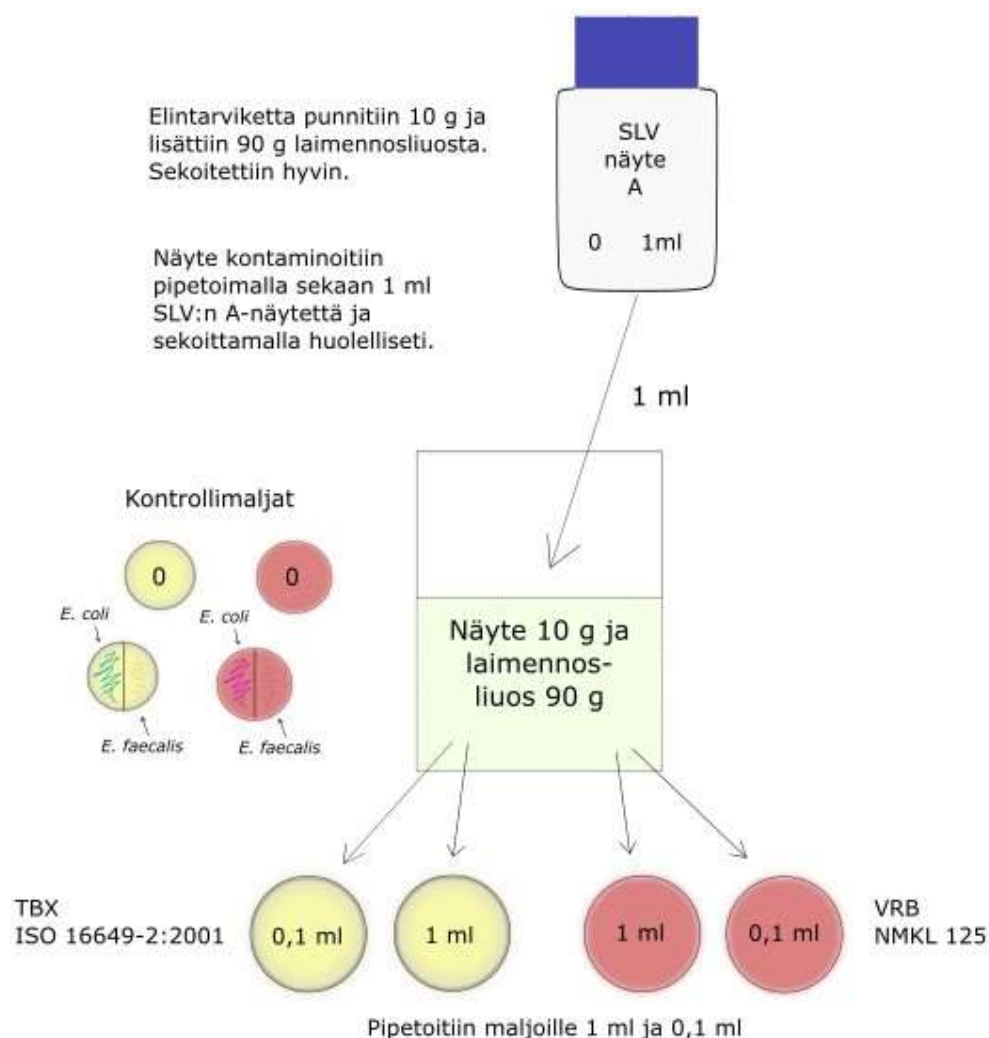
Luonnollisista tuotenäytteistä valittiin neljä näytettä, joissa saattaa esiintyä pesäkkeiden lukuvaikeuksia näytteessä olevien häiritsevien elementtien vuoksi, kuten voissa rasva, jauheessa saostumat, vanukkaassa kaakaojauhe, sekä kreikkalaisessa jogurtissa mukana oleva hillo, josta jää näytteeseen usein marjoista peräisin olevaa sakkua.

Tuotenäytteet punnittiin Dilumat-laitteella (kuva 3), joka lisäsi automaattisesti laimennosliuoksen näytteen painon mukaan. Tuotenäytettä punnittiin 10 g. Voi pehennettiin lämpökaapissa ennen punnitsemista.



Kuva 3. Dilumat-laite. Laitteessa kiinni olevaan pussiin oli punnittu 10 g voita. Laitteesta valittiin hapan laimennosliuos ja laite punnitsi automaattisesti takana olevasta pullostasta laimennosliuoksen näytteen painon mukaan.

Näytteet sekoitettiin elintarvikenäytteen ja laimennosliuoksen punnitsemisen jälkeen Smasher-homogenisaattorissa. Interkalibroitinäyte A valmistettiin pipetoimalla laimennosliuosta 1 ml kerrallaan kylmäkuivattuun mikrobiseokseen. Seos sekoitettiin varovasti ja siirrettiin isoon 250 ml:n laimennospulloon. Sama toistui lisäksi kolme kertaa niin, että isossa laimennosliuos pullossa hyvin sekoitettua valmista näytettä oli yhteensä 254 ml. Ennen kontaminointia pipetoitiin 1 ml puhdasta näytettä omille maljoilleen vertailua varten. Tämän jälkeen näytteet kontaminoitiin SLV:n A-näytteellä pipetoimalla sitä 1ml näytepussiin ja sekoitettiin Smasher-homogenisaattorilla (kuvio 2).



Kuvio 2. Näytteiden kontaminointi.

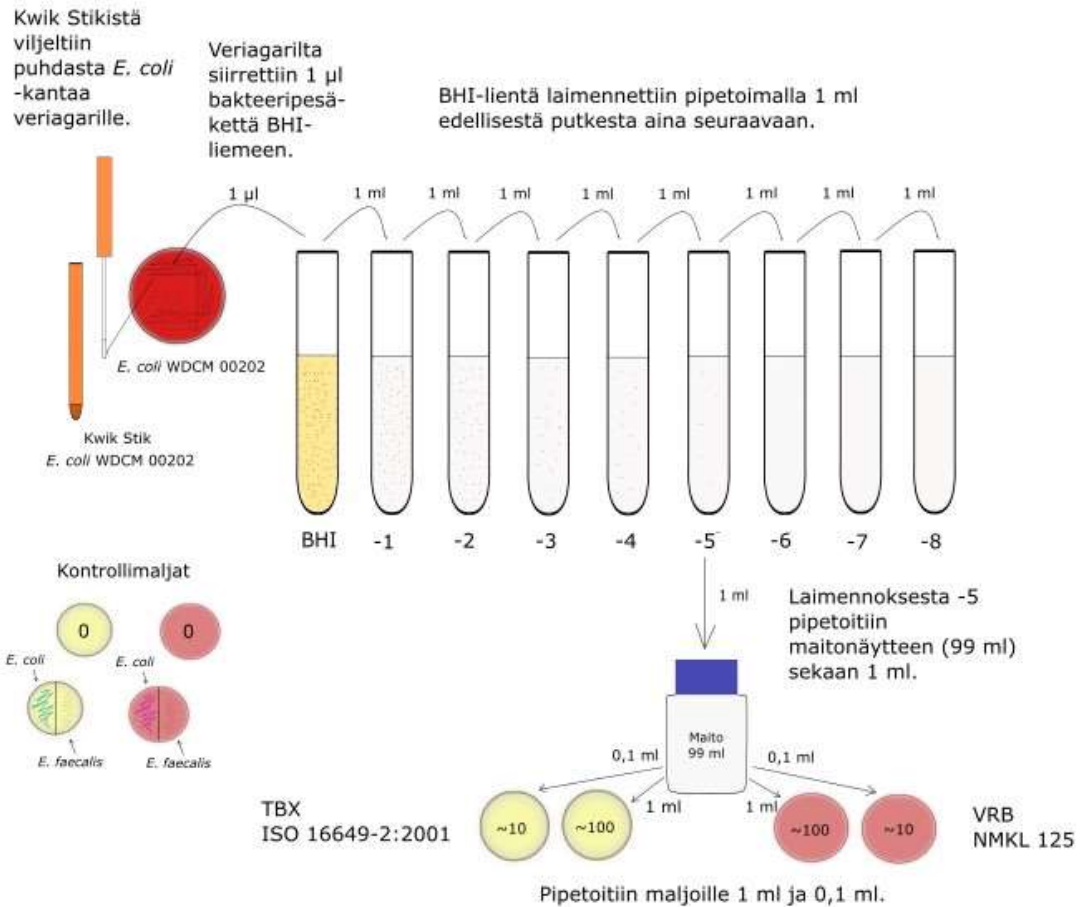
SLV:n A-näyte sisälsi 15 000 pmy:ä. Luonnollista näytettä oli yhteensä 100 ml. Näin 1 ml kontaminoitua näytettä sisälsi 150 pmy/ml ja 0,1 ml 1,5 pmy/ml. Kahdella laimennoksella varmistettiin luettavissa oleva tulos.

Näytteet pipetoitiin kahdessa eri laimennoksessa maljoille ja päälle valettiin TBX- ja VRB-agar. Lisäksi valettiin pos/neg- sekä 0-malja. Inkubointi tapahtui 44 °C:ssa, 24 tuntia.

6.5 Kontaminoitu maito

Tällä työllä suoritettiin uusittavuus ja toistettavuus. Työ aloitettiin valmiiksi herätetyllä mikrobilla (*E. coli* WDCM 00202), joka oli siirrostettu KWIK-STIK™:stä veriagarille. Veriagarilla inkuboitui yön yli, jonka jälkeen veriagarilta siirrostettiin silmukalla 1 µl pesäkettä BHI-liemeen, jota inkuboitui jälleen yön yli.

Laimennossarja aloitettiin pipetoimalla BHI-liemestä 1 ml putkeen -1, josta jatkettiin taas pipetoimalla 1 ml putkeen -2. Näin laimennosta jatkettiin laimennokseen -8 asti (kuvio 3). Välissä jokaista putkea sekoitettiin hyvin ennen seuraavaan pipetointia. Jokaisesta laimennoksesta valettiin oma viljelymalja TSA-agarille (kuva 4). Laimennosta pipetoitiin 1 ml/malja. Tehtiin myös pos/neg-kontrolli ja 0-malja. Positiiviseen kontrolliin siveltiin *E. coli* ja negatiiviseen *Staphylococcus aureus*. Inkubointi tapahtui 37°C:ssa, 24 tuntia.



Kuvio 3. Havainnekuva laimennossarjasta ja maidon kontaminoinnista.



Kuva 4. Laimennossarjan tuloksia TSA-maljalla. Maljalla -5 kasvua on yli 150 pmy/ml, jolloin kaikkia pesäkkeitä ei lasketa ja laimennoksen oletetaan kasvaneen logaritmisesti, jolloin maljalla on noin 10 000 pmy/ml.

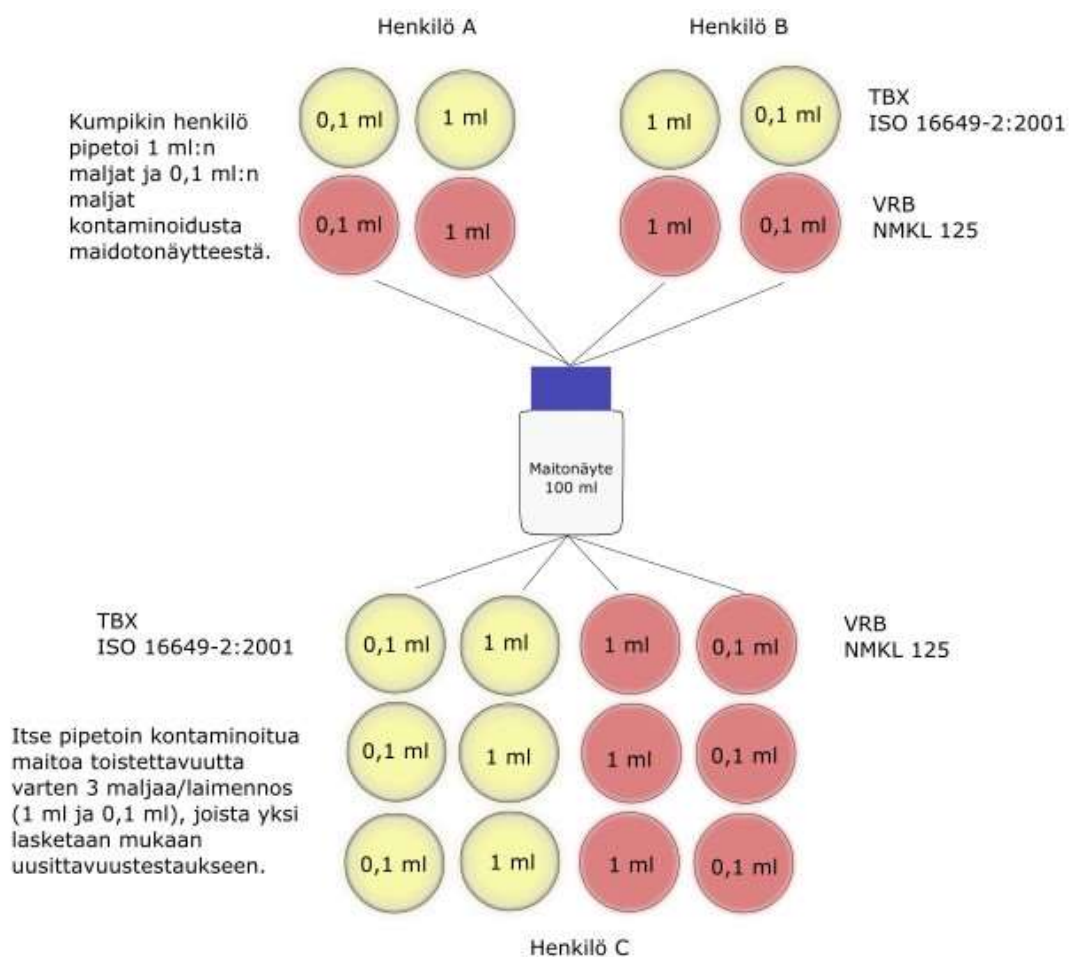
6.5.1 Toistettavuus

Tavoitepitoisuus kontaminoidussa maidossa oli 100 pmy/ml. Laimennossarjasta käytettiin laimennosta -5, jossa kasvua 10^4 .

Kevytmaitoa mitattiin mittapulloon 99 ml. Joukkoon pipetoitiin 1 ml laimennoksesta -5. Sekoitettiin huolellisesti. Maitonäytteestä pipetoitiin kolme rinnakkaista maljaa kummallekin agarille eli yhteensä 12 maljaa. Puolelle maljoista 1 ml ja toiselle puolelle 0,1 ml. Valettiin TBX- ja VRB-agarit (kuvio 4).

6.5.2 Uusittavuus

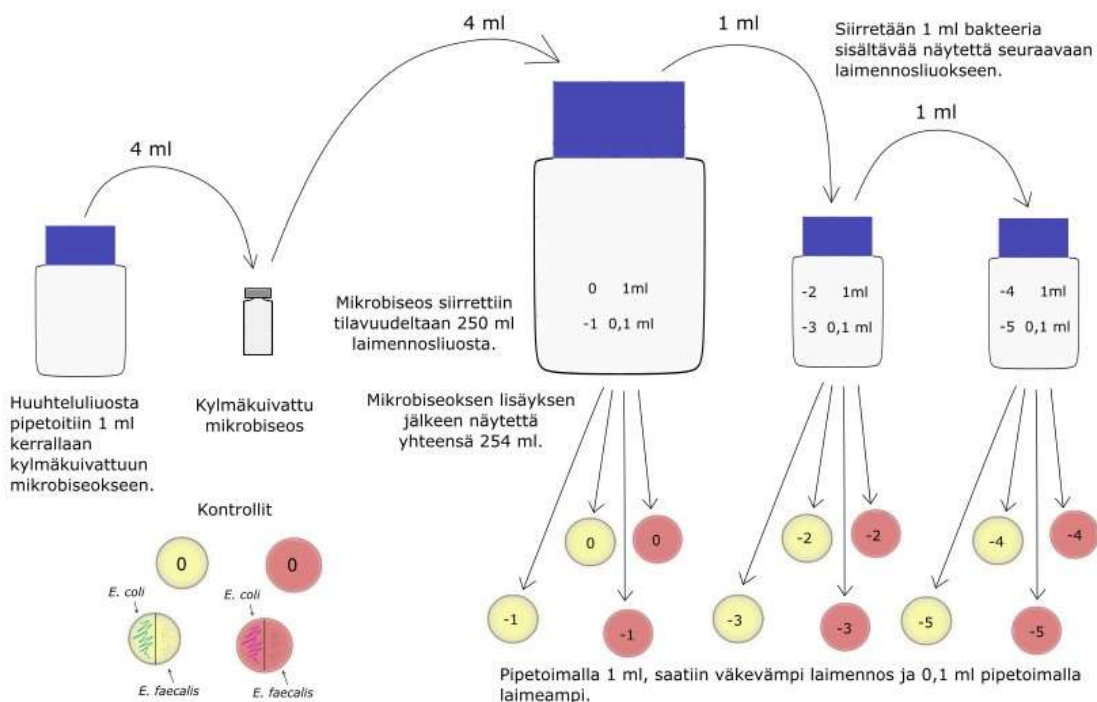
Itseni lisäksi kaksi henkilöä (A ja B) pipetoivat kumpikin kaksi 1 ml:n maitonäytettä ja kaksi 0,1 ml maitonäytettä. Valettiin TBX- ja VRB-agarit (kuvio 4). Kaikki näytteet inkuboitiin 44 °C:ssa, 24 tuntia.



Kuvio 4. Toistettavuus ja uusittavuus.

6.6 Interkalibrointinäytteet

Interkalibrointinäytteitä oli kolme; A, B ja C. Näytteet olivat lokakuu 2019 kierrokselta. Interkalibrointinäyte valmistettiin pipetoimalla laimennosliuosta 1 ml kerrallaan kylmäkuivattuun mikrobiseokseen. Seos sekoitettiin varovasti ja siirrettiin isoon 250 ml:n laimennosliuospulloon. Sama toistui lisäksi kolme kertaa niin, että isossa laimennosliuospullossa valmista näytettä oli yhteensä 254 ml. Isosta näytepullostsa pipetoitiin 1 ml maljalle, jolloin saatiin näyte nolla ja 0,1 ml pipetoimalla näyte -1. Isosta pullosta pipetoitiin 1 ml 99 ml:n laimennosliuospulloon, josta pipetoimalla 1 ml maljalle saatiin näyte -2 ja 0,1 ml pipetoimalla näyte -3. Tästä laimennosliuoksesta taas pipetoitiin 1 ml uuteen 99 ml:n laimennosliuospulloon, jolloin saatiin pipetoimalla 1 ml maljalle näyte -4 ja 0,1 ml pipetoimalla näyte -5 (kuvio 5).

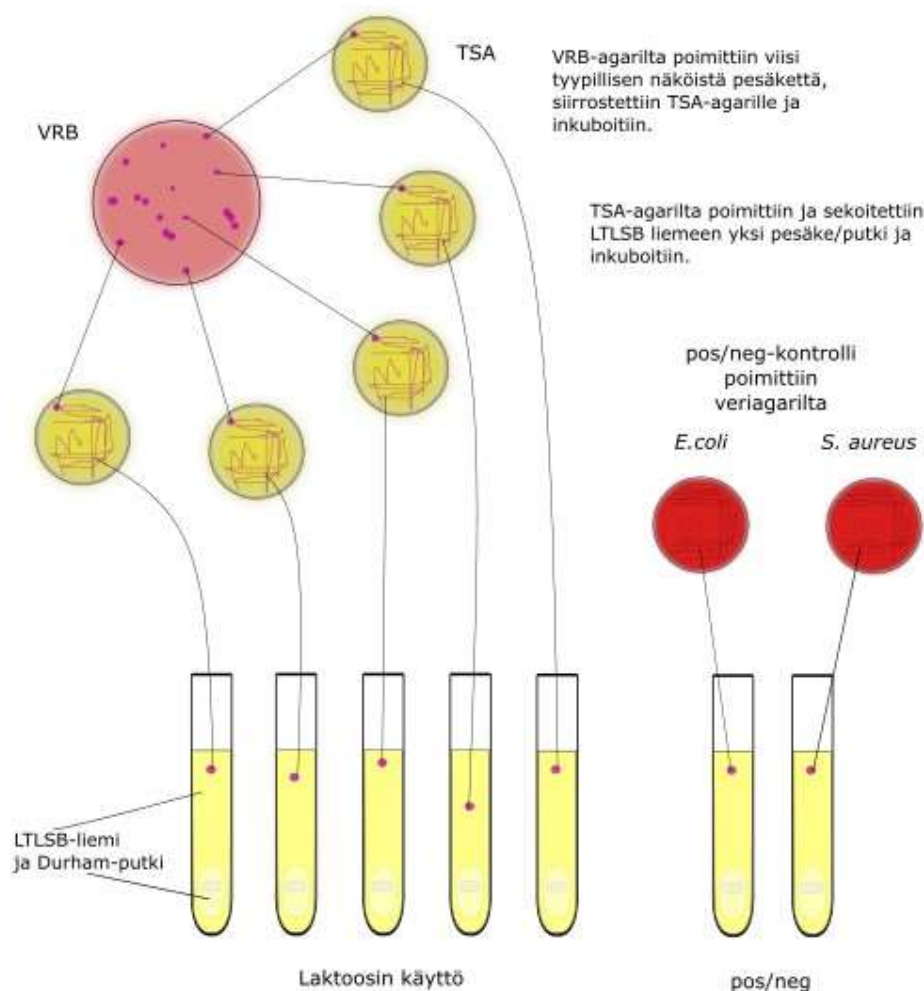


Kuvio 5. Havainnekuva interkalibrointinäytteen valmistuksesta.

Pipetoinnit suoritettiin kumpaakin kasvualustaa varten, sekä lisäksi rinnakkaisnäytteet. Kasvualustat valettiin ja annettiin jähmettyä 20 min. Lisäksi puhtaat maljat valettiin pos/neg-kontrollia, sekä 0-maljaa varten. Inkubointi tapahtui 44°C:ssa 24 tuntia.

Seuraavana päivänä laskettiin pesäkkeet ja valittiin yksi VRB-malja, jolta siirrettiin viisi tyypillisen näköistä tai epäilyttävää pesäkettä yleisalusta TSA:lle puhdasviljelmää varten niin, että yksi pesäke yhtä maljaa kohden (5 kpl). Pesäke siirrettiin painamalla keskelle pesäkettä puisella terävällä tikulla ja sivelemällä puutikkua TSA-alustan yhteen reunaan. Tästä jatkettiin silmukalla levitystä (kuvio 6). Valmistettiin pos/neg-kontrolli ja 0-malja. TSA-alustalle positiivi- ja negatiivikontrollina käytettiin *E. coli*- ja *S. aureus*-bakteereita. Inkubointi tapahtui 37 °C:ssa 24 tuntia.

Laktoosin käyttö varmistettiin siirrostamalla 1 µl:n silmukalla bakteerikasvua laktoosi-tryptoni-lauryylisulfaatti-liemeen (LTLBS) (kuvio 6). Pos/neg-kontrollina *E. coli* ja *S. aureus*. Inkubointi 44 °C:ssa, 24 tuntia.



Kuvio 6. Puhdasviljelmästä laktoosin käyttökoe.

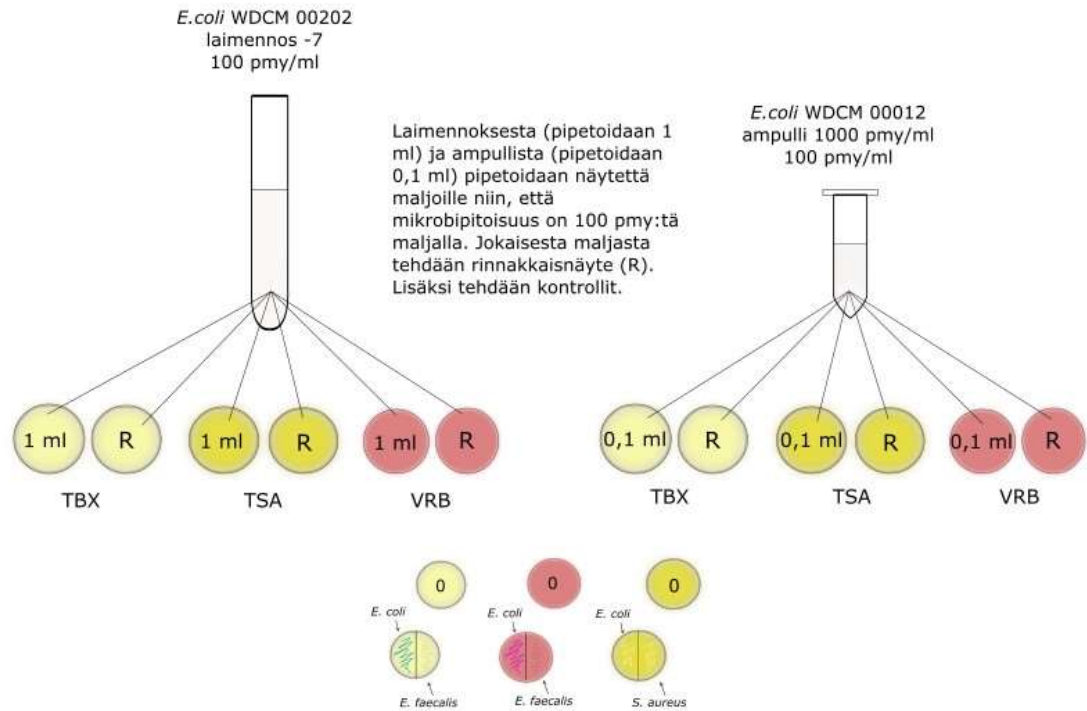
Koska inkuboinnin jälkeen Durham-putken kaareva osa oli kaasun täyttämä, jatkettiin koetta vielä varmistamalla indolin tuotto pipetoimalla Kovacin reagenssia 0,3 ml

koeputkiin. Punaisen renkaan ilmestyttyä jatkettiin varmistamalla β -glukuronidaasin tuotto valmistamalla pieneen koeputkeen solususpensio. Putkeen tiputtiin yksi PGUA/Indoli-tabletti ja lisättiin laimennosliuosta 0,25 ml, sekä jokaiselta TSA- alustalta 1 pesäke/putki. Pos/neg-maljalta siirrettiin silmukalla *E. coli* positiivi- ja *S. aureus* negatiivikontrolliksi. Inkubointi tapahtui 37 °C:ssa, 3 tuntia. Keltainen väri putkessa on positiivinen tulos.

6.7 Tuottavuus

Tuottavuuden testauksessa käytettiin kvantitatiivista menetelmää, jossa kantalaimennosta siirrostetaan kasvualustalle. Kasvualustan tuottavuutta testattiin laimennossarjalla ja pakasteampullilla. Testattavana oli kaksi ISO-menetelmässä määriteltyä *E. coli* -kanta. Kannat olivat WDCM 00012 ja WDCM 00202 (SFS_EN ISO 11133:2014, 55). Kannasta WDCM 00202 käytettiin samaa laimennossarjaa, kuin kontaminoidussa maidossa, mutta laimennosta -7. Kannasta WDCM 00012 käytettiin pakasteessa valmiina olevia pakasteampulleja.

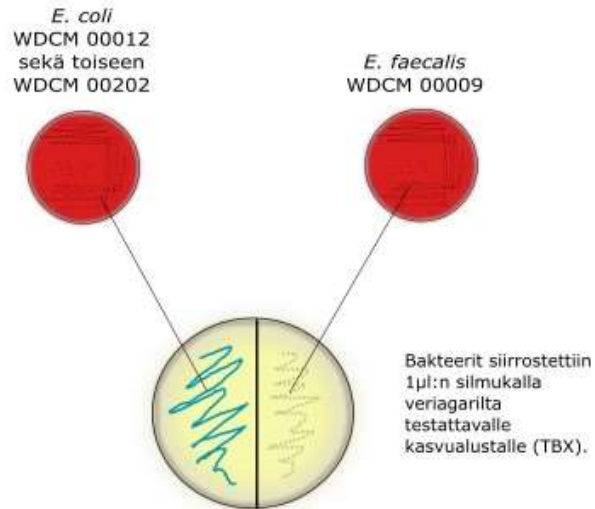
Bakteeria pipetoitiin kuudelle maljalle, joissa agareina testattava TBX, käytössä olevan menetelmän VRB ja vertailualustana TSA (kuvio 7). Laimennossarjasta 1 ml ja ampullista 0,1 ml varsinaista näytettä ja rinnakkaista näytettä varten. Päälle valettiin TBX-, TSA- ja VRB-agarit. Valettiin pos/neg ja 0-malja. Inkubointi tapahtui 44 °C:ssa, 24 tuntia.



Kuvio 7. Tuottavuustestauksen pipointi.

6.8 Selektiivisyys

Selektiivisyyden testauksessa käytettiin kvalitatiivista menetelmää. Selektiivisyyden testauksessa *E. faecalis*- ja *E. coli*-bakteereja siirrostettiin veriagarilla olevalta puhdasviljelmältä TBX-alustalle (kuvio 8) 1 µl:n silmukalla ja inkuboitiin 44 °C:ssa 24 tuntia.



Kuvio 8. Selektiivisyyden testaus.

6.9 Spesifisyys

Spesifisyyden testauksessa käytettiin kvalitatiivista menetelmää. Spesifisyyden testauksessa *C. freundii* siirrostettiin 1 µl:n silmukalla veriagarilla olevalta puhtasviljelmältä TBX-alustalle niin, että saadaan erillisiä pesäkkeitä. Inkubointi tapahtui 44 °C:ssa, 24 tuntia.

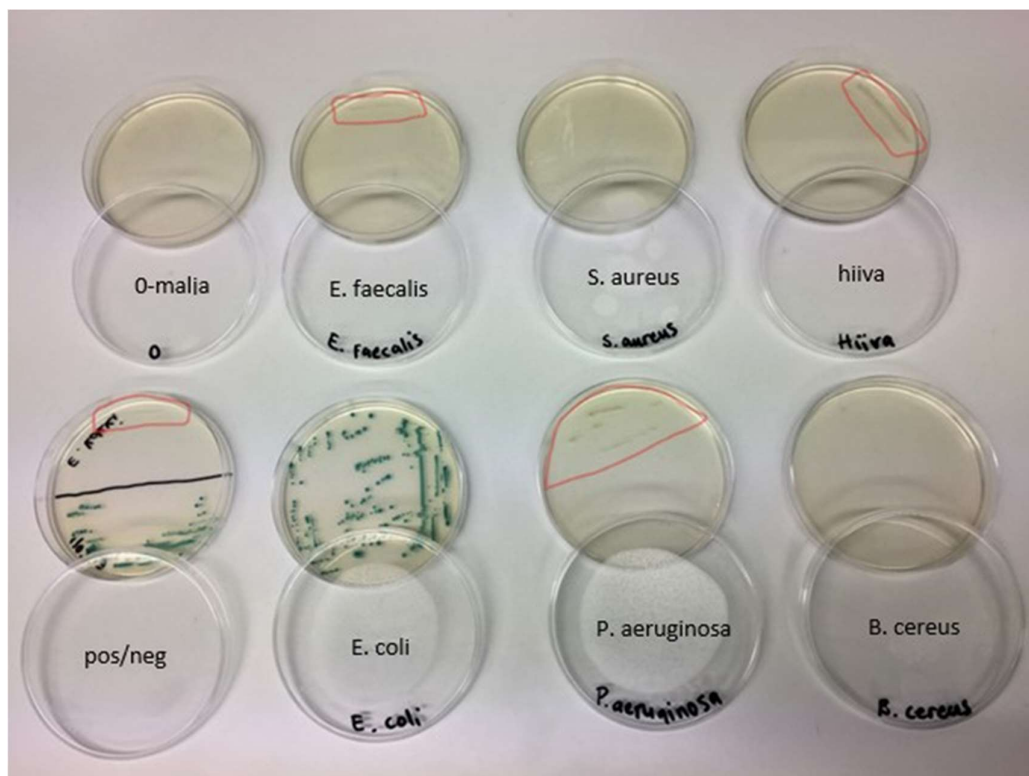
7 TYÖN TULOKSET

7.1 TBX-alustan koetestauksen tulokset

Kokeilun tulokset olivat odotetunlaiset (taulukko 6). *E. coli* näkyi kirkkaalla värittömällä alustalla turkoosin värisenä. Muut bakteerit näkyivät epätyypillisen näköisenä, paksuna vaaleana viivana (kuva 5). Malja toimi sivelytekniikalla tehdyssä testissä toivotulla tavalla.

Taulukko 6. Sivelytulokset TBX-alustalla.

SIIRROSTETUT BAKTEERIT	TULOS	KASVUN LAATU
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	kasvua	vähäistä, epätyypillistä kasvua
<i>Staphylococcus aureus</i>	ei tulosta	
<i>Enterococcus faecalis</i>	kasvua	hyvin vähäistä, epätyypillistä kasvua
<i>Escherichia coli</i>	selvää kasvua	turkoosia, tyypillisiä pesäkkeitä
<i>Bacillus cereus</i>	ei kasvua	
Hiiva	kasvua	vähäistä kasvua



Kuva 5. Bakteerien siveykokeilu TBX-alustalla. Punaisella on ympyröity heikot, vaaleat kasvustot.

7.2 Valikoimassa olevat luonnolliset tuotenäytteet

Tuotevalikoimassa olevat näytteet olivat luonnollisessa, myyntivalmiissa tilassa suljettuina suoraan tehtaalta. Näytteet analysoitiin, kuten ne normaalisti analysoitaisiin, mutta molemmilla alustoilla vertailun vuoksi. Yhdestäkään näytteestä ei löytynyt kummallakaan alustalla *E. coli*-bakteereja (taulukko 7). Näytteet läpäisivät mikrobiologisen laaduntarkkailun.

Taulukko 7. Tuotevalikoimanäytteiden tulokset.

Tuotenäyte*	TBX-agar**	VRB-agar**
Suolaamaton voi	<10	<10
Raejuusto 2 %	<10	<10
Kreikkalainen jogurtti mustikka-vanilja	<10	<10
Proteiinirahka mansikka-raparperi	<10	<10
Proteiinivanukas minttusuklaa	<10	<10
Laktoositon maitojauhe	<10	<10
Rasvaton maitojauhe	<10	<10
Demi 50 proteiinijauhe	<10	<10

*Näyte 10 g laimennosliuos 90 g = 100 g

**pmy/ml

7.3 Kontaminoidut tuotenäytteet

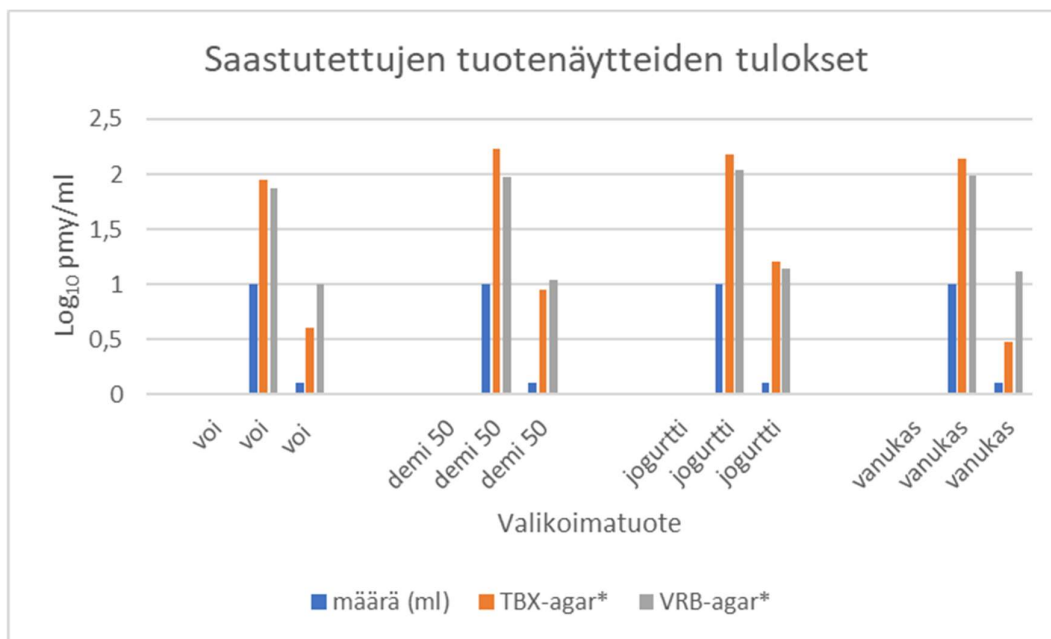
Tuotevalikoimassa olevia valittuja näytteitä kontaminoitiin SLV:n A-näytteellä, jossa mikrobipitoisuus oli 100 ml:ssa 150 pmy/ml (Liite 1). TBX:llä pesäkkeet löytyivät isommassa laimennoksessa selvästi paremmin kuin VRB:llä, mutta tulosten perusteella VRB:ltä taas löytyi pienemmällä laimennoksella pesäkkeitä enemmän (taulukko 8). TBX:llä pesäkkeet erottuvat selkeästi muista häiritsevistä tekijöistä. VRB:llä seassa saattoi olla myös muita laktoosia fermentoivia bakteereja, koska SLV:n A-näyte sisälsi myös muita koliformeja. Liitteestä 1 tuloksia voi tarkastella pesäkemäärinä.

Taulukko 8. Saastuneiden tuotenäytteiden tulokset.

Tuotenäyte	määrä (ml)	TBX-agar*	VRB-agar*
voi	puhdas	0	0
voi	1	1,95	1,87
voi	0,1	0,60	1
demi 50	puhdas	0	0
demi 50	1	2,23	1,98
demi 50	0,1	0,95	1,04
jogurtti	puhdas	0	0
jogurtti	1	2,18	2,04
jogurtti	0,1	1,20	1,15
vanukas	puhdas	0	0
vanukas	1	2,14	1,99
vanukas	0,1	0,48	1,11

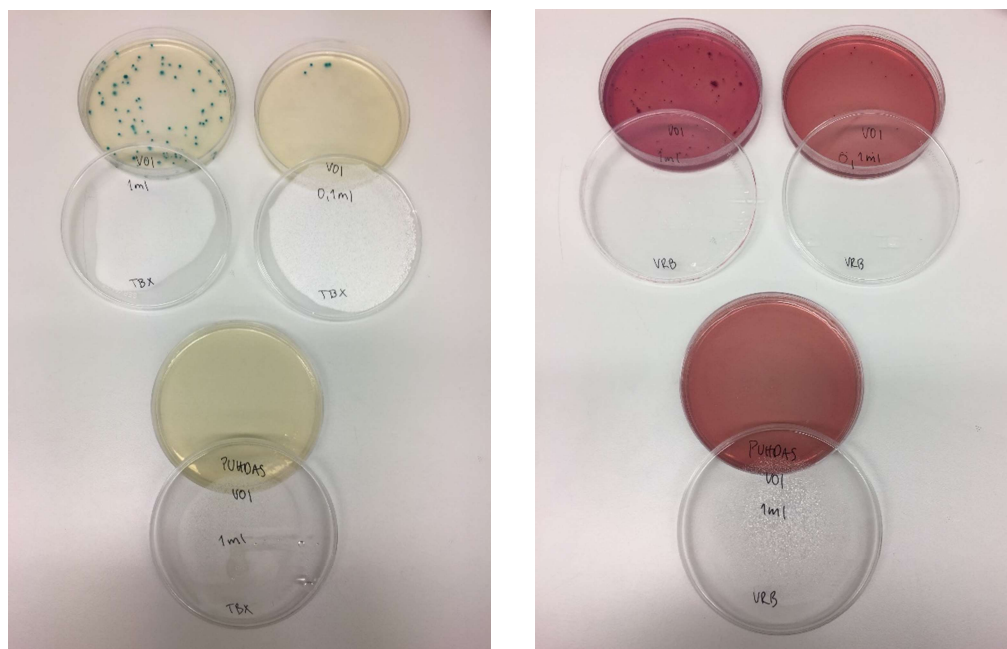
*Log₁₀ pmy/ml

Voissa *E. coli* kasvoi vähiten. Kuvio 9 perusteella voi päätellä, että proteiinipitoisemmissa tuotteissa *E. coli* kasvaa paremmin. TBX-agarilla 0,1 ml näytetilavuudesta tuli *E. coli* esille vaihtelevasti.

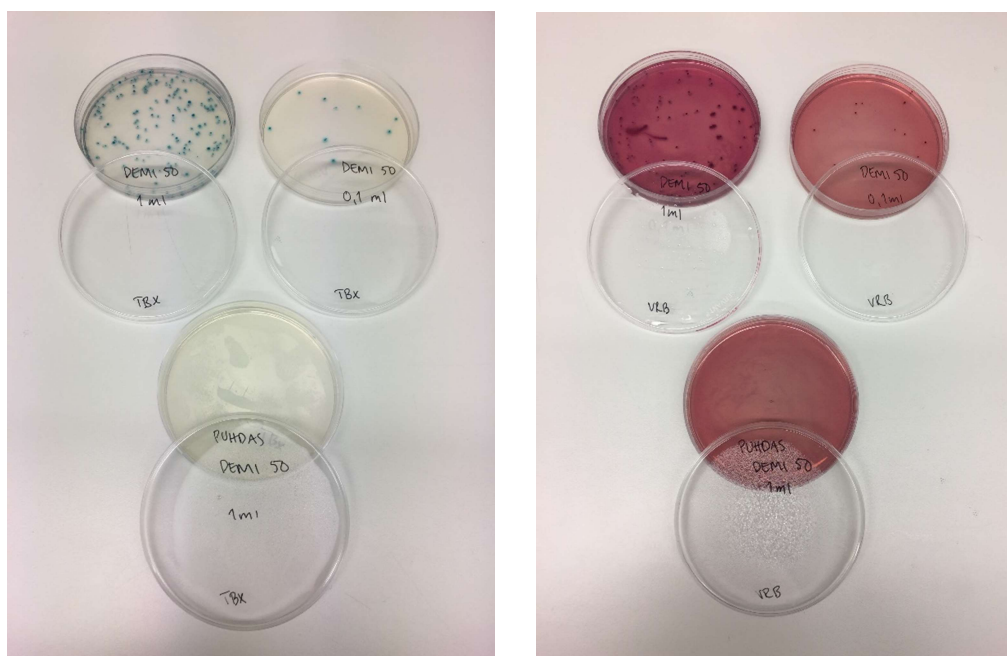


Kuvio 9. Pesäkemäärien eroja uuden ja vanhan alustan välillä, kun tulokset ovat ilmoitettu Log_{10} pmy/ml. Tuotteet vasemmalta oikealle; puhdas, kontaminoitu ja kontaminoitu, joka on laimennettu 1:10.

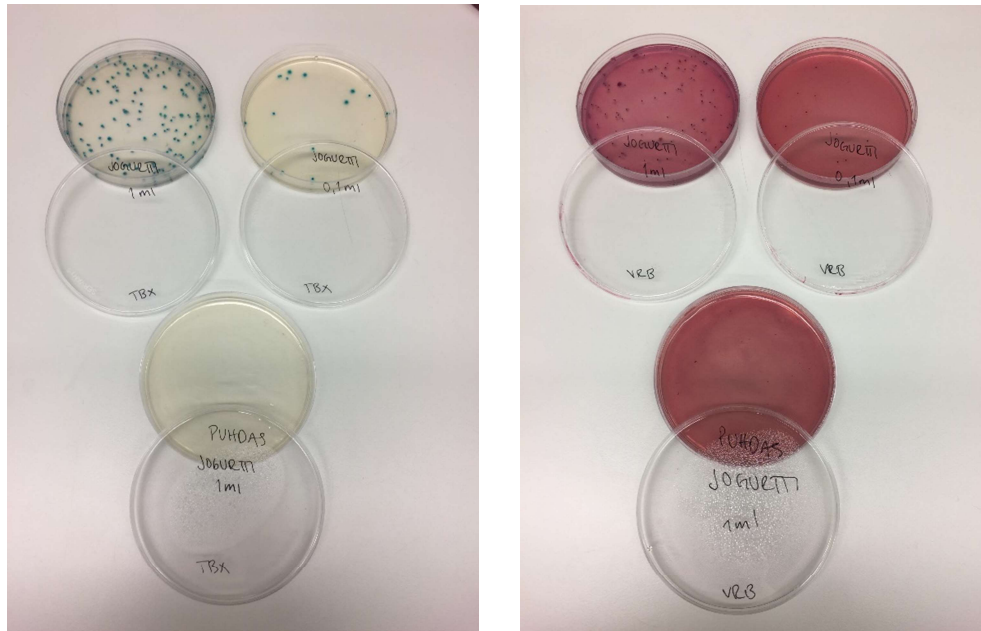
Voi-näyte oli alustoilla hieman sameaa ja teki agariin tekstuuria, mutta pesäkkeet näkyivät hyvin (kuva 6). Proteiinijauheesta jäi hieman sameutta, mutta pesäkkeet erottuivat hyvin (kuva 7). Jogurtinäytteessä TBX-agarilta erottuivat siniset pesäkkeet eikä lukuvaikeutta ollut (kuva 8), kun taas VRB-agarilla jogurtin pienet hillosta peräisin olevat partikkelit taas häiritsivät hieman lukua, koska ne olivat väriltään pieniä pesäkkeitä muistuttavia pisteitä (kuva 10). Vanukasnäytteessä kummassakin agarissa pesäkkeet näkyivät hyvin, eritoten TBX-agarilla, vaikka joukossa näkyi kaakaojauhetta, joka samensi agaria ja värjäsi sitä hieman rusehtavaksi (kuva 9).



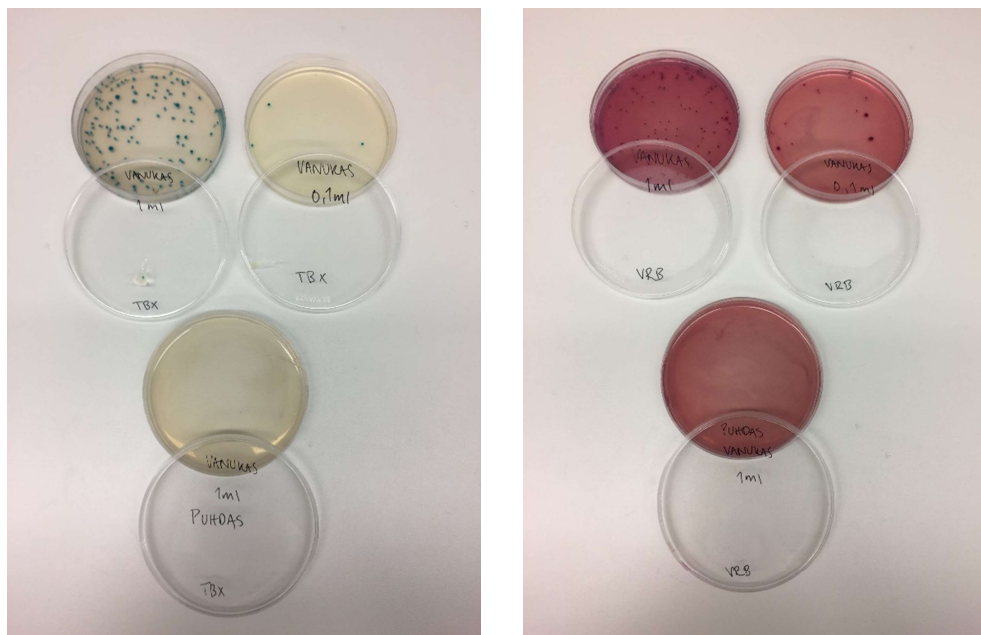
Kuva 6. Viljely kontaminoidusta voinäytteestä. Alustat vasemmalta oikealle: TBX, VRB. Ylhäällä kuvassa saastutetut tuotenäytteet vasemmalla 1 ml ja oikealla 0,1 ml. Alhaalla luonnollinen näyte 1 ml.



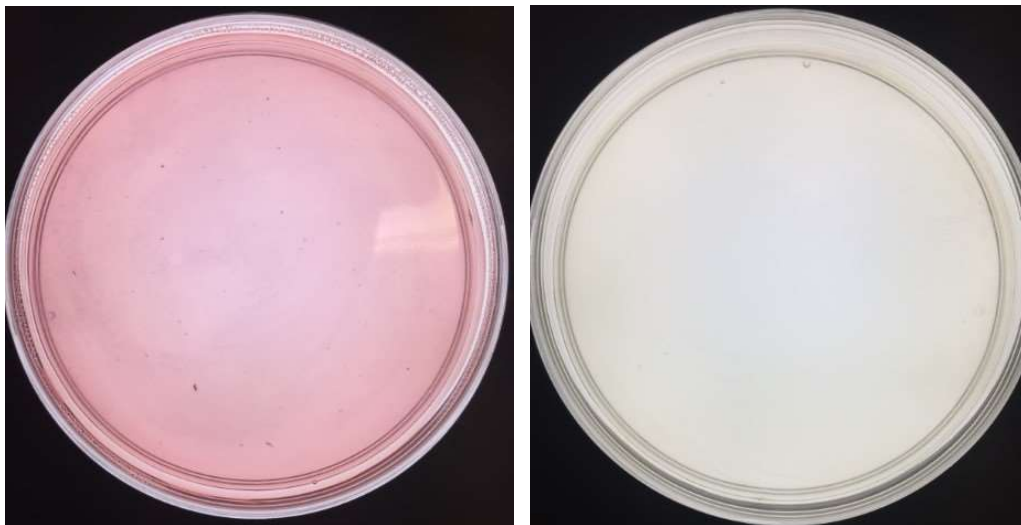
Kuva 7. Viljely kontaminoidusta proteiinijauhenäytteestä (demi 50). Alustat vasemmalta oikealle: TBX, VRB. Ylhäällä kuvassa saastutetut tuotenäytteet vasemmalla 1 ml ja oikealla 0,1 ml. Alhaalla luonnollinen näyte 1 ml.



Kuva 8. Viljely kontaminoidusta jogurtinäytteestä. Alustat vasemmalta oikealle: TBX, VRB. Ylhäällä kuvassa saastutetut tuotenäytteet vasemmalla 1 ml ja oikealla 0,1 ml. Alhaalla luonnollinen näyte 1 ml.



Kuva 9. Viljely kontaminoidusta vanukasnäytteestä. Alustat vasemmalta oikealle: TBX, VRB. Ylhäällä kuvassa saastutetut tuotenäytteet vasemmalla 1 ml ja oikealla 0,1 ml. Alhaalla luonnollinen näyte 1 ml.



Kuva 10. Kontaminoimaton jogurttinäyte kummallakin alustalla. Vasemmalla VRB-, oikealla TBX-alusta.

7.4 Saastunut maito

Tässä työssä ensimmäinen laimennossarja tehtiin *E. coli* -kannalla WDCM 00012, joka kuitenkin epäonnistui, joten uusi laimennossarja uusintaa varten tehtiin WDCM 00202-kannalla. Molemmat ovat kasvualustan testausta koskevassa standardissa hyväksytyjä kantoja TBX-agarin testaukseen. Tulokset pesäkemäärinä löytyvät liitteestä 2, taulukosta (15-16). Ennen kontaminointia laskettiin, paljonko pesäkkeitä on 100 ml:n laimennosliuoksessa, kun pesäkemäärä tiedetään A-näytteen osalta (liite 2).

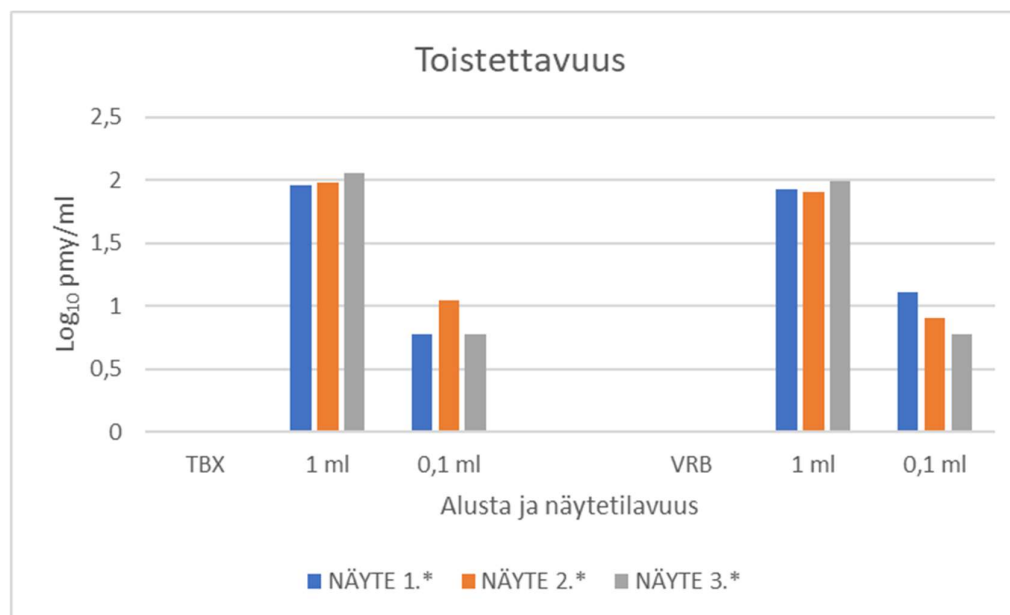
Toistettavuustestaus suoritettiin samassa tilassa omasta toimestani peräkkäin samoilla välineillä samasta näytteestä. Tuloksista laskettiin keskiarvo ja keskihajonta, joka saa sitä suuremman arvon mitä enemmän vaihtelua on jakauman satunnaisuuttujen arvoissa. Kahdella kerrottua keskihajontalukua Valiolla on käytetty, kun on ilmoitettu, että saadut tulokset ovat sallituissa rajoissa (taulukko 9)

Taulukko 9. Toistettavuustulokset.

	NÄYTE 1.*	NÄYTE 2.*	NÄYTE 3.*	Keski- arvo*	Keski- hajonta (S)*	2(S)*
TBX						
1 ml	1,96	1,98	2,05	2,00	1,05	2,09
0,1 ml	0,78	1,04	0,78	0,88	0,46	0,92
VRB						
1 ml	1,93	1,91	1,99	1,82	0,95	1,90
0,1 ml	1,11	0,90	0,78	0,95	0,56	1,11

*Log₁₀ pmy/ml

Toistettavuudessa toistuu sama ilmiö kuin muissa testauksissa, 1 ml näytetilavuudella tulee tasaisempaa tulosta kuin 0,1 ml näytetilavuudella (kuvio 10).



Kuvio 10. Yhden henkilön toistettavuustulokset.

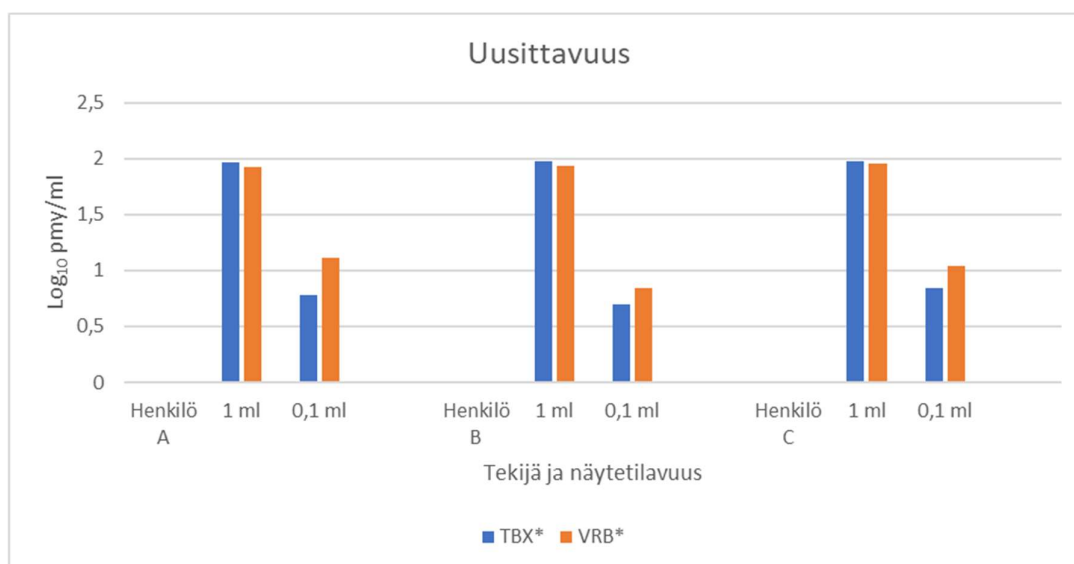
Uusittavuus suoritettiin samalla kertaa kuin toistettavuus. Uusittavuuden testauksessa kaksi muuta henkilöä lisäksi pipetoi saman näytteen omille maljoilleen. Tulokset ovat linjassa henkilöiden kesken ja TBX- sekä VRB-agareiden välillä (taulukko 10). Keskiarvon erosta voi nopeasti nähdä tuloksen heittelyn verrattuna keskiarvoon.

Taulukko 10. Uusittavuustulokset.

Määrä (ml)	TBX*	Ero keski- arvosta*	VRB*	Ero keski- arvosta*
Henkilö A				
1 ml	1,96	0,02	1,93	0,01
0,1 ml	0,78	-0,01	1,11	-0,11
Henkilö B				
1 ml	1,98	0,00	1,93	0,01
0,1 ml	0,70	0,07	0,85	0,15
Henkilö C				
1 ml	1,98	0,00	1,95	-0,01
0,1 ml	0,85	-0,08	1,04	-0,04
Keskiarvo*				
1 ml	1,98		1,94	
0,1 ml	0,77		1,00	
Keskihajonta (S)*				
1 ml	0,988		0,013	
0,1 ml	0,073		1,000	

*Log₁₀ pmy/ml

Kuviossa 11 näkee tulosten yhtäläisyyden. Kummatkin agarit antavat hyvin tasaisen tuloksen eri henkilöiden analysoidessa.



Kuvio 11. Kolmen eri henkilön tulokset uusittavuuden testauksessa.

7.5 SLV-interkalibrointinäytteiden tulokset

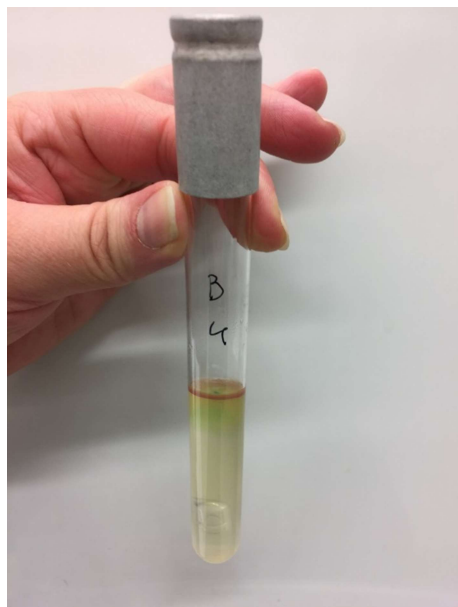
Interkalibrointitestit tehtiin lokakuun 2019 -kierroksen kylmäkuivatuista mikrobiseokista. Pesäkemääristä (liite 3, taulukko 17) laskettiin painotettu keskiarvo (liite 4) kaavalla ja tuloksia verrattiin SLV:n Raportoimiin tuloksiin sekä Valion tuloksiin kyseisellä kierroksella. Kaikki tulokset olisivat läpäisseet interkalibroinnin.

VRB-agarin tuloksista piti tehdä vielä varmistustestit. Kaikista poimituista pesäkkeistä tuli laktoosintuottokokeessa positiivinen tulos, koska Durham-putket olivat kaasun täyttämiä (kuva 11).



Kuva 11. Laktoosin käyttökoe. Durham putkien yläosa on kaasun täyttämä, kun tulos on positiivinen (putken pohjalla Durham-putki, jossa ilmakupla).

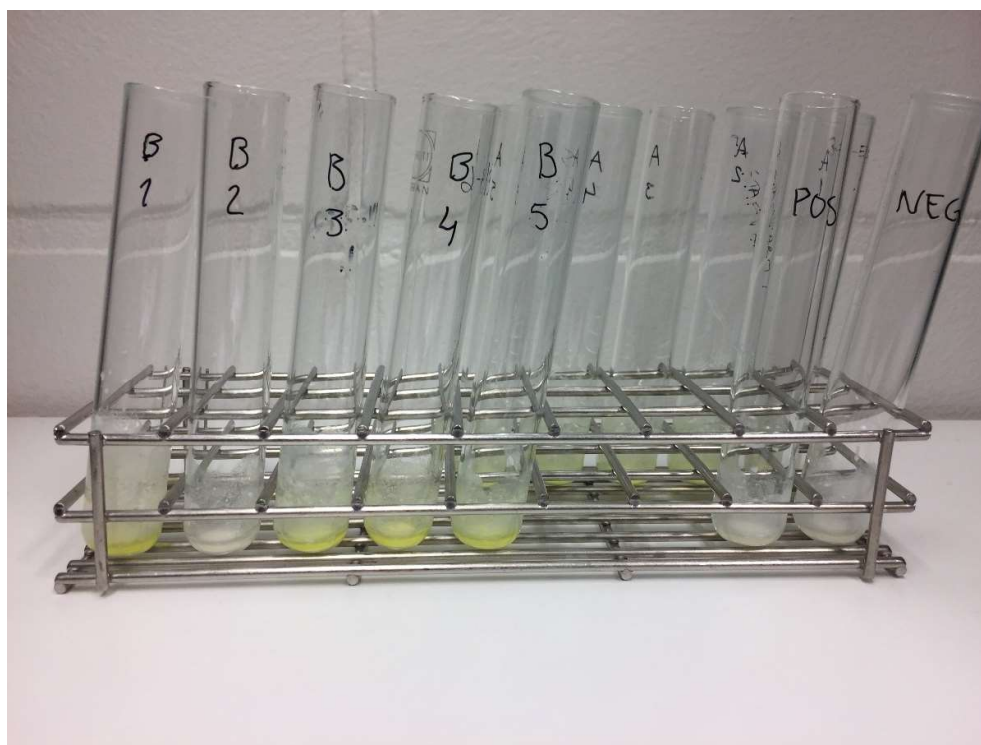
Varmistustestejä jatkettiin indolikokeella, joissa kaikissa muodostui punainen rinki nesteen pinnalle, jolloin tulos on positiivinen (kuva 12).



Kuva 12. Positiivinen tulos näkyy indolikokeessa punaisena renkaana nesteen pinnalla.

β -glukuronidaasin tuottokokeessa keltainen väri on positiivinen ja väritön negatiivinen tulos. Yksi osoittautui negatiiviseksi (kuva 13). Kuvassa kontrollimaljan väri näyttää negatiiviselta, mutta kellersi selvästi negatiiviseen verrattuna, ei kuitenkaan niin paljon, kuin näytteiden positiiviset. Tämä saattaa johtua siitä, ettei bakteeri ole irronnut silmukasta kunnolla siirrettäessä. Bakteeria oli hankala saada irtoamaan. Olimme usean henkilön kanssa samaa mieltä siitä, että näyte kellersi sen verran, että se katsotaan positiiviseksi.

Koska yksi oli SLV:n B-näytteistä negatiivinen laskettiin, sijoittuuko tulos ala- ja ylärajan väliin. Painotettu keskiarvo jaetaan näytemäärällä (5 kpl), jolloin saadaan yhden näytteen arvo. Neljä viidesosaa jaetaan tällä yhden näytteen arvolla, jolloin saadaan näytteistä painotettu keskiarvo, jossa on huomioitu yksi negatiivinen tulos (liite 4).



Kuva 13. β -glukuronidaasikoe, jossa yksi osoittautui negatiiviseksi.

Taulukossa 11 oma tulos ja taulukossa 12 Valion tulos. Lisäksi molemmissa SLV:n tulos ja keskihajonta, SLV:n asettamat ala- ja ylärajat, sekä z-arvo. Z-arvo on laskettu liitteessä 4 olevan kaavan mukaan. Z-arvon tulee olla välillä $-2 \dots 2$. Mitä lähempänä nollaa tulos on, sitä luotettavampi se on.

Taulukko 11. Omat interkalibrointinäytteiden tulokset.

Näyte	Oma tulos TBX*	Oma tulos VRB*	SLV tulos*	SLV keski-hajonta*	Hyväksytty min.*	Hyväksytty max.*	z-arvo TBX*	z-arvo VRB*
Näyte A	3,98	4,04	4,15	0,16	3,62	4,47	-1,06	-0,69
Näyte B	4,02	3,96	4,08	0,18	3,62	4,6	-0,30	-0,60
Näyte C	0	0	0	0	0	0	0	0

*Log₁₀ pmy/ml

Taulukko 12. Valion interkalibrointinäytteiden tulokset. Näytteet tehty VRB-agarille.

Näyte	Valion tulos*	SLV tulos*	Keski-hajonta*	min.*	max.*	z-arvo
Näyte A	4,18	4,15	0,16	3,62	4,47	0,19
Näyte B	4,15	4,08	0,18	3,62	4,6	0,38
Näyte C	< 1	0	0	0	0	0

*Log₁₀ pmy/ml

7.6 Kasvualustan tuottavuus-, selektiivisyys- ja spesifisyystestien tulokset

Kasvualustan tuottavuus, selektiivisyys ja spesifisyys testattiin noudattamalla kasvualustan toimivuudentestaus-standardia SFS-EN ISO 11133:2014, sekä Valion menetelmäohjetta, joka perustui kyseiseen standardiin. Tuottavuustestaus tehtiin käyttäen kvantitatiivista menetelmää, koska näytteet analysoidaan normaalisti maljavalumenetelmällä ja näin saadaan tarkempi tulos tuottavuudesta. Kasvualusta on

myös käytössä pesäkemäärän määrittämiseen, jolloin em. standardi (SFS-EN ISO 11133:2014, 28) velvoittaa käyttämään kvantitatiivista menetelmää, jolloin saadaan kasvualustan vaihtopäätöstä tukevaa lisätietoa. Selektiivisyys- ja spesifisyystestaus suoritettiin kvalitatiivisella menetelmällä arvioiden kohdebakteerin kasvun laadullisia kriteerejä. Vertailualustana käytettiin TSA-agaria.

7.6.1 Tuottavuustestien tulokset

Tuottavuuden testauksessa käytettiin ampulliin pakastettua *E. coli* -kanta (WDCM 00012) ja laimennossarjan laimennosta -7 (WDCM 00202). Pitoisuus kummassakin 100 pmy/ml. Näiden tulosten ero oli huomattava (taulukko 13). Tähän syynä oli, että pakasteesta otettavat ampullit eivät toimineet odotuksien mukaan. Kuvassa 14 lasketut pesäkkeet näkyvät mustina pisteinä. Tuottavuus laskettiin liitteessä 5 olevalla kaavalla.

Tuottavuussuhteen tulee olla $\geq 0,50$ verrattaessa valikoivaa kasvualustaa valikoimattomaan vertailualustaan. Jos tuottavuussuhde on yli 1,4, syy tulee selvittää. Tulokset voidaan hyväksyä, jos rinnakkainen näyte antaa positiivisen tuloksen ja jokainen yksittäinen tulos on analyysin sallimissa rajoissa (korkeintaan 150 pesäkettä). Tuottavuussuhde oli pakasteampullien kohdalla liian pieni (*E. coli* WDCM 00012). (SFS-EN ISO 11133:2014, 32.)

Taulukko 13. Kasvualustan tuottavuustestauksen tulokset.

Kanta *E. coli* 00012 - ampulli

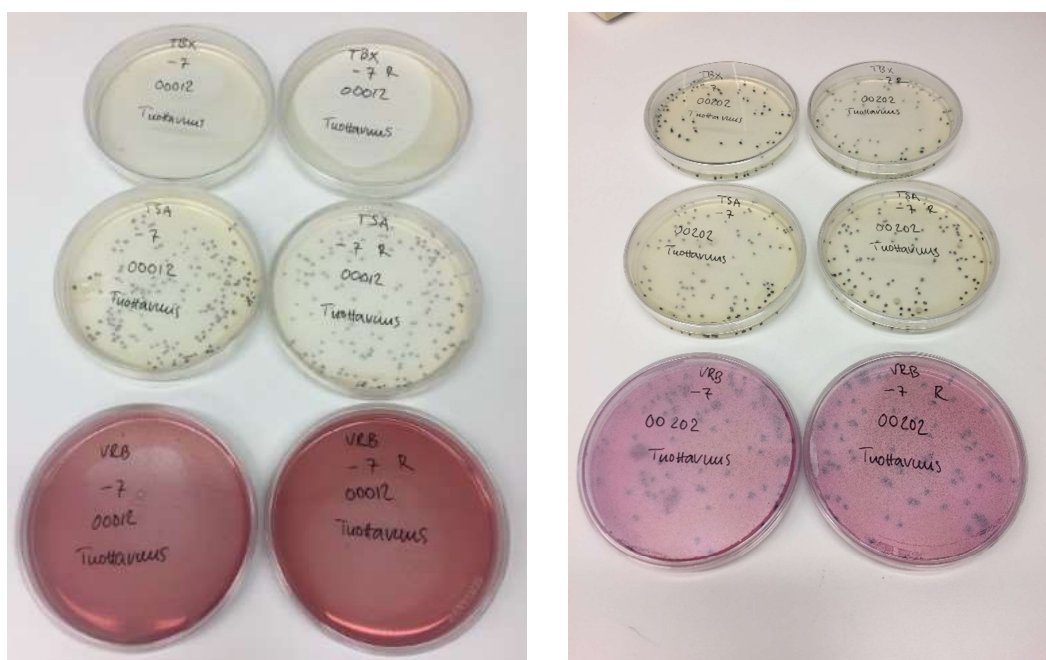
Laimennos	TBX*	TSA*	VRB*	Tuottavuus- suhde TBX	Tuottavuus- suhde VRB
-7	1	169	2	0,01	0,01
R -7	1	163	0	0,01	0

*Pesäkemäärät 100 pmy/ml

**Kanta *E. coli* 00202 –
laimennossarja -7**

Laimennos	TBX*	TSA*	VRB*	Tuottavuus- suhde TBX	Tuottavuus- suhde VRB
-7	66	101	87	0,65	0,86
R -7	66	108	74	0,61	0,69

*Pesäkemäärät 100 pmy/ml

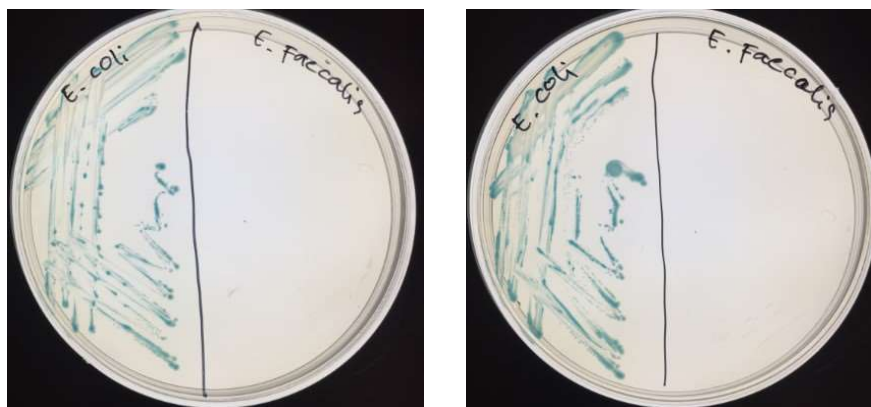


Kuva 14. Tuottavuustestaus maljat laskettu. Vasemmalla *E. coli* -kanta WDCM 00012, oikealla WDCM 00202.

7.6.2 Selektiivisyystestin tulokset

Kvalitatiivisessa menetelmässä tulos arvioidaan kasvun mukaan. Ei lainkaan kasvua = 0, heikkoa kasvua = 1 ja hyvä kasvu = 2. Kohdemikrobien tulee saada kasvusta tulokseksi 2. Taustamikrobien kasvun on estyttävä kokonaan tai osittain.

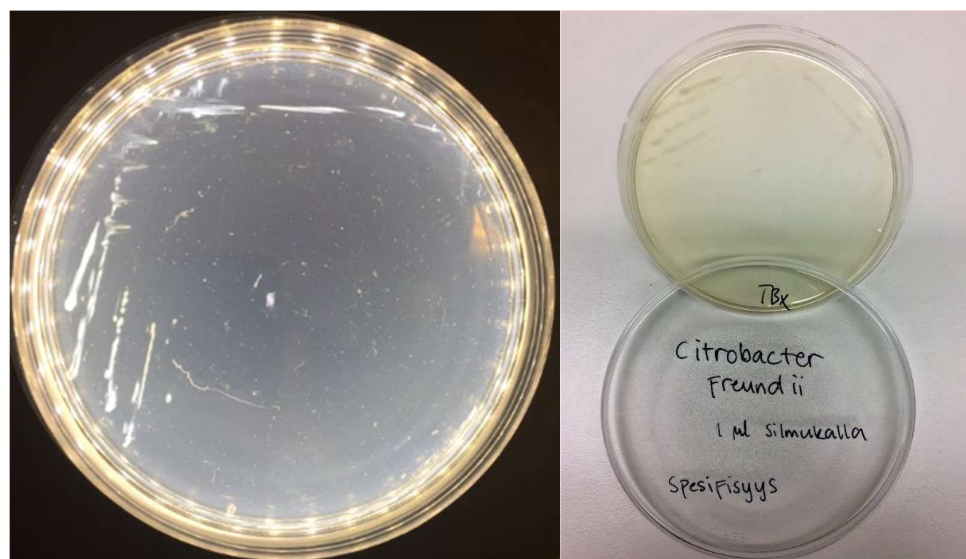
Kummatkin käytettävät *E. coli* -kannat (WDCM 00012 ja 00202) saivat kasvusta tulokseksi 2. *E. faecalis* sai kasvusta tulokseksi 0 (kuva 15). (SFS-EN ISO 11133:2014, 33.)



Kuva 15. Vasemmalla *E. coli*-kanta WDCM 00012 ja oikealla WDCM 00202. *E. faecalis* WDCM 00009 kummassakin.

7.6.3 Spesifisyystestauksen tulokset

Spesifisyyden testauksessa käytettiin myös kvalitatiivista menetelmää. *C. freundii* -bakteerin (WDCM 00006) kasvun tuli olla epätyypillistä valkoisesta vihreään tai vaaleanruskeaan vivahtavia pesäkkeitä (SFS-EN ISO 11133:2014, 55). Tulokseksi saatiin epätyypillistä valkoista kasvua bakteerin levityksen alkukohdassa (kuva 16). Tulos voidaan hyväksyä, koska kasvu oli valkoista ja epätyypillistä, eikä kasvanut juurikaan.



Kuva 16. *C. freundii* (WDCM 00006) levitettynä koko alustalle. Epätyypillistä kasvua vain vähän levityksen lähtökohdassa.

8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Verifioitu ISO -standardi-menetelmällä on etunsa, vaikkakin tällä hetkellä käytössä oleva NMKL-menetelmä on hyvä ja toimiva. Tavoitteena ei ollut saada parempia tuloksia TBX-alustalla vaan todentaa, että uudelta alustalta bakteeri löytyy yhtä hyvin kuin vertailualusta VRB:ltä. Johtopäätös verifiointin jälkeen on, että laatu säilyy, vaikka menetelmä vaihdetaan.

Menetelmänä ISO -standardi on yksinkertaisempi, koska se ei erikseen tarvitse varmistustestejä. Alustalla ei muut koliformiset bakteerit kasva ja β -glukuronidaasiposiitivisuus tulee esiin kromoforin avulla. TBX-agar on kirkasta ja vaaleaa, josta pesäkkeet sekä häiritsevät tekijät on helppo huomata ja erottaa toisistaan. Kromofori värjää *E. coli* -pesäkkeet sinisiksi. VRB:n eduiksi lasken sen toimivuuden pienemmissä laimennoksissa paremmin. TBX-agar säilyy kaksi kuukautta valmistuksesta Valion T&K:ssa tehdyn säilyvyystestauksen mukaan, jolloin se on nopeasti käyttöön otettavissa. VRB-agar ei säily kuin kolme tuntia valmistuksesta. Jokainen erä täytyy keittää juuri ennen käyttöä ja se vie jonkin verran aikaa. Testauksia tehdessäni huomasin TBX-agarin vaivattomuuden juuri valmistamisessa. Jos sulattamani erä oli lopussa, sitä sai vaivattomasti ja nopeasti kuumennettua lisää. TBX-agar ei myöskään tarvitse valumenetelmässä pinnalleen peittokerrosta, kuten VRB-agar ja TBX-maljat ovatkin heti valmiita inkubointiin valun jälkeen, kun agar on hyytynyt. Näin ne saadaan nopeasti valmiiksi ja pienissä tiloissa siirrettyä suoraan lämpökaappiin. Koska *E. coli* -bakteeri testataan erikseen asiakkaan toiveesta tai tarpeesta, tämä ISO-standardi-menetelmä on toimiva, varma, vaivaton ja nopea.

Työssäni oli myös epäonnistumisia, jotka liittyivät lähinnä bakteerin kasvuun ja elinkelpoisena pysymiseen. Ensimmäinen kontaminoitu maitotesti saastuneella maidolla ei antanut tuloksia. Olin käyttänyt laimennossarjasta liian laimeaa laimennosta ja bakteerin kasvu oli jatkotutkimuksissa heikohkoa. Myös eri kannat ovat tuottavuudeltaan erilaisia. Myöhemmin valmistin uuden laimennossarjan eri kannasta, jota käytettiin maidon saastuttamiseen, sekä tuottavuustestaukseen. Myös syväjäähäpakkauksessa säilytettävät valmiit kantalaimennosta sisältävät ampullit, joissa glyseroli suojaa bakteerisoluja pakastukselta, eivät toimineet toivotulla tavalla. Tein tuottavuuskokeen myös uusintana käyttäen pakasteampulleja, mutta tulokset olivat niin

heikot, että päädyin käyttämään alkuperäistä testausta, jossa toisesta bakteerista käytettiin laimennossarjaa ja toisesta pakasteampullia. Tuottavuustestauksen tuloksista näkee eron. Jatkoselvitystarvetta näen pakasteampullien toimivuuden suhteen.

Saastutetuista tuotenäytteistä oli aluksi suunnitelmissa vain maitonäyte, mutta sain toteuttaa toiveeni, saastutin tuotenäytteitä, joita analysoin. SLV:n näyte oli hyvä saastutukseen, koska se sisälsi muitakin bakteereja kuin vain *E. coli* -bakteeria. Mielestäni tulokset antavat hyvää tietoa TBX:n toimivuudesta.

LÄHTEET

A. 15.11.2005. Komission asetus (EY) N:o 2073/2005 elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista.

About NMKL. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. NMKL-NordVal International. [Viitattu 25.4.2020]. Saatavana: <https://www.nmkl.org/index.php/en/about-nmkl>

About us, ISO. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Geneva: International Organization for Standardization. [Viitattu 25.4.2020]. Saatavana: <https://www.iso.org/about-us.html>

Adams, R. M., Moss, M. O. & McClure, P. J. 2016. Food Microbiology 4th Edition. [Verkkokirja]. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. [Viitattu 29.4.2020]. Saatavana Knovel-verkkopalvelusta. Vaatii käyttöoikeuden.

Alhroos, T. 2019a. 11798 Työ ESCHERICHIA COLI. Valio menetelmäohje 22.8.2019. Julkaisematon.

Alhroos, T. 2019b. 17208 Työ ESCHERICHIA COLI, ISO-menetelmä. Valio menetelmäohje 22.8.2019. Julkaisematon.

Barros-Velázquez, J. 2016. Antimicrobial Food Packaging. [Verkkokirja]. Lontoo: Elsevier. [Viitattu 9.5.2020]. Saatavana Knovel-verkkopalvelusta. Vaatii käyttöoikeuden.

BD. 2003. BDTM Tryptic Soy Agar. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2.5.2020]. Saatavana: <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/BA/BA-256665.pdf>

Biolife. 2004. VIOLET RED BILE AGAR: Ready to use flasks. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2.5.2020]. Saatavana: <http://www.biolifeit.com/public/cartellina-allegati-schede-certificazioni/schede-tecniche-inglese/TS-5121852.pdf>

Biolife. 2011. TRYPTONE BILE X-GLUC (TBX) agar: Powdered and ready to use chromogenic medium for the detection of β -glucuronidase positive E. coli in foodstuff. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2.5.2020]. Saatavana: <http://www.biolifeit.com/public/cartellina-allegati-schede-certificazioni/schede-tecniche-inglese/TS-492156.pdf>

Björkroth, J. 2007. Mikrobin kasvuun elintarvikkeissa vaikuttavat tekijät. Teoksessa: Korkeala, H (toim.). Elintarvikehygieniä: ympäristöhygieniä, elintarvikkeiden ympäristötoksikologia. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit OY.

- Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W. & Baird, R.M. 2012. Handbook of Culture Media for Food Microbiology 3rd Edition. [Verkkokirja]. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. [Viitattu 2.5.2020]. Saatavana Knovel-verkkopalvelusta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Ehder, T. 2006. Mikrobiologian laboratorion elatusaineiden sisäinen laadunvarmistus. [Verkkójulkaisu]. Espoo: Mittatekniikan keskus. [Viitattu 12.5.2020]. Saatavana: <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2006-J6.pdf>
- General information - description of the schemes. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Uppsala: Livsmedelsverket (Swedish Food Agency). [Viitattu 15.5.2020]. Saatavana: <https://www2.slv.se/Absint/Home/General>
- Grumezescu, A. M. & Holban, A. M. 2018. Food Safety and Preservation: Modern Biological Approaches to Improving Consumer Health. [Verkkokirja]. Lontoo: Elsevier. [Viitattu 1.5.2020]. Saatavana Knovel-verkkopalvelusta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Gunell, M., Hakanen, A., Aittoniemi, J., Kauppila, J., Rantakokko-Jalava, K., Rissanen, A-M., Saha, K., Vaara, M., Vuonto, R., Huovinen, P. & Nissinen, A. 2012. Mikrobilääkeresistenssi Suomessa: Fineres 1997-2010. [Verkkójulkaisu]. Tampere: Fire ja Terveysten- ja hyvinvoinnin laitos. [Viitattu 18.8.2020] Saatavana: http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/90830/URN_ISBN_978-952-245-767-7.pdf?sequence
- Hägg, M (toim.). 2016. Validoinnin suunnittelun opas. [Verkkójulkaisu]. Espoo: Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. [Viitattu 16.5.2020]. Saatavana: <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>
- International Food Information Service 2009. 2.painos. Dictionary of Food Science and Technology. [Verkkokirja]. Shinfield: International Food Information Service. Saatavana Knovel verkkopalvelusta. Vaatii käyttöoikeuden.
- ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feed stuffs - Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive Escherichia coli - Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide. International standard.
- Matthews, K.R., Kniel, K.E. & Montville, T.J. 2017. 4th Edition Food Microbiology. [Verkkokirja]. Washington: ASM Press. [Viitattu 10.5.2020]. Saatavana Knovel-verkkopalvelusta. Vaatii käyttöoikeuden.
- National reference laboratory - NRL. 24.3.2020. [Verkkosivu]. Uppsala: Livsmedelsverket (Swedish Food Agency) [Viitattu 16.5.2020]. Saatavana: <https://www.livsmedelsverket.se/en/production-control-and-trade/laboratory-activities-sampling-and-analysis2/national-reference-laboratory-nrl>

- NMKL 125, 4th. 2005. Thermotolerant coliform bacteria and E. coli. Enumeration in food and feed. [Verkkosivu]. NMKL-NordVal International. [Viitattu 25.4.2020]. Saatavana: <https://www.nmkl.org/index.php/en/publications/item/termotolerante-koliforme-bakterier-og-escherichia-coli-bestemmelse-i-naeringsmidler-og-for-nmkl-125-4-utg-2005>
- Pönkä, A. 1999. Elintarvikemyrkytykset ja elintarvikehygienia. Helsinki: Suomen ympäristöterveys Oy.
- Robinson, R. K. 2000. Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1-3. [Verkkokirja]. Elsevier. [Viitattu 26.4.2020]. Saatavana Knovel-verkkopalvelusta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Ruokavirasto. 1.7.2019a. Yleistä mikrobeista. [Verkkosivu]. [Viitattu 15.8.2020]. Saatavana: <https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/yleista-mikrobeista/>
- Ruokavirasto. 5.3.2019b. Elintarvikemikrobiologisten menetelmien ja sille vaihtoehtoisten menetelmien luettelo. [Verkkosivu]. [Viitattu 16.8.2020]. Saatavana: <https://www.ruokavirasto.fi/laboratoriopalvelut/vertailulaboratoriot/ohjeita-laboratorioille/suosittelvat-menetelmat/>
- Salkinoja-Salonen, M. 2002. Mikrobiologian perusteita. Teoksessa: Salkinoja-Salonen, M. (toim). Helsinki: Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos.
- Santos, G.A. 1990. A Manual for the Processing of Agar from Gracilaria. [Verkkójulkaisu]. [Viitattu 19.8.2020]. Saatavana: <http://www.fao.org/3/ag156e/AG156E00.htm>
- SFS-EN ISO 11133:2014. Elintarvike-, rehu- ja vesimikrobiologia. Kasvualustojen valmistus, tuotanto, säilytys ja toimivuuden testaus. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- Sojakka, K & Välimäki, M-L. 2011. Ammatillinen mikrobiologia. Tampere: Opetushallitus.
- Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos. 5.12.2019. VRE eli vankomysiiniresistentti enterokokki. [Verkkosivu]. [Viitattu 18.8.2020]. Saatavana: <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/vre-eli-vankomysiiniresistentti-enterokokki>
- Valio Campus. Ei päivystä. Työskentely mikrobiologian laboratoriossa. [Verkkosivu]. [Viitattu 2.5.2020]. Saatavana: Valion Intranet. Vaatii käyttöoikeuden.

VWR International. 2015. Tryptone bile x-glucuronide agar - TBX (ISO. [Verkköjulkaisu]. [Viitattu 2.5.2020]. Saatavana: https://fi.vwr.com/assetsvc/asset/fi_FI/id/16981614/contents

Wareing, P., Stuart, F. & Fernandes, R. 2010. Micro-facts: The Working Companion for Food Microbiologist 7th Edition. [Verkkokirja]. Surrey: Leatherhead Food International Ltd. [Viitattu 1.5.2020]. Saatavana Knovel-verkkopalvelusta. Vaatii käyttöoikeuden.

WDCM History. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms. [Viitattu 19.5.2020]. Saatavana: <http://www.wdcm.org/history.html>

WDCM Reference Strain Catalogue. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms. [Viitattu 19.5.2020]. Saatavana: <http://www.wdcm.org/databases.html>

Wirtanen, G. 1995. Biofilm formation and its elimination from food processing equipment: Dissertation. [Verkkosivu]. Espoo: VTT Technical Centre of Finland. [Viitattu 18.8.2020]. Saatavana: <https://cris.vtt.fi/en/publications/biofilm-formation-and-its-elimination-from-food-processing-equipm>

LIITTEET

Liite 1. Saastuneet tuotenäytteet

Liite 2. Saastunut maito

Liite 3. Interkalibrointinäytteet

Liite 4. Interkalibrointitulosten painotettu keskiarvo ja Z-arvo

Liite 5. Tuottavuussuhde

Liite 1. Saastuneet tuotenäytteet

Taulukko 14. Pesäkemäärät.

Näyte	määrä (ml)	TBX*	VRB*
voi	puhdas	0	0
voi	1	90	74
voi	0,1	4	10
demi 50	puhdas	0	0
demi 50	1	170	95
demi 50	0,1	9	11
jogurtti	puhdas	0	0
jogurtti	1	153	109
jogurtti	0,1	16	14
vanukas	puhdas	0	0
vanukas	1	139	98
vanukas	0,1	3	13

***pmy/ml**

Interkalibrointinäyte A:n mikrobipitoisuus tiedettiin ja laskettiin paljonko pesäkkeitä jää, kun näyte A laimennetaan 100 ml:aan laimennosliuosta.

$$\frac{15\,000\text{ pmy}}{100\text{ ml}} = 150\text{ pmy/ml}$$

Liite 2. Saastunut maito

Taulukko 15. Toistettavuustulokset pesäkemäärinä.

Määrä (ml)	Kontaminoitu näyte kerta 1.*	Kontaminoitu näyte kerta 2.*	Kontaminoitu näyte kerta 3.*	Keskiarvo	Keskihajonta (S)
TBX					
1 ml	92	96	113	100	11,2
0,1 ml	6	11	6	8	2,9
VRB					
1 ml	85	81	98	66	8,9
0,1 ml	13	8	6	9	3,6

***pmy/ml**

Toistettavuudessa pesäkkeitä jää laimennosliuokseen seuraavasti

$$\frac{10\,000 \text{ pmy}}{100 \text{ ml}} = 100 \text{ pmy/ml}$$

Taulukko 16. Uusittavuustulokset pesäkemäärinä.

Määrä (ml)	TBX*	VRB*
Henkilö 1		
1 ml	92	85
0,1 ml	6	13
Henkilö 2		
1 ml	96	86
0,1 ml	5	7
Henkilö 3		
1 ml	96	90
0,1 ml	7	11
Keskiarvo		
1 ml	94,67	87
0,1 ml	6	10,33
Keskihajonta (S)		
1 ml	2,309	2,646
0,1 ml	1,000	3,055

***pmy/ml**

Liite 3. Interkalibrointinäytteet

Taulukko 17. Interkalibrointinäytteiden pesäkemäärät pmy/ml.

NÄYTE		0	-1	-2	-3	-4	-5
TBX	A	> 150	> 150	90	9	2	0
TBX R	A	> 150	> 150	91	22	1	0
VRB	A	> 100	> 100	120	8	1	0
VRB R	A	> 100	> 100	113	18	2	0
TBX	B	> 150	> 150	109	7	2	0
TBX R	B	> 150	> 150	106	8	2	0
VRB	B	> 100	> 100	144	13	3	0
VRB R	B	> 100	> 100	88	4	3	0
TBX	C	0	0	0	0	0	0
TBX R	C	0	0	0	0	0	0
VRB	C	0	0	0	0	0	0
VRB R	C	0	0	0	0	0	0

Liite 4. Interkalibrointitulosten painotettu keskiarvo ja Z-arvo

Painotettu keskiarvo lasketaan kaavalla

$$\frac{\sum^c}{(1ml * n_1 + 0,1ml * n_2)} * d$$

missä

\sum^c = laskettujen pesäkkeiden summa

n_1 = väkevämmän laimennoksen maljojen lukumäärä

n_2 = laimeamman laimennoksen maljojen lukumäärä

d = väkevämmän laimennoksen laimennoskerroin

Tulokset ilmoitetaan kahden merkitsevän numeron tarkkuudella. Tulos voidaan ilmoittaa myös esim. $1,13 \times 10^4$ pmy/ml tai pmy/g.

Tuloksen ilmoittaminen voidaan tehdä myös käyttämällä Log_{10} .

Laskut**TBX A**

$$\frac{(90 + 91 + 9 + 22)}{(1 * 2 + 0,1 * 2)} * 10^2 = 9636,36 = 9,64 * 10^3$$

$$\text{Log}_{10} 9,64 * 10^3 = 3,98408$$

VRB A

$$\frac{(120 + 113 + 8 + 18)}{(1 * 2 + 0,1 * 2)} * 10^2 = 11000 = 1,1 * 10^4$$

$$\text{Log}_{10} 1,1 * 10^4 = 4,04139$$

TBX B

$$\frac{(109 + 106 + 7 + 8)}{(1 * 2 + 0,1 * 2)} * 10^2 = 10454,54 = 1,05 * 10^4$$

$$\text{Log}_{10} 1,05 * 10^4 = 4,02119$$

VRB B

$$\frac{(144 + 88 + 13 + 4)}{(1 * 2 + 0,1 * 2)} * 10^2 = 113181,18 = 1,13 * 10^4$$

$$\text{Log}_{10} 1,13 * 10^4 = 4,05$$

Koska β -glukuronidaasitestin 1/5 näytti negatiivista ja 4/5 positiivista, lasketaan vielä kaavalla painotettu keskiarvo seuraavasti

$$\frac{1,13 * 10^4}{5} * 4 = 9040 = \log_{10}(9040) = 3,96$$

Z-arvon laskeminen

$$Z = \frac{\text{oma tulos} - \text{verailutulos}}{\text{keskihajonta}}$$

TBX A

$$Z = \frac{3,98 - 4,15}{0,16} = 1,06$$

VRB A

$$Z = \frac{4,04 - 4,15}{0,16} = 0,69$$

TBX B

$$Z = \frac{4,02 - 4,08}{0,18} = 0,30$$

VRB B

$$Z = \frac{3,96 - 4,08}{0,18} = 0,60$$

Liite 5. Tuottavuussuhde

Tuottavuussuhde lasketaan seuraavasti

$$P_R = \frac{N_S}{N_O}$$

missä

N_S = on testattavalta kasvualustalta laskettujen pesäkkeiden kokonaislukumäärä

N_O = on määritellyltä vertailukasvualustalta laskettujen pesäkkeiden kokonaisu-
määrä

Laskut

Kanta *E. coli* (WDCM 00012)

TBX

$$-7 \quad P_R = \frac{1}{169} = 0,01$$

$$-7 R \quad P_R = \frac{1}{163} = 0,01$$

VRB

$$-7 \quad P_R = \frac{2}{169} = 0,01$$

$$-7R \quad P_R = \frac{0}{163} = 0$$

Kanta *E. coli* (WDCM 00202)**TBX**

$$-7 \quad P_R = \frac{66}{101} = 0,65$$

$$-7R \quad P_R = \frac{66}{108} = 0,61$$

VRB

$$-7 \quad P_R = \frac{87}{101} = 0,86$$

$$-7R \quad P_R = \frac{74}{108} = 0,69$$