



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Ilona Aittokoski

Legionella-suvun bakteerien määrittämenetelmän verifiointi talousvedestä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

31.10.2020

Tekijä(t) Otsikko	Ilona Aittokoski <i>Legionella</i> -suvun bakteerien määrittäminen talousvedestä
Sivumäärä Aika	24 sivua + 3 liitettä 31.10.2020
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalytiikka
Ohjaaja(t)	lehtori Jarmo Palm mikrobiologi Jaakko Pakarinen
<p>Opinnäytetyö tehtiin Vita Laboratoriot Oy:lle. Opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida menetelmä <i>Legionella</i>-suvun bakteerien määrittämiseen talousvedestä. Menetelmä perustui SFS-EN ISO 11731:2017 standardiin. Työssä oli tarkoituksena tutkia valitun menetelmän toimivuutta ja valmistaa sen perusteella työohje laboratoriolle. Tällä varaudutaan EU talousvesidirektiivin uudistumisen sisältämään vaatimukseen <i>Legionella</i>-tutkimusten suorittamisesta.</p> <p><i>Legionella</i> on ympäristöbakteeri, jota esiintyy luonnon vesissä sekä ihmisten rakentamissa vesijärjestelmissä, ja sitä löytyy myös maaperästä. <i>Legionella</i>-sukuun kuuluu yli 60 lajia, joista 26:n on todettu infektoivan ihmisiä. Näistä taudinaiheuttajista yleisin on <i>Legionella pneumophila</i>. <i>L. pneumophila</i> voi aiheuttaa ihmiselle legioonalaistaudin eli legionelloosin. Legioonalaistaudin oireet ovat keuhkokuumeen kaltaiset. <i>Legionellat</i> ovat pieniä gram-negatiivisia bakteereja. <i>Legionellalle</i> otollisin kasvulämpötila on 20–42 °C ja optimaalinen pH-arvo kasvuun on 6,8–7,0. <i>Legionella</i> löydettiin vuonna 1976 Yhdysvalloissa, kun se aiheutti siellä keuhkokuume-epidemian.</p> <p>Verifioitavan menetelmän toimivuutta testattiin käytännössä suorittamalla vertailevia kokeita, vertaillen talousvesinäytteitä, joihin oli lisätty <i>Legionella</i>-bakteeria ja talousvesinäytteitä ilman <i>Legionella</i>-bakteerin lisäystä. Näissä kokeissa käytettiin kylmäkuivattua <i>L. pneumophila</i> -bakteeria. Menetelmästä tutkittiin esimerkiksi sen spesifisyyttä, toistettavuutta ja mittausepävarmuutta. Opinnäytetyössä myös vertailtiin erilaisia suodatinkalvotyyppejä.</p> <p>Näistä parametreista saadut tulokset vastasivat menetelmästandardissa esitettyjä viitearvoja. Menetelmällä saatiin hyväksytty tulos vertailututkimuksessa. Näiden testien lisäksi suoritettiin menetelmästandardin mukaiset varmistustestit, joiden perusteella arvioitiin menetelmän herkkyys, spesifisyys ja selektiivisyys. Varmistustestien tulokset osoittivat menetelmän erittäin toimivaksi. Verifiointin tulokset osoittivat, että menetelmä täyttää suunnitellun käyttötarkoituksen eli talousveden testauksen.</p>	
Avainsanat	<i>Legionella</i> , <i>L. pneumophila</i> , kalvosuodatus, verifiointi

Author(s) Title	Ilona Aittokoski Verification of a Method to Detect <i>Legionella</i> Species from Drinking Water
Number of Pages Date	24 pages + 3 appendices 31 October 2020
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Jarmo Palm, Senior Lecturer Jaakko Pakarinen, Microbiologist
<p>This study was carried out for Vita Laboratoriot Oy. The aim was to verify a method to detect <i>Legionella</i>-bacteria from drinking water. This method is based on SFS-EN ISO 11731:2017. Purpose was to study the methods functionality and produce instructions for the laboratory. Vita Laboratoriot Oy is preparing for the new European Union drinking water directive. which concerns detecting the <i>Legionella</i>-bacteria from water.</p> <p><i>Legionella</i> is an environmental bacteria, which can appear in freshwater environments and in constructed water systems. It can also be found from soil. There are over 60 <i>Legionella</i> species and 26 of those can infect humans. The most common pathogen is <i>Legionella pneumophila</i>. <i>L. pneumophila</i> can cause Legionnaires' disease, also known as Legionellosis. The symptoms of Legionnaires' disease are similar to pneumonia. <i>Legionella</i> is a small, gram-negative bacteria. The optimal growth temperature is estimated among 20–42 °C. The pH optima for growth is 6.8–7.0. <i>Legionella</i> was discovered in 1976 after it caused a pneumonia outbreak in the United States of America.</p> <p>The method's functionality was tested by conducting comparative testing. In testing, drinking water with added <i>Legionella</i> bacteria and drinking water without adding <i>Legionella</i> bacteria were compared. In these tests lyophilized <i>L. pneumophila</i> bacteria was used. The method was tested for its repeatability, uncertainty in measurement and trueness. In the study, also filtration differences were compared.</p> <p>The results from the parameters matched the given result in the standard. Comparative testing gave an accepted result. In addition to these tests, extra testing for confirmation of identification was performed according to the standard. Method's sensitivity, specificity and selectivity were evaluated. The results indicated that the method is valid. The results from verification show that the method fulfills its purpose as a test for drinking water.</p>	
Keywords	<i>Legionella</i> , <i>L. pneumophila</i> , membrane filtration, verification

Sisällys

1	Johdanto	1
2	<i>Legionella</i> -suvun bakteerit	2
2.1	<i>Legionella pneumophila</i>	2
2.2	<i>Legionellan</i> löytyminen	3
2.3	<i>Legionella</i> -bakteerin patogeenisuus	3
2.4	Legioonalaistaudit Suomessa ja ulkomailla	4
2.5	Standardi <i>Legionellan</i> määrittämiseen, SFS-EN ISO 11731:2017	5
3	Mikrobiologisen menetelmän validointi ja verifiointi	5
3.1	Validointi	5
3.2	Verifiointi	6
3.3	Mikrobiologisiin menetelmiin liittyvä epävarmuus	6
3.4	Validointiin ja verifiointiin liittyvät suureet	6
3.4.1	Spesifisyys	7
3.4.2	Toistettavuus	7
3.4.3	Uusittavuus	7
3.4.4	Mittausepävarmuus	7
3.4.5	Oikeellisuus	8
4	Menetelmän käyttöönotto ja suoritus	8
4.1	Bakteerikannat	9
4.2	Menetelmässä käytetyt maljatyyppit	9
4.3	Näytteiden valmistaminen	10
4.4	Näytteiden happokäsittely	10
4.5	Suodatus ja inkubointi	10
4.6	Maljojen lukeminen	11
4.7	Alustavien tulosten varmistuksia	12
5	Tuloksia	13
5.1	Suodatinkalvojen vertailu	13
5.2	Näytteen käsittelyn vaikutus menetelmän herkkyYTEEN	14
5.3	Menetelmän oikeellisuus	15
5.4	Toistettavuus	16
5.5	Pesäkelaskennan epävarmuus	19

5.6	Kategoriset suoritusarvot	20
5.7	Mittausepävarmuus	21
6	Johtopäätökset	22
	Lähteet	23
	Liitteet	
	Liite 1. Verifiointisuunnitelma	
	Liite 2. Työohje	
	Liite 3. SFS-EN ISO 11731:2017, vaihtoehtoiset menetelmät	

Lyhenteet

BCYE	Buffered charcoal yeast agar
ISO	International Organization for Standardization, Kansainvälinen standardisoimisjärjestö
pmy	Pesäkettä muodostava yksikkö
SFS	Suomen Standardisoimisliitto

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Vita Laboratoriot Oy:lle. Vita Laboratoriot Oy on suomalainen perheyrittäjä, joka on 25 vuoden ajan tuottanut korkealaatuisia klinisiä laboratoriopalveluita kunnille, yrityksille ja sairaanhoitopiireille. Yritykseen kuuluu myös ympäristölaboratorio, jossa tutkitaan vesiä ja elintarvikkeita. [1.]

Opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida uusi menetelmä, jonka avulla pystytään määrittämään *Legionella*-bakteerit talousvedestä. Työ tehtiin standardia SFS-EN ISO 11731:2017 käyttäen. SFS-standardi kuvaa useita eri vaihtoehtoja *Legionellan* määrittämiseen, mutta työssä keskityttiin talousvesinäytteiden analysointiin. Opinnäytetyössä testattiin valittujen menetelmien toimivuutta sekä aloitettiin analyysin menetelmäohjeen laatiminen standardin pohjalta. [2.]

Työssä tutkittava bakteeri on *Legionella pneumophila*. *Legionella* on ympäristöbakteeri, jota esiintyy luonnon vesissä sekä rakennetuissa vesijärjestelmissä ja sitä löytyy myös maaperästä. *Legionella*-bakteerit lisääntyvät lämpötilan ollessa otollinen. Ihmisille niistä on vaaraa, jos ne pääsevät aerosoleina hengitysteitse keuhkoihin ja sieltä kudoksiin aiheuttamaan infektion. *Legionella*-bakteerin aiheuttama keuhkokuume tunnetaan paremmin nimellä legioonalaistauti eli legionelloosi. [2.] *Legionella*-tartunnat ovat olleet viime vuosina nousussa [3; 4].

Euroopan unionin uusi juomavesidirektiivi pyrkii turvaamaan talousveden laadun ja se sisältää *Legionellan* tutkimisen talousvedestä. *Legionella*-bakteerin valvonta on tullut osaksi juomavesidirektiiviä uusien suositusten ja tietojen takia. Uusi direktiivi astuu voimaan vuonna 2020, ja EU:n jäsenmailla on kaksi vuotta aikaa ottaa direktiivi osaksi lainsäädäntöä. [5.] Vita Laboratoriot on joutunut käyttämään alihankintalaboratoriota *Legionella*-bakteerin analysointiin. Näiden edellä mainittujen syiden takia analyysin verifiointi aloitettiin Vita Laboratoriot Oy:ssä.

2 *Legionella*-suvun bakteerit

Legionellat ovat pieniä gram-negatiivisia bakteereja, joilla on erittäin nirsot elintarpeet. *Legionellat* käyttävät ravintonaan proteiinia ennemmin kuin hiilihydraatteja, ja ne vaativat aerobisen kasvuympäristön. *Legionella*-bakteerit ovat sauvamuotoisia ja ne ovat 0,3–0,9 mikrometriä leveydeltään ja noin 1,3 mikrometriä pituudeltaan. *Legionellalle* otollisin kasvulämpötila on 20–42 °C ja optimaalisin pH-arvo kasvulle on 6,8–7,0. *Legionella* selviytyy kovissakin olosuhteissa. Veden lämpötilan laskiessa alle 20 °C *Legionella* pysyy elinvoimaisena, mutta horroksessa. [6; 7, s. 107–108; 8, s. 3–4.]

Legionella-bakteerit pystyvät elämään alkueläinten, kuten amebojen, sisällä. Tämä mahdollistaa *Legionellan* kasvun ja myös suojaa bakteeria [2; 8, s. 10]. *Legionella*-bakteeri lisääntyy lämpimissä ja kosteissa olosuhteissa; otollisia kasvupaikkoja ovat vesijärjestelmät, kompostit ja multa. Näissä kasvupaikoissa *Legionella*-pitoisuudet voivat kasvaa suuriksi ja tämä voi vaikuttaa esimerkiksi työturvallisuuteen. [6; 7, s.107–108.]

Legionella on ympäristöbakteeri, jota esiintyy maaperässä ja vesistöissä. Yleisimmin *Legionella*-bakteeria löytyy luonnon makeista vesistä ja ihmisen rakentamista vesijärjestelmistä, joissa lämpötila on otollinen *Legionella*-bakteerille. [5.] Tällaisista vesijärjestelmistä ovat esimerkkeinä muun muassa poreammeet, suihkulähteet ja vettä sisältävät jäähdytysjärjestelmät [9].

Helpoiten taudilta välttyy, kun huolehtii, että vesijärjestelmät puhdistetaan tietyin väliajoin. Hävittääkseen *Legionella pneumophila* vedestä voi käyttää esimerkiksi kemiallista puhdistusta, UV-säteilyä tai kloorausta. Mikään näistä menetelmistä ei kuitenkaan hävitä *Legionellaa* täysin vedestä. [8 s. 32–33; 10.]

2.1 *Legionella pneumophila*

Legionella-sukuun kuuluu ainakin 61 löydettyä lajia, ja uusia lajeja löydetään jatkuvasti. 26 lajin tiedetään tarttuvan ihmiseen ja niiden on todettu infektoivan ihmisiä [2; 11 s. 94]. Tauteja aiheuttavia *Legionella*-lajeja ovat muun muassa *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Legionella longbeachae*, *Legionella feelei* ja *Legionella anisa* [11, s.94.]

Legionella-sukuun kuuluva *Legionella pneumophila* aiheuttaa 70–90 % legioonalaistaudeista [2]. *Legionella pneumophila* on löydetty myös erittäin vaativista olosuhteista. Sitä on löydetty kylmistä vesistä, joiden lämpötila on ollut 0 °C ja myös happopitoisista sekä kuumista vesistöistä, joiden lämpötila on ollut yli 60 °C. Muihin gram-negatiivisiin bakteereihin verrattuna *L. pneumophila* kestää kuumuutta hyvin. [8, s. 6; 12 s.125.]

2.2 *Legionellan* löytyminen

Legionella löydettiin vuonna 1976, kun se aiheutti keuhkokuume-epidemian Philadelphiassa Yhdysvalloissa järjestetyssä kokouksessa [2; 4]. Kokoukseen osallistujilla todettiin keuhkokuumetta, joka myöhemmin nimettiin *Legionella*-bakteerin aiheuttamaksi legioonalaiskuumeeksi. Bakteeri pääsi leviämään ilmastointilaitteiden välityksellä hotellissa, jossa kokous järjestettiin. *Legionella*-bakteerin löytymisen jälkeen todettiin myös, että sama bakteeri oli aiheuttanut Pontiac-kuumetta Yhdysvaltojen Michiganissa vuonna 1968. [4.] Bakteerin myöhäinen löytyminen johtuu siitä, ettei sitä saada kasvamaan tavallisella bakteeriviljelyllä [13].

2.3 *Legionella*-bakteerin patogeenisuus

Legionella-bakteeri voi aiheuttaa infektion, jos se pääsee aerosoleina hengitysteitse keuhkoihin ja sieltä kudoksiin. *Legionellasta* ei voi saada infektiota juomalla *Legionella*-bakteeria sisältävää vettä, koska bakteerin pitää päästä suoraan keuhkoihin. Tautia ei voi myöskään saada eläimestä eikä tauti tartu ihmisestä toiseen. [12 s. 125; 13; 14, s.72–73]. Suomessa todetuissa tapauksissa tartuntalähteet ovat sisältäneet *Legionella*-bakteeria noin 10 000–10 000 000 pmy/l. Tartunnan voi saada myös pienemmästä *Legionella*-pitoisuudesta. Sairastumiseen vaikuttaa ihmisen ikä, yleisterveys sekä mahdolliset keuhkosairaudet. [15.]

Legionella voi aiheuttaa legioonalaistaudin eli legionelloosin. Legioonalaistaudin oireet ovat keuhkokuumeen kaltaiset. Oireina ovat muun muassa yskä, hengitysvaikeudet, kuume, lihaskivut ja päänsärky. Myös ripulia, sekavuutta ja pahoinvointia voi ilmetä. [6; 17.] Taudin oireet ilmenevät yleensä 2–5 päivän sisällä, pisimmillään parissa viikossa. Vain 5 % sairastuneista saa keuhkokuumeen. Miehet sairastuvat tautiin herkemmin kuin naiset, ja lapsilla tauti on harvinainen. Taudin rajuuteen ja vakavuuteen vaikuttavat

korkea ikä, krooniset keuhkosairaudet ja immuunipuutokset. Tupakointi ja diabetes vaikuttavat myös taudin vakavuuteen. [12 s. 125; 13.]

Legioonalaistautia hoidetaan antibiootein, siihen ei ole olemassa rokotetta. Kymmenes kaikista sairastuneista kuolee legionalaistaudin oireisiin ja joka neljäs sairastunut, joka tarvitsee sairaalahoitoa, kuolee legionalaistaudin aiheuttamiin tauteihin. Aiemmin sairastettu legionalaistauti ei suojaa uudelta tartunnalta. [13; 17.]

Legionella voi aiheuttaa myös Pontiac-kuumeen. Tämä on harvinaisempi kuin legionalaistauti, ja sen oireet alkavat nopeasti, noin muutamasta tunnista muutaman päivän sisällä. Pontiac-kuumeen oireina ovat korkea kuume ja lihaskivut sekä päänsäryt. Oireet ovat yleensä lievempiä kuin legionalaistaudissa, eikä kuume yleensä kehity keuhkokuumeeksi. Potilas selviää taudista yleensä ilman antibioottihoitoa. [13; 17.]

2.4 Legionalaistaudit Suomessa ja ulkomailla

Suomessa sairastetaan vuosittain noin 30 legionalaistautia. Näistä yli puolet on ulkomailta tuotuja. Suomessa sairastuneet ovat saaneet taudin muun muassa uimahallista, teollisuusvesistä tai kodin talousvesistä. Suomessa sairastetaan vuosittain noin 50 000 keuhkokuumetta, joten tähän verrattuna legionalaistautitapausten määrä on pieni. [13.] Legionalaistautia kuitenkin pidetään Suomessa alidiagnostoituna tautina [5].

Euroopassa sairastetaan vuosittain noin 6 500 legionalaistautia. Kaksi kolmasosaa näistä tartunnoista on paikallisia, 20 % hotelleista ja 10 % sairaaloista saatuja. Vuonna 2019 Suomessa todettiin 44 *Legionella*-bakteerin aiheuttamaa legionelloosia. Näistä tartunnoista 59 % oli saatu ulkomailta ja 41 % Suomesta. Kodin vesijärjestelmistä, kuten porealtaasta ja jäähdytysjärjestelmistä, oli sairastunut kahdeksan ihmistä ja työperäisiä sairastumisia oli kolme. Työperäisiä sairastumisia oli aiheuttanut kaivosteollisuuden vesijärjestelmä, laivan kylmä vesi ja jäähallin lämmin ja kylmä vesi. [3; 13.]

Esimerkiksi Yhdysvalloissa legionalaistaudit ovat lisääntyneet vuosittain. Sairastuneiden määrä on siellä noussut vuodesta 2000 lähtien. Vuonna 2000 sairastuneiden määrä oli 1 000 ja vuonna 2018 määrä oli 10 000. Tutkijat eivät ole varmoja, mistä vuosittain kasvava sairastuneiden määrä johtuu. Syynä tähän voivat olla esimerkiksi lisääntyneet testausmäärät. Myös ihmisten tietoisuus *Legionella*-bakteerin

aiheuttamista oireista sekä mahdollisista paikoista, joissa *Legionella*-bakteerille voi altistua, on kasvanut. *Legionella*-bakteerin lisääntyminen vesijärjestelmissä voi myös olla syynä kasvaviin tartuntamääriin. [4; 18 s. 23.]

2.5 Standardi *Legionellan* määrittämiseen, SFS-EN ISO 11731:2017

Suomen Standardisoimisliitto SFS on Suomessa standardisointijärjestelmän keskusjärjestö. SFS julkaisee satoja standardeja joka vuosi, ja osa näistä on maailmanlaajuisia tai eurooppalaisia standardeja. Kansainväliset standardit voidaan tarpeen mukaan kääntää suomeksi. Standardien käyttö, hyödyntäminen ja laadinta on avointa kaikille. Standardit on luotu helpottamaan viranomaisten ja kuluttajien elämää. Standardien sisältämällä yleisesti hyväksytyjen käsitteiden ja määritelmien avulla on pystytty nopeuttamaan ja helpottamaan esimerkiksi tutkimustyötä. [19.]

SFS-EN ISO 11731:2017: "Water quality. Enumeration of Legionella" on vahvistettu suomalaiseksi kansalliseksi standardiksi vuonna 2017 ja silloin se korvasi edeltävän standardin SFS-EN ISO 11731-2:en:2008. Standardi on englanninkielinen. [2.]

Standardissa SFS-EN ISO 11731:2017 on esitettyä menetelmän periaate ja erilaiset toimintatavat riippuen näytteestä. Standardissa on esitettyä myös kaikki tarvittavat välineet, kasvatusalustat ja reagenssit. Menetelmän toteutusosiossa on kuvattu kasvatusajat, lämpötilat ja tulosten tulkinta. Standardista löytyy verifiointiin liittyvät hyväksymisrajat.

3 Mikrobiologisen menetelmän validointi ja verifiointi

3.1 Validointi

Validoimalla menetelmä osoitetaan sen soveltuvuus ja luotettavuus. Validoinnissa laboratorio tuottaa vertailuarvoja, joilla mahdollisesti pystytään osoittamaan menetelmän epävarmuustekijät. Tällaisia vertailuarvoja mikrobiologisessa validoinnissa on esimerkiksi suhteellinen oikeellisuus, toistettavuus, uusittavuus, mittausepävarmuus, spesifisyys ja herkkyys. [20 s. 1–3.]

Täydellinen validointi on suoritettava aina kun laboratorio ottaa käyttöön uuden itse kehittämänsä menetelmän. Menetelmä voidaan ottaa käyttöön laboratoriossa vasta, kun

validoinnin tulokset on hyväksytty. Tällainen laaja validointi vaatii useiden laboratorioden välisiä tutkimuksia. Jos kyseessä on esimerkiksi standardimenetelmän käyttöönotto, laboratorio voi suorittaa suppeamman validoinnin, jossa tarkoituksena on osoittaa menetelmän hallitseminen. Laboratoriot, niiden asiakkaat tai viranomaiset voivat määrittää validoinnin tavoitteet. Edellä mainitut voivat määrätä, kuinka tarkkoja tulosten pitää olla. [20; 21.]

Validointiin kuuluu kaikki tutkittavan testauksen osa-alueet, näytteenotosta raportointiin sekä tulosten tulkinta. Validoitua menetelmää tulee seurata käyttöönoton jälkeen, esimerkiksi laadunvarmistustoimilla. [20; 21.]

3.2 Verifiointi

Verifiointi on validointia suppeampi menettelytapa. Verifiointi tehdään, kun laboratoriolle uusi, mutta jo muualla käytössä oleva validoitu menetelmä otetaan käyttöön. Tutkimuksin ja dokumentein laboratorio osoittaa hallitsevansa käyttöönotettavan menetelmän. Verifiointi tulee suorittaa myös silloin, jos laboratoriossa jo validoituun menetelmään tulee muuttujia. Nämä voivat olla esimerkiksi muutokset analyysimenetelmässä, näytematriisissa tai näytteen käsittelyssä sekä silloin, jos laite siirretään toiseen käyttötilaan. [20; 21.]

3.3 Mikrobiologisiin menetelmiin liittyvä epävarmuus

Mikrobiologiassa analysoitava näyte on elävä, joten todellista pitoisuutta ei pystytä koskaan määrittämään niin, että se pysyisi muuttumattomana. Tästä syystä rinnakkaisanalyysien tulokset voivat vaihdella, eikä kyseessä silti ole virhe. Epävarmuutta menetelmiin tuovat myös suuret laimennuskertoimet, joita on käytettävä, että päästään laskettaviin tuloksiin. Näytteiden homogeenointi on merkittävä epävarmuustekijä, koska se saattaa tuhota tutkittavia mikrobeja, varsinkin jos näyte on kiinteä. Myös analyysin tekijöiden työskentelyerot voivat vaikuttaa tulosten hajontaan, tästä esimerkkinä pesäkkeiden tulkintaerot. [20 s. 2–3.]

3.4 Validointiin ja verifiointiin liittyvät suureet

Validointiin ja verifiointiin liittyvät suureita, joiden määritelmät poikkeavat hieman toisistaan. Määritelmiä on yritetty saada yhdenmukaisiksi sekä kansallisesti että

kansainvälisesti, koska eri merkityksessä on saatettu käyttää samaa suuretta. Seuraavassa on esitetty suureita, joita käytetään mikrobiologisten menetelmien validoinnissa ja verifiointissa. [20 s. 6.]

3.4.1 Spesifisyys

Spesifisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä löytää tutkittava mikrobi, näytteen häiritsevistä tekijöistä huolimatta. Menetelmä on spesifinen, jos se määrittää vain analysoitavan mikrobin. [20; 21.] Useinkaan menetelmät eivät tuota täydellistä spesifisyyttä, koska esimerkiksi pesäkkeiden tunnistaminen on aina subjektiivista [21].

3.4.2 Toistettavuus

Olosuhteiden, tekijän, näytteiden, laitteiden, laboratorion ja menetelmän ollessa samat, pystytään määrätyn aikavälin sisällä testaamaan menetelmän toistettavuus. Toistettavuus kuvaa tulosten välistä samanarvoisuutta, ja sitä voidaan testata joko kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti. [21.]

3.4.3 Uusittavuus

Uusittavuus on tulosten välistä yhtäpitävyyttä. Määritykset tehdään samalla menetelmällä, mutta yhdellä tai useammalla muuttujalla. Muuttujina voivat olla esimerkiksi tutkimuksen tekijä, suorituspaikka, mittaustilaite tai muu oleellinen tekijä. Määritettäessä uusittavuutta voidaan mittaukset tehdä myös pitkällä aikavälillä, verraten yksittäisen mittauksen kestoajaan. Menetelmän uusittavuutta kuvaa keskihajonta, joka lasketaan rinnakkaisten erotuksen perusteella. Todellisten näytteiden tai vertailututkimukseen osallistumisen avulla voidaan tutkia menetelmän uusittavuutta. [21.]

3.4.4 Mittausepävarmuus

Menetelmiin liittyy epävarmuustekijöitä, joita ovat esimerkiksi epätarkkuudet näytteenotossa, näytteen säilytyksessä ja laitteissa. Epätarkkuutta voi esiintyä myös analyysin eri vaiheissa. Mittausepävarmuus määritellään virherajojen avulla ja sillä kuvataan mittaustulosten vaihtelua. Määritykseen vaikuttavat tekijät on kirjattava mahdollisimman tarkasti, jos menetelmän mittausepävarmuutta ei pystytä laskemaan.

On hyvä erottaa mittausvirhe ja mittausepävarmuus toisistaan. Mittausvirhe on yksittäinen arvo ja mittausepävarmuus taas on vaihteluväli, jota voidaan soveltaa kaikkiin mittausmenetelmän tuloksiin. [21.]

3.4.5 Oikeellisuus

Oikeellisuus on yhtä kuin suureen mitattujen arvojen keskiarvojen ja suureen vertailuarvon yhtäpitävyys. Oikeellisuuden määrittämiseksi tarvitaan mahdollisimman paljon toistoja, joiden tuloksista oikeellisuutta voidaan mitata. Mittauksia on suoritettava mahdollisimman pitkällä aikavälillä, jotta pystytään selvittämään muuttujien mahdolliset vaikutukset. Häggin [21] mukaan oikeellisuus kuvaa analyysituloksen ja tuntemattoman tosiarvon läheisyyttä. Tulosten oikeellisuutta eikä todellista pitoisuutta pystytä varmuudella määrittämään, koska mikrobiologiassa analyytti on elävää materiaalia. Oikeellisuutta arvioidessa voidaan validoitavaa menetelmää verrata myös hyväksytyyn referenssimenetelmään. Näiden menetelmien tulosten perusteella voidaan määrittää suhteellinen oikeellisuus analysoitaessa samoja näytteitä. [20 s. 6–7.]

Hägg [21] määrittelee virhepositiivisuuden tarkoittavan validoitavan menetelmän antamaa positiivista tulosta silloin, kun näyte ei sisällä tutkittavaa analyyttiä. Virhenegatiivisuus tarkoittaa sitä, että tutkittava näyte sisältää analyyttiä, mutta validoitava menetelmä antaa negatiivisen tuloksen [20; 21].

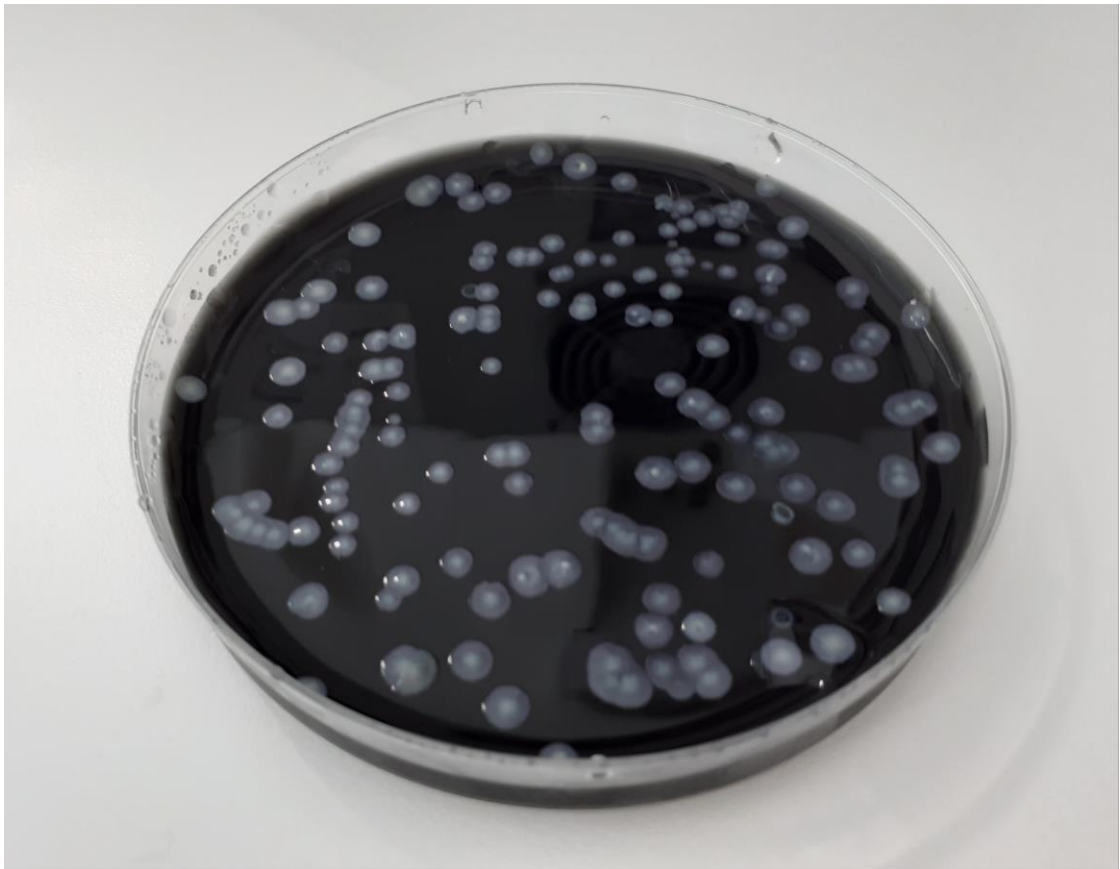
4 Menetelmän käyttöönotto ja suoritus

Menetelmän verifiointista tehtiin verifiointisuunnitelma yhdessä laboratorion asiantuntijan kanssa (liite 1). Verifioitaviksi parametreiksi valittiin pesäkelaskennan epävarmuus, toistettavuus ja oikeellisuus. Näiden parametrien avulla määritettiin myös menetelmän mittausepävarmuus. Myös menetelmän kategorisia suoritusominaisuuksia eli herkkyyttä, spesifisyyttä ja selektiivisyyttä testattiin varmistustestien avulla. Käytännössä verifiointi toteutettiin analysoimalla talousvesinäytteitä, joihin oli lisätty *Legionella*-bakteeria ja vertaamalla tuloksia talousvesinäytteisiin, joihin ei ollut lisätty *Legionella*-bakteeria.

SFS-standardin EN ISO 11731:2017 sisältämistä useista vaihtoehtoisista menetelmistä valittiin talousvesimatriiseille sopivimmat vaihtoehdot, joiden pohjalta aloitettiin myös työohjeen laatiminen. Työohje sisältää tarkasti kaikki työn vaiheet (liite 2).

4.1 Bakterikannat

Verifiointikokeissa käytettiin kylmäkuivattua *Legionella pneumophila* (serogroup 1) WDCM 00205 Vitroids -bakterikantaa (kuva 1). Ulkoisessa laadunarvioinnissa vertailututkimusnäytteenä oli LGC WT-423 *Legionella*-bakteeri, jolla osallistuttiin kevään 2020 vertailututkimukseen.



Kuva 1. *Legionella pneumophila* kasvu BCYE-agarilla

4.2 Menetelmässä käytetyt maljatyytit

Legionellan nirsouden takia menetelmässä käytettiin *Legionellalle* suunniteltuja selektiivisiä kasvatusalustoja, eli BCYE-agareita (buffered charcoal yeast agar, Oxoid, PO5315A). Selektiivisyyden lisäämiseksi käytettiin myös kaupallisia BCYE+AB-kasvatusagareita (Oxoid, PO5072A), joissa on lisättyä antibiootteja (vankomysiini,

polymyksiini, anisomyysiini). Antibioottien tarkoituksena on vähentää ei-haluttujen bakteerien kasvua agarilla. BCYE-agarit sisältävät myös *Legionelloille* tarpeelliset ravinteet sekä hiiltä, jonka avulla harmaat pesäkkeet erottuvat helposti mustasta agarista. *Legionellan* varmistamiseen käytettiin veriagarimaljoja, joissa *Legionella*-bakteerit eivät pysty kasvamaan, koska veriagarit eivät sisällä L-kysteiiniä.

4.3 Näytteiden valmistaminen

Näytteenä oli talousvesi. Tässä työssä verrattiin tavallista talousvettä talousveteen, johon oli lisätty *Legionella*-bakteeria. Kylmäkuivattu bakteeria sisältävä putki otettiin huoneenlämpöön sulamaan. Putkessa oleva bakteerikiekko siirrettiin steriiliin koeputkeen ja liuotettiin 9 millilitraan steriiliä kasvatuslientä. Vesihanasta otettiin talousvesinäytettä 100 millilitraa natriumtiosulfaattia sisältävään steriiliin näytepulloon. Natriumtiosulfaattia käytettiin talousveden kloorin pelkistämiseksi. Valmistetusta bakteerisuspensiosta (9 millilitraa) pipetoitiin 0,1 millilitraa 100 millilitraan talousvesinäytettä. Tämän näytteen tiedettiin sisältävän noin 500 pmy/ml pitoisuuden *Legionella*-bakteeria. Toisena näytteenä toimi samasta vesihanasta otettu näyte, johon ei lisätty *Legionella*-bakteeria.

4.4 Näytteiden happokäsittely

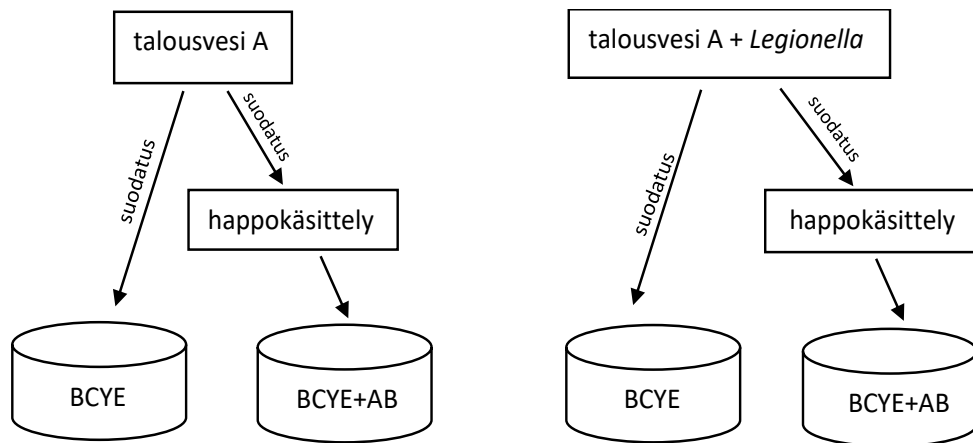
Talousvedessä on paljon ei-haluttua taustakasvua. Näytteitä käsiteltiin, jotta taustakasvu vähenisi ja *Legionella*-bakteeri havaittaisiin selkeämmin. Menettelytavassa suodatettu näyte happokäsiteltiin SFS-standardin ohjeen mukaisesti. Käsittely tapahtui suodatuksen jälkeen suodatussuppilossa, johon happoliuos jätettiin viideksi minuutiksi suodatinkalvon päälle ja huuhdottiin sitten steriilillä vedellä.

4.5 Suodatus ja inkubointi

Tässä työssä verifioitiin menetelmä talousvesimatriisille siten, että viljely suoritetaan maljan pinnalle siirretyllä suodatinkalvolla rinnakkain BCYE-agarilla (Procedure 5) sekä happokäsittelyn jälkeen BCYE+AB-agarilla (Procedure 7). Nämä Procedure 5 ja Procedure 7 valittiin SFS-standardista (liite 3).

Vesinäytteen sisältämät bakteerit kerättiin suodattamisen avulla steriilille kalvosuodattimelle (Millipore, HAWP04700), jonka huokoskoko oli 0,45 mikrometriä.

Kalvo siirrettiin steriilisti pinseteillä BCYE-agarille. Rinnakkainen samansuuruinen koe-erä suodatettiin uuden suodatinkalvon läpi ja kalvo käsiteltiin SFS-standardin mukaisella happoliuoksella suodatinsuppilossa. Suodatinkalvo huuhdeltiin steriilillä vedellä ja siirrettiin selektiiviselle BCYE+AB-agarille (kuva 2).



Kuva 2. Menetelmässä käytetty näytteiden viljelytapa

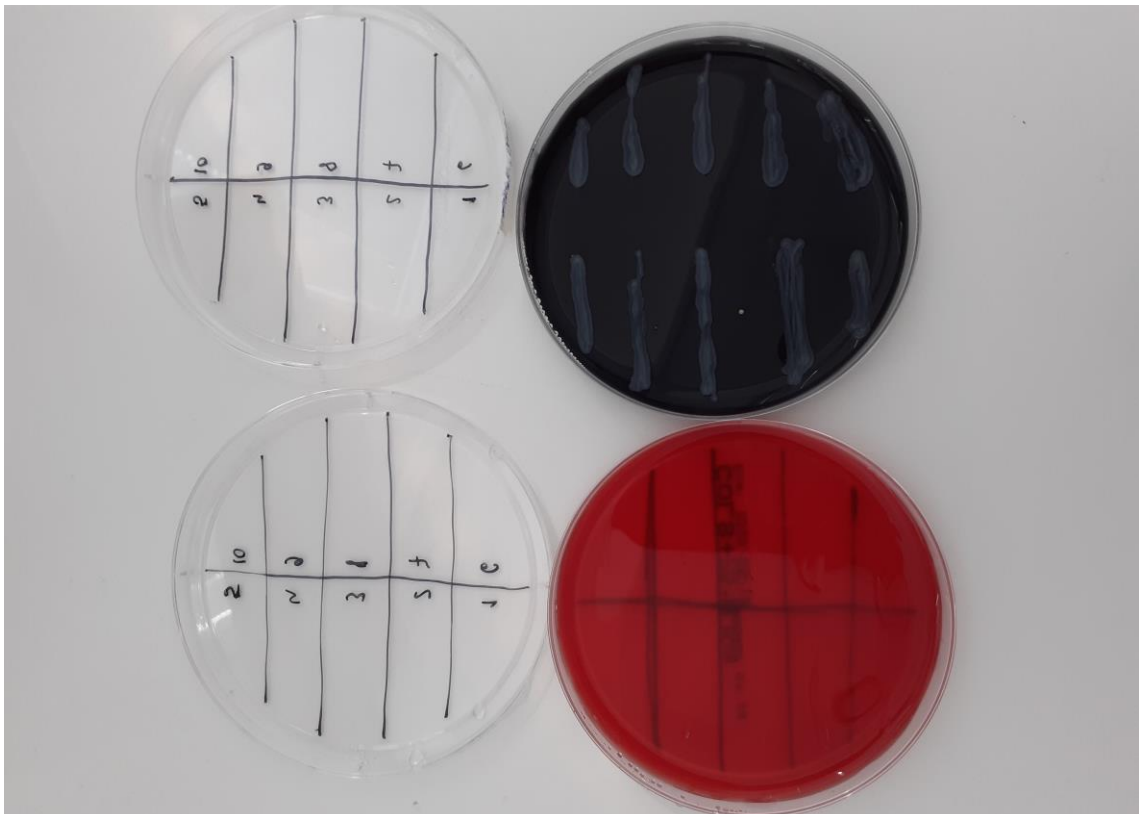
Maljoja inkuboitiiin 36 ± 2 °C:ssa seitsemästä päivästä jopa kymmeneen päivään. Pitkän inkubaatioajan takia maljat suositeltiin laittamaan pussiin, jotta kuivumista ei pääsisi tapahtumaan.

4.6 Maljojen lukeminen

Pitkä kasvatusaika johti siihen, että maljoja luettiin useita kertoja. Maljat tutkittiin ensimmäisen kerran kahden vuorokauden jälkeen kasvatuksen aloituksesta. Alustavat *Legionella*-pesäkkeet pystyttiin eristämään ja tutkimaan varmistustesteillä jo tällä ensimmäisellä tutkimuskerralla. Lopullinen tulos saatiin kuitenkin vasta kasvatusajan lopussa.

Tyypilliset *Legionella*-pesäkkeet ovat vaaleanharmaita, ja joidenkin lajien pesäkkeet fluoresoivat UV-valossa. Maljoja tutkittiin UV-valossa mahdollisimman vähän aikaa, kasvatusajan ollessa kesken, jotta välttyttäisiin bakteerin vaurioitumiselta tai kuolemislta.

Seitsemäntenä päivänä tyypillisten *Legionella*-pesäkkeiden määrä laskettiin. Alustavat *Legionella*-pesäkkeet siirrostettiin BCYE-agarille sekä veriagarille. Näitä maljoja kasvatettiin 36 ± 2 °C:ssa 2–5 vuorokauden ajan. Varmistetuiksi *Legionella*-pesäkkeiksi laskettiin ne, jotka kasvoivat BCYE-agarilla ja eivät kasvaneet veriagarilla (kuva 3). EU-juomavesidirektiivin ohjeen mukaisesti *Legionellan* enimmäistiheys saa olla 1000 pmy/1000 ml [5].



Kuva 3. *Legionella*-bakteerin kasvu BCYE-maljalla verrattuna kasvuun verimaljalla

4.7 Alustavien tulosten varmistuksia

Pesäkkeille suoritettiin SFS-standardin mukainen varmistustesti, jossa epäillyt *Legionella*-pesäkkeet viljeltiin BCYE- ja veriagarmaljoille. *Legionella* kasvaa BCYE-agarilla, mutta ei veriagarilla, koska se tarvitsee L-kysteiniä. Jos bakteeri kasvoi molemmilla kasvatusmaljoilla, voitiin todeta, että se ei ole *Legionella*-suvun bakteeri.

Lisävarmistuksena suoritettiin kaupallinen *Legionellan* tunnistamiseen tarkoitettu pikatesti, *Legionella* Dry Spot vasta-aineagglutinaatiotesti (Oxoid). Testissä *Legionella* tunnistetaan *Legionellan* soluseinän vasta-aineista, kun ne reagoivat testin vasta-aineelle herkistettyjen sinisten lateksipartikkelien kanssa muodostaen näkyvää sakkaa. Nämä pikatestit on kehitetty tunnistamaan patogeeniset *Legionella*-lajit. Dry Spot -testikittejä oli kolme erilaista *Legionellan* tunnistamiseksi: *Legionella pneumophila* serogroup 1 latex agglutination test (Oxoid, DR0200M), *Legionella pneumophila* serogroup 2–14 latex agglutination test (Oxoid, DR0210M) ja *Legionella* species latex agglutination test (Oxoid, DR0220M).

5 Tuloksia

5.1 Suodatinkalvojen vertailu

Eri suodatinkalvomateriaalien soveltuvuutta *Legionella*-viljelyyn tutkittiin vertaamalla *Legionella*-pesäkesaantoa vertailumateriaaliliuoksesta suhteessa pintalevitysmenetelmällä saatuun määritystulokseen. Vertailu suoritettiin kolmea eri suodatinkalvoa käyttäen (Millipore, Whatman, Pall). Kaikista kolmesta erilaisesta kalvosta suoritettiin neljä rinnakkaista määrittystä. Tuloksia verrattiin pintalevitystekniikalla määritettyyn *Legionella*-pitoisuuteen. Paras saanto saavutettiin Millipore-nitroselluloosasuodatinkalvolla. Eri suodatinkalvojen saannot on esitetty taulukossa 1.

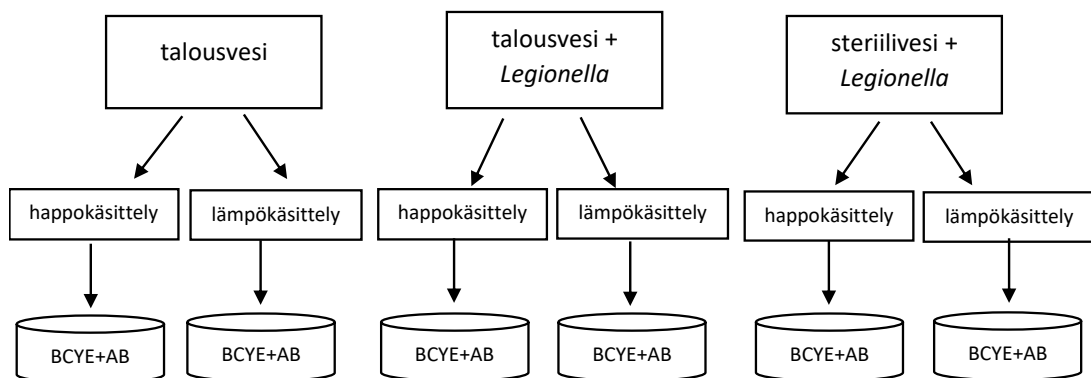
Taulukko 1. Suodatinkalvojen (0,45 µm huokoskoko) vertailu.

Menetelmä	Suodatin- valmistaja	Materiaali	N	Pesäkeluku, pmy/malja		Saanto
				Keskiarvo	Keski- hajonta	
Kalvo- suodatus	Millipore, (HAWP04700)	nitroselluloosa	4	79,8	9,5	84 %
	Whatman, (ME25/21 ST)	selluloosaesteri	4	38,8	6,2	41 %
	Pall, (GN-6 Metrice)	selluloosaesteri	4	74,8	6,4	79 %
Pintalevitys			2	94,5	10,6	100 %

5.2 Näytteen käsittelyn vaikutus menetelmän herkkyyteen

Verifiointikokeissa käytetty happokäsittelymetodi valittiin vertaamalla kahta näytteen käsittelyvaihtoehtoa. Happokäsittelyn lisäksi testattiin lämpökäsittelyn vaikutusta *Legionella*an ja ei-toivottuun taustakasvuun. Molemmat menetelmät ovat SFS-standardista [2]. Lämpökäsittely toteutettiin ohjeen mukaisesti laittamalla näyte steriilissä putkessa +50 asteiseen vesihauteeseen 30 minuutiksi. Tämän jälkeen näyte suodatettiin steriilisti suodatinkalvon lävitse.

Näytteenä käytettiin talousvettä, johon oli lisätty *Legionella*-bakteeria ja sitä verrattiin talousveteen, johon ei ollut lisätty *Legionella*-bakteeria. Lisäksi tutkittiin myös steriili vesi, johon oli lisätty *Legionella*-bakteeria (kuva 4). Vertailun vuoksi kaikki kolme näytettä suodatettiin myös käyttämättä kumpaakaan käsittelymetodia.



Kuva 4. Suoritettu viljelytapa, kun verrattiin lämpö- ja happokäsittelyä

Inkubointiajan jälkeen maljoilta laskettiin alustavat *Legionella*-pesäkkeet. Tulokset ovat näkyvillä alla olevassa taulukossa (taulukko 2). Taulukossa näkyy myös rinnakkaiset tulokset.

Taulukko 2. Vertailun tulokset ilmoitettuna kuinka monta tyypillistä *Legionella*-pesäkettä kasvaa maljalla. Taulukossa näkyy myös rinnakkaiset tulokset.

	Ilman käsittelyä BCYE-malja	Happokäsittely BCYE+AB-malja	Lämpökäsittely BCYE+AB-malja
Talousvesi	0, 0	0, 0	0, 0
Talousvesi + <i>Legionella</i>	107, 92	121, 104	0, 0
Steriili vesi + <i>Legionella</i>	17, 26	30, 32	0, 0

Tuloksista huomattiin, että lämpökäsittely oli inaktivoiut lisätyt *Legionella*-bakteerit täysin. Tämän takia taustakasvun vähentämiseksi valittiin happokäsittely. Tuloksissa näkyy myös se, ettei *Legionella*-bakteeri viihdy steriilissä vedessä.

5.3 Menetelmän oikeellisuus

Menetelmän oikeellisuuden arvioimiseksi osallistuttiin vertailututkimukseen LGC QWAS kierros 287, näyte 423. Määrittystulokseksi saatiin 20 pmy/1000 ml ja kierroksen vertailuarvo oli 28 pmy/1000 ml, mikä tuotti Z-arvon -0,29. Z-arvo kuvastaa oman tuloksen ja vertailuarvon suhdetta kaikkien tulosten keskihajontaan. Jotta tulos olisi hyväksyttävä, Z-arvo ei saa olla alle -2 eikä yli 2. Vertailututkimuksen tulos siis täytti vertailututkimuksen hyväksymiskriteerit.

Ulkoisen laadunarvioinnin tuloksen perusteella pystyttiin laskemaan menetelmän oikeellisuus. Menetelmän oikeellisuudeksi saatiin 28,6 %. Alla on esitettyä kaava 1 oikeellisuuden määrittämiseen.

$$\text{Menetelmän oikeellisuus} = \left(1 - \frac{\text{Määrittystulos}}{\text{Vertailuarvo}}\right) \times 100 \% \quad (1)$$

$$\text{Menetelmän oikeellisuus} = \left(1 - \frac{20}{28}\right) \times 100 \% = 28,6 \%$$

5.4 Toistettavuus

Menetelmän toistettavuutta testattiin talousveteen tai laimennusliemeen lisätyn *Legionella*-bakteerin rinnakkaismääritysten perusteella (taulukko 3). Määrittystuloksissa esiintyi enintään 11 %:n ylihajontaa, suhteessa otosten hajontaan. Taulukossa 3 esitettävä p-arvo kuvaa tilastollista merkittävyyttä. Jos p-arvo on <0,05, on se tilastollisesti merkittävä ero. Tulosten ylihajonta ei siis ollut X^2 -testin perusteella tilastollisesti merkittävä, koska p-arvo ei ole alle 0,29 yhdessäkään otoksessa.

Henkilöiden välistä toistettavuutta tutkittiin vertaamalla kahden henkilön saamia määrittystuloksia. Näytteinä oli laboratorion talousvesi sekä steriili vesi, johon kumpaankin oli lisätty *Legionella*-bakteeria (taulukko 4). Määrittystulosten hajonnan keskiarvo oli 11,7 %. Tulos vastaa menetelmästandardin esitettyä laboratorion sisäisen uusittavuuskokeen tulosta (11,86 %) [2].

Taulukko 3. Menetelmän toistettavuus yhden henkilön suorittamissa rinnakkaismäärittelyissä.

Menetelmä: Kalvosuodatus, BCYE-agar			
Matriisi	Määrittystulokset pmy/malja	Ylihajonta	p-arvo (X ² -testi)
Peptonisuolavesi + <i>Legionella</i>	80		
	92		
	69		
	78		
	keskiarvo: 79,75		
keskihajonta	11,90 %	6 %	0,34
Laboratorion talousvesi + <i>Legionella</i>	75		
	60		
	59		
	77		
	76		
keskiarvo: 69,4			
keskihajonta	13,10 %	9 %	0,31
Laboratorion talousvesi + <i>Legionella</i>	28		
	21		
	25		
	keskiarvo: 28,7		
	keskihajonta	8 %	-62 %
MENETELMÄ: kalvosuodatus, happokäsittely, BCYE+AB-agar			
Matriisi	Määrittystulokset pmy/malja	Ylihajonta	p-arvo (X ² -testi)
Laboratorion talousvesi + <i>Legionella</i>	168		
	164		
	192		
	156		
	173		
keskiarvo: 170,6			
keskihajonta	8 %	3 %	0,37
Laboratorion talousvesi + <i>Legionella</i>	70		
	54		
	48		
	64		
	59		
keskiarvo: 59			
keskihajonta	14 %	11 %	0,29
	keskiarvo: 11,00 %		

Taulukko 4. Henkilöiden välinen toistettavuus

Menetelmä: Kalvosuodatus, BCYE-agar			
Matriisi	Henkilö 1 Määrittystulos pmy/malja	Henkilö 2 Määrittystulos pmy/malja	Keskihajonta %
Laboratorion talousvesi + <i>Legionella</i>	62	75	13 %
	67	60	8 %
	57	59	2 %
	56	77	22 %
	58	76	19 %
Steriili vesi + <i>Legionella</i>	19	20	4 %
Menetelmä: Kalvosuodatus, happokäsittely, BCYE+AB-agar			
Matriisi	Henkilö 1 Määrittystulos pmy/malja	Henkilö 2 Määrittystulos pmy/malja	Keskihajonta %
Laboratorion talousvesi + <i>Legionella</i>	180	168	5 %
	160	164	2 %
	164	192	11 %
	166	156	4 %
	183	173	4 %
	65	70	5 %
	50	54	5 %
	37	48	18 %
	38	64	36 %
	40	59	27 %
		Keskiarvo	11,7 %

5.5 Pesäkelaskennan epävarmuus

Alustavan *Legionella*-pesäkelaskennan epävarmuutta arvioitiin rinnakkaislaskennan perusteella (taulukko 5). Näytteenä oli talousvesi, johon oli lisätty *Legionella*-bakteeria. Otanta oli neljä maljaa ja kaksi henkilöä tulkitsi näitä maljoja.

Taulukko 5. Maljojen rinnakkaislaskennan tulokset

Malja	Henkilö 1	Henkilö 2	ka	s	u_z	u_z^2
1	28	27	27,5	0,707107	0,025713	0,000661
2	21	25	23	2,828427	0,122975	0,015123
3	25	24	24,5	0,707107	0,028862	0,000833
4	163	163	163	0	0	0
					summa $u_z^2=$	0,016617

Taulukossa 5 on esitetty rinnakkaisten laskentojen keskiarvo, ka ja keskihajonta, s . Näiden arvojen avulla laskettiin u_z -arvo eli yhden maljan pesäkesumman epävarmuus. u_z -arvo laskettiin jakamalla keskihajonta keskiarvolla. Näistä u_z -arvoista laskettiin u_z -arvo, eli usean maljan pesäkesumman lukemaepävarmuus, alla olevan kaavan 2 avulla.

$$u_z = \sqrt{\frac{\sum \left(\frac{s}{ka}\right)^2}{n}} \quad (2)$$

Tämän jälkeen u_z -arvo kerrotaan sadalla, jotta tulos voidaan ilmoittaa prosentteina.

$$\text{usean maljan pesäkesumman lukemaepävarmuus \%} = \sqrt{\frac{0,016617}{4}} \times 100 \% = 6,44\%$$

Lukemaepävarmuudeksi saatiin 6,44 %. Lukemaepävarmuuden tavoitearvo on 5 % [21]. Tuloksena 6,44 % on hieman korkea, mutta hyväksyttävä, koska otanta oli pieni. Rinnakkaislaskenta-aineiston keräämistä tullaan jatkamaan menetelmän käytön ohessa.

5.6 Kategoriset suoritusarvot

Menetelmän herkkyyttä, spesifisyyttä ja selektiivisyyttä testattiin varmistustesteillä. Näytteenä oli talousvesi, johon oli lisätty *Legionella*-bakteeria. Varmistustesteihin valittiin 99 pesäkettä. Näistä 64 oli alustavia *Legionella*-pesäkkeitä ja loput 35 pesäkettä olivat mahdollista muuta kasvua, eivätkä *Legionella*-bakteeria.

Pesäkkeille suoritettiin menetelmästandardin mukainen alustava varmistustesti (viljely BCYE- ja veriagarmaljalle) sekä lisävarmistuksena *Legionella* Dry Spot vasta-aineagglutinaatiotestit. Tulokset on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. Varmistustestin verifiointi ja menetelmän kategoriset suoritusarvot

		Alustava tunnistus (kysteiniivaatimustesti)		Summa
		+	-	
Varmistettu pesäkeluku	+	64	0	64
	-	0	35	35
Summa		64	35	99
Kategoriset suoritusarvot				Hyväksymisrajat
Herkkyys	(64/64)	100 %		99,0 %
Spesifisyys	(35/35)	100 %		95,3 %
Väärien positiivisten osuus	(0/64)	0 %		3,3 %
Väärien negatiivisten osuus	(0/35)	0 %		1,4 %
Selektiivisyys	(64/99)	65 %		57,2 %

Tulokset täyttivät SFS-standardin mukaiset hyväksymisrajat [2]. Varmistustesti todettiin erittäin toimivaksi näiden tulosten perusteella.

5.7 Mittausepävarmuus

Menetelmän yhdistetty ja laajennettu epävarmuus määritettiin pesäkelaskennan epävarmuuden, toistettavuuden ja oikeellisuuden perusteella arvoista, jotka ovat esitettyinä taulukossa 7.

Taulukko 7. Menetelmästä saadut tulokset ja niistä lasketut epävarmuudet

Pesäkelaskennan epävarmuus	6,44 %
Toistettavuus	11,0 %
Henkilöiden välinen toistettavuus	11,7 %
Oikeellisuus (vertailututkimus)	28,6 %
Yhdistetty epävarmuus	33,4 %
Laajennettu epävarmuus	66,9 %

Yhdistetty epävarmuus laskettiin neljästä saadusta tuloksesta kaavalla 3.

$$Yhdistetty\ epävarmuus = \sqrt{(6,44^2 + 11^2 + 11,7^2 + 28,6^2)} = 33,43 \quad (3)$$

Yhdistetyksi epävarmuudeksi saatiin siis 33 %. Tästä tuloksesta laskettiin laajennettu epävarmuus kattavuuskertoimen ollessa kaksi. Laajennetuksi epävarmuudeksi saatiin täten 67 %. Suuret epävarmuusluvut ovat normaaleja mikrobiologiassa, koska epävarmuustekijöitä on useita.

6 Johtopäätökset

Opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida Vita Laboratoriot Oy:lle menetelmä, jonka avulla pystyttiin määrittämään *Legionella*-bakteerien pesäkemäärä talousvedestä. Menetelmästä tehtiin myös työohje, joka tuli käyttöön laboratoriolle. Menetelmä valittiin vertailemalla erilaisia suodatusmenetelmiä, joista valittiin laboratoriolle paras vaihtoehto. Tämä valittu menetelmä todettiin toimivaksi tehtyjen kokeiden perusteella.

Legionellan pitkä kasvatusaika tuotti aikataulujen venymisiä ja toi lisähaasteita aikatauluttamiseen. *Legionellan* kasvatus kylmäkuivatusta bakteeriantipista osoittautui aluksi vaikeaksi, eivätkä pesäkemäärät vastanneet odotettua määrää. Lopulta alun virheet huomattiin ja korjattiin, jolloin pesäkemäärät vastasivat annettuja pitoisuuksia. Työssä vertailtiin kalvosuodatuksen tuloksia suoraviljelyn tuloksiin, jolloin huomattiin saannin olevan vähäisempi suodatinkalvolla. Tämän takia päädyttiin testaamaan kolmea erilaista suodatinkalvoa, joista paras saanti todettiin kuitenkin olevan jo käytössä olevalla kalvolla.

Talousvesien taustakasvun vähentämiseksi kokeiltiin kahta erilaista metodia, lämpö- ja happokäsittelyä. Lämpökäsittely oli paljon helpompi ja nopeampi tapa, mutta aiheutti lisätyn *Legionella*-bakteerin inaktivoitumisen. Happokäsittely, joka valittiin lopulta osaksi menetelmää, oli paljon työläämpi ja aikaa vievämpi tapa. Happokäsittely todettiin kuitenkin erittäin toimivaksi metodiksi taustakasvun vähentämiseen.

Legionellan tunnistaminen maljalta osoittautui melko helpoksi, koska *Legionellalle* suunnitellut kasvatusmaljat olivat selektiivisiä ja musta väri helpotti harmaiden pesäkkeiden erottumista (kuva 1). Varmistukset alustavista *Legionella*-pesäkkeistä tehtiin siirrostamalla bakteerimassaa BCYE-agarmaljalle ja veriagarmaljalle. Koska *Legionella*-bakteeri ei kasva veriagarmaljalla, tämä oli helppo ja nopea tapa varmistaa *Legionella*-pesäkkeet.

Menetelmä todettiin toimivaksi valittujen parametrien avulla. Näitä parametrejä olivat laskentaepävarmuus, toistettavuus ja oikeellisuus. Jos aikaa olisi ollut enemmän, olisi lisäksi voitu valita vielä useampia parametrejä. Koska menetelmä verifioitiin yhden laboratorion käyttöön, parametrejä ei vaadittu enempää. Täten menetelmän tulokset osoittivat, että menetelmä täyttää suunnitellun käyttötarkoituksen, talousveden testauksen, mukaiset vaatimukset.

Lähteet

- 1 Vita Laboratoriot Oy. Verkkoaineisto <https://vita.fi/> Luettu 17.5.2020
- 2 SFS-EN ISO 11731:2017. Water quality. Enumeration of Legionella (ISO 11732:2017). Suomen ympäristökeskus. Suomen Standardisoimisliitto SFS ry Vahvistettu 16.6.2017.
- 3 Infektiotaudit ja rokotukset. Legionellan esiintyvyys Suomessa. Terveyden ja hyvinvoinninlaitos. Verkkoaineisto. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/legionella/legionellan-esiintyvyys-suomessa> Päivitetty 8.6.2020. Luettu 13.10.2020
- 4 CDC: History, Burden, and Trends. Center of Disease Control and Prevention. Verkkoaineisto. Päivitetty 30.4.2018. <https://www.cdc.gov/legionella/about/history.html#f1> Luettu 17.5.2020
- 5 EU:n uusi juomavesidirektiivi parantaa talousveden turvallisuutta. 2020. Verkkoaineisto. Päivitetty 5.2.2020. [https://www.ymparisto.fi/fi-FI/Vesi/EUn_uusi_juomavesidirektiivi_parantaa_ta\(54711\)](https://www.ymparisto.fi/fi-FI/Vesi/EUn_uusi_juomavesidirektiivi_parantaa_ta(54711)) Luettu 30.10.2020
- 6 Ruokavirasto. Työturvallisuusohjeet maanparannusaineiden ja kasvualustojen käsittelijöille legionellabakteerilta suojautumisen varalle. Terveyden ja hyvinvoinninlaitos. Verkkoaineisto. Päivitetty 26.8.2020. https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/asiointi/oppaat-ja-lomakkeet/yritykset/lannoitevalmisteet/ohjeet/legionella-tyoturvallisuusohjeet_lopullinen.pdf Luettu 13.10.2020.
- 7 Boamah, D.K.; Zhou, G.; Ensminger, A.W. & O'Connor, T.J. 2017. From Many Hosts, One Accidental Pathogen: The Diverse Protozoan Hosts of Legionella. Julkaisussa *Biology and pathogenesis of legionella*. Toim. Newton, H.; Hartland, E. & Machner, M. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018, 107–123.
- 8 Uzel, A. & Hames-Kocabas, E.E. Legionella Pneumophila: From Environment to Disease. *Environmental Health - Physical, Chemical and Biological Factors*. Nova Science Publishers, Incorporated. 2010.
- 9 CDC: Causes, How it Spreads, & People at Increased Risk. Center of Disease Control and Prevention. Verkkoaineisto. Päivitetty 15.1.2020. <https://www.cdc.gov/legionella/about/causes-transmission.html> Luettu 17.5.2020
- 10 CDC: Prevention. Center of Disease Control and Prevention. Verkkoaineisto. Päivitetty 30.4.2018. <https://www.cdc.gov/legionella/about/prevention.html> Luettu 17.5.2020
- 11 Appelt, S. & Heuner, K. 2017 The Flagellar Regulon of Legionella—A Review. Julkaisussa *Biology and pathogenesis of legionella*. Toim. Newton, H.; Hartland, E. & Machner, M. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018, 94–106.
- 12 Oliva, G.; Sahr, T., & Buchrieser, C. 2018. The Life Cycle of *L. pneumophila*: Cellular Differentiation Is Linked to Virulence and Metabolism. Julkaisussa *Biology and pathogenesis of legionella*. Toim. Newton, H.; Hartland, E. & Machner, M. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018, 124–136.

- 13 Lumio, J. Legioonalaistauti. Lääkärikirja Duodecim. Terveyskirjasto. Verkkoaineisto. Päivitetty 15.11.2019.
https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00580 Luettu 15.5.2020
- 14 Allgood, S.C.; Romero Dueñas, B.P.; Noll, R.R., Pike, C.; Lein, S. & Neunuebel, M.R. 2017. Legionella Effector AnkX Disrupts Host Cell Endocytic Recycling in a Phosphocholination-Dependent Manner. Julkaisussa *Biology and pathogenesis of legionella*. Toim. Newton, H.; Hartland, E. & Machner, M. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018, 72–84.
- 15 Ympäristöterveys. Legionellabakteerit vesijärjestelmissä. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. Verkkoaineisto. Päivitetty 22.6.2020.
<https://thl.fi/fi/web/ymparistoterveys/vesi/legionellabakteerit-vesijarjestelmissa> Luettu 13.10.2020.
- 16 CDC: Signs & Symptoms. Center of Disease Control and Prevention. Verkkoaineisto. Päivitetty 30.4. 2018. <https://www.cdc.gov/legionella/about/signs-symptoms.html> Luettu 17.5.2020
- 17 CDC: Diagnosis, Treatment, & Complications. CDC: Center of Disease Control and Prevention. Verkkoaineisto. Päivitetty 30.4.2018.
<https://www.cdc.gov/legionella/about/diagnosis.html#f1> Luettu 17.5.2020
- 18 Li, L. & Faucher, S.P. 2016. The Membrane Protein LasM Promotes the Culturability of Legionella pneumophila in Water. Julkaisussa *Biology and pathogenesis of legionella*. Toim. Newton, H.; Hartland, E. & Machner, M. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018, 22–32.
- 19 Suomen standardisoimisliitto SFS. Standardien laadinta. Verkkoaineisto.
https://www.sfs.fi/standardien_laadinta Luettu 13.10.2020
- 20 Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Valvonta/Elintarvikevirasto. Helsinki. 13/1997.
- 1 Hägg, Margareta. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Espoo: Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy.

Verifiointisuunnitelma

Verifiointisuunnitelma- Veden laatu. *Legionella*.

Kalvosuodatus- ja pintalevitysmenetelmä.

SFS-EN ISO 11731:2017

Tausta:

Verifioidaan SFS-EN ISO 11731:2017 standardin mukainen menetelmän *Legionella*-bakteerien pesäkeluvun määrittämiseen talousvedestä. Tällä varaudutaan EU talousvesidirektiivin uudistumisen sisältämään vaatimukseen *Legionella*-tutkimusten suorittamisesta.

Käytännön toteutus:

Verifiointi toteutetaan analysoimalla talousvesinäytteitä, joihin lisätään *Legionella*-bakteereita (Vidroids vertailumateriaali).

Lisäksi tutkitaan näytteitä ilman *Legionella*-lisäystä.

Toistettavuuteen tehdään kymmenen rinnakkaismaljausta kahden eri työntekijän toimesta.

Lisätyn talousvesinäytteen valmistus (Vitroid *Legionella* määrä n. 500 000 cfu/putki)

1. Siirrä Vitroids ampulli pakastimesta huoneenlämpöön ja anna lämmetä 5–10 minuuttia.
2. Avaa Vitroid putki ja siirrä punainen bakteerikiekko steriiliin koeputkeen ja lisää 1 ml Dilucup lientä.
3. Liuota pelletti pipetillä sekoittaen. Lisää putkeen loppu Dilucup liemi (yht 9 ml)
4. Ota vesihanasta talousvesinäytettä (esim. laboratorion) 100 ml natriumtiosulfaattia sisältävään steriiliin näytepulloon.
5. Siirrä 0,1 ml bakteerisuspensiota Vitroid-putkesta 100 ml vesinäytepulloon.
6. Saadun lisätyn vesinäytteen sisältää n 500 pmy/ml lisättyä *Legionella* -bakteeria.

Legionellanäytteen valmistus peptonisuolaveteen

(Vitroid *Legionella* määrä n. 500 000 cfu/putki)

1. Siirrä Vitroids ampulli pakastimesta huoneenlämpöön ja anna lämmetä 5–10 minuuttia.
2. Avaa Vitroid putki ja siirrä punainen bakteerikiekko steriiliin koeputkeen ja lisää 1 ml Dilucup lientä.
3. Liuota pelletti pipetillä sekoittaen. Lisää putkeen loppu Dilucup liemi (yht 9 ml) ja sekoita.
4. Valmista liuoksesta 1:10 laimennos siirtämällä 1 ml liuosta uuteen Dilucuppiin.
5. Mittaa 100 ml peptonisuolavettä näytekuppiin ("Colilert"-kuppi).
6. Siirrä 0,1 ml bakteerisuspensiota Dilucup-laimennoksesta 100 ml:aan peptonisuolavettä.
7. Liuos sisältää n 50 pmy/ml lisättyä *Legionella* -bakteeria.

Työohje

Vesimikrobiologia. Legionella- kalvosuodatusmenetelmä (ISO 11731)

Yleistä

Legionella -suvun bakteerit aiheuttavat ympäristöperäisiä hengitystieinfektioita ja voivat lisääntyä lämpimissä talousvesijärjestelmissä. Legionellan määrälle on määritelty raja-arvot laivojen talousvesijärjestelmissä WHO:n toimesta sekä EU:n juomavesidirektiivissä.

Menetelmä

Työohje kuvaa standardin SFS-EN ISO 11731:2017 mukaisen menetelmän Legionella -bakteerien määrittämiseksi talousvedestä kalvosuodatusmenetelmällä.

Periaate

Vesinäytteen (10 ... 1000 ml) sisältämät bakteerit kerätään kalvosuodattimelle vakuumin avulla. Kalvo asetetaan BCYE-agarille. Toinen samansuuruinen koe-erä suodatetaan kalvon läpi, kalvo käsitellään happoliuoksella, huuhdellaan ja asetetaan selektiiviselle BCYE+AB-agarille. Molempia maljoja inkuboidaan 37 °C:ssa 10 vuorokauden ajan, Tyypilliset Legionella-pesäkkeet lasketaan ja varmistetaan kysteiinivaatimuksen perusteella.

Näyte

Talousvesi. Tutkimus suoritettava 24 h kuluessa näytteenotosta. Näytteen säilytys 5 ± 3°C:ssa näytteenoton ja tutkimuksen välisenä aikana. Klooratusta vedestä näyte otetaan pulloon, joka sisältää natriumtiosulfaattia kloorin pelkistämiseksi.

Suoritus

Näytteen suodatus ja kasvatus

1. Suodata 10 ml (tai muu sopivaksi oletettu tilavuus) vesinäytettä kalvosuodatustyöohjeen mukaisesti.
2. Siirrä suodatuskalvo BCYE-agarille.
3. Suodata sama näytettä toinen samansuuruinen koe-erä ja lisää suodatuksen jälkeen lisää kalvon päälle noin 30 ml happoliuosta ja jätä liuos 5 + 0,5 min ajaksi, minkä jälkeen poista liuos imusuodatuksen avulla. Huuhtelee suodatinkalvo vähintään 20 ml:lla fosfaattipuskuria, siten että puskuriliuos ei huuhtelee suodattimen sitä osaa, joka ei ollut kosketuksissa happoliuoksen kanssa.
4. Siirrä happoliuoksella käsitelty suodatinkalvo BCYE+AB-agarimaljalle
5. Pakkaa maljat muovipussiin (kuivumisen estämiseksi) ja inkuboi ylösalaisin käännettynä 36 +2 °C lämpötilassa 7–10 vuorokauden ajan.

Maljojen tulkinta

1. Tutki maljat ensimmäisen kerran 2, 3, 4 tai 5 vuorokauden inkuboinnin jälkeen ja uudestaan inkubointiajan lopussa.
2. Alustavia legionellapesäkkeitä voidaan eristää ja tutkia varmistustestillä ensimmäisellä tutkimuskerralla, mutta lopullinen analyysitulokset saadaan vasta inkubointiajan lopussa.
3. Tyypilliset legionellapesäkkeet ovat vaaleanharmaita ja joidenkin lajien pesäkkeet fluoresoivat UV-valossa. Maljaa tulee tutkia UV-valossa mahdollisimman vähän aikaa bakteerien kuoleminen tai vaurioitumisen välttämiseksi.
4. Laske tyypillisten Legionella-pesäkkeiden määrä. Mikäli maljoilla esiintyy useita erilaisia alustavia legionellapesäketyppejä, tallenna kunkin pesäketypin lukumäärä työlialle. Siirrosta vähintään yksi pesäke jokaista alustavaa Legionella-pesäketyppiä BCYE-agarille ja veriagarille.
5. Inkuboi BCYE- ja verimaljaa 36 ±2 °C lämpötilassa 2–5 vuorokauden ajan. Varmistetuiksi legionellapesäkkeiksi katsotaan ne, jotka kasvavat BCYE-agarilla ja eivät kasva veriagarilla.
6. Laske Legionella -pesäkeluku varmistuskokeen tulosten perusteella tutkitussa näytämäärässä tuloslaskenta ohjeen mukaisesti.

Viitearvot

Enimmäistiheys 1000 pmy / 1000 ml WHO, EU-juomavesidirektiivi.

SFS-EN ISO 11731:2017, vaihtoehtoiset menetelmät

SUOMEN STANDARDISOIMISLIITTO SFS
FINNISH STANDARDS ASSOCIATION SFSSFS-EN ISO 11731:2017
40

Step 1											
Water or water derived from water related matrices e.g. swabs, biofilm, sediments											
Matrix A			Matrix B			Matrix C					
Water with low background (see 8.4.2 and 8.4.3) e.g. potable water			Water with high background (see 8.4.4) e.g. cooling tower, process water, water from air washers chambers, water from dental units			Water with extremely high background ^a (see 8.4.5) e.g. waste water, surface water					
Step 4											
Culture media											
Step 2	Step 3	Procedure	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Direct plating	Without treatment	1	R	R	O		O	R			
	Heat treatment	2	O	O	O		O	R			
	Acid treatment	3	O	O	O		O	R			
	Combination of heat/acid treatment	4					O	O		O	R
Membrane filter on plate	Without treatment	5	R	O	O						
	Heat treatment	6	O	O	O		O	O			
	Acid treatment	7	O	R ^b			O	O			
Filtration with washing procedure	Without treatment	8	R	R ^b			O	R			
	Heat treatment	9	R	R ^b			O	R			
	Acid treatment	10	R	R ^b			O	R			
Plating after dilution	Without treatment	11	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c			
	Heat treatment	12	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c			
	Acid treatment	13	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c			
	Combination of heat/acid treatment	14					O ^c	O ^c		O ^d	R ^d
Culture media											
A: BCYE agar (see B.1).											
B: Selective BCYE agar [BCYE+AB agar (see B.3)].											
C: Highly selective culture media [GVPC agar or MWY agar (see B.4 or B.5)].											
Key											
R required											
O optional											
^a For this type of water, both methods (direct plating and plating after dilution) are required.											
^b Choice of culture media B or C.											
^c With dilution 1:10.											
^d With dilution 1:10 and 1:100.											
NOTE 1 For the different matrices above, some examples are described (e.g. potable water). It is possible, based on the experience of the laboratory, that the examples can be covered by another matrix using one or more pre-treatment methods.											
NOTE 2 For the different matrices, the shorter expression is used above: "water with low background" (= an expected low concentration of interfering microorganisms), "water with high background" (= an expected high concentration of interfering microorganisms), and "water with extremely high background" (= an expected extremely high concentration of interfering microorganisms).											
NOTE 3 The cells in "grey" can be used for a more detailed way of reporting: Reference to this document (ISO 11731) [Matrix A, Procedure 1, Media A and B].											

Figure J.1 Decision matrix

 Tämä julkaisu on ladattu SFS Online-palvelusta (oop. nro) 28.10.2020.
 Lataaja: ip-käyttäjä. Vain Metropolia Ammattikorkeakoulu käyttää.