

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2012

Matti Riihiaho

LISTERIA MONOCYTOGENES – KVANTITATIIVISEN MÄÄRITYSMENETELMÄN VALIDOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2012 | Sivumäärä: 32 + 23

Ohjaajat: Kai Rosenberg, FM., Kirsi Weckman, FM.

Matti Riihiaho

LISTERIA MONOCYTOGENES – KVANTITATIIVISEN MÄÄRITYSMENETELMÄN VALIDOINTI

Listeria monocytogenes on elintarvikelaboratorioissa tutkittava patogeeninen bakteeri, joka voi pahimmillaan aiheuttaa jopa kuoleman ihmiselle. *Listeria monocytogenes* on gram-positiivinen bakteeri, jota esiintyy yleisesti maaperässä, eläimissä, kasveissa, vedessä ja rehuissa. *Listeria*-sukuun kuuluu seitsemän eri lajia, joista *L. monocytogenes* on ainoa, joka voi aiheuttaa ruokamyrkytyksiä ihmiselle. Riskiryhmiin kuuluvat vastustuskyvyltään alentuneet ihmiset kuten vanhukset, raskaana olevat, vastasyntyneet ja AIDS-potilaat.

Listeria monocytogenes –bakteerin kvantitatiivinen määrittäminen perustuu ISO-standardiin ISO 11290-2:1998, johon on tullut muutoslehti: Amendment 1:2004. ISO 11290-2–menetelmän käyttöönottoa- ja akkreditointia puoltaa mikrobikriteeriasetus (EY 2073-2005), jossa se on asetuksen mukainen vertailumenetelmä jota suositellaan käytettäväksi akkreditoituissa laboratorioissa.

Validoinnin tarkoituksena on tuottaa vertailuarvoja suureille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Validointi sisältää validointisuunnitelman, käytännön osuuden, tulosten kirjaamisen ja analysoimisen sekä validointiraportin.

Validointiin valittiin kolme eri näytematriisia, joihin siirrostettiin *Listeria monocytogenes* ja *Listeria innocua* –bakteereita.

Laboratoriolla on nykyisin käytössään akkreditoitu kvantitatiivinen menetelmä *Listeria monocytogenes* –bakteerin määrittämiseen.

ASIASANAT:

Listeria monocytogenes, listerioosi, kvantitatiivinen analyysi, validointi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2012 | Total number of pages: 32 + 23

Instructors: Kai Rosenberg, M.Sc., Kirsi Weckman, M.Sc.

Matti Riihiaho

LISTERIA MONOCYTOGENES – VALIDATION OF QUANTITATIVE METHOD

Listeria monocytogenes is a pathogenic bacterium examined in food laboratories, and may at the worst even cause death in humans. *Listeria monocytogenes* is a Gram-positive bacterium, which is commonly found in soil, animals, plants, water, and feed. The *Listeria* genus includes seven species, of which *L. monocytogenes* is the only one that can cause food poisoning in humans. Risk groups include immune depressed people, such as the elderly, pregnant women, newborns, and AIDS patients.

The quantitative determination of *Listeria monocytogenes* is based on ISO standard 11290-2:1998, which has been amended in: Amendment 1:2004. The ISO 11290-2 method and the introduction of accreditation are favoured by the microbe criterion regulation (EC 2073-2005), according to which the method complies with the standard method recommended for use in accredited laboratories.

The purpose of this thesis was to provide validation of reference values for the parameters, describing the reliability of the method. The validation included the validation plan, the practical part, the results recorded and analyzed, and the validation report.

Three different sample matrixes were chosen for the validation, which were inoculated with *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* bacteria.

As a result, the laboratory now has an accredited quantitative method for *Listeria monocytogenes* determination.

KEYWORDS:

Listeria monocytogenes, listeriosis, quantitative analysis, validation

SISÄLTÖ

| | |
|--|-----------|
| KÄYTETYT LYHENTEET | 7 |
| 1 OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT | 8 |
| 1.1 Rauman ympäristölaboratorio | 8 |
| 2 LISTERIA | 9 |
| 2.1 <i>Listeria spp.</i> | 9 |
| 2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> | 9 |
| 2.3 <i>Listeria monocytogenes</i> elintarvikkeissa | 9 |
| 2.4 Listerioosi | 10 |
| 3 MIKROBIOLOGISEN MENETELMÄN VALIDOINTI | 12 |
| 3.1 Menetelmän validointi | 12 |
| 3.2 Mikrobiologisiin menetelmiin liittyvä epävarmuus | 12 |
| 3.3 Validointiin liittyvät suureet | 13 |
| 3.3.1 Määritysraja | 14 |
| 3.3.2 Toistettavuus | 14 |
| 3.3.3 Uusittavuus | 15 |
| 3.3.4 Spesifisyys | 15 |
| 3.3.5 Suhteellinen oikeellisuus | 15 |
| 3.3.6 Laskennan toistotarkkuus | 15 |
| 3.3.7 Menetelmän saanto | 16 |
| 4 STANDARDI ISO 11290-2:1998 JA AMENDMENT 1: MODIFICATION OF THE ENUMERATION MEDIUM | 17 |
| 5 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS | 18 |
| 5.1 Määritettävät suureet | 18 |
| 5.1.1 Määritysraja | 18 |
| 5.1.2 Toistettavuus | 18 |
| 5.1.3 Uusittavuus | 19 |
| 5.1.4 Spesifisyys | 19 |
| 5.1.5 Suhteellinen oikeellisuus | 20 |
| 5.1.6 Laskennan toistotarkkuus | 20 |
| 5.1.7 Menetelmän saanto | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2 Näytematriisit | 21 |
| 5.3 <i>Listeria monocytogenes</i> ja <i>innocua</i> -puhdasviljelmien laimennussarjat | 21 |
| 5.4 Matriisien valmistus, niihin siirrostettavat pitoisuudet, siirrostus sekä ALOA-maljojen valaminen ja viljely | 23 |
| 5.5 Maljojen lukeminen | 24 |
| 5.6 <i>Listeria monocytogenes</i> varmistustestit | 24 |
| 6 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET | 26 |
| 6.1 Määritysraja | 26 |
| 6.2 Toistettavuus | 26 |
| 6.3 Uusittavuus | 27 |
| 6.4 Spesifisyys | 28 |
| 6.5 Suhteellinen oikeellisuus | 28 |
| 6.6 Laskennan toistotarkkuus | 29 |
| 6.7 Saanto | 29 |
| 6.8 Johtopäätökset | 30 |
| LÄHTEET | 32 |

LIITTEET

- Liite 1. Pipetointi- ja ympäyestaulukko.
- Liite 2. Validointitulokset.
- Liite 3. Listerian pitoisuustestaukset.
- Liite 4. Validointisuunnitelma.
- Liite 5. Validointiraportti.
- Liite 6. Työohje M10.

KUVAT

| | |
|--|----|
| Kuva 1. Laimennuskaavio. | 22 |
| Kuva 2. <i>L. monocytogenes</i> -pesäkkeitä ALOA-agarilla. | 24 |

TAULUKOT

| | |
|--|----|
| Taulukko 1. Toistettavuusmääritysten tulokset. | 27 |
| Taulukko 2. Uusittavuusmääritysten tulokset. | 27 |
| Taulukko 3. Laskennan toistotarkkuus. | 29 |

KÄYTETYT LYHENTEET

| | |
|--------|---|
| ISO | International Standard Organization |
| FINAS | Finnish Accreditation Service |
| EVIRA | Elintarvikevirasto |
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome |
| pmy | pesäkkeen muodostama yksikkö |
| PALCAM | Polymixin, Acriflavine, Lithium chloride, Ceftazidime, Aesculin Mannitol, agar |
| ALOA | Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti |
| SLV | Livsmedelsverket (National food agency) |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| halo | läpikuultava rengas listeriapesäkkeen ympärillä ALOA- agarilla |
| o/n | Yön yli (over night) |

1 OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT

Opinnäytetyöni lähtökohtana oli validoida käyttöön uusi menetelmä *Listeria monocytogenes* -bakteerin kvantitatiiviseen, eli määrälliseen määrittämiseen. Uusi menetelmä perustuu ISO 11290-2:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Enumeration method –standardiin ja siihen tulleeeseen lisäykseen: Amendment 1: Modification of the enumeration method. Validointi tehtiin ISO-menetelmän mukaisesti, koska se on ensisijainen mikrobikriteeriatuksen määrittelemä menetelmä *Listeria monocytogenes* -bakteerin määrittämiseksi.

Laboratoriolle oli tärkeää saada validointi ja siihen liittyvä raportti sekä suunnitelma valmiiksi kevääksi 2012, jotta uusi menetelmä ehtisi silloin järjestettävään akkreditointitarkastukseen. Tein käytännön osuuden 2011 touko- ja syyskuussa sekä kirjallisen osuuden 2011-2012 syksyn ja kevään aikana. Validointiraportin, validointisuunnitelman, työohjeen ja taulukoiden viimeistelyyn osallistui myös Kirsi Weckman Rauman ympäristölaboratoriolta.

1.1 Rauman ympäristölaboratorio

Rauman ympäristölaboratorio on nykyaikainen FINAS-akkreditointipalvelun akkreditoima laboratorio T126, jonka EVIRA on hyväksynyt viralliseksi tutkimuslaitokseksi.

Laboratoriolla on valmiudet tutkia näytteiden mikrobiologiset ja kemialliset ominaisuudet sekä tehdä aistinvaraisia arviointeja.

Laboratoriossa tutkitaan viranomaisten, yksityisten ja yritysten tuomia näytteitä.¹

2 LISTERIA

2.1 *Listeria spp.*

Listeriasukuun kuuluu kuusi lajia: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* ja *L. gray*. *L. monocytogenes* –laji on suvun ensisijainen ihmis- ja eläinpatogeeni, joskin *L. ivanovii* ja *L. seeligeri* on joskus yhdistetty humaanilisterioositapauksiin ja *L. ivanovii* lisäksi erityisesti jyräjien listerioositapauksiin.^{2,3}

2.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes on lyhyt, gram-positiivinen, pyöreäpäinen, itiöitä muodostamaton sauva, joka pystyy liikkumaan lämpötiloissa +22 - 28 °C:ssa flagellojensa avulla. Korkeammassa lämpötiloissa, kuten +37 °C:ssa bakteeri ei kykene enää liikkumaan⁴. *L. monocytogenes* esiintyy normaalisti luonnossa ja sillä on kyky sopeutua ja selviytyä haastavissa ympäristöissä, joissa on esimerkiksi korkea suolapitoisuus (10 % NaCl). *L. monocytogenes* ei myöskään ole kovin riippuvainen oikeasta pH:sta, eikä lämpötilasta, sillä se kykenee lisääntymään -1 – +45 °C:ssa. Tämä lisää bakteerin lisääntymisriskiä erityisesti elintarvikkeissa, kuten leikkeleissä, kalatuotteissa ja pastöroimattomissa maitotuotteissa³. Eri-laisten olosuhteiden sietokyky onkin merkittävä syy listerian tarkkaan valvontaan elintarvikkeissa.

2.3 *Listeria monocytogenes* elintarvikkeissa

L. monocytogenes on yleinen, luonnossa esiintyvä bakteeri joka sietää poikkeuksellisen hyvin erilaisia ääriolosuhteita, minkä takia bakteeri on elintarviketuotannon kannalta ongelmallinen. *L. monocytogenes* –bakteeria esiintyy maaperässä, vesissä, kasveissa ja eläimissä.²

L. monocytogenes –bakteeria on todettu maitotuotteista, erityisesti raaka-maidosta valmistetuista koska pastörintiprosessi tuhoaa listeriabakteereja, sekä lihatuotteista, kalatuotteista ja vihanneksista. Myös kuumakäsitellyistä tuotteista todetaan listeriaa, koska *L. monocytogenes* –bakteeri voi jälkisaastuttaa valmiin tuotteen. Jälkisaastumisen riski kasvaa sitä suuremmaksi, mitä enemmän valmiita tuotteita on käsitelty valmistuksen jälkeen. Tämä voidaan estää käsittelemällä raakaa ja valmista tuotetta eri välineillä ja alueilla noudattaen hyvää tuotantohygieniaa.²

Vähittäismyynnissä olevissa tuotteissa *L. monocytogenes* -pitoisuus ei saa ylittää pitoisuutta 100 pmy/g, joka on lakisääteinen raja-arvo. Yleensä pitoisuudet ovat pieniä, alle 100 pmy/g, mutta riskielintarvikkeissa pitoisuus voi kasvaa suureksi. Esimerkiksi vähittäismyynnissä olleista kylmäsavukirjohinäyhteistä on Suomessa todettu jopa yli 10 000 pmy/g pitoisuuksia ennen viimeistä käyttöpäivää ja maahan saapuneesta homejuustosta 180 000 pmy/g.²

Uudet pakkaustavat, vähäisen lisäaineiden ja suolapitoisuuden suosiminen sekä myynti- ja kylmäketjujen pidentyminen kaikki vaikuttavat listerian säilyvyyteen ja lisääntyvyyteen erityisesti riskielintarvikkeissa. Tämänlaisia riskielintarvikkeita ovat kuumentamatta syötäväksi tarkoitettut tuotteet, kuten tyhjiöpakatut kylmäsavustetut ja graavisuolatut kalatuotteet. Näillä on usein pitkä myyntiaika ja niiden valmistusprosessi ei tuhoa listeriaa, joka pystyy elämään ja lisääntymään hapettomissakin olosuhteissa. Erilaisia pehmeitä tuorejuustoja ja homejuustoja pidetään myös riskielintarvikkeina.²

2.4 Listerioosi

Listerioositapaukset ovat viime vuosien aikana lisääntyneet Suomessa, kuten myös useissa muissakin Euroopan maissa⁵. *L. monocytogenes* –bakteeri tuli tunnetuksi 1980-luvun alussa elintarvikkeiden välityksellä leviävänä taudinaiheuttajana ja niitä pidetäänkin nyt tärkeimpänä tartunnanaiheuttajana ihmiselle. Listeriaepidemioita on maailmalla esiintynyt useitakin vuosien aikana, esimerkiksi Ranskassa sairastui 279 ja kuoli 85 porsaan kielipateen aiheuttamaan lis-

terioosiin ja Italiassa sairastui 1594 maissin aiheuttamaan listerioosiin. Yksittäiset listerioositapaukset jäävät kuitenkin usein selvittämättä, koska taudin itämisaika voi olla jopa kuukausia.²

Listeriabakteerin ihmiselle aiheuttamat infektiot, listerioosit voidaan eritellä kolmeen ryhmään: 1. vakava infektio, 2. suolisto-oireet, 3. paikallinen ihoinfektio. Taudille ovat erityisen alttiina henkilöt, joiden vastustuskyky on alentunut. Vastustuskyky voi olla alentunut AIDS-potilailla tai henkilöillä joilla on syöpälääkitys. Myös elinsiirrot, sokeritauti, krooninen munuais- ja maksatauti ja kortisonilääkitys voivat alentaa vastustuskykyä. Alentunut vastustuskyky tavallisimmin johtaa siihen, että listerioosi ilmenee aivokalvon tulehduksena tai vakavana yleisinfektiona. Vastasyntyneillä, raskaana olevilla ja vanhuksilla on myös lisääntynyt riski sairastua. Riskiryhmiin kuuluville *L. monocytogenes* –bakteeri tavallisimmin aiheuttaa influenssan kaltaisia oireita, kuten kuumeilua, päänsärkyä ja lihaskipuja. Vakavimmat seuraukset ovat ennenaikainen synnytys, keskenmeno tai vastasyntyneen infektio.⁶

L. monocytogenes -bakteerin infektiivinen annos ei ole tiedossa, mutta todennäköisesti pienet määrät (<100 pmy/g) eivät aiheuta kliinistä sairautta. Erilaisten tutkimusten perusteella on arvioitu, että terveelle aikuiselle tai lapselle ruoka joka sisältää suuria, yli 10^4 pmy/g pitoisuuksia *L. monocytogenes* –bakteeria, voi aiheuttaa kuumeisen vatsataudin tai vain ohimenevän suolistokantajuuden.^{5,6}

Listeria tuhoutuu, kun elintarvike kuumennetaan yli +70 °C:seen. Tämän takia ruoka, etenkin liha tulisi kypsentää hyvin ennen syömistä. Myös pakastevihannekset tulisi kuumentaa ennen nauttimista ja viimeisen käyttöpäivän ylittäneitä elintarvikkeita ei tulisi käyttää. Raakana syötäviä elintarvikkeita tulisi säilyttää vain lyhyen aikaa ja avatut tuotteet tulee käyttää mahdollisimman pian. Kalatuotteet, kuten mäti ja raaka kala pitää säilyttää 0 – +3 °C:n lämpötilassa.^{2,6}

3 MIKROBIOLOGISEN MENETELMÄN VALIDOINTI

3.1 Menetelmän validointi

Ennen kuin uutta menetelmää otetaan laboratorioissa käyttöön, se on validoitava tarkoituksenmukaisin menetelmin. Mikrobiologisen menetelmän validoinnin tarkoituksena on todistaa menetelmän toimivuus ja sen antamien tulosten oikeellisuus laboratorioissa. Yleisesti ottaen validointi on siis menetelmän kelpoisuuden osoittamista.

Validointi on vertailuarvojen tuottamista suureille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Mikrobiologiassa tällaisia suureita ovat määrittäjäraja, lineaarisuus, spesifisyys, oikeellisuus ja täsmällisyys, johon sisältyvät toistettavuus ja uusittavuus. Koska mikrobiologisten menetelmien validoimiseksi ei vielä ole olemassa kansainvälisesti hyväksytyjä ohjeita eikä myöskään kriteerejä, on toistaiseksi validoinnissa tyydyttävä hankkimaan tuntumaa menetelmän käyttöön liittyviin epävarmuustekijöihin ja kuvaamaan niitä numeerisesti.⁷

Eri menetelmien validoimiselle asetetut vaatimukset vaihtelevat menetelmän ja sen käyttötarkoituksen mukaan. Menetelmän kehittäjä suorittaa yleensä täydellisen validoinnin, joka edellyttää laajoja laboratorioiden välisiä tutkimuksia, jonka takia laboratorioissa validointi liittyy yleensä standardimenetelmien ja muiden yleisesti käytössä olevien menetelmien käyttöönottoon. Tämän vuoksi validointi voidaan suorittaa suppeahkona, dokumentoituna menettelyinä, jonka tarkoituksena on osoittaa, että laboratorio hallitsee menetelmän.⁷

3.2 Mikrobiologisiin menetelmiin liittyvä epävarmuus

Mikrobiologiset ja kemialliset analyysit poikkeavat toisistaan periaatteellisesti. Kemiallisessa analyysissä pyritään uuttamalla, liuottamalla, saostamalla ym. menettelyillä erottamaan analyysi matriisista. Jos analyysiä joudutaan laimentamaan, se tehdään näiden vaiheiden jälkeen. Laimennetun näytteen hiuk-

kaspitoisuus on usein suuri, joten satunnainen hajonta vaikuttaa kemiallisissa analyysissä hyvin vähän tuloksiin.

Mikrobiologiassa näyte analysoidaan kaikkien taustahäiritsijöiden kanssa. Analyysin erottelu tapahtuu vasta kasvatusalustalla, jonka koostumus ja kasvatusolosuhteet määrittelevät menetelmän spesifisyyden, johon lisäksi vaikuttaa vielä tutkittavien mikrobikantojen ominaisuuksien vaihtelu. Mikrobiologiassa kvantitatiivisessa määrittämisessä näyte joudutaan laimentamaan sellaiselle pitoisuustasolle, että on ylipäätään mahdollista laskea yksittäisten pesäkkeiden muodostamat yksiköt. Tämä tarkoittaa sitä, että solumäärän tulee olla korkeintaan satoja tutkittavassa näytemäärässä. Kun solumäärä on satoja näytemäärässä, rinnakkaisanalyysien pesäkemäärät voivat vaihdella suurestikin ilman, että kyseessä on virhe.⁷

Oikeellisuuden, eli täsmällisesti oikean tuloksen määrittäminen mikrobiologisessa tutkimuksessa on vaikeaa. Mikrobit ovat eläviä organismeja, eikä niistä pystytä tekemään standardisoituja valmisteita joiden todellinen pitoisuus olisi tiedossa, saati pysyisi muuttumattomana. Oikeana tuloksena mikrobiologiassa pidetään menetelmän keskiarvotuloksen ja hyväksytyn arvon lähekkäisyyttä.⁷

Merkittävimpiä epävarmuustekijöitä on homogenointi, joka tehdään usein koneellisesti ja se saattaa tuhota mikrobeja. Toisaalta käsin homogenointi, eli näytteen puristelu ei irrota mikrobeja niin tehokkaasti tutkittavasta materiaalista. Tämän vuoksi etenkin kiinteitä näytteitä tutkittaessa esiintyy voimakasta hajontaa. Analyysitulosten hajontaa lisäävät myös työntekijöistä johtuvat työskentelyerot, esimerkiksi pesäkkeiden lukemiserot, näytteen pipetoinnissa tapahtuvat erot ynnä muut.⁷

3.3 Validointiin liittyvät suureet

Tähän kvantitatiiviseen validointiin liittyviä suureita ovat määrittämiss raja, toistettavuus, uusittavuus, spesifisyys, suhteellinen oikeellisuus, laskennan toistotarkkuus ja saanto.

Menetelmän validointiin on otettu myös muita suureita huomioon validointiohjeen ulkopuolelta, kuten esimerkiksi laskennan toistotarkkuus ja saanto. Laskennan toistotarkkuus on yksi oleellinen suure määritettäessä laboratorion mittausepävarmuutta, joka koostuu useasta mittausepävarmuutta aiheuttavasta suureesta. Saannon määrittäminen on tärkeää siksi, että voidaan osoittaa laboratorion pystyvän menetelmällä saamaan alkuperäistä pitoisuutta vastaavia tuloksia. Joitakin suureita vaihdettiin, koska menetelmän kehittäjä on jo validoinut menetelmän täydellisesti. Täydelliseen validointiin liittyy laajoja laboratorioden välisiä tutkimuksia. Yksittäisissä laboratorioissa validointi liittyykin yleensä standardimenetelmien ja muiden yleisesti käytössä olevien menetelmien käyttöönottoon.⁷ Tällä validoinnilla halutaan osoittaa Rauman ympäristölaboratorion kykyä käyttää menetelmää luotettavasti ja toistettavasti.

3.3.1 Määrittämiss raja

Määrittämiss raja on alhaisin mikrobipitoisuus, joka pystytään kvantitatiivisesti määrittämään validoitavalla menetelmällä. Kiinteitä näytteitä tutkittaessa määrittämiss raja on yleensä < 10 pmy/g (maljavalu) tai < 100 pmy/g (pintalevitys) ja nestemäisiä näytteitä tutkittaessa vastaavasti < 1 pmy/ml (maljavalu) tai < 10 pmy/ml pintalevitys. Määrittämiss rajaa voidaan tarpeen vaatiessa alentaa lisäämällä näyttemäärää ja rinnakkaisia määrittämiss raitoja.⁷

3.3.2 Toistettavuus

Toistettavuus tarkoittaa peräkkäisten toistojen antamien tulosten lähekkäisyyttä kun tutkitaan identtisiä näytteitä ja kun analyysi on suoritettu samalla menetelmällä, samoissa olosuhteissa ja samojen henkilöiden tekemänä lyhyellä aikavälillä.⁷

3.3.3 Uusittavuus

Uusittavuus tarkoittaa yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyyttä eri henkilöiden tutkiessa identtisiä näytteitä käyttäen samoja menetelmiä.⁷

3.3.4 Spesifisyys

Spesifisyys tarkoittaa kvantitatiivisen sekä kvalitatiivisen menetelmän kykyä löytää tutkittava mikrobi häiritsevien tekijöiden, kuten muiden mikrobien vaikutuksesta huolimatta.⁷

Jos menetelmä määrittäisi vain analysoitavan mikrobin, voitaisiin sitä sanoa täydellisen spesifiseksi menetelmäksi. Käytännössä tällaisia ei ole, vaan menetelmää validoitaessa on opittava tunnistamaan tyypilliset pesäkkeet analyysiä häiritsevän epätyypillisen kasvun joukosta pesäkkeitä varmistamalla.⁷

3.3.5 Suhteellinen oikeellisuus

Menetelmän antamien tulosten oikeellisuuden tutkiminen edellyttää tietoa analysoitavan mikrobin todellisesta pitoisuudesta. Koska mikrobiologiassa analytti on elävää materiaalia, ei sen todellista pitoisuutta eikä validoitavan menetelmän antamien tulosten oikeellisuutta pystytä varmuudella määrittämään. Parhaimmillaan tilanne olisi se, että voitaisiin käyttää sertifioituja referenssimateriaaleja, joiden pitoisuutta pidetään oikeana tuloksena. Käytännössä oikeellisuus joudutaan usein määrittämään kuitenkin käyttämällä siirrostettuja näytteitä puhdasviljelmistä.⁷

3.3.6 Laskennan toistotarkkuus

Laskennan toistotarkkuus kuvaa laboratorion työntekijöiden petrimaljoilta laskemien pesäkemäärien lähekkäisyyttä.⁷

3.3.7 Menetelmän saanto

Menetelmän saannolla tarkoitetaan menetelmällä saatujen analyysitulosten prosenttiosuutta bakteereiden oikeasta konsentraatiosta.⁸

4 STANDARDI ISO 11290-2:1998 JA AMENDMENT 1: MODIFICATION OF THE ENUMERATION MEDIUM

Standardi on standardisoimisjärjestöjen laatima asiakirja, joka on yhteisesti sovittu ratkaisu usein toistuvan tehtävän yhdenmukaiseksi suorittamiseksi. Ne ovat yleensä luonteeltaan suosituksia, mutta viranomaiset voivat kuitenkin määrätä joidenkin standardien noudattamisen pakolliseksi. Pakolliseksi määrätty standardit koskevat yleensä ihmisten terveyttä tai turvallisuutta.

Standardien tarkoitus on nopeuttaa työtä, vähentää virheitä ja väärinkäsityksiä sekä auttaa saamaan parempia käytännön tuloksia.

ISO on laaja-alaisin maailmanlaajuinen standardisoimisjärjestö, jonka standardien tunnusmerkkinä on merkintä ISO. Tunnusmerkin jälkeen tulee standardin numero ja vahvistusvuosi. ISON jäseniä ovat kansalliset standardisoimisjärjestöt 148 maasta.^{9,10}

Standardi ISO 11290-2:1998, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method, käsittelee kvantitatiivista, eli määrällistä analyysiä elintarvikkeista ja eläinten rehuista. Standardissa kerrotaan yksityiskohtaisesti menetelmän periaate, suoritus, tarvittavat laitteet, lämpötilat, näytteenottotavat, käytettävät reagenssit, elatusaineet, tulosten ilmoittaminen ja kaikki mitä menetelmän suorittamisessa vaaditaan. Standardissa on ohjeet *Listeria monocytogenes* –bakteerin määrälliseen määrittämiseen niin kiinteistä kuin nestemäisistä näytteistä. Opinnäytetyössä käsiteltiin kuitenkin vain kiinteitä näytteitä, eli tulokset saadaan muodossa pmy/g.¹¹

Amendment 1: Modification of the enumeration method on vuonna 2004 ilmestynyt lisäys alkuperäiseen standardiin, jossa elatusaine vaihtuu PALCAM-agarista ALOA-agarin, sekä inkubaatiolämpötila vaihtuu +37 °C:seen sen sijaan että valittavana olisi lämpötila +35 – 37 °C:n väliltä.¹²

5 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

5.1 Määritettävät suureet

Validoinnissa määritettiin seitsemän suuretta, joita olivat määritysraja, toistettavuus, uusittavuus, spesifisyys, suhteellinen oikeellisuus, laskennan toistotarkkuus ja saanto. Validointi suoritettiin siirrostamalla *L. monocytogenes* ja *L. innocua* –bakteereita kolmeen eri näytematriisiin. Matriiseita analysoimalla uudella menetelmällä ja vertaamalla siirrostettuun listeriapitoisuuteen, saatiin tuloksia joiden avulla pystyttiin matemaattisten kaavojen avulla selvittämään, onko validoitava menetelmä tarpeeksi luotettava. Joidenkin suureiden laskemiseksi käytettiin referenssimateriaalina myös SLV:n ampullia ”P/2008 Food”.

5.1.1 Määritysraja

Määritysraja on alhaisin mikrobipitoisuus, joka voidaan määrittää luotettavasti validoitavalla menetelmällä. ISO 11290-2:1998 –standardissa mainittu alhaisin määritysraja on nestemäisillä näytteillä 10 pmy/ml ja kiinteillä 100 pmy/g. Validoinnissa päätettiin alentaa määritysrajaa viljelemällä siirrostilavuudeltaan myös 1 ml:n näytteitä rinnakkain 0,1 ml:n lisäksi, jolloin määritysrajaa saatiin laskettua kiinteillä näytteillä 10 pmy/g:aan ja nestemäisillä 1 pmy/ml:aan.

Määritysraja määritettiin siirrostamalla tutkittavaan näytematriisiin, maitojuustoon, 10 pmy/g sekä *L. monocytogenes* että *L. innocua* –bakteereita.

5.1.2 Toistettavuus

Toistettavuus määritettiin laskemalla suure ”Sr” SLV:n ampullista saaduista viljelytuloksista kaavalla: $Sr = \sqrt{\frac{\sum(x-ka)^2}{n-1}}$, jossa ”x” on saadun mikrobiluvun logaritmi, ”ka” mikrobilukujen logaritmien keskiarvo ja ”n” tulosten lukumäärä, kun

ääriarvot on poistettu. Toistettavuusarvon ollessa välillä 0,10 – 0,15 toistettavuus oli hyvä.

5.1.3 Uusittavuus

Uusittavuus määritettiin neljän eri henkilön saamista rinnakkaismääritystuloksista. Näytteet merkittiin tunnuksin ”A, B ja C”, jonka vuoksi laborantit tai mikrobiologi eivät tiedäneet, mikä oli näytteiden todelliset bakteeripitoisuudet. Uusittavuuskokeeseen osallistui neljä laboratorion mikrobiologian osaston työntekijää. Matriisina uusittavuus- ja laskennan toistotarkkuuskokeissa käytettiin ylikypsää kinkkua.

Kaikki osaston laborantit ja mikrobiologi tutkivat rinnakkain kolme näytettä (A, B, C) viljelemällä samasta näytteestä kaksi 0,1 ml:n siirrosta kahdelle eri maljalle ja yhden 1 ml näytteen jaettuna kolmelle maljalle. Yhdestä näytteestä viljeltiin yhteensä viidelle maljalle ja kukin osallistuja viljeli yhteensä siis 15 maljaa.

Kvantitatiivisten menetelmien uusittavuutta voitiin kuvata laskemalla suhteellisen keskihajonnan keskineliö (RSD_c). Suhteellisen keskihajonnan keskineliön ollessa $<0,25$, katsottiin että uusittavuus on hyvä.

5.1.4 Spesifisyys

ALOA-agarilla ei valmistajan mukaan kasva muut kuin *Listeria*-sukuiset bakteerit, sekä jotkut *Bacillus cereus* -suvun bakteerit. *B. cereus* -suvun bakteerit kasvavat kuitenkin epätyypillisinä, matalina, epäsymmetrisinä ja ne voivat olla väriltään kaikkea valkoisesta siniseen, sekä niillä on suuri vahva halo. Validointi suoritettiin kolmella eri matriisilla, jotka itsessään sisältävät taustaflooraa ja matriiseihin lisättiin *L. innocua* -bakteereita häiritseväksi taustatekijöiksi. Jos maljoilla kasvaa muita kuin *Listeria*-bakteereita, ja varmistustestit osoittavat että tyypilliset pesäkkeet osoittautuvat *L. monocytogenes* -bakteereiksi, voidaan näiden seikkojen perusteella osoittaa agarin spesifisyys.

L. ivanovii -bakteeri on ainoa, joka muodostaa pesäkkeitä joiden pesäkemorfologia on samankaltainen *L. monocytogenes* -bakteerin kanssa. Näiden erottamiseksi käytettiin API-Listeria -testiä.

5.1.5 Suhteellinen oikeellisuus

Oikeellisuus määritettiin käyttämällä SLV:n referenssiampullia, jonka bakteeripitoisuudet tunnettiin. Vertaamalla maljoilta saatujen analyysitulosten keskiarvoa annettuun bakteeripitoisuuteen, voitiin tuloksia vertailemalla saada lukuarvoja suhteellisen oikeellisuuden määrittämiseksi.

5.1.6 Laskennan toistotarkkuus

Laskennan toistotarkkuus määritettiin eri laboranttien samoista petrimaljoilta laskemien pesäkemäärien lähekkäisyyden perusteella. Kriteeriksi Rauman ympäristölaboratoriossa laskennan toistotarkkuudelle on asetettu $RSD_c < 0,1$, jolloin vaihtelukerroin laskentojen välillä on pienempi kuin 10 %.

Laskennan toistotarkkuuden määrittämiseen käytettiin samoja maljoja, kuin uusittavuuden määrittämiseen. Maljat koodattiin uudestaan eri nimillä, jotta laborantit eivät tieneet etukäteen, montako pesäkettä kullakin maljalla oli.

5.1.7 Menetelmän saanto

Menetelmän saanto määritettiin käyttämällä SLV:n referenssiampullia "SLV P/2008 Food". Ampulli sisälsi tunnetun määrän *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, ja *Staphylococcus saprophyticus* -bakteereita. Ampulli valmisteltiin ohjeiden mukaan ja viljeltiin kymmenelle rinnakkaiselle ALOA-maljalle. SLV:n ampullille oli annettu *L. monocytogenes* -pitoisuudelle vaihteluväli 13-100 pmy/ml, jonka sisälle analyysitulosten tulisi osua. Saanto laskettiin vertaamalla saatua analyysitulosten keskiarvoa vaihteluvälin keskiarvoon 56 pmy/ml.

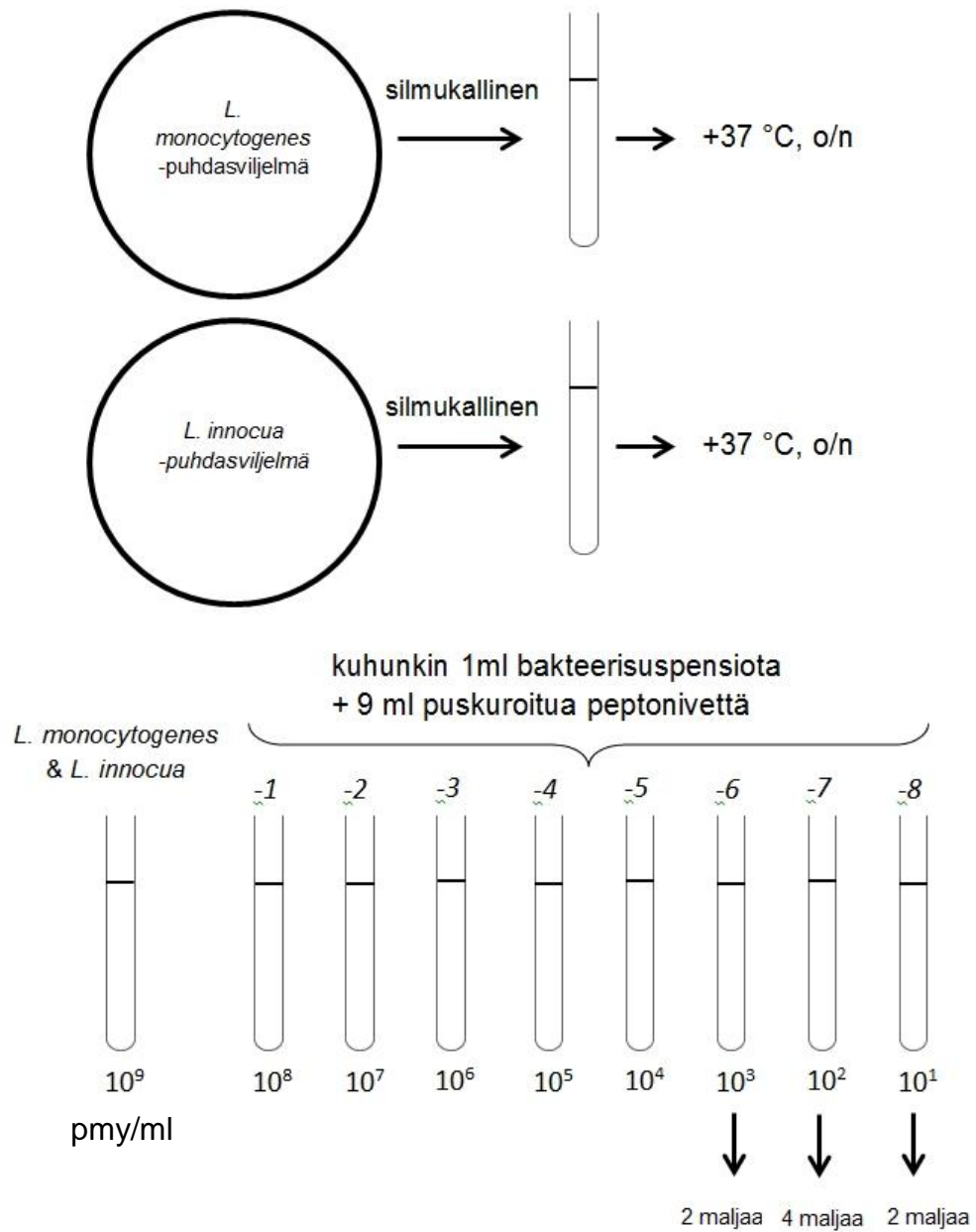
5.2 Näytematriisit

Näytematriiseina validoinnissa käytettiin kylmäsavustettua lohta, ylikypsää kinkkuleikkelettä, sekä maitojuustoa. Nämä olivat elintarvikkeita, joita laboratorio säännöllisesti tutkii ja joissa *L. monocytogenes* -bakteerin tiedettiin kasvavan helposti. Graavikala- ja kylmäsavukalavalmisteet olivat listerian suhteen riskielintarvikkeita, koska niiden valmistusprosessi ei tuhoa listeriaa ja ne syödään kuumentamatta sekä niiden myyntiaika on pitkä. Lisäksi tyhjiöpakkaus tarjoaa suotuisat kasvuolosuhteet listerialle. Maitojuusto voidaan tehdä pastöroimattomasta maidosta, jolloin pastörintitoimenpide ei tuhoa listeriaa elintarvikkeesta.

5.3 *Listeria monocytogenes* ja *innocua* -puhdasviljelmien laimennussarjat

Siirrostettiin tuoreesta *L. monocytogenes* ja *L. innocua* -puhdasviljelmistä silmukallinen bakteeria 10 ml:aan BHI-lientä eri koeputkiin. Putkia inkuboitiiin +37 °C yön yli, jonka jälkeen kasvatusten *L. monocytogenes* ja *L. innocua* -pitoisuus tulisi olla noin 10^8 - 10^9 pmy/ml.

Laimennettiin esikasvatuksia puskuroidulla peptonivedellä 10^{-8} -putkeen asti. Molempien bakteerien laimennoksista 10^{-6} , 10^{-7} , ja 10^{-8} maljattiin omille rinnakkaisille verimaljoille 0,1 ml kasvatusten todellisten listeriapitoisuuksien määrittämiseksi (10^{-6} -putkesta 2 maljaa, 10^{-7} -putkesta 4 maljaa ja 10^{-8} -putkesta 2 maljaa). Maljoja inkuboitiiin 24h +37 °C, jonka jälkeen kasvatusten todellinen *L. monocytogenes* ja *L. innocua* -pitoisuudet laskettiin maljoilla olevien pesäkkeiden perusteella.



Kuva 1. Laimennuskaavio.

5.4 Matriisien valmistus, niihin siirrostettavat pitoisuudet, siirrostus sekä ALOA-maljojen valaminen ja viljely

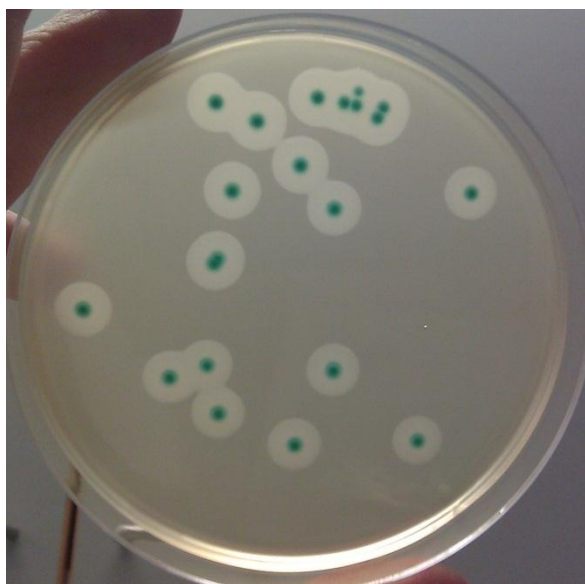
Matriiseihin siirrostettavat pitoisuudet tulee valita siten, että päästään mahdollisimman pieneen määritysrajaan, ja toisaalta taas myös korkeat *L. monocytogenes* –pitoisuudet tulee pystyä lukemaan maljoilta luotettavasti.

Matriisit valmistettiin punnitsemalla matriisia 10 g seitsemään eri Stomacher-pussiin. Sen jälkeen lisättiin matriiseihin bakteerisuspensiota liitteen 1 mukaisista laimennosputkista. Yksi matriisi on nollanäyte, johon ei lisätä ollenkaan listeriaa. Homogenisoitiin pussin sisältö käsin puristelemalla ja annettiin bakteerien tottua ympäristöönsä seisottamalla matriiseja 30 min huoneenlämmössä. Seisottamisen jälkeen lisättiin Stomacher-pusseihin 90 ml:aa puskuroitua peptonivettä ja homogenisoitiin Stomacher-laitteella hitaalla nopeudella (200 rpm, 15 s), etteivät listeriasolut vahingoitu. Tämän jälkeen pussien annettiin seistä pöydällä huoneenlämmössä 1 h ± 5 min.

ALOA-maljoja kuivattiin valamisen jälkeen noin 15 minuuttia laminaarikaapissa, jotta bakteerisuspension imeytyminen agarille tehostuisi. Tämä oli tärkeää etenkin kun viljeltiin ALOA-agarille matriisista, jossa oli suuri pitoisuus *L. monocytogenes* –bakteeria. Ilman kuivausta suuret bakteerimäärät helposti levisivät elatusaineella siten, että niiden tarkka laskeminen oli käytännössä mahdotonta. Viljely ALOA-maljoille tehtiin homogenoinnin jälkeen liitteen 1 mukaan. ALOA-maljoja seisotettiin pöydällä pintaviljelyn jälkeen noin 15 minuuttia, jotta bakteerisuspensio ehtii imeytyä niihin. ALOA-maljojen inkubaatioaika ja lämpötila on 24 h +37 °C, mutta jos 24 tunnin kuluttua ei näy kunnollista haloa pesäkkeiden ympärillä, inkuboitiin maljoja toiset 24 h.

5.5 Maljojen lukeminen

Inkubointiajan kuluttua tarkistettiin kasvaako maljoilla *L. monocytogenes* –bakteerille tyypillisiä pesäkkeitä. *Listeria monocytogenes* kasvaa ALOA-maljalla sinivihreinä pesäkkeinä, joiden ympärillä on halo. *L. innocua* kasvaa myös sinivihreinä pesäkkeinä, mutta niiden ympärillä ei ole haloa. *L. ivanovii* ja jotkut *Bacillus cereus* –bakteerin kannat voivat muodostaa pesäkemorfologialtaan samantyyppisiä pesäkkeitä kuin *L. monocytogenes*, joten varmistustestit ovat tarpeen.



Kuva 2. *L. monocytogenes* -pesäkkeitä ALOA-agarilla.

5.6 *Listeria monocytogenes* varmistustestit

Varmistustestejä varten viljeltiin maljoilta vähintään viisi *L. monocytogenes* –bakteeriksi epäiltyä pesäkettä puhtaaksi naudanveriagarille. Veriagarilla kaikille β -hemolysoiville pesäkkeille tehtiin katalaasitesti. *L. monocytogenes* on katalaasipositiivinen, joten lisättäessä vetyperoksidia lasilevyllä siirrostetyn pesäkkeen päälle välitön kaasunmuodostus indikoi katalaasipositiivisuuden. Jos yksikin pesäke oli katalaasipositiivinen, siitä tehtiin API Listeria–tunnistustesti. Mikäli

varmistettava pesäke osoittautuu negatiiviseksi, varmistettiin yksitellen myös loput β -hemolysoivat, katalaasiposiitiviset pesäkkeet API Listeria –testillä.

6 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

6.1 Määrittämiss raja

Alhaisin pitoisuus josta *L. monocytogenes* -bakteeri saatiin esiin, oli 13 pmy. Tulos saatiin maitojuustonäytteestä johon oli ympätty 108 pmy/10g näytettä, eli noin 11 pmy/g. Menetelmän määrittämiss rajaksi Rauman ympäristölaboratoriossa saatiin 13 pmy/g. Kyseisessä pitoisuudessa kolmesta näytteestä yhden tulos oli negatiivinen. Pitoisuus 32 pmy/g saatiin maitojuuston tapauksessa esiin kaikista rinnakkaisista näytteistä. Leikkeleen ja kalan pienimmät kaikkien rinnakkaisnäytteiden tuloksista lasketut keskiarvopitoisuudet olivat 27 pmy/g ja 30 pmy/g.

Tarkempaan määrittämiss rajan määrittämiseen ei todettu tarvetta, sillä asiakkaat tilaavat *Listeria monocytogenes* –bakteerin kvantitatiivista analyysiä silloin, kun halutaan varmistua, että elintarvike täyttää mikrobikriteeriasetuksen EY 2073/2005 vaatimukset. Kaupasta ostettavien sellaisenaan syötävien elintarvikkeiden lakisääteinen raja-arvo *L. monocytogenes* –bakteereille viimeisenä käyttöpäivänä on 100 pmy/g. Vaikkakaan validoinnissa ei päästy standardissa mainittuun määrittämiss rajaan 10 pmy/g, on saavutettu määrittämiss raja tähän tarkoitukseen varsin riittävä.

6.2 Toistettavuus

Toistettavuus tarkoittaa analyysistä saatujen peräkkäisten tulosten lähekkäisyyttä identtisistä näytteistä. Mikrobiologiassa toistettavuus määritetään samasta näytteestä, samoilla välineillä ja saman henkilön tekemänä lyhyellä aikavälillä. Toistettavuus määritettiin käyttämällä SLV:n ampullia. Kvantitatiivisten menetelmien toistettavuutta, S_r , lasketaan kaavalla $S_r = \sqrt{\frac{\sum(x-ka)^2}{n-1}}$, jossa x on saadun tuloksen logaritmi, ka tulosten logaritmien keskiarvo ja n tulosten lukumää-

rä, kun ääriarvot on poistettu. Toistettavuusarvon ollessa välillä 0,10 – 0,15 toistettavuus on hyvä.

Taulukko 1. Toistettavuusmääritysten tulokset.

| Matriisi | Näytenro | Tulos (pmy/g) | log pmy/g (x) | x-ka | (x-ka) ² |
|-----------------------|----------|---------------|---------------|-------------|---------------------|
| SLV P/2008 Food | 1 | 40 | ääriarvo | ääriarvo | ääriarvo |
| | 2 | 34 | 1,53148 | -0,01756 | 0,00031 |
| | 3 | 32 | 1,50515 | -0,04389 | 0,00193 |
| | 4 | 33 | 1,51851 | -0,03053 | 0,00093 |
| | 5 | 35 | 1,54407 | -0,00497 | 0,00002 |
| | 6 | 25 | ääriarvo | ääriarvo | ääriarvo |
| | 7 | 34 | 1,53148 | -0,01756 | 0,00031 |
| | 8 | 38 | 1,57978 | 0,03074 | 0,00095 |
| | 9 | 40 | 1,60206 | 0,05302 | 0,00281 |
| | 10 | 38 | 1,57978 | 0,03074 | 0,00095 |
| | | keskiarvo = | 1,549039623 | summa = | 0,008201135 |
| | | | | Sr = | 0,034 |

Koska saatu Sr-arvo on vielä pienempi kuin 0,10, voidaan sanoa että menetelmän toistettavuus on erinomainen.

6.3 Uusittavuus

Kvantitatiivisten menetelmien uusittavuutta voidaan kuvata laskemalla suhteellisen keskihajonnan keskineliö RSD_o. Keskihajonnan keskineliön ollessa <0,25, katsotaan että uusittavuus on hyvä.

Taulukko 2. Uusittavuusmääritysten tulokset.

| PVM | Näyte | Lukija | | | | ka | s | RSD | RSD ² |
|-----------|-------|--------|------|-----|------|--|----------|-------------|------------------|
| | | JT | KW | HS | TR | | | | |
| 6.9.2011 | A | 80 | 130 | 90 | 90 | 97,5 | 22,17356 | 0,227421 | 0,052 |
| | B | 660 | 740 | 660 | 560 | 655,0 | 73,71115 | 0,112536 | 0,013 |
| | C | 1430 | 1030 | 970 | 1290 | 1180,0 | 216,9485 | 0,183855 | 0,034 |
| 23.1.2012 | SLV 1 | 360 | 360 | 470 | 480 | 417,5 | 66,52067 | 0,159331 | 0,025 |
| | SLV 2 | 620 | 505 | 630 | 540 | 573,8 | 61,01571 | 0,106345 | 0,011 |
| | SLV 3 | 470 | 480 | 670 | 395 | 503,8 | 117,1449 | 0,232546 | 0,054 |
| | | | | | | Suhteellisen keskihajonnan keskineliö RSD _c | | 0,18 | |

Uusittavuusmääritysten tulosten perusteella suhteellinen keskihajonnan keskineliö on 0,20, joten menetelmän uusittavuus on hyvä.

6.4 Spesifisyys

Spesifisyys on ALOA-agarilla erittäin hyvä ja se on suunniteltu nimenomaan listeriasuvun bakteereiden tutkimiseen. Validoinnin aikana ainoastaan yksi listeriasta poikkeava bakteerikanta kasvoi elatusaineella, eikä sekään haitannut listeriapesäkkeiden laskemista.

Elatusaineeseen on lisätty litiumkloridia ja tasapainotettua antimikrobista seosta, joiden ansiosta ei-haluttujen bakteerikantojen kasvu estyy.

ALOAn listeriaspesifisyys perustuu pääosin kahdelle biokemialliselle ominaisuudelle, jotka *L. monocytogenes* –bakteerilla on:

- fosfolipaasiaktiiviteetti, joka aiheuttaa samentuman *L. monocytogenes* –pesäkkeen ympärille
- β -glukosidaasiaktiiviteetti, jossa kromogeenisen substraatin hydrolyysi aiheuttaa sinivihreän värin *L. monocytogenes* –pesäkkeille

6.5 Suhteellinen oikeellisuus

SLV:n ampullille oli annettu *L. monocytogenes* –bakteerille logaritminen vaihteluväli 1,1 – 2,0 (log₁₀ pmy/ml). Tämä tarkoittaa samaa kuin 13-100 pmy/ml. Suhteellista oikeellisuutta voidaan tarkastella käyttäen logaritmista asteikkoa saadusta bakteerimäärän keskiarvosta 35. $\log 35 = 1,54$, joka osuu annetun 1,1 – 2,0 väliin hyvin. Verrattaessa saatua keskiarvotulosta teoreettisiin minimi ja maksimiarvoihin jotka SLV:n ampullista on annettu, saadaan saannoksi 77 – 138 %, joka on varsin riittävä saantoprosentti.

6.6 Laskennan toistotarkkuus

Laskennan toistotarkkuutta määritettäessä matriisina toimi kylmäsavulohi. RSD_c-luku oli Rauman ympäristölaboratoriolla 0,03 joka alittaa kriteeriksi asetetun 0,1:n selvästi. Tämä tarkoittaa, että laskennan toistotarkkuus on erinomainen. Laskennan toistotarkkuus on yksi oleellinen suure määritettäessä eri suureita, joista koostuu analyysin tekninen mittausepävarmuus. Siihen kuuluu esimerkiksi siirrostilavuuden epävarmuus ja punnitseminen.

Taulukko 3. Laskennan toistotarkkuus.

| PVM | Näyte | Tekijä | Lukija | | | | ka | s | RSD | RSB |
|--------------------|-------|--------|--------|----|----|----|------|--|-------------|--------|
| | | | JT | KW | HS | TR | | | | |
| 6.9.2011 | 666 | JT | 21 | 20 | 20 | 20 | 20,3 | 0,5 | 0,0247 | 0,001 |
| | 667 | JT | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | 668 | KW | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | 669 | KW | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 670 | KW | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| | 671 | HS | 5 | 5 | 4 | 5 | 4,8 | 0,5 | 0,1053 | 0,011 |
| | 672 | HS | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| | 673 | HS | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| | 674 | HS | 15 | 14 | 15 | 15 | 14,8 | 0,5 | 0,0339 | 0,001 |
| | 675 | HS | 30 | 29 | 28 | 30 | 29,3 | 0,957 | 0,0327 | 0,001 |
| | 676 | TR | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| | 677 | TR | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| | 678 | TR | 15 | 16 | 16 | 17 | 16 | 0,816 | 0,051 | 0,003 |
| | 679 | TR | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 | 0 |
| | 680 | TR | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| 25.1.2012 (SLV) | 171 | KW | 58 | 58 | 57 | 57 | 57,5 | 0,577 | 0,01 | 0,0001 |
| | 114 | KW | 65 | 65 | 65 | 65 | 65 | 0 | 0 | 0 |
| | 135 | TR | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 0 | 0 | 0 |
| | 126 | TR | 58 | 58 | 58 | 58 | 58 | 0 | 0 | 0 |
| | 106 | TR | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | Suhteellisen keskihajonnan keskineliö RSD _c | 0,03 | |

6.7 Saanto

Menetelmän saanto määritettiin SLV:n referenssiampulliviljelmällä ampullista ”SLV P/2008 Food”. Ampulli sisälsi *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, ja *Staphylococcus saprophyticus* –bakteereita. Ampulli liuotettiin ohjeiden mukaan peptoniveteen ja viljeltiin kymmenelle rinnakkaiselle

ALOA-maljalle. SLV:n ampullille oli annettu *L. monocytogenes* –pitoisuudelle vaihteluväli 13-100 pmy/ml. Kaikki rinnakkaismaljojen analyysitulokset osuivat annettuun vaihteluväliin ja maljaviljelyiden keskiarvoksi saatiin 35 pmy/ml. Vaihteluvälin keskiarvo on 56 pmy/ml, jonka perusteella laskettu saanto menetelmälle oli 62%. Saanto oli varsin kohtuullinen huomioon ottaen se, että ampulli oli lievästi jo vanhentunut (viimeinen käyttöpäivä maaliskuu 2010).

6.8 Johtopäätökset

Menetelmän luotettavuutta kuvaavat suuret määritettiin, ja kullekin suurelle asetetut kriteeriarvot saavutettiin. Validoinnin tiettyihin osiin (laskennan toistotarkkuus, uusittavuus) osallistuivat kaikki mikrobiologian osaston laborantit, joilla kullakin on vankka kokemus ALOA-agarin käytöstä. Tämä näkyy mm. laskennan toistotarkkuuden tuloksessa, joka on erinomainen.

ALOA-maljojen inkubointiaikaan liittyen on tärkeä huomioida, että maljat tarkistetaan kunnolla ensimmäisen 24 tunnin jälkeen. Kasvat pesäkkeet voidaan tällöin mahdollisesti havaita helpommin, mutta niitä on joka tapauksessa inkuboitava vielä toiset 24 h. Vaikkakin standardissa mainitaan että tulos voidaan lukea jo 24 tunnin jälkeen, on tärkeää inkuboida maljoja toiset 24 h, sillä joukossa saattaa olla stressaantuneita pesäkkeitä jotka eivät kasva yhtä nopeasti. Toisaalta pesäkkeiden laskeminen ensimmäisten 24 tunnin jälkeen on tärkeää myös siksi, että ALOAlla kasvavien pienten *L. monocytogenes* –pesäkkeiden ympärille muodostuvat halot on 24 tunnin jälkeen helpompi erottaa 48 tunnin kuluessa mahdollisesti kasvavien suuremmista, pesäkkeistä muodostuvien ryppäiden joukosta. Ryppäiden keskeltä voi myös joskus joutua ottamaan pesäkkeen puhdistettavaksi, joka on helpompi toimenpide, kun pesäkkeet ovat pienempiä ja erillään toisistaan.

Eri matriisit eivät vaikuttaneet menetelmän toimivuuteen merkittävästi. Maitujuusto oli ainoa matriisi, joka sisälsi itsessään sen kaltaista mikrobiflooraa, joka kasvoi ALOA-agarilla eivätkä nekään haitanneet tutkittavien bakteerien lukemis-

ta maljoilta, sillä ne kasvoivat valkoisina pesäkkeinä agarilla ja olivat helposti erotettavissa *L. monocytogenes* –pesäkkeistä.

ALOA-agar osoittautui validointiprosessissa hyvin selektiiviseksi elatusaineeksi, jolla ei kasvanut *L. monocytogenes*- ja *L. innocua* –bakteerien lisäksi kuin yksi muu tuntematon bakteeri, jota ei voinut sekoittaa edellä mainittujen bakteerien pesäkkeisiin johtuen niiden valkoisesta väristä. Kaikki *L. monocytogenes* –bakteereiksi epäillyt pesäkkeet osoittautuivat varmistuskokeissa juurikin niiksi, joten voidaan sanoa agarin luotettavuuden olevan erittäin hyvä.

Validointi onnistui ja menetelmä otettiin käyttöön Rauman ympäristölaboratoriossa.

LÄHTEET

-
- ¹ Rauman kaupunki (2011), internet lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 10.9.2011]. Saatavilla www-muodossa: http://www.rauma.fi/sosiaali-ja_terveyspalvelut/Terveyspalvelut/Ymparistolaboratorio/default.htm.
- ² Aalto, Juha-Matti [et al.] 2002, Mikrobiologian perusteita (toim:) Mirja Salkinoja-Salonen, Julkaistu: Helsinki : Helsingin yliopisto, s. 629-643.
- ³ Pallen, Mark J., Nelson, Karen E., Preston, Gail M., 2007, Bacterial pathogenomics, Julkaistu: Washington, DC. s. 361-362. Saatavilla www-muodossa: <http://site.ebrary.com/lib/turkuamk/Doc?id=10346900>.
- ⁴ Brooks, Geo. F., Carroll, Karen C., Butel, Janet, Morse Stephen, 2007, Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 24th edition, Julkaistu: McGraw-Hill Medical, s. 218.
- ⁵ Eläinlääkäripäivät, luentokokoelma 2011, julkaisija Fennovet Oy, s. 244-247.
- ⁶ Elintarviketurvallisuusvirasto (2011), internet lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 10.11.2011], saatavilla www-muodossa: http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia_aiheuttavia_bakteereja/listeriabakteeri.
- ⁷ Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Valvonta 13/1997. Helsinki: Elintarvikevirasto.
- ⁸ EUR-Lex –kotisivut (2012), internet lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 8.2.2012], saatavilla www-muodossa: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32002D0657:FI:HTML>.
- ⁹ Suomen Standardisoimisliiton kotisivut (2011), internet lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 17.11.2011], saatavilla www-muodossa: <http://www.sfs.fi>.
- ¹⁰ Finatexin kotisivut (2011), internet lähteisiin viittaaminen, [online, viitattu 17.11.2011], saatavilla www-muodossa: <http://www.finatex.fi>.
- ¹¹ ISO 11290-2:1998, 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method. First edition 1998-07-01. Switzerland.
- ¹² ISO 11290-2:1998, 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method. Amendment 1: Modification of the enumeration medium. Switzerland.

Pipetointi- ja ympäystäulukko

| Matriisit | Näytenumero | Käytettävä laimennos | Siirrostilavuus matriisiin /ml | Siirrostilavuus maljalle /ml | Haluttu <i>L. monocytogenes</i> pitoisuus /g |
|-----------|---------------|----------------------|--------------------------------|------------------------------|--|
| K,L,M | 0-näyte | - | - | 1 (3 maljalle) | 0 |
| | KML50A | (-7 putkesta) | 5 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 50 |
| | KML50B | (-7 putkesta) | 5 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 50 |
| | KML50C | (-7 putkesta) | 5 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 50 |
| | KML100A | (-6 putkesta) | 1 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 100 |
| | KML100B | (-6 putkesta) | 1 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 100 |
| | KML100C | (-6 putkesta) | 1 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 100 |
| | KML250A | (-6 putkesta) | 2,5 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 250 |
| | KML250B | (-6 putkesta) | 2,5 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 250 |
| | KML250C | (-6 putkesta) | 2,5 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 250 |
| | KML500A | (-6 putkesta) | 5 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 500 |
| | KML500B | (-6 putkesta) | 5 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 500 |
| | KML500C | (-6 putkesta) | 5 | 1 ml (3 maljaa) ja 0,1 ml | 500 |
| | KML1000A | (-5 putkesta) | 1 | 1 ml (3 maljalle) | 1000 |
| | KML1000B | (-5 putkesta) | 1 | 1 ml (3 maljalle) | 1000 |
| | KML1000C | (-5 putkesta) | 1 | 1 ml (3 maljalle) | 1000 |
| | KL1500A | (-5 putkesta) | 1,5 | 1 ml (3 maljalle) | 1500 |
| | KL1500B | (-5 putkesta) | 1,5 | 1 ml (3 maljalle) | 1500 |
| | KL1500C | (-5 putkesta) | 1,5 | 1 ml (3 maljalle) | 1500 |
| | M10A | (-7 putkesta) | 1 | 1 ml (3 maljalle) | 10 |
| M10B | (-7 putkesta) | 1 | 1 ml (3 maljalle) | 10 | |
| M10C | (-7 putkesta) | 1 | 1 ml (3 maljalle) | 10 | |

Validointitulokset

Näytetunnusten koodit: K=Kala, L=Leikkele, M=Maitojuusto. Kirjaimen perässä oleva numerosarja tarkoittaa haluttua pitoisuutta ja A,B,C rinnakkaisuutta.

| L.M arvioitu pitoisuus/g | L.M todettu pitoisuus/g veriagarilla | Koodi | Tulos pmy/g | KA |
|--------------------------|--------------------------------------|--------|-------------|-----|
| 50 | 27 | K50A | 20 | 31 |
| 50 | 27 | K50B | 64 | |
| 50 | 27 | K50C | 10 | |
| 100 | 53 | K100A | 50 | 60 |
| 100 | 53 | K100B | 90 | |
| 100 | 53 | K100C | 40 | |
| 250 | 133 | K250A | 200 | 194 |
| 250 | 133 | K250B | 191 | |
| 250 | 133 | K250C | 190 | |
| 500 | 267 | K500A | 455 | 442 |
| 500 | 267 | K500B | 500 | |
| 500 | 267 | K500C | 373 | |
| 1000 | 533 | K1000A | 600 | 607 |
| 1000 | 533 | K1000B | 660 | |
| 1000 | 533 | K1000C | 560 | |
| 1500 | 800 | K1500A | lev. | - |
| 1500 | 800 | K1500B | lev. | |
| 1500 | 800 | K1500C | lev. | |
| 50 | 40 | L50A | 10 | 61 |
| 50 | 40 | L50B | 73 | |
| 50 | 40 | L50C | 100 | |
| 100 | 81 | L100A | 60 | 84 |
| 100 | 81 | L100B | 100 | |
| 100 | 81 | L100C | 91 | |
| 250 | 202 | L250A | 300 | 255 |
| 250 | 202 | L250B | 164 | |
| 250 | 202 | L250C | 300 | |
| 500 | 405 | L500A | 327 | 476 |
| 500 | 405 | L500B | 600 | |
| 500 | 405 | L500C | 500 | |
| 1000 | 809 | L1000A | 700 | 840 |
| 1000 | 809 | L1000B | 980 | |
| 1000 | 809 | L1000C | lev. | |
| 1500 | 1214 | L1500A | lev. | - |
| 1500 | 1214 | L1500B | lev. | |
| 1500 | 1214 | L1500C | lev. | |

| | | | | |
|------|------|--------|-----|-----|
| 0 | 0 | L0 | - | - |
| 0 | 0 | M0 | - | |
| 0 | 0 | K0 | - | |
| 50 | 54 | M50A | 20 | 32 |
| 50 | 54 | M50B | 30 | |
| 50 | 54 | M50C | 45 | |
| 100 | 108 | M100A | 91 | 83 |
| 100 | 108 | M100B | 40 | |
| 100 | 108 | M100C | 118 | |
| 250 | 270 | M250A | 200 | 209 |
| 250 | 270 | M250B | 227 | |
| 250 | 270 | M250C | 200 | |
| 500 | 540 | M500A | 436 | 445 |
| 500 | 540 | M500B | 409 | |
| 500 | 540 | M500C | 491 | |
| 1000 | 1080 | M1000A | 630 | 650 |
| 1000 | 1080 | M1000B | 710 | |
| 1000 | 1080 | M1000C | 610 | |
| 1500 | 11 | M10A | 10 | 13 |
| 1500 | 11 | M10B | 0 | |
| 1500 | 11 | M10C | 30 | |

Listerian pitoisuustestaukset

Listerian pitoisuustestaukset 24.05.2011, kylmäsavulohi

| <i>L. innocua</i> | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Laimennos | Pesäkkeitä maljalla |
| -7 | 72 |
| -7 | 61 |
| -8 | 10 |
| -8 | 9 |
| -8 | 9 |
| -8 | 5 |
| Pitoisuus alkuperäisessä BHI-liemessä | 691666666,7 6,92E+08 |

| <i>L. monocytogenes</i> | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Laimennos | Pesäkkeitä maljalla |
| -7 | 60 |
| -7 | 50 |
| -8 | 6 |
| -8 | 5 |
| -8 | 4 |
| -8 | 3 |
| Pitoisuus alkuperäisessä BHI-liemessä | 533333333,3 5,33E+08 |

Listerian pitoisuustestaukset 30.05.2011, leikkele

| <i>L. innocua</i> | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| Laimennos | Pesäkkeitä maljalla |
| -7 | 98 |
| -7 | 73 |
| -8 | 11 |
| -8 | 9 |
| -8 | 9 |
| -8 | 7 |
| Pitoisuus alkuperäisessä BHI-liemessä | 862500000 8,63E+08 |

| <i>L. monocytogenes</i> | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Laimennos | Pesäkkeitä maljalla |
| -7 | 87 |
| -7 | 77 |
| -8 | 9 |
| -8 | 9 |
| -8 | 4 |
| -8 | SAASTUNUT |
| Pitoisuus alkuperäisessä BHI-liemessä | 808695652,2 8,09E+08 |

Listerian pitoisuustestaukset 30.08.2011, maitojuusto

| <i>L. innocua</i> | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| Laimennos | Pesäkkeitä maljalla |
| -7 | 96 |
| -7 | 92 |
| -8 | 16 |
| -8 | 14 |
| -8 | 12 |
| -8 | 4 |
| Pitoisuus alkuperäisessä BHI-liemessä | 975000000 9,75E+08 |

| <i>L. monocytogenes</i> | |
|---------------------------------------|------------------------|
| Laimennos | Pesäkkeitä maljalla |
| -7 | 115 |
| -7 | 96 |
| -8 | 21 |
| -8 | 10 |
| -8 | 9 |
| -8 | 8 |
| Pitoisuus alkuperäisessä BHI-liemessä | 1079166667 1,08E+09 |

Validointisuunnitelma

VALIDOINTISUUNNITELMA 5.5.2010

Listeria monocytogenes –bakteerin kvantitatiivinen määrittäminen elintarvikkeista
Viite: ISO 11290-2:1998 / Amendment 1:2004

Johdanto

Rauman ympäristölaboratoriossa on tehty kvantitatiivisia *Listeria monocytogenes* -määrittämiä ISO 11290-2:1998 standardiin perustuvalla menetelmällä vuodesta 2002. Menetelmää ei ole akkreditoitu, mutta menetelmän kanssa on vuosittain osallistuttu menestyksekkäästi SLV:n interkalibrointeihin.

Kyseiseen standardiin julkaistiin vuonna 2004 muutoslehti 1, jossa merkittävin muutos oli PALCAM- kasvatusalustan muuttuminen *L. monocytogenes* -bakteerille selektiivisemmäksi ALOA-agariksi.

Laboratoriossa on käytössä vuonna 2010 akkreditoitu menetelmä *Listeria monocytogenes* -bakteerin toteamiseksi elintarvikkeista. Menetelmä perustuu samaiseen ISO 11290:1998 standardiin ja muutoslehden 1:2004 eli tässä menetelmässä on jo käytössä kromogeeninen ALOA-agar.

EU:n komissio on vuonna 2005 antanut asetuksen EY 2073/2005 elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista (jäljempänä mikrobikriteeriasetus). Tässä asetuksessa ISO 11290-2:1998 standardin mukainen menetelmä vuoden 2004 muutoksineen on nimetty vertailumenetelmäksi *L. monocytogenes* -bakteerin lukumäärän määrittämiseen.

Mikrobikriteeriasetuksen myötä asiakkaiden tietoisuus käytettävistä menetelmistä on lisääntynyt. Samalla on ilmennyt tarvetta menetelmän akkreditointiin asiakkaiden tarpeista johtuen. Validointi ja akkreditoinnin hakeminen on luontevaa tehdä tässä vaiheessa standardin uusimmalla versiolla eli ottaa huomioon muutoslehden 2004 aiheuttamat muutokset menetelmään.

Koska kyseessä on hyvin kansainvälisissä kollaboratiivisissa tutkimuksissa validoitu, standardoitu menetelmä, suoritetaan Rauman ympäristölaboratoriossa kevyempi osittainen validointi, jonka tarkoituksena on varmistua menetelmän toimivuudesta tässä laboratoriossa. Validointi toteutetaan osana AMK-opiskelija Matti Riihiahon lopputyötä. Matti Riihiaho on ollut Rauman ympäristölaboratoriossa kesäsijaisena kahtena kesänä ja tuntee laboratorion työympäristön ja toimintatavat hyvin. Riihiaho myös perehdyttää laboratorion henkilökunnan menetelmän käyttöön.

Muutoslehden 1:2004 aiheuttamat muutokset ISO 11290:1998 standardiin

Muutoslehden 1:2004 myötä ISO 11290:1998 standardiin perustuvaan menetelmään tulee kaksi muutosta:

1. Selektiivinen kasvualusta muuttuu. Vanhassa menetelmässä käytetty PALCAM-malja korvataan uudessa menetelmässä ALOA-maljalla (Harlequin Listeria – kromogeeniagar). ALOA- agarin selektiivisyys perustuu Listeria suvun bakteereille tyypillisen entsyymin, β -glukosidaasientsyymin väriä muodostavaan eli kromogeeniseen reaktioon substraattinsa X- glukosidin kanssa, jolloin muodostuu vihertävän sinisiä pesäkkeitä. *L. monocytogenes*- ja *L. ivanovii* –bakteerit erottuvat ALOA-maljalla muista Listeria- lajeista tuottamansa fosfolipaasi C-entsyymin ansiosta, sillä kyseinen entsyymi aiheuttaa sinivihreän pesäkkeen ympärille vaalean, samean halon. Muut kuin Listeria-lajit kasvavat maljalla valkoisina pesäkkeinä.
2. Inkubointilämpötila on muutoslehden myötä vakiinnutettu +37 °C:seen, kun taas vanhassa versiossa Palcam-maljoja voitiin inkuboida joko +35°C:ssa tai +37 °C:ssa.

Validointi

Validoinnissa määritetään seuraavat menetelmän luotettavuutta kuvaavat suureet:

1. Määrittäysraja
2. Oikeellisuus
3. Toistettavuus
4. Uusittavuus
5. Laskennan toistotarkkuus
6. Spesifisyys
7. Saanto

Suureet määritetään analysoimalla näytteitä, joihin on laboratoriossa siirrostettu sopiviksi arvioituja määriä *L. monocytogenes* -bakteeria ja analyysiä häiritsevää *L. innocua* – bakteeria. Molempia bakteeria siirrostetaan näytteisiin yhtä paljon. Siirroksen todellinen pitoisuus kullakin määrityskerralla saadaan määritettyä vasta jälkikäteen, joten eri kerroilla käytettyjen siirrostosten pitoisuudet vaihtelevat jonkin verran.

Lisäksi laboratorio osallistuu tammikuussa 2012 SLV:n elintarvikkeiden interkalibrointikerroksen validoitavalla menetelmällä. SLV:n interkalibrointituloksista lasketaan Z-arvo, josta pystytään päättelemään laboratorion onnistuminen analyysissä. SLV:n analyysiin osallistuvat kaikki mikrobiologian osaston laborantit ja mikrobiologi.

Validoinnin aikana aloitetaan myös menetelmään liittyvän mittausepävarmuuden arviointi. Laskennan toistotarkkuuden määrittämissä jatketaan edelleen SLV:n interkalibrointinäytteiden sekä mahdollisten *L. monocytogenes* -bakteeria sisältävien, aitojen näytteiden avulla myöhemmin vuonna 2012.

Matriisin valinta

Rauman ympäristölaboratoriossa on tehty kvantitatiivista *L. monocytogenes* – bakteerin analyysiä pääsääntöisesti kalatuotteista, kypsistä lihatuotteista, maitotuotteista ja vihanneksista. Satunnaisesti analyysiä tehdään myös muista elintarvikkeista esim. ruokamyrkytystä epäiltäessä. Validoitaviksi matriiseiksi valittiin kylmäsavustettu kala, maitojuusto ja ylikypsä kinkkuleikkele, koska kalatuotteet, maitotuotteet ja kypsät lihatuotteet ovat yleisimpiä laboratoriossa analysoitavia näytteitä. Lisäksi kalatuotteen valinta validointiin on perusteltua, koska kalatuotteissa esiintyy yleisesti sekä *L. innocua* ja *L. monocytogenes* -bakteereja ja ALOA -agarin oletetaan helpottavan näiden bakteerien erottamista toisistaan.

Siirrosteen valmistus

Validoinnissa käytetään kolmea eri matriisia: kylmäsavustettua kalaa, leikkelettä ja maitojuustoa. Kukin matriisi valmistetaan eri työkerralla ja viljellään samalla tavalla.

Näytteiden siirrostusta varten kasvatetaan *L. monocytogenes* ja *L. innocua* – bakteereita BHI-liemessä 24 h +37° C:ssa, jonka jälkeen kasvatusten *L. monocytogenes* ja *L. innocua* –pitoisuus on kirjallisuuden mukaan noin 10^8 - 10^9 pmy/ml. BHI-liemikasvatuksista saadaan laimentamalla sopivat listeriapitoisuudet matriisiin lisättäväksi. Kasvatusten todellinen pitoisuus lasketaan verimaljoilta luettavien pesäkkeiden lukumäärän perusteella.

BHI-liemikasvatuksista tehdään laimennokset suolapeptonivedellä 10^{-8} -laimennokseen asti. *L. monocytogenes* -bakteerin laimennoksista 10^{-6} , 10^{-7} , ja 10^{-8} viljellään 0,1 ml rinnakkaisille verimaljoille kasvatusten todellisen *L. monocytogenes* - bakteeripitoisuuksien määrittämiseksi. Samoin toimitaan *L. innocua* –bakteerin suhteen. Maljoja kasvatetaan 24 h +37° C:ssa, jonka jälkeen kasvatusten todellinen *L. monocytogenes*- ja *L. innocua* –pitoisuus lasketaan maljoilla olevien pesäkkeiden perusteella.

Matriisien siirrostus

Tutkittavat näytteet valmistetaan punnitsemalla 10 g tutkittavaa matriisia kuuteen eri Stomacher-pussiin ja lisäämällä niihin *L. monocytogenes*- ja *L. innocua*- bakteereita liitteenä olevan pipetointi- ja ymppäystaulukon mukaan. Lisäksi yksi näyte on ns. nollanäyte, johon ei lisätä ollenkaan siirrostetta. Homogenoidaan pussin sisältöä käsin puris-

telemalla ja annetaan bakteerien tottua ympäristöönsä seisottamalla matriiseja 1 h ± 5 min huoneenlämmössä.

Analyysin suoritus

Tunnin seisotuksen jälkeen lisätään Stomacher-pussiin 90 ml suolapeptonivettä ja homogenisoidaan Stomacher-laitteella hitaalla nopeudella 30 s., jotta solut vahingoittuivat mahdollisimman vähän.

Homogenoinnin jälkeen tehdään pintaviljely ALOA-agarille alkususpensiosta eli laimennoksesta -1. Laimennoksesta -1 viljellään sekä 0,1 ml:n että 1 ml:n siirros. Laimennoksen – 1 tulos saadaan määritettyä niin, että 1 ml laimennoksen -1 suspensiota pipetoidaan ja levitetään T-sauvalla kolmelle ALOA-maljalle (n. 0,33 ml kullekin). Pesäkkeiden laskemisvaiheessa näiltä maljoilta saadut tulokset lasketaan yhteen. ALOA-maljoja seisotetaan pöydällä pintaviljelyn jälkeen noin 15 minuuttia, jotta bakteerisuspensio ehtii imeytyä niihin. ALOA-maljojen inkubaatioaika- ja lämpötila on 24 h + 37° C. Standardissa mainitaan, että jos kasvu on 24 tunnin jälkeen heikkoa, on inkuboitava toiset 24 tuntia. Inkubointia jatketaan joka tapauksessa ensimmäisen maljojen tarkastuksen jälkeen vielä toiset 24 h.

Inkubointiajan kuluttua tarkistetaan kasvaako maljoilla *L. monocytogenes* -bakteerille tyypillisiä pesäkkeitä. *Listeria monocytogenes* kasvaa maljalla sinivihreinä pesäkkeinä, joiden ympärillä on läpikuultamaton rengas (halo). *L. innocua* kasvaa myös sinivihreinä pesäkkeinä, mutta niiden ympärillä ei ole haloa. *L. ivanovii* ja jotkut *Bacillus cereus* -bakteerin kannat voivat muodostaa pesäkemorfologialtaan samantyyppisiä pesäkkeitä kuin *L. monocytogenes*, joten varmistustestit ovat tarpeen.

Varmistustestejä varten viljellään molemmilta maljoilta vähintään viisi *L. monocytogenes* -bakteeriksi epäiltyä pesäkettä puhtaaksi veriagarille. Veriagarilla β-hemolysoivista pesäkkeistä valitaan yksi varmistettavaksi. Tästä pesäkkeestä tehdään katalaasitesti. *L. monocytogenes* on katalaasiposiitivinen. Mikäli lasilevyllä siirrostetun pesäkkeen päälle lisättyyn vetyperoksidiin alkaa välittömästi muodostua kaasua, on kyseessä katalaasiposiitivinen bakteeri. Mikäli varmistettava pesäke on katalaasiposiitivinen, tehdään siitä API Listeria-tunnistustesti. Mikäli varmistettava pesäke osoittautuu joksikin muuksi, kuin *L. monocytogenes* -bakteeriksi, varmistetaan yksitellen myös loput β-hemolysoivat, katalaasiposiitiiviset pesäkkeet API Listeria -testin avulla.

1. Määrittäysraja

Määrittäysraja määritetään siirrostamalla tutkittavaan näytematriisiin pieni pitoisuus sekä *L. monocytogenes* että *L. innocua* -bakteereita. Tutkitaan näytteet työohjeen mukaan. Menetelmän määrittäysraja on pienin *L. monocytogenes* -bakteerin pitoisuus, joka kyseisellä menetelmällä saadaan määritettyä Rauman ympäristölaboratoriossa. Pintaviljelymenetelmällä tehtävän kvantitatiivisen määrittäyksen pienin teoreettisesti

mahdollinen määrittäysraja on 100 pmy/g, mikäli käytetään normaalia laimennossarjaa. Määrittäysrajaa on tässä tapauksessa mahdollista pienentää tekemällä määrittäys laimennoksesta -1 käyttäen siirrostilavuutena 1 ml:ä ja jakamalla siirros kolmelle ALOA-maljalle.

2. Oikeellisuus

Oikeellisuus määritetään käyttämällä SLV:n referenssiampullia, jonka bakteeripitoisuudet tunnetaan. Vertaamalla viljeltyjen maljojen pesäkemäärien keskiarvoa annettuun bakteeripitoisuuteen, voidaan arvioida menetelmän oikeellisuutta.

3. Toistettavuus

Toistettavuus on peräkkäisten määrittäysten antamien tulosten lähekkäisyyttä tutkittaessa identtisiä näytteitä. Toistettavuus saadaan määritettyä analysoimalla mahdollisimman samanlainen näyte samalla menetelmällä, samoissa olosuhteissa ja samojen henkilöiden toimesta lyhyellä aikavälillä. (rinnakkaisten viljelysten tulosten läheisyys).

Toistettavuutta voidaan arvioida määrittämällä suure ”Sr” SLV:n ampullista saaduista viljelytuloksista kaavalla:

$$Sr = \sqrt{\frac{\sum(x-ka)^2}{n-1}},$$

jossa x on saadun mikrobiluvun logaritmi, ka mikrobilukujen logaritmien keskiarvo ja n tulosten lukumäärä, kun ääriarvot on poistettu. Toistettavuusarvon ollessa välillä 0,10 – 0,15 toistettavuus on hyvä.

4. Uusittavuus

Uusittavuus tarkoittaa yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyyttä eri henkilöiden tutkiessa identtisiä näytteitä käyttäen samoja menetelmiä. Menetelmän uusittavuus määritetään siten, että kaikki osaston laborantit ja mikrobiologi tutkivat rinnakkain kolme laboratoriossa siirrostettua sokkonäytettä (A, B, C).

Kvantitatiivisten menetelmien uusittavuutta voidaan kuvata laskemalla suhteellisen keskihajonnan keskineliö (RSD_c). Keskihajonnan keskineliön ollessa <0,25, katsotaan että uusittavuus on hyvä.

5. Laskennan toistotarkkuus

Laskennan toistotarkkuus määritetään osana menetelmän mittausepävarmuuden määrittäystä. Laskennan toistotarkkuus määritetään eri laboranttien samoista petrimaljoista laskemien analyysitulosten lähekkäisyyden perusteella. Kriteeriksi Rauman ym-

päristölaboratoriossa laskennan toistotarkkuudelle on asetettu $RSD_c < 0,1$, jolloin vaihtelukerroin laskentojen välillä on pienempi kuin 10 %.

Laskennan toistotarkkuuden määrittämiseen käytetään samoja maljoja, kuin uusittavuuden määrittämiseen. Maljat koodataan uudelleen, jotta laborantit eivät tiedä etukäteen, montako pesäkettä kullakin maljalla on.

6. Spesifisyys

ALOA-agarilla ei valmistajan mukaan kasva muut kuin *Listeria*-sukuiset bakteerit, sekä jotkut *Bacillus cereus* -suvun bakteerit. *B. cereus* -suvun bakteerit kasvavat kuitenkin epätyypillisinä, matalina, epäsymmetrisinä ja ne voivat olla väriltään kaikkea valkoisesta siniseen, sekä niillä on suuri vahva halo. Erottelu *L. monocytogenes* ja *L. innocua* -bakteerin välillä perustuu halon muodostukseen maljalla. Aikaisemman *L. monocytogenes* -bakteerin kvalitatiivisen menetelmän validoinnissa todettiin, että menetelmän spesifisyyttä vähensi eniten *L. innocua* -bakteerin ylikasvu maljoilla. Toisaalta, koska tässä menetelmässä ei ole esirikastusvaihetta, jossa *L. innocua* -bakteerien ylikasvu todennäköisesti tapahtui, on järkevää arvioida validoinnissa myös menetelmän spesifisyyttä *L. monocytogenes* -bakteerin määrittämisessä.

Spesifisyyttä arvioidaan validoinnissa käyttämällä aitoja, taustaflooraa sisältäviä matriiseja sekä lisäämällä näytteisiin *L. innocua* -bakteereita.

7. Saanto

Menetelmän saanto määritetään käyttämällä tunnetun määrän *Listeria monocytogenes* -bakteereita sisältävää SLV:n referenssiampullia SLV P/2008 Food. Ampulli sisältää *Listeria monocytogenes* -bakteerin lisäksi *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, ja *Staphylococcus saprophyticus* -bakteereita. Ampulli valmistetaan näytteeksi ohjeiden mukaan ja viljellään kymmenelle rinnakkaiselle ALOA-maljalle. SLV:n ampullille on annettu *L. monocytogenes* -pitoisuudelle vaihteluväli 13-100 pmy/ml, jonka sisälle kasvavien bakteerimäärien tulisi osua. Saanto lasketaan vertaamalla saatua bakteerimäärän keskiarvoa vaihteluvälin keskiarvoon 56 pmy/ml.

VALIDOINTIRAPORTTI

Listeria monocytogenes –bakteerin osoittaminen elintarvikkeista
ISO 11290-2:1998/Amd. 1:2004

31.1.2012

Kirsi Weckman

Matti Riihiaho

***Listeria monocytogenes* –bakteerin osoittaminen elintarvikkeista (työohje M10)**

Viite: ISO 11290-2:1998/Amd. 1:2004

Johdanto

Rauman ympäristölaboratoriossa on tehty kvantitatiivisia *Listeria monocytogenes* -määryksiä ISO 11290-2:1998 standardiin perustuvalla menetelmällä. Menetelmä ei ole akkreditoitu.

Kyseiseen standardiin julkaistiin vuonna 2004 muutoslehti 1, jossa merkittävin muutos oli PALCAM - kasvatusalustan muuttuminen *L. monocytogenes* -bakteerille selektiivisemmäksi ALOA-agariksi.

Laboratoriossa on validoitu ja akkreditoituna käytössä menetelmä *Listeria monocytogenes*- bakteerin toteamiseksi elintarvikkeista. Menetelmä perustuu ISO 11290:1 1998 standardiin ja muutoslehden 1:2004 ja tässä menetelmässä on jo käytössä kromogeeninen ALOA-agar.

Validoitava menetelmä on muuttunut seuraavilta osin:

- Selektiivinen kasvualusta muuttui. Vanhassa menetelmässä käytetty PALCAM-malja korvattiin uudessa menetelmässä ALOA-maljalla (Harlequin *Listeria* –kromogeeniagar).
- Inkubointilämpötila on muutoslehden myötä vakiinnutettu +37 °C:seen. Vanhassa versiossa PALCAM-maljoja voitiin inkuboida joko +35 °C:ssa tai +37 °C:ssa.

Koska kyseessä on useissa kansainvälisissä kolaboratiivisissa tutkimuksissa validoitu ja standardoitu menetelmä, menetelmä validoitiin kevyemmällä menettelyllä, jonka tarkoituksena oli varmistua menetelmän toimivuudesta Rauman ympäristölaboratoriossa.

Validoinnissa tarkasteltiin seuraavia menetelmän luotettavuutta kuvaavia ominaisuuksia:

1. Määrittäysraja
2. Saanto
3. Oikeellisuus
4. Toistettavuus
5. Uusittavuus
6. Laskennan toistotarkkuus
7. Spesifisyys

Matriisit

Validoitaviksi matriiseiksi valittiin leikkele, eli ylikypsä kinkku, raakamaidosta valmistettu maitojuusto sekä kylmäsavustettu lohi. Matriisit ovat ns. riskielintarvikkeita, joissa listeriabakteerit helposti pääsevät lisääntymään. Listeriavalvonta sekä omavalvonnassa että viranomaisvalvonnassa kohdistetaan erityisesti sellaisenaan syötäviin elintarvikkeisiin, joissa listeria voi kasvaa. Tämän vuoksi kalatuotteet, maitotuotteet ja kypsät lihatuotteet ovat yleisimpiä laboratorioissa analysoitavia näytteitä.

Matriisit ostettiin lähikaupasta ja niissä oli viimeinen käyttöpäivä usean päivän päässä lukuun ottamatta maitojuustoa, jolla viimeinen käyttöpäivä oli sama kuin ostopäivä.

Validointi

Validointi suoritettiin validointisuunnitelmassa kuvatulla tavalla analysoimalla joko laboratoriossa siirrostettuja näytteitä (matriisikokeet) tai SLV:n referenssiampullia. Matriisien siirrostukset on tehty siirrostussuunnitelman mukaisesti. Koska eri matriisit tehtiin useammassa erässä ja niihin ympäritiin eri kerroilla kasvatettua bakteerisuspensiota, eroavat siirrostusten *L. monocytogenes* ja *L. innocua* - pitoisuudet toisistaan jonkin verran. Molempia bakteereita siirrostettiin näytematriiseihin yhtä suurista laimennoksista yhtä suuret tilavuudet. Siirrostussuunnitelma on liitteessä 1.

Jokaisesta viljelystä pitoisuudesta otettiin viisi positiiviseksi epäiltyä pesäkettä jatkotutkimuksiin. Veriagarilla tutkittiin β -hemolyysiä. Katalaasi tutkittiin kaikista puhdasviljellyistä pesäkkeistä. Jos varmistettava pesäke oli sekä β -hemolysoiva että katalaasipositiivinen, tehtiin API Listeria -testi. API tehtiin vain yhdestä pesäkkeestä pitoisuutta kohden.

Eri matriisien siirrostuksessa käytettyjen *L. monocytogenes* ja *L. innocua* -bakteeriliemien todetut pitoisuudet on taulukoitu liitteeseen 3.

Validoinnin matriisikokeiden tulokset on taulukoitu liitteeseen 2.

Nollanäytteet

Kustakin matriisista analysoitiin myös nollanäytteet, joihin ei lisätty listeriabakteereita. Tarkoitus oli saada näkyviin mahdollisesti näytteissä luonnollisesti kasvavat listeriabakteerit.

Nollanäytteessä ei havaittu *L. monocytogenes* tai *L. innocua* kontaminaatiota. Maitojuuston analyysissä ALOA-maljalla todettiin myös valkoisia, halottomia pesäkkeitä, mutta ne olivat morfologialtaan niin selkeästi erilaisia kuin Listeria-suvun pesäkkeet, että niiden vaikuttaminen Listeria-lajien laskemiseen tai tunnistamiseen maljalta on epätodennäköistä.

1. Määrittäysraja

Alhaisin pitoisuus josta *L. monocytogenes* saatiin esiin, oli 13 pmy/g. Tulos saatiin keskiarvona kolmesta maitojuustonäytteestä, johon oli ympätty 108 pmy/10 g näytettä, eli noin 11 pmy/g. Tässä pitoisuudessa kolmesta näytteestä yhden tulos oli negatiivinen. Vasta pitoisuus 32 pmy/g saatiin esiin maitojuuston tapauksessa kaikista rinnakkaisista näytteistä. Leikkeleen ja kalan määrityksissä pienimmät kaikkien rinnakkaisnäytteiden tuloksista lasketut keskiarvopitoisuudet olivat 27 pmy/g ja 30 pmy/g tässä järjestyksessä.

Pienimpään todettuun pitoisuuteen vaikuttaa luonnollisesti käytetyn siirroksen pitoisuus. Tarkempan määritysrajan määrittämiseen ei kuitenkaan koettu tarvetta, sillä pääsääntöisesti asiakkaat tilaavat *Listeria monocytogenes* - bakteerin kvantitatiivista analyysiä silloin, kun halutaan varmistua että vähittäismyynnissä oleva tuote täyttää mikrobikriteeriasetuksen EY 2073/2005 vaatimukset. Mikrobikriteeriasetuksen mukaan vähittäismyynnissä olevan sellaisenaan syötävän elintarvikkeen *L. monocytogenes* - bakteerin pitoisuus viimeisenä myyntipäivänä ei saa ylittää 100 pmy/g. Tähän tarkoitukseen tässä validoinnissa saavutetut määritysrajat ovat riittäviä.

2. Saanto

Menetelmän saanto määritettiin viljelmällä SLV:n referenssiampulli SLV P/2008 Food. Ampulli sisälsi *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, ja *Staphylococcus saprophyticus* – bakteereita. Ampulli liuotettiin ohjeiden mukaan peptoniveteen ja viljeltiin kymmenelle rinnakkaiselle ALOA-maljalle. SLV:n ampullin *L. monocytogenes* – pitoisuuden vaihteluväliksi oli ilmoitettu 13–100 pmy/ml. Kaikilla rinnakkaismaljoilla kasvavien pesäkkeiden määrä osui annettuun vaihteluväliin ja maljaviljelyiden keskiarvoksi saatiin 35 pmy/ml. Vaihteluvälin keskiarvo on 56 pmy/ml, jonka perusteella laskettu saanto menetelmälle oli 62 %. Saanto oli kohtuullinen huomioon ottaen, että käytetty ampulli oli lievästi vanhentunut (viimeinen käyttöpäivä maaliskuu 2010). Ampullin analysoinnista saadut tulokset ovat taulukossa 1.

3. Oikeellisuus

Suhteellista oikeellisuutta voidaan arvioida vertaamalla validoitavalla menetelmällä saatuja tuloksia referenssimenetelmään tai sertifioidusta vertailumateriaalista analysoituihin tuloksiin. Koska laboratoriossa ei ole käytössä akkreditoitua referenssimenetelmää, päätettiin oikeellisuutta arvioida vertaamalla SLV:n referenssiampullin analysoinnista saatuja tuloksia SLV:n ilmoittamiin arvoihin. SLV:n ampullin *L. monocytogenes*–pitoisuudelle oli ilmoitettu logaritminen vaihteluväli 1,1 – 2,0 (\log_{10} pmy/ml). Kymmenen rinnakkaisen analyysin keskiarvoksi saatiin 1.54 log pmy/ml, joka osuu annetulle vaihteluvälille hyvin.

Analysoitava ampulli on ollut mukana vuoden 2008 interkalibrointikierroksella. Kyseisellä kierroksella *L. monocytogenes* –bakteerin kvantitatiiviseen analyysiin osallistui 36 laboratoriota. Laboratorioiden analysointiin käyttämät menetelmät vaihtelivat. Tässä validoinnissa ja vuoden 2008 interkalibrointikierroksella saaduista tuloksista laskettiin ääriarvojen poistamisen jälkeen keskihajonta, joka oli 0.28. NMKL Procedure No 8 mukaan menetelmän suhteellista oikeellisuutta voidaan pitää tyydyttävänä, jos validoitavalla menetelmällä ja referenssimenetelmällä saaduista tuloksista laskettu keskihajonta on pienempi kuin 0.4.

Matriisikokeissa leikkeleen ja maitojuuston pienimmissä pitoisuuksissa oli molemmissa yksi kolmesta rinnakkaisesta negatiivinen, vaikka matriiseissa oli laskelmien mukaan 40 pmy/ g ja 11 pmy/g. Toisaalta kahden muun näytteen pitoisuudet olivat vastaavasti vähän korkeammat, joten todennäköisesti kyse ei ollut todellisesta menetelmään liittyvästä virhenegatiivisuudesta, vaan pikemminkin siirroksen jakautumisesta epätasaisesti näytteeseen.

4. Toistettavuus

Toistettavuus tarkoittaa analyysistä saatujen peräkkäisten tulosten lähekkäisyyttä identtisistä näytteistä. Mikrobiologiassa toistettavuus määritetään samasta näytteestä, samoilla välineillä ja saman henkilön tekemänä lyhyellä aikavälillä. Toistettavuus määritettiin käyttämällä SLV:n ampullia. Kvantitatiivisten menetelmien toistettavuus, S_r , lasketaan kaavalla

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum(x-ka)^2}{n-1}}$$

jossa x on saadun mikrobiluvun logaritmi, ka mikrobilukujen logaritmien keskiarvo ja n tulosten lukumäärä, kun ääriarvot on poistettu. Toistettavuuden ollessa 0,10 - 0,15 toistettavuus on tyydyttävä. Toistettavuus on hyvä, jos se on pienempi kuin 0.10. Koska saatu Sr-arvo on 0,034, voidaan sanoa että menetelmän toistettavuus on erinomainen.

Saadut arvot ja laskelmat on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1: Toistettavuusmääritysten tulokset.

| Matriisi | Näyttenro | Tulos (pmy/g) | log pmy/g (x) | x-ka | (x-ka) ² |
|-----------------------|-----------|---------------|---------------|----------|---------------------|
| SLV P/2008 Food | 1 | 40 | ääriarvo | ääriarvo | ääriarvo |
| | 2 | 34 | 1,5315 | -0,0176 | 0,0003 |
| | 3 | 32 | 1,5052 | -0,0439 | 0,0019 |
| | 4 | 33 | 1,5185 | -0,0305 | 0,0009 |
| | 5 | 35 | 1,5441 | -0,0050 | 0,0000 |
| | 6 | 25 | ääriarvo | ääriarvo | ääriarvo |
| | 7 | 34 | 1,5315 | -0,0176 | 0,0003 |
| | 8 | 38 | 1,5798 | 0,0307 | 0,0009 |
| | 9 | 40 | 1,6021 | 0,0530 | 0,0028 |
| | 10 | 38 | 1,5798 | 0,0307 | 0,0009 |
| keskiarvo | | 35 | 1,5490 | | |
| Σ | | | | | 0,00820 |
| Sr = | | | | | 0,034 |

5. Uusittavuus

Uusittavuus tarkoittaa yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyyttä eri henkilöiden tutkiessa identtisiä näytteitä käyttäen samoja menetelmiä. Menetelmän uusittavuus määritettiin siten, että kaikki osaston laborantit ja mikrobiologi tutkivat rinnakkain kolme laboratoriossa siirrostettua sokkonäytettä (A, B, C) sekä SLV:n interkalibrointikierroksen kolme näytettä tammikuussa 2012. Uusittavuuskokeeseen osallistuivat Kirsi Weckman, Helinä Sjöman, Tanja Ridal ja Jaana Taavitsainen. Samat henkilöt osallistuivat myös laskennan toistotarkkuuden määrittämiskokeeseen. Matriisina uusittavuus- ja laskennan toistotarkkuuskokeissa käytettiin ylikypsää kinkkua.

Kvantitatiivisten menetelmien uusittavuutta voidaan kuvata laskemalla suhteellisen keskihajonnan keskineliö. Keskihajonnan keskineliön ollessa <0,25, katsotaan että uusittavuus on hyvä.

Uusittavuus määritysten tulokset on esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2: Uusittavuusmääritysten tulokset

| PVM | Näyte | Lukija | | | | ka | s | RSD | RSB |
|--|-------|--------|------|-----|------|--------|----------|----------|-------------|
| | | JT | KW | HS | TR | | | | |
| 6.9.2011 | A | 80 | 130 | 90 | 90 | 97,5 | 22,17356 | 0,227421 | 0,052 |
| | B | 660 | 740 | 660 | 560 | 655,0 | 73,71115 | 0,112536 | 0,013 |
| | C | 1430 | 1030 | 970 | 1290 | 1180,0 | 216,9485 | 0,183855 | 0,034 |
| 23.1.2012 | SLV 1 | 360 | 360 | 470 | 480 | 417,5 | 66,52067 | 0,159331 | 0,025 |
| | SLV 2 | 620 | 505 | 630 | 540 | 573,8 | 61,01571 | 0,106345 | 0,011 |
| | SLV 3 | 470 | 480 | 670 | 395 | 503,8 | 117,1449 | 0,232546 | 0,054 |
| Suhteellisen keskihajonnan keskineliö RSD_c | | | | | | | | | 0,18 |

6. Laskennan toistotarkkuus

Laskennan toistotarkkuus kuvaa eri laboranttien samoista maljoista laskemien pesäkemäärien läheisyyttä. Kriteeriksi laskennan toistotarkkuudelle Rauman ympäristölaboratoriossa on asetettu $RSD_c < 0,1$, jolloin vaihtelukerroin laskentojen välillä on pienempi kuin 10 %. Laskennan toistotarkkuutta käytetään menetelmän kokonaismittausepävarmuuden laskemiseen. Laskennan toistotarkkuutta määritettäessä matriisina toimi kylmäsavulohi. Laskennantoistotarkkuutta kuvaava suure, RSD_c , oli 0,03. Tämä alittaa kriteeriksi asetetun 0,1:n selvästi. Laskennan toistotarkkuustulokset on esitetty taulukossa 3.

TAULUKKO 3: Laskennan toistotarkkuuden tulokset

ka = keskiarvo

RSD = suhteellinen keskihajonta

s = keskihajonta

RSB = suhteellisen keskihajonnan neliö

| PVM | Näyte | Tekijä | Lukija | | | | ka | s | RSD | RSB |
|---|-------|--------|--------|----|----|------|------|-------|-------------|--------|
| | | | JT | KW | HS | TR | | | | |
| 6.9.2011 | 666 | JT | 21 | 20 | 20 | 20 | 20,3 | 0,500 | 0,0247 | 0,001 |
| | 667 | JT | 10 | 10 | 10 | 10 | 10,0 | 0 | 0 | 0 |
| | 668 | KW | 4 | 4 | 4 | 4 | 4,0 | 0 | 0 | 0 |
| | 669 | KW | 6 | 6 | 6 | 6 | 6,0 | 0 | 0 | 0 |
| | 670 | KW | 7 | 7 | 7 | 7 | 7,0 | 0 | 0 | 0 |
| | 671 | HS | 5 | 5 | 4 | 5 | 4,8 | 0,500 | 0,1053 | 0,011 |
| | 672 | HS | 7 | 7 | 7 | 7 | 7,0 | 0 | 0 | 0 |
| | 673 | HS | 5 | 5 | 5 | 5 | 5,0 | 0 | 0 | 0 |
| | 674 | HS | 15 | 14 | 15 | 15 | 14,8 | 0,500 | 0,0339 | 0,001 |
| | 675 | HS | 30 | 29 | 28 | 30 | 29,3 | 0,957 | 0,0327 | 0,001 |
| | 676 | TR | 5 | 5 | 5 | 5 | 5,0 | 0 | 0 | 0 |
| | 677 | TR | 7 | 7 | 7 | 7 | 7,0 | 0 | 0 | 0 |
| | 678 | TR | 15 | 16 | 16 | 17 | 16,0 | 0,816 | 0,0510 | 0,003 |
| 679 | TR | 14 | 14 | 14 | 14 | 14,0 | 0 | 0 | 0 | |
| 680 | TR | 13 | 13 | 13 | 13 | 13,0 | 0 | 0 | 0 | |
| 25.1.2012 (SLV) | 171 | KW | 58 | 58 | 57 | 57 | 57,5 | 0,577 | 0,0100 | 0,0001 |
| | 114 | KW | 65 | 65 | 65 | 65 | 65,0 | 0 | 0 | 0 |
| | 135 | TR | 43 | 43 | 43 | 43 | 43,0 | 0 | 0 | 0 |
| | 126 | TR | 58 | 58 | 58 | 58 | 58,0 | 0 | 0 | 0 |
| | 106 | TR | 10 | 10 | 10 | 10 | 10,0 | 0 | 0 | 0 |
| Suhteellisen keskihajonnan keskineliö RSD_c | | | | | | | | | 0,03 | |

7. Spesifisyys

ALOA-agarin selektiivisyys perustuu *Listeria* suvun bakteereille tyypillisen entsyymin, β -glukosidaasientsyymin väriä muodostavaan eli kromogeeniseen reaktioon substraattinsa X- glukosidin kanssa. Substraatin hydrolyysi saa aikaan maljalle vihertävän sinisiä pesäkkeitä. Myös jotkut muut bakteerilajit, kuten esimerkiksi *Enterococcus*-, *Klebsiella*- ja *Serratia*- suvut pystyvät pilkkomaan X- glukosidia β -glukosidaasi-entsyyminsä ansiosta, mutta niiden kasvu on estetty maljalla litiumkloridin, polymyksiini B:n ja nalidiksiinihapon avulla. Amfoterisiinin avulla puolestaan estetään hiivojen ja homeiden kasvu maljalla. Muut kuin *Listeria*-lajit kasvavat maljalla valkoisina pesäkkeinä.

Lisäaineena agarin lisättävä L- α -fosfotidyl-inositoli pilkkoutuu patogeenisten *L. monocytogenes*- ja *L. ivanovii* -bakteerien tuottaman fosfolipaasi C- entsyymin ansiosta muodostaen sinivihreän pesäkkeen ympärille vaalean, samean halon. Myös muutamilla *Bacillus* -suvun bakteereilla on fosfolipaasi C entsyymi ja ne kasvavat maljalla aiheuttaen ympärilleen vahvan halon. *Bacillus* -bakteerit kasvavat kuitenkin epätyypillisinä, matalina, epäsymmetrisinä ja ne voivat olla väriltään kaikkea valkoisesta siniseen.

L. ivanovii-bakteerin tunnistaminen maljalta pesäkemorfologian perusteella ei ole mahdollista. Vaikka *L. ivanovii* on joissain tutkimuksissa todettu aiheuttavan paitsi eläimille myös ihmisille listerioosia, ei sitä nyky-lainsäädännön puitteissa raportoida. Tästä syystä *L. monocytogenes*- ja *L. ivanovii* -bakteerien erottaminen on tärkeää. Tunnistukseen käytetään API-Listeria -testiä.

Validoinnissa näytteisiin lisättiin *L. monocytogenes* - bakteerin lisäksi *L. innocua* -bakteeria. Kuten *Listeria monocytogenes* -bakteerin kvalitatiivisen menetelmän validoinnissa, *L. innocua* - bakteerin havaitseminen *L. monocytogenes* - pesäkkeiden joukosta on haastavaa, mikäli pesäkemäärät maljalla ovat suuria. *L. monocytogenes* - pesäkkeiden halot ovat varsinkin 48 tunnin lukemisen jälkeen niin suuria, että pesäkeryypäistä on vaikea päätellä, saavatko kaikki ryppään pesäkkeet aikaan halon, vai onko ryppäessä halon aikaansaavien *L. monocytogenes* -pesäkkeiden seassa joku/joitain *L. innocua* - pesäkkeitä.

Käytännössä tilannetta voidaan helpottaa lukemalla maljat kahteen kertaan; ensin 24 tunnin kuluttua, jolloin halot ovat pieniä ja paremmin irti toisistaan sekä toisen kerran 48 tunnin kuluttua. SLV:n interkalibrointinäytteitä analysoitaessa havaittiin myös, että halottomat pesäkkeet olivat hieman tummemman vihreitä kuin halolliset pesäkkeet. API Listeria -testissä halollisten pesäkerykelmien keskeltä varmistetut tummemman vihreät sekä yksittäin kasvaneet halottomat pesäkkeet varmistuivat *L. innocua* -pesäkkeiksi. Pelkkään pesäkkeen värisävyyn perustuva tunnistus ei kuitenkaan ole käytännössä riittävän luotettava, vaan pesäkkeet on varmistettava halon suhteen epäselvissä tilanteissa ohjeen mukaan hemolyysiin, katalaasiin ja API-listeria testeihin perustuvalla tunnistuksella.

Standardissa pesäkkeet lasketaan maljalta, jossa on korkeintaan 150 pesäkettä. Tässä validoinnissa tehtyjen havaintojen perusteella luotettavan laskutuloksen aikaansaamiseksi maljakohtaista maksimipesäkemäärää on syytä laskea. NMKL:n vastaavassa menetelmässä maksimipesäkemäärä lasketavalla maljalla on 100 ja tähän lopputulokseen tultiin myös tässä validoinnissa.

SLV:n interkalibrointinäytteissä oli *L. monocytogenes* - bakteerien lisäksi kampylobakteereita, Salmonella- ja *E.coli* - bakteereita, mutta ainoastaan *Listeria* -bakteerit kasvoivat ALOA -maljoilla.

Osallistuminen SLV:n interkalibrointikierrukseen tammikuussa 2012

Laboratorio on osallistunut menetelmällä SLV:n interkalibrointikierrukseen tammikuussa 2012. Tulokset on raportoitu SLV:lle, mutta SLV ei vielä ole antanut alustavia tuloksia julki. Kunhan SLV:n raportit julkaistaan, lasketaan laboratorion saamista tuloksista menettelytapaohjeen 15 mukaisesti Z-arvo. Z-arvon itseisarvon tulee olla < 2. Mikäli z-arvon itseisarvo > 2, poikkeaman syy selvitetään ja tarvittaessa tilataan uusintanäyte kierroksen järjestäjältä. Mikäli Z-arvon itseisarvo on yli 3, harkitaan uudelleen, onko menetelmää syytä ottaa käyttöön ilman lisäselvityksiä.

Johtopäätökset

Menetelmän luotettavuutta kuvaaville suureille asetetut kriteeriarvot saavutettiin. Mikrobiologian osaston henkilökunnalla on jo aiempaa kokemusta ALOA-agarin käytöstä, joten siltä osin menetelmän käyttöönotto on helppoa. Onnistumista menetelmän käytössä voidaan arvioida vielä SLV:n tammikuisen interkalibrointikierroksen tulosten valmistuttua.

ALOA-maljojen inkubointiaikaan liittyen on tärkeä huomioida, että maljat tarkistetaan kunnolla ensimmäisen 24 tunnin jälkeen. Pienet halolliset ja halottomat pesäkkeet voidaan tällöin erottaa toisistaan helpommin kuin 48 tunnin jälkeen mahdollisesti kasvavien suuremmista pesäkkeistä muodostuvien ryppäiden joukosta. Lopullinen tulos annetaan maljoilta, joita on inkuboitu täydet 48 tuntia, sillä joukossa saattaa olla stressaantuneita pesäkkeitä, jotka eivät kasva tunnistettaviksi 24 tunnin aikana. Lisäksi muutos maljoilta laskettaviin maksimipesäkemääriin on aiheellinen, jotta vääriä positiivisilta vältetään.

Eri matriisit eivät vaikuttaneet menetelmän toimivuuteen merkittävästi. Kalamatriisissa tulokset olivat jonkin verran suurempia kuin leikkele ja maitojuustomatriiseissa kun verrattiin tuloksia siirrostettuun pitoisuuteen.

ALOA-agar osoittautui validointiprosessissa hyvin selektiiviseksi elatusaineeksi, jolta listeriabakteerit on helppo erottaa muista suvuista. Sen sijaan *L. monocytogenes* -bakteerin ja *L. innocua*-bakteerien erottamiseen toisistaan tulee kiinnittää huomiota silloin, kun kasvu maljoilla on runsasta.

Haasteena *L. monocytogenes*- bakteerin niin kvantitatiivisissa kuin kvalitatiivisissa määrittelyissä voidaan pitää suhtautumista *L. innocua*- bakteerin esiintymiseen näytteissä. Tutkimuksissa on todettu, että *L. innocua*- bakteerin runsas esiintyminen tuotantolaitoksissa saattaa indikoida tulevia ongelmia *L. monocytogenes*-bakteerin kanssa. Tulisiko siis myös maljoilla esiintyvät epätyypilliset pesäkkeet varmistaa API-testin kanssa loppuun asti? Tämä on luonnollisesti paitsi työmenekki myös kustannuskysymys. Mahdollisuutena olisi tarjota valveutuneille asiakkaille erillisenä vaikkapa kokonaislisteriapitoisuuden määrittystä tai jopa listerialajien tunnistuspalvelua normaalin kvalitatiivisen ja kvantitatiivisen analyysin rinnalla.

Tällä erää tämän menetelmän antamat tulokset vastaavat mikrobikriteeriasetuksen aikaansaamaan tarpeeseen ja ovat siltä osin riittävät. Menetelmä on valmis otettavaksi käyttöön Rauman ympäristölaboratoriossa.

Työohje M10

KW

Versio 1.0

31.1.2012

LISTERIA MONOCYTOGENES - BAKTEERIN LUKUMÄÄRÄN MÄÄRITYS ELINTARVIKKEISTA

1. Soveltuvuus

Menetelmä soveltuu *Listeria monocytogenes* – bakteerin määrälliseen osoittamiseen elintarvikkeista ja rehuista. Menetelmää voidaan käyttää myös muiden *Listeria* – lajien osoittamiseen elintarvikkeista ja rehuista.

2. Laitteet ja välineet

Mikrobiologinen perusvälineistö.
Lämpökaappi $+37 \pm 1$ °C

3. Alustat ja reagenssit

- Laimennusliuos:
Puskuroitu peptonivesi
- Kasvualusta:
ALOA-agar (Lab M HAL010)
Naudanveriagar
- Varmistustestit:
Katalaasitesti
API-*Listeria* –testi
- Vertailukannat:
L. monocytogenes, *L. innocua*

4. Suoritus

Näytteen käsittely:

Ota aseptisesti 10-20 g näyte ja siirrä se Stomacher-pussiin. Lisää puskuroitua peptonivettä suhteessa 1:10. Homogenisoi näytettä 30 sekunnin ajan. Anna suspension seistä $1 \text{ h} \pm 5 \text{ min}$. $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$:ssa elvyttääksesi stressaantuneet mikro-organismit.

Valmista tämän jälkeen tarvittavat laimennokset puskuroituun peptoniveteen.

Viljely:

Siirrosta steriilillä pipetillä 0,1 ml:aa alkuperäisestä suspensiosta ja tarvittavista laimennoksista kustakin kahteen ALOA-maljaan. Levitä siirros niin pian kuin mahdollista sauvalla agarin pinnalle. Anna maljojen seistä pöydällä

noin 15 minuuttia siirroksen imeytymiseksi elatusaineeseen.

Jos halutaan määrittää pieniä määriä *L. monocytogenes* – bakteereita, ota alkuperäisestä suspensiosta 1 ml ja jaa se kolmelle maljalle ja jatka kuten edellä. Tee myös tällöin rinnakkaismääritys. Yhteensä käytetään siis kuusi maljaa.

Pesäkkeiden laskeminen:

Tarkasta maljat 24 tunnin kuluttua inkuboinnin aloittamisesta. Jos maljalle on tulossa runsaasti kasvua, laske maljat jo tässä vaiheessa. Jatka inkubointia joka tapauksessa vielä 24 tuntia, jotta myös mahdollisesti hitaasti kasvavat pesäkkeet saadaan esiin.

Tyypillinen *L. monocytogenes* –pesäke on väriltään sinivihreä ja sitä ympäröi samea läpikuultamaton rengas (halo). Muut listeriakannat muodostavat agarille sinivihreitä pesäkkeitä, mutta halo ei ympäröi niitä. Jotkut *L. ivanovii* – kannat voivat myös muodostaa pesäkemorfologialtaan samankaltaisia pesäkkeitä kuin *L. monocytogenes*, joten pesäkkeet tulee aina varmistaa varmistustesteillä.

Laske kaikki *L. monocytogenes* – bakteereille tyypilliset pesäkkeet maljoilta, joilla pesäkkeiden kokonaislukumäärä on alle 100 pesäkettä.

Pieniä *L. monocytogenes* – määriä laskettaessa on huomioitava, että 1 ml jaettuna kolmelle maljalle käsitellään yhtenä maljana.

Jatkotutkimukset

Valitse kultakin laskettavalta maljalta viisi pesäkettä jatkotutkimuksiin. Jos pesäkkeitä on vähemmän kuin viisi, valitse kaikki pesäkkeet. Valitut pesäkkeet viljellään puhtaiksi naudanveriagarille. Käytä vertailukantoina *L. monocytogenes* ja *L. innocua* – kantoja. Inkuboi maljoja $+37 \pm 1$ °C 21 ± 3 h. *L. monocytogenes* – bakteeri muodostaa verimaljalla pesäkkeen, jota ympäröi kirkas β -hemolyyttinen vyöhyke. Tutki maljat tarkoin, sillä joissakin tapauksissa hemolyysi on vain pesäkkeen alla.

Verilevyillä kasvavista β -hemolysoivista pesäkkeistä tutkitaan katalaasireaktio työhjeen 58 mukaisesti. Veriagarilla kasvavat β -hemolyyttiset ja katalaasipositiiviset puhdasviljelmät varmistetaan API Listeria – testillä valmistajan ohjeen mukaisesti.

5. Tulosten laskeminen

Varmistuneiden *L. monocytogenes* –bakteerien pesäkemäärän ja laimennoksen perusteella lasketaan *L. monocytogenes* –bakteerien määrä näytteessä. Tulos lasketaan menettelytapaohjeen 19 mukaisesti. Jos kahden perättäisen laimennoksen maljoilla on 15 – 100 pesäkettä, lasketaan tulos painotetun keskiarvon mukaisesti. Tulos ilmoitetaan pmy/g tai pmy/ml näytteestä riippuen.

6. Poikkeamat viitemenetelmästä

Pesäkkeet lasketaan maljoilta, joilla kasvaa maksimissaan 100 pesäkettä eikä 150 pesäkettä, kuten standardissa on ilmoitettu.

Varmistustesteistä liikkuvuus, hiilihydraattitesti ja CAMP-testi korvataan API[®]-listeria testillä.

Laadunvarmistus

Laimennosliuoksen ja ALOA-alustan pH ja steriiliys kontrolloidaan joka valmistuserästä. ALOA-agarin toimivuus varmistetaan *L. monocytogenes* - bakteerilla suoraviljelyllä joka valmistuserästä. Tulokset kirjataan keittopäiväkirjaan.

ALOA - agarin toimivuus varmistetaan kasvuindeksimenetelmällä menettelytapaohjeen 10 mukaisesti elatusainejauheen tai lisäaine-erän valmistuserän vaihtuessa sekä vähän ennen elatusainejauhe-erän loppumista, mutta kuitenkin vähintään kaksi kertaa vuodessa. Kasvuindeksin määrittämisessä käytetään *L. monocytogenes*– ja *L. innocua* –bakteerikantoja. Ohjeet kasvuindeksin määrittämiseen ovat laadunvarmistusohjeessa L1. Tulokset kirjataan laadunvarmistus-kansioon.

Varmistustestinä käytettävän API Listeria –testin toimivuus testataan laadunvarmistusohjeen L3 mukaisesti

Laboratorio osallistuu menetelmällä säännöllisesti SLV:n interkalibrointeihin.

7. Akkreditointi/validointi

Menetelmä on validoitu elintarvikkeille.

8. Viite

ISO 11290-2:1998

ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004(E)