



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Riitta Björkman

PCR-menetelmien verifiointi *Salmonella* spp:n ja

***Listeria monocytogenes* analysoimiseen**

Atria Suomi Oy Laboratorio

Opinnäytetyö

Kevät 2021

SeAMK Ruoka

Insinööri (AMK) Bio- ja elintarviketekniikka



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: SeAMK Ruoka

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

Suuntautumisvaihtoehto: Liha- ja valmisruokateknologia

Tekijä: Riitta Björkman

Työn nimi: PCR-menetelmien verifiointi *Salmonella* spp:n ja *Listeria Monocytogeneksen* analysointiin

Ohjaaja: Matti-Pekka Pasto

Vuosi: 2021

Sivumäärä: 58

Liitteiden lukumäärä: 5

Elintarvikepatogeenit ovat ruokamyrkytyksiä aiheuttavia mikrobeja. Niistä melko yleisiä ovat salmonellat ja listeriat. Suomessa seurataan salmonellan esiintymistä elintarviketeollisuudessa ja sille on määrätty tietyt näytteenottotiheydet teurastamoissa ja lihanleikkaamoissa. Näytteenottotiheydet perustuvat lainsäädäntöön. Listerian seurantanäytteet perustuvat elintarvikelaitosten omiin omavalvontasuunnitelmiin. Salmonellan ja *Listeria monocytogeneksen* esiintyminen elintarviketeollisuudessa on yleensä osoitus huonosta hygieniasta.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida GENE UP® *Salmonella* (SLM2) ja GENE UP® *L. monocytogenes* (LMO2) -PCR-menetelmät *Salmonella* spp:n ja *Listeria monocytogeneksen*, kvalitatiiviseen analysoimiseen Atria Suomi Oy:n Nurmon laboratoriossa. GENE-UP® -PCR-menetelmät ovat reaaliaikaiseen DNA:n monistamiseen ja tunnistamiseen perustuvia menetelmiä, jotka on validoitu referenssimenetelmiä (EN-ISO 6579 *Salmonella* spp. ja EN ISO 11290-1 *L. monocytogenes*) vasten eri elintarvikkeille ja tuotantoympäristönäytteille. Menetelmien verifiointiin valittiin sellaiset matriisit eli näytteet, joita rutiinistikin tutkitaan laboratoriossa salmonellan ja listerian varalta huomioiden verifiointin vaatimukset matriisien suhteen. Verifiointiin käytettiin sekä luonnollisia että siirrostettuja näytteitä. Osana verifiointia analysoitiin runsaasti näytteitä rinnakkain laboratoriossa käytössä olevien menetelmien kanssa, jotta saatiin harjoitusta tarkkaan PCR-työskentelyyn. Verifiointi tehtiin menettelyohjeen NMKL 32 Verification of microbiological methods ja osittain standardin ISO/DIS 16140-3 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative implemented in a single laboratory mukaan. Verifiointissa määritettiin PCR-menetelmille LOD₅₀ -arvot eri matriiseille. LOD₅₀ -arvo on luku, joka kuvaa menetelmän määritysrajaa. Verifiointin toisena tarkoituksena oli saada PCR-menetelmille akkreditointi, koska laboratorio analysoi lakisäätteisiä näytteitä. Suomessa laboratorioiden pätevyyden arvioi FINAS-akkreditointipalvelu. FINASin akkreditointipäätöksen jälkeen GENE-UP® -PCR-menetelmät *Salmonella* spp:n ja *Listeria monocytogeneksen* analysointiin otettiin käyttöön Atria Suomen Nurmon laboratoriossa syksyllä 2020.

¹ Asiasanat: PCR polymeeraasiketjureaktio, DNA deoksiribonukleehappo, patogeeni, verifiointi, akkreditointi

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Faculty: SeAMK Food and Agriculture

Degree programme: Food processing and Biotechnology

Specialisation: Meat and Convenience Food Technology

Author/s: Riitta Björkman

Title of thesis: Verification of PCR Methods for Analysis of *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes*

Supervisor(s): Matti-Pekka Pasto

Year: 2021

Number of pages: 58

Number of appendices: 5

Food pathogens are microbes that cause food poisoning. Quite common of these are salmonella and listeria. In Finland, the occurrence of salmonella is monitored in the food industry and certain sampling frequencies have been set for it in slaughterhouses and meat cutting plants. Sampling frequencies are based on legislation. Listeria monitoring samples are based on the control plans of the food establishments. The presence of salmonella and *Listeria monocytogenes* in the food industry is usually an indication of poor hygiene.

The objective of this thesis was to verify GENE UP[®] Salmonella (SLM2) and GENE UP[®] L. monocytogenes (LMO2) PCR methods for the qualitative analysis of *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* in the laboratory of Atria Plc in Nurmo. GENE-UP[®] PCR methods are based on real-time amplification and identification of DNA. Methods are validated against reference methods (EN-ISO 6579 *Salmonella* spp. and EN ISO 11290-1 *L. monocytogenes*) for various food products and production environment samples. Matrices, i.e. samples that are routinely tested in the laboratory for salmonella and listeria, were selected for verification of the methods, in consideration of the verification requirements for the matrices. Both natural and inoculated samples were used for verification. As part of the verification, many samples were analyzed in parallel with the methods used in the laboratory to provide training for accurate PCR work. The verification was performed according to the Procedural Instruction NMKL 32 Verification of Microbiological Methods and partly according to the standard ISO/DIS 16140-3 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative implemented in a single laboratory. In the verification, LOD₅₀ values for different matrices were determined for PCR methods. The LOD₅₀ value is a number that describes the limit of detection of the method. The second purpose of the verification was to obtain accreditation for PCR methods, as the laboratory analyses statutory samples. In Finland, the validity of the laboratories is evaluated by the FINAS accreditation service. Following the FINAS accreditation decision, GENE-UP[®] PCR methods for analysis of *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* were introduced at the Atria Plc laboratory in Nurmo in the autumn of 2020.

¹ Keywords: PCR Polymerase chain reaction, DNA, pathogen, verification, accreditation

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä	2
Thesis abstract	3
SISÄLTÖ	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo	6
Käytetyt termit ja lyhenteet.....	8
1 JOHDANTO JA TAVOITTEET.....	11
2 PATOGEENIT	12
2.1 Salmonella	12
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
2.3 Patogeenien seuranta elintarviketeollisuudessa.....	14
2.4 Patogeenien tunnistamismenetelmät.....	14
3 PCR-MENETELMÄ	16
3.1 PCR – menetelmän periaate	16
3.2 GENE-UP® -menetelmä	18
4 VALIDOINTI JA VERIFIOINTI	24
4.1 Validointi	24
4.2 Verifiointi	24
4.3 Verifioinnin standardeista	25
5 VERIFIOINNIN SUUNNITTELU	27
5.1 Verifioinnin tavoite ja tausta.....	27
5.2 Verifioinnissa käytettävät mikrobikannat.....	28
5.3 Verifioitavat matriisit	28
6 VERIFIOINNIN TOTEUTUS	30
6.1 Siirrosteiden valmistus	30
6.2 Näytteiden esikäsittely, rikastus	33
6.3 DNA:n uutto	34
6.4 PCR-reaktion suorittaminen	35

6.5 Varmistukset	38
7 VERIFIOINNIN TULOSTEN TARKASTELU	41
7.1 Salmonella-verifioinnin tulosten tarkastelu.....	41
7.2 Tulosten tarkastelu - <i>L. monocytogenes</i>	43
8 LOD ₅₀ -ARVON MÄÄRITTÄMINEN WILRICH-LASKURILLA	45
8.1 LOD ₅₀ -arvot GENE-UP® Salmonella (SLM2) -menetelmälle	47
8.2 LOD ₅₀ -arvot GENE UP® <i>L. monocytogenes</i> (LMO2) -menetelmälle.....	48
9 OIKEELLISUUS	50
10 VERIFIOINNIN LOPPUTULOS	53
LÄHTEET	55
LIITTEET	58

Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuva 1 Polymeraasiketjureaktion periaate.....	17
Kuva 2 FRET-teknologian periaate.....	19
Kuva 3 Sulamispisteen määrittäminen E. coli O157:H7 verrattuna E. coli O157:non H7.....	19
Kuva 4 PCR-negatiivisen näytteen monistuskäyrä.	20
Kuva 5 GENE-UP® PCR-protokolla eli työn suoritus.....	23
Kuva 6 Laimennossarjan tekeminen.....	31
Kuva 7 Bakteeri siirrostaiden siirto petrifilmeille ja näytematriiseihin.	32
Kuva 8 Bakteeri siirrostaiden valmistamisessa käytettyjä välineitä.....	32
Kuva 9 Näytteiden käsittelypaikka Nurmon laboratoriossa.	34
Kuva 10 DNA:n uutto ja siihen tarvittavia välineitä, reagensseja ja laitteita.	35
Kuva 11 PCR-reaktioputket ja avaustyökalu.....	36
Kuva 12 Sinisiä PCR-reagenssi-pellettejä PCR-reaktioputkissa.....	37
Kuva 13 Vasemmalla 8-kanavapipetti, oikealla lysis-liuokset telineessään.	37
Kuva 14 Mini-spinneri, PCR-lämmityslaite ja tietokone, jossa avoinna ohjelma.	38
Kuva 15 Salmonella-kasvua XLD- ja HAL-maljoilla.	39
Kuva 16 <i>L. monocytogenes</i> RLM- ja ALOA-maljoilla.	40
Kuva 17 Wilrich-laskurin (2017) taustatietojen syöttötaulukko.....	46
Kuva 18 Wilrich- LOD-laskurin (2017) tulokset.	46
Kuva 19 Vertailunäyteampullit.	50

Taulukko 1 Salmonella-menetelmän verifiointin matriisit	29
Taulukko 2 <i>L. monocytogenes</i> -menetelmän verifiointin matriisit.....	29
Taulukko 3 GENE-UP® Salmonella 2 (SLM2) verifiointin LOD ₅₀ -arvot eri matriisiryhmille....	47
Taulukko 4 GENE-UP® <i>L. monocytogenes</i> 2 (LMO2) verifiointin LOD ₅₀ -arvot eri matriisiryhmille	48
Taulukko 5 SLV:n vertailututkimuksen tulokset. Salmonella.....	52
Taulukko 6 SLV:n vertailututkimuksen tulokset. <i>L. monocytogenes</i>	52

Käytetyt termit ja lyhenteet

AGE	Agaroosigeelielektroforeesi, nukleiinihappojen tunnistusmenetelmä
Akkreditointi	Akkreditointi, pätevyyden toteaminen, kansainvälisiin kriteereihin perustuva menettelytapa, jonka avulla toimijan pätevyys ja sen antamien todistusten uskottavuus voidaan luotettavasti todeta.
ALOA	ALOA-agar, (Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti medium) selektiivinen kasvualusta <i>L. monocytogeneksen</i> varmistamiseen
ATCC	American Type Culture Collection, USA:lainen organisaatio, joka kerää, säilyttää ja välittää mikro-organismien referenssikantoja tutkimus ja kehitystyöhön.
BHI	Brain heart infusion, kasvatusliemi bakteereille
BPW	Buffered peptone water, puskuroitu peptonivesi, salmonellalle edullinen rikastusliemi
cfu	Colony forming unit, pesäkettä muodostava yksikkö
DNA	Deoksiribonukleiinihappo, sisältää tiedon perintötekijöistä eli siihen on koodattu eliön geenit.
FINAS	Finnish Accreditation Service suomalainen toimielin, joka tarjoaa laboratorioille pätevyyden toteamispalvelua
FRET	Fluorecence Resonance Energy Transfer, Fluoresenssin aiheuttama signaali, energian siirtyminen, joka voidaan havaita
HAL	Harlequin -agar, salmonellan varmistamiseen käytettävä elatusainemalja
Inkubointi	Bakteerien kasvatus tietyissä olosuhteissa
Interkalibrointi	Vertailututkimus

ISO	International Organization for Standardization, Kansainvälinen standardisoimisorganisaatio
Kvalitatiivinen	Laadullinen
LOD	Limit of detection, toteamisraja, havaitsemisraja, analyytin, esim. tutkittavan mikrobin, pienin pitoisuus, joka saadaan esille, tulee määrittää kattavalle määrälle eri matriiseja.
LOD₅₀	toteamisraja, joka tarkoittaa että 50 % testin tuloksista on positiivisia, käytetään mikrobiologisten menetelmien verifiointissa
LPT	Listerian kasvua edistävä rikastusliemi
Matriisi	Näyttemateriaali
MRD	Maximal recovery diluent, laimennusliuos
NMKL	Nordic Committee on Food Analysis, Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea
Patogeeni	Patogeeni, tautia aiheuttava bakteeri, virus tai muu pieneliö.
PCR	PCR eli polymeraasiketjureaktio, DNA:n monistamiseen perustuva analysointimenetelmä.
pmy	pesäkettä muodostava yksikkö
RLM	Rapid L'mono, selektiivinen kasvualusta <i>L. monocytogenes</i> in varmistamiseen
SLV	Svenska Livsmedelsverket, Ruotsin elintarvikevirasto
Spesifinen	Eriytynyt, tietyn ominaisuuden omaava
Validointi	Validointi suoritetaan jollekin ennen käyttämättömälle menetelmälle, yleensä uudelle. Validointi on laaja tutkimus, jossa käytetään paljon erilaisia näyttematriiseja ja todennetaan, että validoitava menetelmä on toimiva.

- Verifiointi** Verifiointi on osoitus siitä, että jokin analysointimenetelmä toimii verifiointiin suorittavassa laboratoriossa. Ennen verifiointia on menetelmä täytynyt validoida jonkin toisen toimijan, esimerkiksi laitteen toimittajan toimesta.
- XLD** Ksyloosi-lysiini-deoksikolaatti-agar, salmonellan varmistamiseen käytettävä elatusainemaalja

1 JOHDANTO JA TAVOITTEET

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida ja käyttöönottaa GENE-UP[®] -PCR-menetelmät patogeeneiden, *Salmonella* spp:n ja *Listeria monocytogenes*n kvalitatiiviseen analysointiin Atria Suomi Oy:n Nurmon laboratoriossa (myöhemmin Atrian laboratorio). Atrian laboratoriolla on kaksi toimipaikkaa, Nurmossa ja Kauhajoella, ja laboratorio on akkreditoitu FINAS-akkreditointipalvelujen toimesta. Laboratoriot palvelevat myös Atrian muita tuotantoyksiköitä. Atrian laboratoriossa tehdään pääasiassa mikrobiologisia analyyskejä niin lakisäätöistä, omavalvonnan kuin tuotekehityksenkin ja sopimustilojen näytteistä. Näytteinä on mm. lihaa ja muita raaka-aineita, valmiita lihatuotteita ja valmisruokia sekä tuotantoympäristönäytteitä.

Toisena tavoitteena oli saada näille menetelmille FINAS:n hyväksymä akkreditointi. FINAS-akkreditointi antaa laboratorion toiminnalle painoarvoa ja osoituksen toiminnan pätevyydestä.

Atria laboratoriossa on jo ennestään FINAS-akkreditoituna käytössä salmonellabakteerin kvalitatiiviseen määrittämiseen SFS-EN ISO 6579-1:2017/A1:2020 -menetelmä ja *L. monocytogenes* määrittämiseen ISO 11290-1:2017 -menetelmä (FINAS 2020b). Sekä salmonellan että *L. monocytogenes* analysoimiseksi on käytössä myös ns. pikamenetelmänä kvalitatiivinen VIDAS-UP[®] -menetelmä, joka perustuu vasta-aineiden mittaamiseen. *L. monocytogenes* määrittämiseen se on erittäin hyvin soveltuva, mutta salmonellamäärittämisessä se on antanut joitakin virheellisesti positiivisia tuloksia, joiden varmistaminen on viivytttänyt tulosten saamista. On tärkeää, että elintarviketuotanto saa nopeasti luotettavia tuloksia.

PCR-menetelmien etuna edellä mainittuihin menetelmiin on lyhyempi rikastusaika sekä menetelmien herkkyys. Rikastusaika on lyhimmillään salmonellan määrittämisessä 18 tuntia ja *L. monocytogenes* määrittämisessä 22 tuntia. Menetelmän herkkyys tarkoittaa sitä, että hyvin pienetkin pitoisuudet tulevat näkyviin, mutta toisaalta se on myös riski sille, että näyte kontaminoituu jostain muusta lähteestä kuin itse näytteestä ja se asettaa erityisen huomion menetelmän tarkkaan ja aseptiseen suorittamiseen. Lyhyet rikastusajat taasen antavat merkittävää etua analysoitaessa esimerkiksi tuotantoympäristönäytteitä, jos esimerkiksi on tehty ns. purku- tai saneerauspesuja joillekin tuotantolaitteille ja tuotanto odottaa tulosten saamista ennen kuin se voidaan aloittaa.

2 PATOGEENIT

Ihmisellä on luonnostaan paljon eri bakteereita iholla, limakalvoilla ja suolistossa. Sitä kutsutaan normaaliflooraksi, jota ilman ihminen ei tule toimeen, sillä se suojaa ihmistä haitallisilta mikrobeilta. (Sivelä & Saarinen 1993, 34.)

Patogeenilla tarkoitetaan tautia aiheuttavaa mikrobia tai eliötä, joka aiheuttaa ihmisen sairastumisen. Tauteja aiheuttavat bakteerien lisäksi virukset, homeet ja hiivat sekä loiset. (Ulmanen ym. 2004, 113.)

Osa patogeenisistä bakteereista tuottaa myrkkyjä eli toksineja, jotka saattavat olla erittäin voimakkaita. Esimerkiksi *Clostridium botulinum* -bakteerin tuottama Toksiini, nimeltään botuliini, on vahvimpia tiedettyjä myrkkyjä, joka jo hyvin pienenä annoksena voi aiheuttaa jopa kuoleman. (Sivelä & Saarinen 1993, 35 - 36.)

2.1 Salmonella

Suomessa salmonellaa esiintyy hyvin harvoin tuotantoeläimissä ja niistä saatavissa elintarvikkeissa. Suomen hyvä tilanne muuhun maailmaan verrattuna on seurausta tehokkaasta ja pitkäaikaisesta valvonnasta. Kuitenkin Suomessa todetaan joistakin sadoista muutamaan tuhanteen salmonellan aiheuttamaa sairastumista vuosittain, mutta monesti tartunta on saatu ulkomailta ja sielläkin huonon hygienian seurauksena. (Korkeala 2007, 84.)

Salmonelat lukeutuvat suolistobakteereihin. Salmonelat aiheuttavat erilaisia suolisto- ja yleisinfektioita sekä ihmisissä että eläimissä. Niiden lisääntyminen onnistuu niin hapellisissa kuin hapettomissakin ympäristöissä. Ne selviytyvät myös isäntäeliön ulkopuolella. Monet eläimet voivat levittää salmonellaa ulosteidensa mukana sairastumatta itse. Tuotantoeläimiin salmonelat voivat tarttua rehun tai juomaveden mukana. (Ruokavirasto 2019.)

Salmonella on tunnistettu ruokamyrkytyksen aiheuttajaksi maailmanlaajuisesti. Ihmisiin salmonella voi tarttua laajasti eri elintarvikkeiden kautta. Yleisimpiä tartuntalähteitä ovat raaka liha, kananmunat, kasvikset ja ns. raakamaito, jota ei ole pastöroitu. Myös salmonellatartunnan saanut elintarviketyöntekijä voi levittää sitä saastuttamalla elintarvikkeita. (Ruokavirasto 2019.) Suomessa salmonellan esiintyminen tuotantoeläimissä ja niistä valmistetuissa elintarvikkeissa

on todella vähäistä, alle 1 %. Salmonellan vähäinen esiintyvyys on saavutettu laajalla ja pitkään kestäneellä tuotantoeläimiin kohdistuneella valvonnalla. (Hatakka 2004, 45.)

Salmonellat leviävät yleensä huonon hygienian takia. Salmonellan esiintymistä valvotaan erityisesti tuotantotiloilla, teurastamoissa, lihanjalostuksessa ja elintarviketeollisuudessa.

2.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes on patogeeni, joka voi elää useissa erilaisissa isäntäeliöissä, elinympäristöissä ja varsinkin maaperässä. Se sietää monenlaisia olosuhteita esimerkiksi happamia ja suolaisia, se lisääntyy jopa jääkaappilämpötilassakin. Se tuhoutuu elintarvikkeesta, kun sitä kuumennetaan riittävästi, yli +72 °C:een. Se tarttuu ihmisiin yleensä saastuneesta elintarvikkeesta. Elintarvikkeet voivat saastua niiden prosessoinnin aikana tai sen jälkeen. (Ruokavirasto 2020b.)

L. monocytogenes on erittäin hankalasti poistettava bakteeri, jos sitä joutuu elintarviketuotantoon. Sitä esiintyy monilla erilaisilla pinnoilla ja lattiakaivoissa ja se leviää myös pesujen aiheuttamasta vesiroiskeesta. *L. monocytogenes* tuhoutuu kuumennettaessa, mutta elintarvikkeet saattavat kontaminoitua saastuneilta pinnoilta kuumennuksen jälkeen ennen pakkaamista. Jos elintarviketuotannon tiloista löydetään toistuvasti *L. monocytogenes*, puhutaan ns. laituskannoista, jotka pesiytyvät yleensä hankalasti puhdistettaviin paikkoihin. Elintarviketuotannon tehostuessa ja elintarvikkeiden erilaisten käsittelyjen lisääntyessä *L. monocytogenes* on saanut valtaa muilta pilaajabakteereilta sietäessään monenlaisia olosuhteita. Siksi sen valvonta elintarviketuotannossa on erityisen tärkeää. (Korkeala 2007, 58 - 60.)

L. monocytogenes on siis elintarviketuotannolle erittäin ongelmallinen bakteeri, joten sen valvonta on myös erittäin tärkeää ruokaketjussa. Sen valvonta kuuluu elintarviketoimijalle varsinkin silloin, kun on kyseessä listerian suhteen riskielintarvikkeet. Ruokavirasto (Ruokavirasto 2020b.) on määritellyt riskielintarvikkeiksi mm. kalatuotteet (varsinkin kylmäsavustetut ja graavisuolatut), mädin, raakamaitotuotteet, pesemättömät kasvikset ja sellaiset elintarvikkeet, jotka on tarkoitus lämmittää ennen nauttimista, mutta jotka monesti syödään sellaisenaan esimerkiksi nakit ja lihapullat.

L. monocytogenes on hyvin yleinen bakteeri maaperässä, kasveissa ja vedessä. Se voi aiheuttaa vakavan taudin, listerioosin, joka on vaarallinen varsinkin riskiryhmiin kuuluville eli niille, joiden vastustuskyky on heikentynyt ja raskaana oleville naisille. Listerioosin aiheuttaman taudin syynä ovat yleensä saastuneet elintarvikkeet, joihin listeria saattaa joutua joko ympäristöstä tai tuotantovälineistä. Suomessa todetaan vuosittain muutamia kymmeniä listerian aiheuttamia sairastumisia. Niissä sairastuminen on useimmiten saatu kalatuotteista. (Korkeala 2007, 57 – 58.)

2.3 Patogeenien seuranta elintarviketeollisuudessa

Patogeenien, eli salmonellan ja *L. monocytogenes*in, seuranta elintarviketuotantolaitoksissa kuuluu laitosten omavalvontaan. Suomessa salmonellan seuranta elintarviketeollisuudessa ohjaa kansallinen salmonellavalvontaohjelma, jossa määritetään näytteenottotiheydet teurastamoissa ja leikkaamoissa (Ruokavirasto 2020a). *L. monocytogenes*in esiintymistä elintarviketuotannossa valvotaan Ruokaviraston mikrobikriteeriasetuksen pohjalta laatiman ohjeistuksen mukaan (Ruokaviraston ohje 2020). Patogeenien pääsyä tuotteisiin asti estetään monilla erilaisilla toiminnoilla ja toimijan täytyy tehdä riskinarviointia omasta toiminnastaan ja dokumentoida se (Korkeala 2007, 468). Esimerkiksi teurastamoissa ja lihanleikkaamoissa noudatetaan hyvän hygienian mukaisia toimenpiteitä ja toimintaan on laadittu omavalvontasuunnitelmat, joiden ensisijainen tarkoitus on tuottaa turvallisia elintarvikkeita kuluttajille. Omavalvonnan toteutumista seurataan näytteenotoilla, esimerkiksi teurastamoissa ruhojen pintapuhtautta seurataan säännöllisesti niin aistinvaraisesti kuin mikrobiologisillakin näytteillä. Elintarviketeollisuudessa salmonellan ja *L. monocytogenes*in esiintymistä seurataan omavalvontasuunnitelmien mukaan raaka-aineista, valmiista tuotteista, tuotantolinjoilta, välineistä sekä tuotantoympäristöstäkin.

2.4 Patogeenien tunnistamismenetelmät

Mikrobien osoittamiseksi on käytössä monenlaisia menetelmiä. Niistä suurin osa perustuu mikrobien tyypillisten ominaisuuksien esiintuomiseen, jossa käytetään mikrobeille sopivia olosuhteita. Yleisimpiä käytettyjä menetelmiä ovat ns. viljelyyn perustuvat menetelmät, joissa käytetään erilaisia, mikrobeille suotuisia, spesifisiä tai selektiivisiä elatusaineita ja olosuhteita (esim. lämpötila ja hapen saatavuus) mikrobien kasvattamiseen ja eristämiseen sekä

tunnistamiseen. Menetelmät voivat olla kvantitatiivisia eli määrällisiä tai kvalitatiivisia eli laadullisia. (Korkeala 2007, 142.)

Mikrobien tunnistamiseksi käytetään viljelymenetelmien lisäksi mikroskopiaan perustuvia menetelmiä (yleensä homeille), kalvosuodatusmenetelmää (vesien mikrobien selvittämiseen), fysikaalis-kemiallisia menetelmiä (esim. maidolle tehtävä värinmuutostesti), immunologisia menetelmiä sekä molekyylibiologisia menetelmiä, joista tunnetuin on PCR eli polymeerasiketjureaktio (Korkeala 2007, 144 - 152).

PCR-menetelmiä on käytetty 1990-luvulta saakka elintarvikkeiden mikrobiologisissa analyyseissä ja varsinkin patogeenien analysoinnissa sen on huomattavasti tarkempi ja herkempi kuin viljelymenetelmät (Korkeala 2007, 152, 156).

Patogeenien, kuten salmonellan ja *L. monocytogenes*en, analysoinnissa käytetään yleensä kvalitatiivista eli laadullista menetelmää. Se tarkoittaa sitä, että analyysimenetelmällä haetaan, löytyykö etsitty mikrobi näytteestä vai ei. Mikrobiologiset menetelmät ovat yleensä ns. in vitro -menetelmiä, joissa analysointi tehdään mikrobille sopivissa olosuhteissa esimerkiksi petrimaljalla olevassa elatusaineessa. Mikrobiologisia tutkimuksia voidaan tehdä myös vasta-aineen tuoton mittaamiseen, sillä eliöt tuottavat vasta-aineita taudinaiheuttajia vastaan. (Pärssinen ym. 2012, 104.)

Elintarviketeollisuudelle patogeenien määritysmenetelmien nopeus ja herkkyys ovat tärkeitä ominaisuuksia. Perinteisiin ISO-standardeihin tai NMKL:n menetelmäohjeisiin perustuvissa viljelymenetelmissä negatiivisenkin tuloksen saaminen kestää useita päiviä. Viljelymenetelmissä tietty määrä näytettä ensin rikastetaan spesifisessä rikastusliemessä, jotta etsitty bakteeri saadaan rikastumaan eli lisääntymään riittävästi, jonka jälkeen tehdään viljelyitä menetelmän määrittelemällä maljalle eli kasvualustalle ja vielä sen jälkeen tarvitaan tarkistusviljelyitä. Jokainen vaihe vie aikaa aina suurin piirtein vuorokauden, jotta bakteerit kasvavat riittävästi ja tunnistettaviksi.

3 PCR-MENETELMÄ

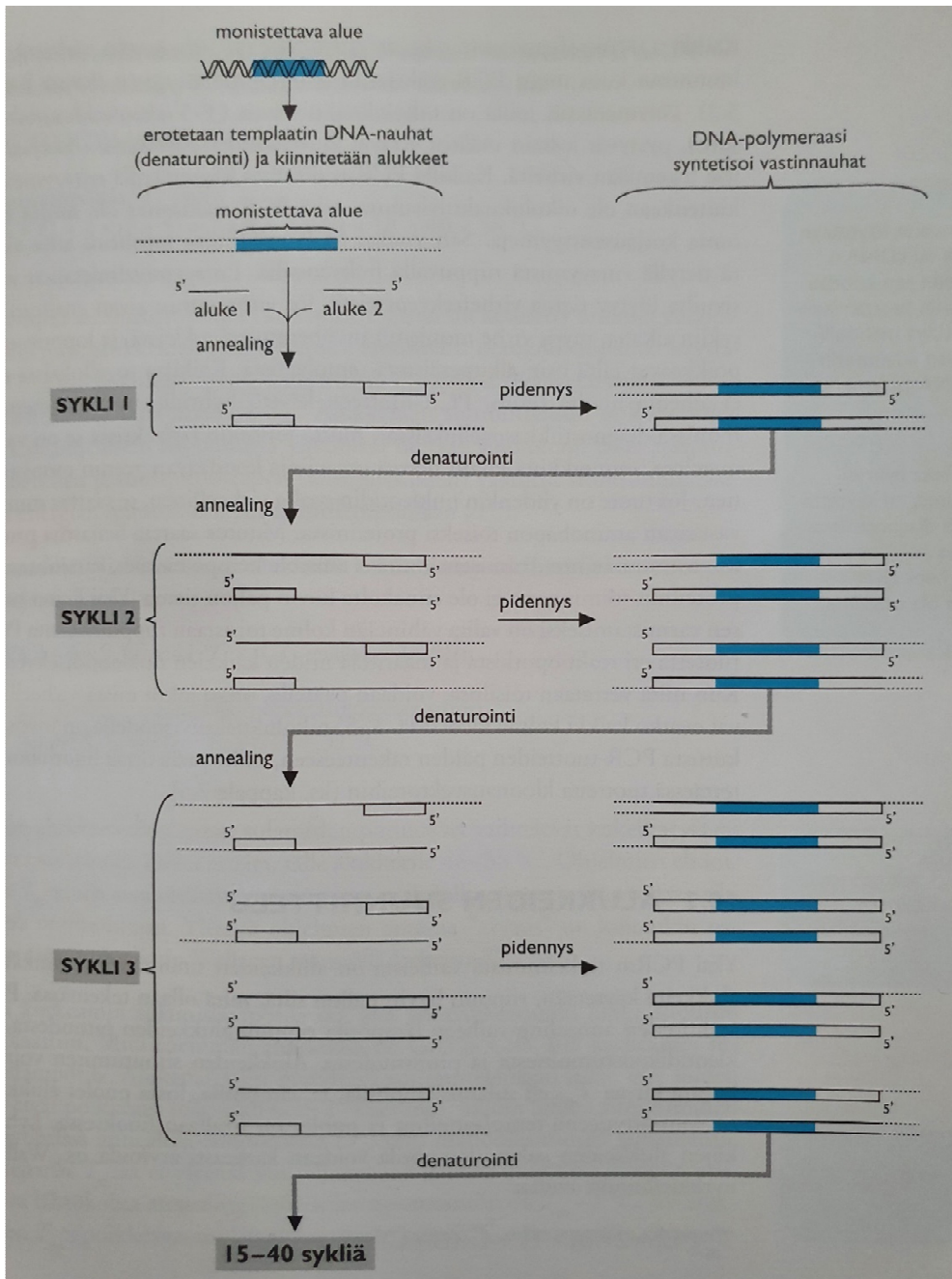
3.1 PCR-menetelmän periaate

Yksinkertaisesti ilmaistuna PCR eli polymeerasiketjureaktio -menetelmä perustuu DNA:n monistamiseen tarkasti rajatulta DNA:n osuudelta DNA-polymeerasientsyymien avulla sekä monistuneen DNA:n tunnistamiseen. Reaktio on nopea ja voidaan toteuttaa pienistäkin näytämääristä. (Ulmanen ym. 2004, 48.)

PCR-reaktion onnistumiseksi tarvitaan vain pieni määrä haettavan kohdeorganismien DNA:ta malliksi. Sitä kutsutaan alukkeeksi. Tutkimuksen kohteena olevaa DNA:ta vapautetaan ensin solujen sisältä. DNA denaturoidaan kuumentamalla, jolloin DNA-juoste avautuu ja sitä kutsutaan templaatiksi. Alukkeiden kiinnittyminen templaattiin tapahtuu kuumennuksen jälkeen, kun lämpötilaa reaktiossa lasketaan nopeasti hetkeksi, niin että alukkeet voivat kiinnittyä templaattiin. Tätä kierrosta kutsutaan sykliksi, jota toistetaan riittävän kauan, jotta saadaan aikaiseksi tunnistettava määrä haettavaa DNA:ta. (Suominen ym. 2010, 154.)

PCR-reaktiossa tarvitaan DNA-polymeerasientsyymien, alukkeiden ja templaattien lisäksi nukleotidejä eli DNA:n rakennuspalikoita, puskuriliuos, jossa on tietty pH ja ioneja, jotka toimivat reaktion katalyytteinä. Yleensä PCR-reaktio tehdään hyvin pienessä koeputkessa tai kuoppalevyssä, jossa on useita pieniä putkia. Reaktio-putket tai -levy, joissa on käsiteltyä näytettä ja PCR-reaktiossa tarvittavat reagenssit, laitetaan laitteeseen, joka kuumentaa reaktioliuoksen monistumiselle otolliseen lämpötilaan ja jäähdyttää reaktion oikealla hetkellä ennalta määritettyjen syklien mukaan. Näitä lämmitys – jäähdytys-syklejä on usein maksimissaan 40. (Solunetti 2006.) Kuvasta 1 näkyy polymeerasiketjureaktion vaiheet ja se, miten monistettavan DNA:n kopioituminen on eksponentiaalista.

Perinteisissä PCR-menetelmissä monistus tapahtuu ensin ja sen jälkeen monistetulle DNA:lle tehdään vielä puhdistus ja tunnistus esimerkiksi AGE:lla eli agarosigeelielektroforeesilla. Nimensä mukaisesti reaaliaikaisella PCR:llä voidaan seurata monistuvan DNA-tuotteen määrää reaktion aikana. Seuranta pohjautuu fluoresoivan väriaineen lähettämään signaaliin silloin, kun se tarttuu monistuvaan DNA:han ja joka pystytään mittaamaan. Merkkiaine eli fluoresoiva koetin, on aina kopioitavalle DNA:lle tietynlainen ja spesifinen. (Suominen ym. 2010, 166 - 168.)



Kuva 1 Polymeerasiketjureaktion periaate (Suominen ym. 2010, 157).

PCR-reaktiot tehdään hyvin pienessä mittakaavassa. Pipetoitavat näytemäärät ovat vain muutamia mikrolitroja. Laboratoriotyöskentelyssä täytyy olla erityisen tarkka ja yleensä PCR-menetelmissä on mukana erilaiset kontrollit indikoimassa reaktion onnistumista tai epäonnistumista. Varsinkin negatiivisella kontrollilla testataan se, ettei tuloksena saada väärää positiivisia tuloksia. (Suominen ym. 2010, 156.)

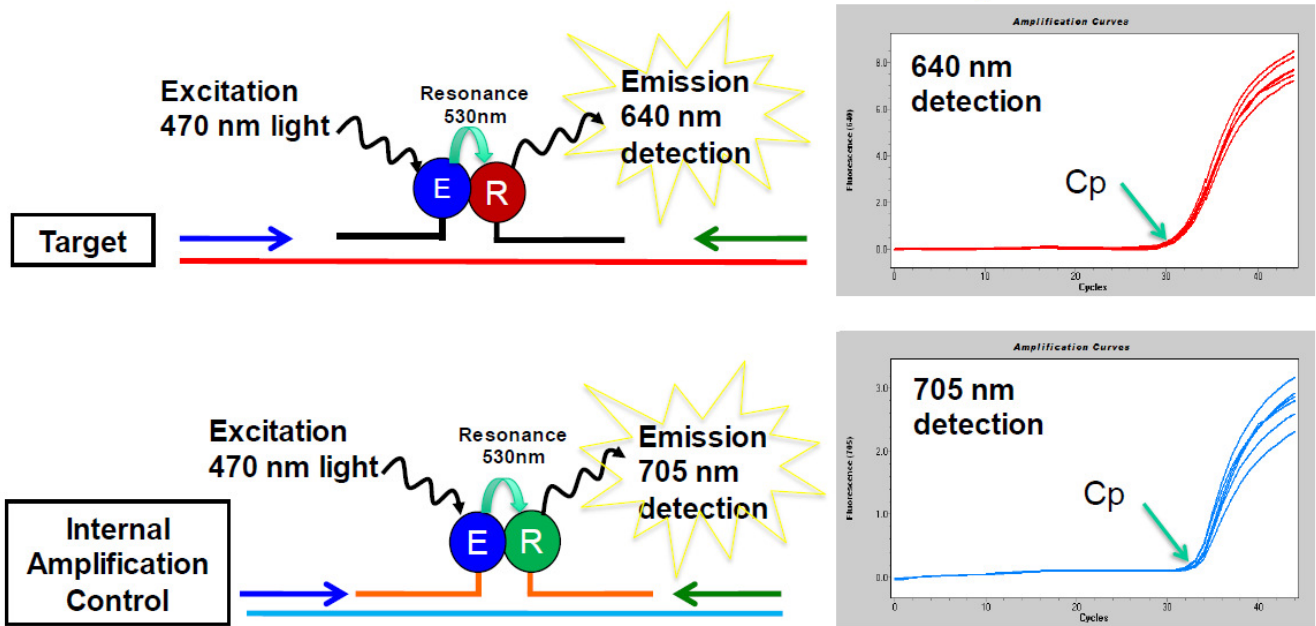
3.2 GENE-UP[®] -menetelmä

Atria Suomi Oy:n Nurmon laboratorioon on hankittu BioMerieux:n GENE-UP[®] -Real-Time PCR -laitteisto, jolla voidaan määrittää patogeeneja hyvin nopeasti ja luotettavasti. GENE-UP[®] Salmonella 2 (SLM2) ja GENE-UP[®] *L. monocytogenes* 2 (LMO2) -menetelmät ovat reaaliaikaiseen polymeerasiketjureaktioon perustuvia analyyseja menetelmien nimien mukaisten patogeenisten bakteerien toteamiseksi elintarvikkeista, eläinten rehuista ja ympäristönäytteistä. (BioMerieux 2019.)

GENE-UP[®] -detektio eli tunnistaminen perustuu ns. FRET-teknologiaan (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Reaktiossa on kaksi leimattua koetinta, joiden kiinnittyessä monistuvaan DNA-juosteeseen vapautuu energiaa valona tietyllä aallonpituudella ja joka voidaan mitata. Näytteestä tuleva fluoresenssi-signaali mitataan aallonpituudella 640 nm. Fluoresenssisignaali on suoraan verrannollinen monistuneen DNA:n määrään. Näistä mittauksista laite tekee tutkittavalle kohteelle kuvaajan eli monistumiskäyrän, jonka muodon perusteella ohjelma tulkitsee, oliko näytteessä läsnä tutkittavaa mikrobia vai ei. PCR-reaktion lopuksi laite määrittää monistuneelle DNA:lle sulamispisteen, jonka avulla voidaan varmistua määrittämisen spesifisyydestä. Sulamispisteen avulla kohdemikrobia voidaan identifioida, vaikka DNA:n monistuminen olisi ollut riittävän vahvaa. (BioMerieux 2019.)

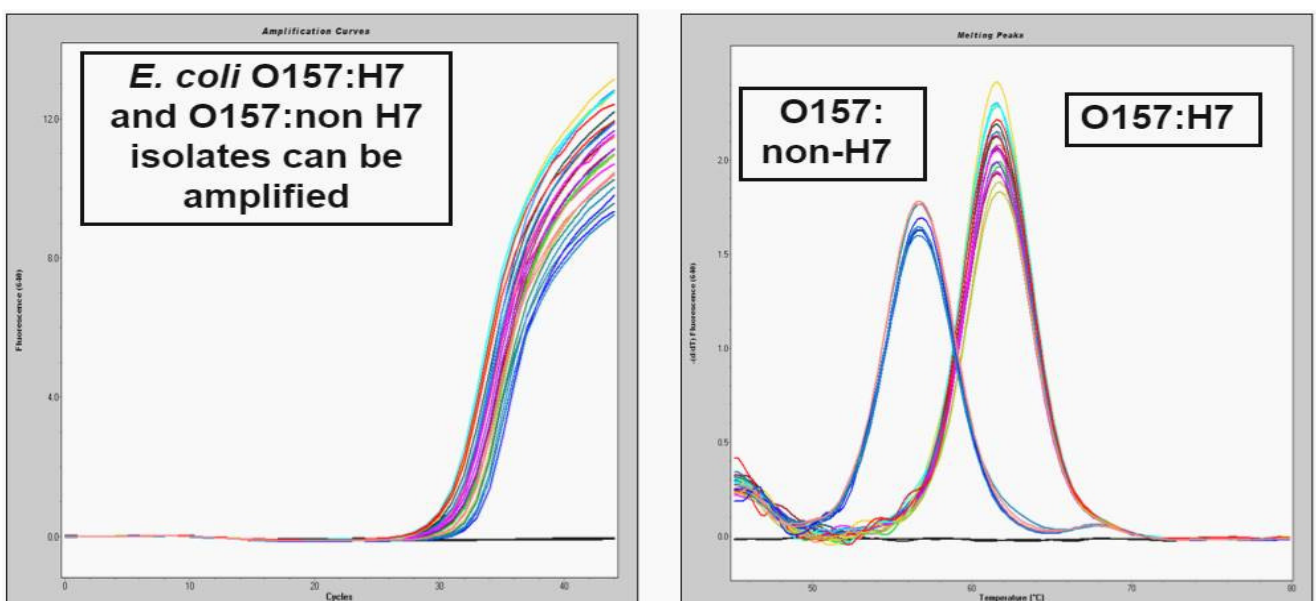
GENE-UP[®] -PCR-menetelmässä on jokaisella näytteellä mukana myös sisäinen monistuskontrolli, jonka avulla voidaan todeta, että monistusreaktio on toiminut. Sisäisen monistuskontrollin muodostama fluoresenssi-signaali mitataan aallonpituudella 705 nm. GENE-UP[®] -menetelmän ohjelma tulkitsee tämän automaattisesti. Sisäiselle kontrollille on myös määritetty oma sulamispisteensä. (BioMerieux 2019.)

Kuvassa 2 havainnollistetaan FRET-teknologian periaatetta ja osoitetaan se, missä kohtaa monistuvan DNA:n muodostama signaali on niin voimakasta, että se voidaan mitata. Kuvassa on fluoresenssin perusteella laitteen muodostama monistuskäyrä sekä Cp eli crossing point, jolla tarkoitetaan sitä kohtaa, jossa monistuvaa DNA:ta on niin paljon, että se erottuu ns. taustakohinasta. Mitä pienempi Cp on, sitä enemmän reaktiossa on haettavaa kohdemikrobia. Kuvassa 2 on sekä kohdeorganismien että sisäisen monistuskontrollin reaktiot. (BioMerieux 2019.)



Kuva 2 FRET-tekniikan periaate (BioMerieux 2019). Kun kaksi fluoresoivaa koetinta kiinnittyy monistuneeseen DNA-juosteeseen, tapahtuu energian siirto valona, joka voidaan detektoida. Kohdemikrobilla ja sisäisellä monistuskontrollilla on erilaiset, spesifiset aallonpituudet.

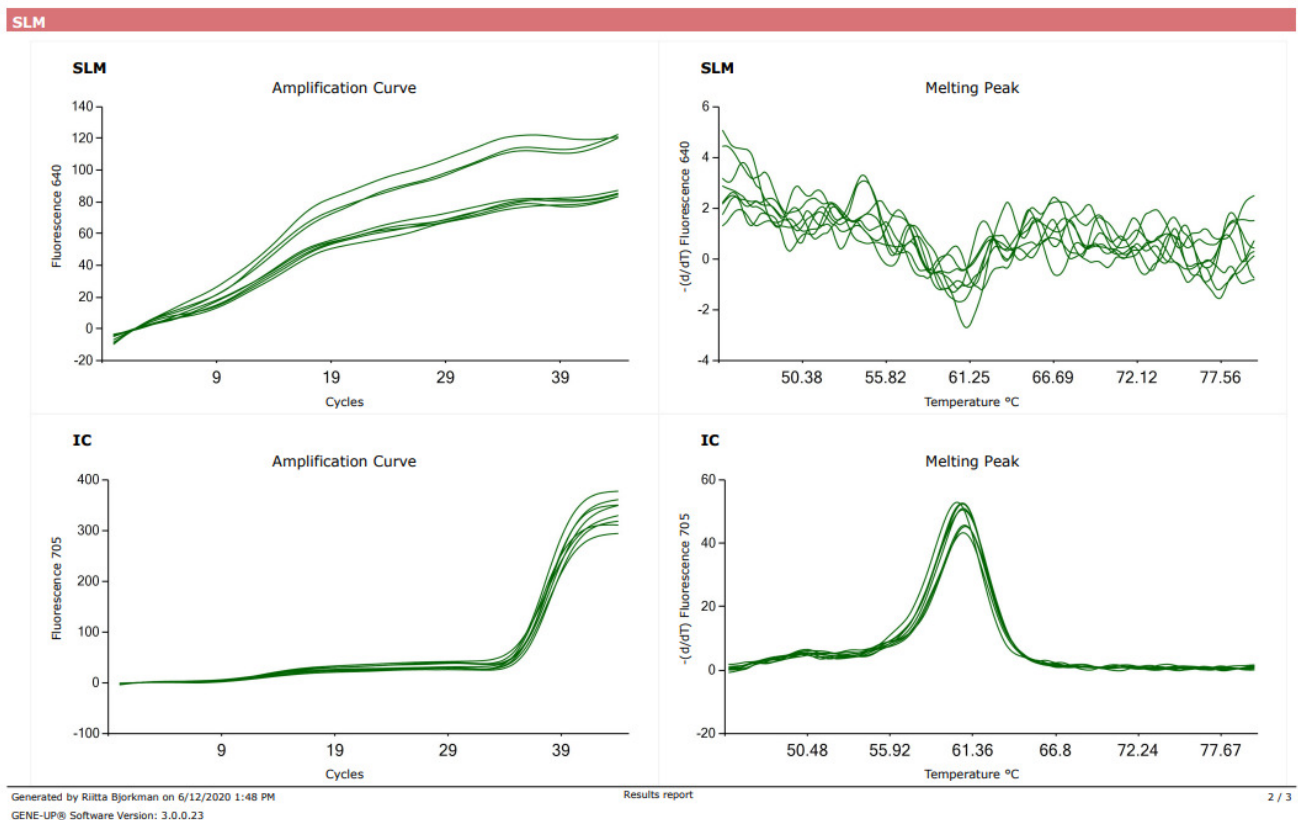
Sulamispisteen määrittäminen on erityisen tärkeässä roolissa, kun tunnistetaan eri antigeenien omaavia mikrobeja. Esimerkiksi *E. coli* O157:H7:n erottaminen *E. coli* O157:non H7:sta. Kuvassa 3 on määritetty sulamispisteet molemmille bakteereille. Kuvasta voidaan sulamispisteen perusteella tulkita selkeästi näiden kahden ero. (BioMerieux 2019)



Kuva 3 Sulamispisteen määrittäminen *E. coli* O157:H7 verrattuna *E. coli* O157:non H7 (BioMerieux 2019). Sulamispisteen kuvaajan perusteella voidaan identifioida monistuneen DNA:n spesifisyys.

Kuvassa 4 on esimerkki tapauksesta, jossa kohdemikrobia ei ole ollut näytteissä ja monistuksessa ei ole tapahtunut juuri mitään, eikä sulamispistettä ole voitu määrittää. Kuvassa alavasemmalla näkyy, miten selkeästi sisäisen kontrollin monistus on onnistunut ja alhaalla oikealla näkyy, miten sisäisen kontrollin sulamispisteet on määrittäneet.

Graphs



Kuva 4 PCR-negatiivisen näytteen monistuskäyrä oikealla ylhäällä ja sulamispiste verrattuna sisäiseen kontrolliin (kuvassa alla).

Toimivan PCR-menetelmän perustana on huolellinen suunnittelu eli PCR-reaktioiden optimointi. Optimoinnin tekemiseen täytyy olla tietoa käytettävästä entsyymistä ja sen oikeasta määrästä, joka taasen riippuu käyttävistä alukkeista ja niiden määrästä. PCR-reaktiossa pitää olla oikea määrä denukleotidejä (dNTP), joiden määrä vaikuttaa PCR:n spesifisyyteen. Myös reaktiossa olevalla magnesiumkloridilla on tärkeä merkitys, sillä se vaikuttaa PCR-reaktiossa moneen eri vaiheeseen mm. alukkeiden kiinnittymiseen, entsyymien aktiivisuuteen sekä muodostuvan tuotteen spesifisyyteen. PCR-reaktiossa erityisen tärkeä rooli on denaturaatioajalla ja -lämpötilalla. Jos ne eivät ole kohdallaan, voi DNA-juosteiden denaturaatio olla epätäydellinen ja syntyy epäspesifisiä lopputuotteita. Alukkeiden kiinnittymiseen ja pidentymiseen vaadittava lämpötila ja aika täytyy myös olla optimoituja. Reaktiosyklien määrään vaikuttaa suoraan vain malli-DNA:n määrä. Monesti PCR

ohjelmoidaan suorittamaan liikaa syklejä, jolloin lisääntyy riski, että syntyy epäspesifistä lopputuotetta. Jos syklejä on liian vähän, voi olla, ettei kohteena olevaa lopputuotetta synny riittävästi. (Suominen ym. 2010, 162 - 164.)

Verifioinnin kohteena olevan BioMerieux:n GENE-UP® PCR-menetelmien kitit, eli reagenssit, on valmiiksi suunniteltu haettaville mikrobeille ja ne sisältävät kaikki PCR-reaktiossa tarvittavat reagenssit. Myös laitteen ohjelmointi ja detektointi on suunniteltu niin, ettei laitteen käyttäjän tarvitse suunnitella PCR:n optimointia, vaan kaikki on jo suunniteltu valmiiksi ja analyysin suorittaminen tehty helpoksi.

Näytteen lyysaus-vaiheessa eli DNA:n uuttovaiheessa käytettävässä Lysis -liuoksessa on DNA:n uutolle optimaalinen puskuriliuos ja lasihelmiä, jotka hajottavat solut vortexoinnin aikana. Lysis-liuosputkissa on spesiaali silikonikansi, "Magic cap", jonka läpi näyte pipetoidaan liuokseen, eikä kansi tarvitse, eikä niitä saa edes avata missään vaiheessa. Jokaisessa PCR-reaktioputkessa on näytesyksilölliset alukkeet (primer) ja koettimet (prope), sisäinen monistuskontrolli, nukleotidit ja magnesiumkloridia kuivattuna reagenssi -pellettinä. Kontaminaation vähentämiseksi, menetelmän valmistaja on tehnyt valmiit reagenssit reaktioputkiin, niihin tarvitsee vain pipetoida rikastetusta näytteestä tehty DNA:n uutoliuos (lysis-liuos). Työn suoritus vaiheessa PCR-putkista poistetaan suojakansi ja näytteiden pipetoinnin jälkeen putkiin laitetaan ns. optinen kansi. Menetelmän suorittaminen on tehty helpoksi verrattuna muihin vastaaviin menetelmiin, joissa on useampia pipetointivaiheita. (BioMerieux 2019.)

Yksi GENE-UP® -PCR-menetelmän eduista on myös se, että samaan PCR-ajoon voidaan laittaa sekä salmonella- että listeria-näytteet ja näin saadaan edelleen nopeutettua tulosten saantia. Yhteen PCR-ajoon voidaan laittaa yhteensä 96 näytettä kerrallaan.

BioMerieux:n (2019) mukaan, GENE-UP® -PCR-laitteella voidaan myös käyttää muiden valmistajien PCR-reagensseja ja tehdä omat ohjelmoinnit ns. avoimeen softaan, jolloin ei tarvitse käyttää valmiita kittejä eikä valmista ohjelmaa. Se kuitenkin vaatii hyvin tarkkaa suunnittelua ja perehtymistä asiaan.

BioMerieux:n GENE-UP® -PCR-menetelmä jaotellaan kolmeen vaiheeseen; näytteen valmisteluun, monistus ja detektointi -vaiheeseen sekä varmistukseen. Kuvassa 5 on kuvattuna GENE-UP® -PCR-menetelmän mukainen työn suoritus pääpiirteittäin.

Näytteen valmistelu alkaa näytteen punnitsemisesta ja rikastusliemen lisäämisestä, jonka jälkeen näyte liemineen laitetaan kasvatukseen menetelmän mukaiseen lämpötilaan menetelmän mukaiseksi ajaksi, jolloin näytteessä mahdollisesti oleva kohdemikrobi lisääntyy (Kuva 5, kohta 1).

Rikastuksen jälkeen näyterikasteesta pipetoidaan 20 µl näytteeksi lysis-putkeen, joka on kiinnitetty lysis-putkitelineeseen ja joka edelleen on kiinnitetty heavy rack -telineeseen, jotta lysis-putkiteline pysyy paikoillaan (Kuva 5, kohta 2).

Lysis-putkiteline irrotetaan heavy rack -telineestä, sen päälle laitetaan suojakansi ja sitä vortexoidaan 2200 rpm nopeudella 5 minuuttia, eli lyysataan eli uutetaan, jolloin solut hajoavat ja DNA vapautuu (Kuva 5, kohta 3).

Vortexoinnin jälkeen lysis-putkesta pipetoidaan 10 µl uutettua näyteliuosta PCR-reaktioputkeen, joka on ensin kiinnitetty PCR-putkitelineeseen (Kuva 5, kohta 4) ja josta on ensin poistettu suojakansi ja tarkistettu, että putkessa on sininen reagenssi -pelletti paikalla (Kuva 5, kohta 5).

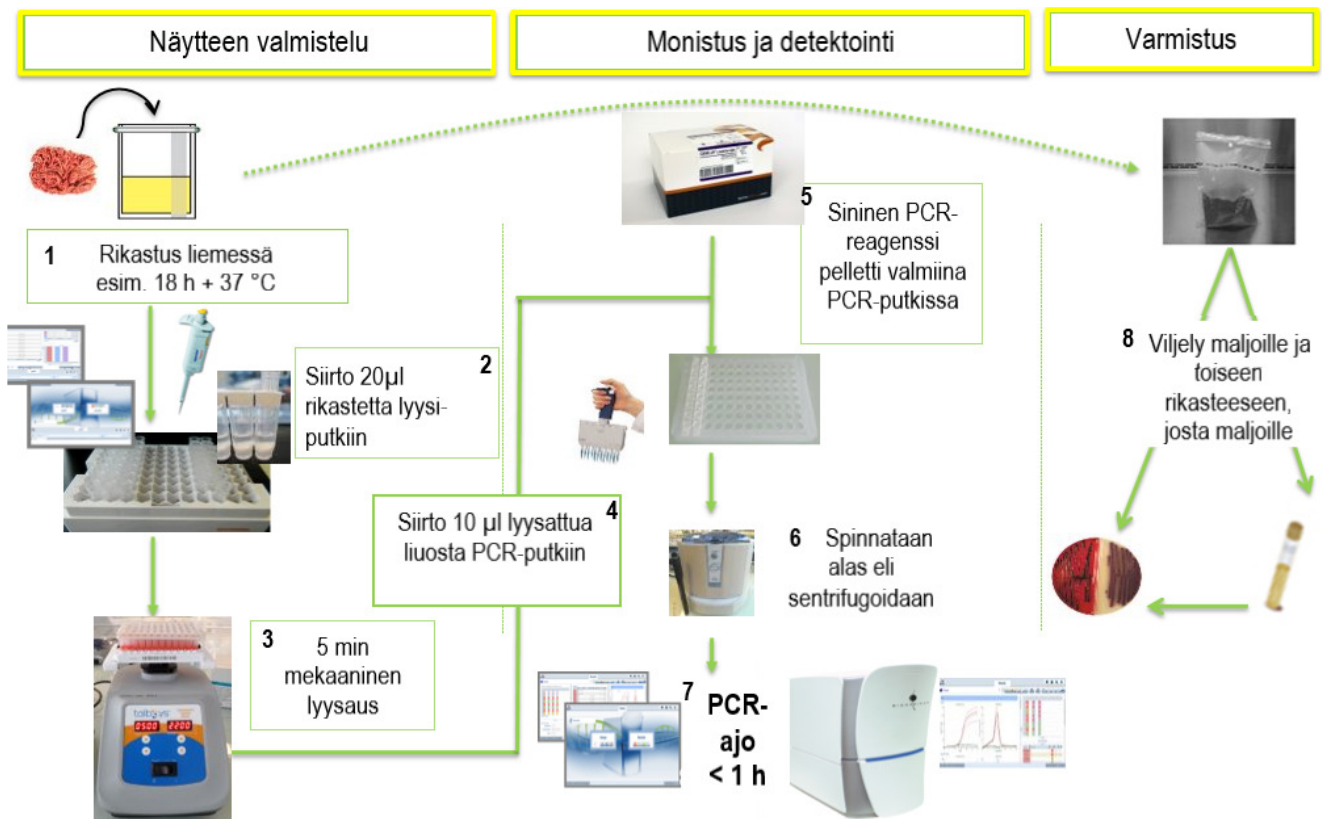
Kun uutettu näyteliuos on pipetoitu PCR-putkeen, PCR-putki suljetaan optisella kannella. Sen jälkeen PCR-putki laitetaan mini -sentrifugiin ja putkessa oleva näyteliuos ”spinnataan” alas eli sentrifugoidaan, jotta pieni näytemäärä varmasti sekoittuu PCR-putkessa olevan reagenssin kanssa (Kuva 5, kohta 6).

Seuraavaksi PCR-putki laitetaan GENE-UP® -lämpölaitteeseen ja käynnistetään valittu ohjelma analyysin aloittamiseksi (Kuva 5, kohta 7).

PCR-ajo kestää alle tunnin. Ennen PCR-ajoa on pitänyt syöttää näytteiden tiedot laitteeseen ja valita ajettava PCR-ajo. Näytteiden tiedot voidaan laittaa koneelle valmiiksi jo vaikka edellisenä päivänä tai juuri ennen ajoa. Jos näytteessä ei todeta haettavaa mikrobia, on analyysi valmis ja tulos negatiivinen. Jos PCR-ajon tulos on positiivinen, se täytyy vielä varmistaa mikrobiologisilla viljelyillä selektiivisille kasvualustoille (Kuva 5, kohta 8).

PCR-ajon tuloksena saattaa tulla myös ”inhibition” eli estyminen, joka tarkoittaa sitä, ettei monistus ole jostain syystä onnistunut. Sen syynä voi olla esimerkiksi matriisista tuleva vaikutus tai pipetoinnissa on tapahtunut virhettä, esimerkiksi uuttoluoksesta on tullut lasihelmiä

mukaan, kun uuttoliuosta on pipetoitu PCR-putkiin. Siinä tapauksessa näyte, tässä kohtaa uutettu näyte, laimennetaan suoraan PCR-putkeen GENE-UP®-ohjeistuksen mukaan 1:3 käyttäen kontrollipuskuriliuosta laimennusliuoksena. Jos tulos edelleen on epäselvä, tehdään lisälaimennus 1:10 ja jos tulos edelleen on epäselvä, tehdään tarkistukset sillä oletuksella, että näyte on positiivinen.



Kuva 5 GENE-UP® -PCR-protokolla eli työn suoritus (BioMerieux 2019).

GENE-UP® -PCR-menetelmän mukainen protokolla on helppo suorittaa. Kuitenkin pitää muistaa, että työskennellään aseptisesti ja se ettei mitään reaktioputkia avata pipetointien eikä PCR-ajon jälkeen suuren kontaminaatoriskin vuoksi. Huomioitavaa on myös se, että PCR-työtä suorittaessa ei missään vaiheessa siirretä näytteitä väärään suuntaan. Protokollan mukaan, näytteiden esikäsittely suoritetaan samassa tilassa, missä muutkin laboratorion patogeeni-näytteet esikäsitellään eli punnitaan ja rikastetaan. Nurmon laboratorion tiloissa on DNA:n uuttoa varten vetokaappi, jossa esirikastetut näytteet pipetoidaan lysis-putkiin. Samassa tilassa on seuraavaa vaihetta varten laminaarivirtauskaappi, jossa siis pipetoidaan uutettu näyteliuos PCR-putkiin. Sen jälkeen PCR-putket siirretään eri tilaan, jossa tehdään ensin sentrifugointi ja sen jälkeen itse PCR-ajo. PCR-ajon jälkeen, PCR-putket laitetaan tiiviisti suljettavaan purkkiin ja hävitetään oikeaoppisesti. Myös näyterikasteet ja muut jätteet hävitetään asianmukaisesti ja huolehditaan välineiden ja pintojen puhdistuksesta.

4 VALIDOINTI JA VERIFIOINTI

Menetelmien käyttöönotoista puhuttaessa menevät käsitykset validointi ja verifiointi monesti sekaisin. Merkitykset ovat selkiytyneet vuosien saatossa ja usein on jo käytössä oikeat termit. Validointi on laajempi kuin verifiointi ja validointia tehdään silloin, kun kehitetään ihan uutta menetelmää tai korvaamaan vanha menettely. Verifiointia tehdään silloin, kun otetaan käyttöön jonkin toisen tahon jo validoima menetelmä ja osoitetaan, että se toimii verifiointia tekevän toimijan toimesta. (Hägg 2016, 7.)

4.1 Validointi

Validointi on sitä, että todennetaan uuden menetelmän tai laitteen toimivuus käytännössä eli tehdään kattavasti testisarjoja, joista saadut tulokset dokumentoidaan ja raportoidaan (Hägg 2016, 7).

Validointi on menettely, jolla arvioidaan menetelmän ja laitteen soveltuvuutta ja suorituskykyä tiettyyn käyttötarkoitukseen. Validoinnilla tuotetaan vertailuarvoja parametreille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Validoinnille asetetut vaatimukset vaihtelevat menetelmän ja sen käyttötarkoituksen mukaan ja ne on asetettava tapauskohtaisesti. Validoinnilla tulee varmentaa, että testitulokset täyttävät lain ja säännöksiin vaatimukset, ovat loogisesti oikeita, käyttötarkoitukseen sopivia ja biologisen tai muun luokituksen mukaisia. Validoinnin laajuus riippuu tutkittavasta analyysimenetelmästä ja sen käyttötarkoituksesta. (Hägg 2016, 7.)

4.2 Verifiointi

Verifiointi ei ole niin laaja kuin validointi. Verifiointia tehdään silloin, kun otetaan käyttöön esimerkiksi jokin analysointimenetelmä, jonka joku toinen toimija tai laitevalmistaja on jo validoinut. Verifiointia puhutaan myös silloin, jos tehdään jo käytössä olevaan menettelyyn muutoksia, esimerkiksi lisätään menetelmään eri näytematriiseja tai käsitellään näytettä eri tavoin. (Hägg 2016, 8.)

Testauslaboratorioiden toimintaa ohjaavan yleisen standardin SFS-EN ISO 17025 (2017, 15) mukaan, laboratorion on valittava testausmenetelmikseen asianmukaisia ja tarkoitukseen sopivia menetelmiä. Asianmukaisuudella standardi viittaa siihen, että menetelmien tulisi olla kansainvälisesti tai kansallisesti hyväksytyjä tai tieteellisesti toimiviksi todettuja tai laitteen valmistajan toimesta määritelty. Standardin mukaan laboratorion on myös varmistettava, että

sillä on käytössään valittujen menetelmien viimeisimmät versiot. Laboratorion on lisäksi todennettava, että se hallitsee menetelmän käytön ja saa sillä oikeellisia tuloksia eli menetelmät tulee verifioida.

4.3 Verifioinnin standardeista

SFS-EN ISO 17025:2017 on siis standardi, joka ohjaa testauslaboratorioiden toimintaa yleensä. Kirjainyhdistelmät SFS ja EN standardin alussa tarkoittavat sitä, että se on vahvistettu myös Suomessa ja Euroopassa. ISO-kirjainlyhenne standardin nimessä tarkoittaa sitä, että kyseinen standardi on koko maailmassa vahvistettu standardi. (SFS, [Viitattu 22.11.2020].)

ISO-, NMKL- ja SFS-standardien saatavuus vaatii käyttöoikeuden eli ko. organisaatiolle maksetaan lisenssi, jotta standardeja voidaan käyttää. Yleensä ne ovat sähköisessä muodossa. NMKL on Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea ja ISO (International Organization for Standardization) eli kansainvälinen standardisoimisjärjestö. ISO-organisaatiossa Suomea organisaatiossa edustaa SFS, Suomen standardisoimisjärjestö ja NMKL:ssä Ruokavirasto. Edellä mainitut organisaatiot julkaisevat myös laboratoriotuotoimintoihin liittyviä ja niissä noudatettavia suosituksia, standardeja ja menettelytapoja. Atria Suomi Oy:n laboratoriollla on näiden organisaatioiden julkaisemiin standardeihin käyttöoikeus.

Pohjoismaissa menetelmien verifiointia ohjaa menettelyohje NMKL 32 2017 Verification of microbiological methods. Menettelyohje ohjeistaa, miten ja millä laajuudella verifiointi tulee suorittaa. Menetelmän verifiointiin vaikuttaa se, millä laajuudella menetelmä on alun perin validoitu. Menettelyohje NMKL 32:n mukaan alkuperäinen validointi jaetaan viiteen eri tasoon. Menetelmät voivat olla muun muassa niin sanottuja virallisia standardeja esimerkiksi NMKL:n tai ISO:n julkaisemia laajasti validoituja, laboratorioiden välistä vertailua sisältäviä menetelmiä tai menetelmä voi olla yksittäisen laboratorion itse kehittämä menetelmä (NMKL 32, 4). Laboratorioilla on harvemmin käytössä itse kehittämiä menetelmiä, mutta niitäkin laboratoriot voivat käyttää, kunhan ne validoidaan suunnitellusti ja validointi dokumentoidaan kattavasti.

Verifioinnissa oleellista on valita elintarvikematriiseiksi eli verifioitaviksi näytteiksi sellaiset, joita on käytetty myös alkuperäisessä validoinnissa ja joita tutkitaan tavallisestikin verifiointia tekevässä laboratoriossa (NMKL 32, 13). Riippuen verifioitavien matriisien lukumäärästä, NMKL 32:ssa on määritetty verifioinnin tasot eli kuinka monta siirrostettua näytettä tarvitaan kutakin matriisia varten sekä kuinka monta eri elintarvikenäytettä kuhunkin elintarvikeryhmään

tulee ottaa. Standardin mukaan LOD:n määrittämiseksi valitaan jokaista validoitua näytekategoriaa kohti kaksi eri näytematriisia, joista tutkitaan 6 ympättyä näytettä ja kaksi normaalia näytettä. Yhteensä siis 16 näytettä näytekategoriaa kohti. Siirrostetuissa näytteissä tulee olla kolme eri pitoisuutta, hyvin matala, keskitaso ja korkea pitoisuus. (NMKL 32 2017, 13.)

Kvalitatiivisen, mikrobiologisen menetelmän osalta tärkein verifioitava ominaisuus on määrittärajana LOD₅₀ (Level of detection) (NMKL 32, 13). Verifiointissa voidaan määrittää muitakin ominaisuuksia laboratorion oman kiinnostuksen mukaan. Näitä ovat spesifisyys, eli miten herkkä menetelmä on, selektiivisyys eli miten hyvin haettava mikrobi tulee esiin muiden bakteerien joukosta ja kestävyys, jolla tarkoitetaan tässä yhteydessä sitä, miten verifioitavat näytteet, tai niiden sisältämät bakteerit, kestävät esimerkiksi pH:n tai lämpötilan muutoksia tai analyysin keskeytyksen viikonlopun ajaksi. (NMKL 32, 14.)

Laboratorion olisi hyvä osallistua verifioitavalla menetelmällä laboratorioden välisiin vertailututkimuksiin, joilla voidaan osoittaa, että laboratorio saa yhteneväisiä tuloksia muiden laboratorioden kanssa eli verifiointi on suoritettu oikeellisesti (NMKL 32, 14).

ISO-organisaation laatimassa standardiluonnoksessa ISO/DIS 16140-3 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative implemented in a single laboratory (astuu voimaan tammikuussa 2021) kerrotaan myös alusta alkaen, miten verifiointi suoritetaan ja vielä yksityiskohtaisemmin kuin NMKL 32 menettelyohjeessa. ISO 16140-3-standardi ohjeistaa laboratorion suorittamaan verifioitavan menetelmän kokonaisuudessaan, jotta saadaan tietoa siitä, miten menetelmä toimii. Vasta sen jälkeen suoritetaan verifiointi siirrostetuilla näytteillä. (ISO/DIS 16140-3, 15.) ISO-standardissa on ohjeistettu siirrosteen valmistaminen bakteerisuspension kasvattamisesta lähtien ja miten tehdään eri pitoisuuden omaavat siirrostetut näytteet (ISO/DIS 16140-3, liite C). Standardiluonnoksen ISO/DIS 16140-3 liitteessä A on myös jaoteltu elintarvikkeet hieman tarkemmin ja selkeämmin eri ryhmiin kuin menettelyohjeessa NMKL 32.

Tässä verifiointissa noudatettiin ensisijaisesti NMKL 32 menettelyohjetta, ottaen huomioon standardiluonnoksen ISO/DIS 16140-3:n vaatimukset verifioitavien matriisien suhteen.

5 VERIFIOINNIN SUUNNITTELU

5.1 Verifioinnin tavoite ja tausta

Verifioinnin tavoitteena oli osoittaa GENE-UP® Salmonella 2 (SLM2) - ja GENE-UP® *L. monocytogenes* 2 (LMO2) -PCR-menetelmien toimivuus laboratoriossa analysoitavilla matriiseilla ja ottaa menetelmät käyttöön analytiikkaan syksyllä 2020.

Tarkoituksena oli myös saada molemmille PCR-menetelmille FINAS-akkreditointi laboratorion vuosittaisen akkreditointiarvioinnin yhteydessä.

Verifiointi on riittävä menettely menetelmän käyttöönotossa silloin, kun menetelmä on validoitu EN ISO 16140-2:2016 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Methods validation Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method - standardin mukaan ja jos verifioitavat matriisit sisältyvät alkuperäiseen validointiin (ISO/DIS 16140-3:2017, 7).

GENE-UP® Salmonella 2 (SLM2) – ja GENE-UP® *L. monocytogenes* 2 (LMO2) - määritysmenetelmät on validoitu EN ISO 16140-2:2016:n mukaan laajasti erilaisille elintarvikkeille ja tuotantoympäristönäytteille (AFNOR Validointiraportti 2017 ja 2018).

Verifioinnissa noudatettiin NMKL 32 (2017) Verification of microbiological methods - menettelytapaa. Sen mukaan kvalitatiivisen menetelmän verifioinnissa todennetaan menetelmän toimivuus määrittämällä LOD₅₀ -arvo (Level of Detection), joka mittaa systemaattista virhettä (NMKL 32, 5). LOD₅₀ -arvo on mikrobiologisen menetelmän kvalitatiivisen verifioinnin tärkein määritettävä ominaisuus, eikä se saa olla kolmea kertaa suurempi kuin alkuperäisessä validoinnissa saatu vastaava arvo (NMKL 32, 14).

LOD₅₀ -arvon laskemiseksi voidaan käyttää Wilrich ja Wilrich:n Excel -laskuria, jota käytetään pääasiassa menetelmien alkuperäisissä validoinneissa LOD-arvon laskemiseen, mutta jota voidaan käyttää myös menetelmien verifioinneissa (NMKL 32, 6).

Lisäksi menetelmien antamien tulosten oikeellisuus todennettiin osallistumalla SLV:n järjestämään kansainväliseen vertailututkimukseen keväällä 2020.

5.2 Verifioinnissa käytettävät mikrobikannat

GENE-UP® Salmonella 2 (SLM2) -menetelmän verifioinnissa käytettiin kohdemikrobina laboratorion *S. pullorum* -kontrollikantaa (Salmonella enterica subsp. enterica serovar Pullorum, ATCC 13036 THL) pitoisuuksilla 10^0 , 10^1 ja 10^2 pmy/ml. Häiritseväksi flooraksi siirrostettiin *E. colia* (ATCC 25922) ja *Ent. faecalista* (ATCC 29212) pitoisuuksilla 10^4 pmy/ml.

GENE-UP® *L. monocytogenes* 2 (LMO2) -menetelmän verifioinnissa kohdemikrobina oli laboratorion kontrollikanta *L. monocytogenes* (ATCC 7644) pitoisuuksilla 10^0 , 10^1 ja 10^2 pmy/ml ja häiritseviksi kannoiksi siirrostettiin *E. colia* ja *L. innocua* (NCTC 11288) pitoisuuksilla 10^4 pmy/ml. Näin saatiin vertailtua sitä, miten *L. monocytogenes* tulee näkyviin, sillä erityisesti *L. innocua* elintarvikkeissa esiintyessään ja viljelymenetelmillä maljoilla analysoitaessa, peittää kasvullaan *L. monocytogeneksen* alleen ja on siten hankala havaita ja tunnistaa.

Mikrobikantojen käsittelyssä tuli noudattaa erityistä varovaisuutta, ettei altisteta laboratorion rutiininäytteitä kontaminaatiolle. Kantojen siirrostus tehtiin niille tarkoitettussa työtilassa ja rikastus eri viljelykaapissa kuin laboratorion päivittäiset näytteet. Kantojen siirrostusten jälkeen huolehdittiin pöytäpintojen, pipettien ja muiden välineiden puhdistuksesta desinfioivalla pesuaineella. Näytteiden rikasteet, mikrobikantojen kasvatusliemet ja laimennossarjojen liuokset autoklavoitiin ennen hävittämistä.

5.3 Verifioitavat matriisit

Verifioinnit toteutettiin NMKL 32:n mukaisesti huomioiden sen ja FINAS-akkreditointipalveluiden vaatimukset verifioitavien elintarvikematriisien suhteen (NMKL 32, 13; FINAS 2020a). FINAS:n elintarvikematriisien luokittelun taustalla on ISO/DIS 16140-3 Mikrobiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory -standardiehdotuksen matriisivaatimukset, mutta ryhmittelyä on FINAS:n taholta selkeytetty. Standardin NMKL 32 mukaan jokaista verifioitavaa matriisiryhmää kohti pitää olla kaksi eri matriisia. Verifiointiin valittiin sellaisia elintarvikkeita matriiseiksi, joita yleensäkin tutkitaan laboratoriossa salmonellan ja *L. monocytogeneksen* varalta ja jotka kuuluivat alkuperäisen validoinnin matriiseihin. Lisäksi verifioitiin tuotantoympäristönäytteet, joita myös otetaan tuotannosta säännöllisesti patogeenien esiintymisen varalta. Listerian verifioinnissa oli lisänä vielä

suolalaukka, josta seurataan *L. monocytogenes* päivittäin. Se kategorioitiin tuotantoympäristönäytteisiin.

Verifioinneissa käytetyt matriisit ovat ryhmiteltyinä yhdistelmäelintarvikkeisiin, kasviksiin, hedelmiin, marjoihin ja viljoihin ja niistä tehtyihin valmisteisiin, lihat, munat ja niistä tehdyt valmisteet sekä tuotantoympäristönäytteisiin. Taulukossa 1 on lueteltu salmonellan osalta käytetyt matriisit ja *L. monocytogenes* -menetelmän osalta taulukossa 2.

Taulukko 1 Salmonella-menetelmän verifioinnin matriisit

FINAS matriisiryhmät	Verifioinnissa ryhmää edustanut matriisi
Yhdistelmäelintarvikkeet	Leppäsavumarinadi, kevyt majoneesi, hodari
Kasvikset, hedelmät, marjat ja viljat ja niistä tehdyt valmisteet	Tomaattikuutio, sipulimurska
Lihat ja munat ja niistä tehdyt valmisteet	Broilerin filee, metwursti
Tuotantoympäristönäytteet	Sivelynäytteet tuotantoympäristöstä (ns. salmonellakierros)

Taulukko 2 *L. monocytogenes*-menetelmän verifioinnin matriisit.

FINAS matriisiryhmät	Verifioinnissa ryhmää edustanut matriisi
Yhdistelmäelintarvikkeet	Maksalaatikko, italiansalaatti, lohileipä, red hunajamarinadi
Kasvikset, hedelmät, marjat ja viljat ja niistä tehdyt valmisteet	Tomaattikuutio, sipulimurska
Lihat ja munat ja niistä tehdyt valmisteet	Broilerin jauheliha, nakki, kalkkunaleike, metwursti, broilerin filee
Tuotantoympäristönäytteet	Sivelynäytteet tuotantoympäristöstä (ns. listeriakierros) ja kierrätetty suolalaukka (ns. alkarvesi)

6 VERIFIOINNIN TOTEUTUS

Verifiointi toteutettiin tammi - toukokuun aikana 2020. Aikataulua jouduttiin hieman jatkamaan, koska FINAS:n vuosittaisen akkreditointiarvioinnin yhteydessä havaittiin verifiointissa joitain puutteita ja sen johdosta piti tehdä jonkin verran lisää verifiointia. Lisäverifiointit suoritettiin kesän aikana ja saatiin valmiiksi heinäkuun lopussa. Salmonellan verifiointiin valittiin taulukossa 1 mainitut elintarvikkeet ja listerian verifiointiin taulukkoon 2 kirjatut elintarvikkeet. Koska kaikkia näytteitä ei käsitelty samana päivänä, myös siirrostettavia bakteerisarjoja piti tehdä useampina päivinä, sillä bakteerit eivät olisi säilyneet pitkiä aikoja rikastusliemissä elinkelpoisina. Verifiointiin kuuluvien näytteiden käsittelyjä jaettiin useammalle päivälle myös siitä syystä, koska näytteisiin siirrostettiin patogeenisiä bakteereita, niin pienempiä näyttemääriä oli helpompi hallita kontaminaatoriskin pienentämiseksi.

Ennen varsinaista verifiointia tehtiin useita näytesarjoja sekä siirrostamattomilla näytteillä että siirrostetuilla näytteillä eri elintarvikeryhmistä, että saatiin menetelmään jonkinlainen rutiini. Näytteet olivat laboratorion päivittäin tutkittavia näytteitä ja ne tehtiin rinnakkain laboratorion virallisten menetelmien kanssa. Saadut tulokset olivat yhteneväisiä. Joidenkin näytteiden kohdalla tehtiin myös menetelmävertailua GENE-UP® -PCR-menetelmän ja laboratorion toisen ns. pikamenetelmän, VIDAS® UP -menetelmän välillä. Joidenkin näytteiden kohdalla PCR-menetelmä oli herkempi eli se antoi positiivisen tuloksen, kun taas VIDAS:lla saatu tulos oli samasta näytteestä negatiivinen. Tästä ei kuitenkaan tehty suurempaa vertailua, vaan vertailu tehtiin omasta mielenkiinnosta menetelmien välillä. Verifiointin suorittaminen NMKL 32:n mukaan ei vaadi menetelmävertailua.

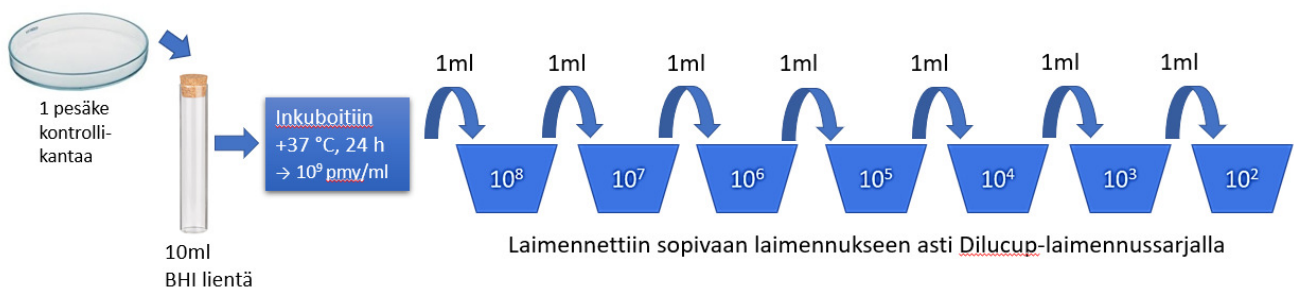
6.1 Siirrosteiden valmistus

Siirrosteiden valmistamisessa tarvittiin seuraavia laboratoriovälineitä, -tarvikkeita ja -liuoksia:

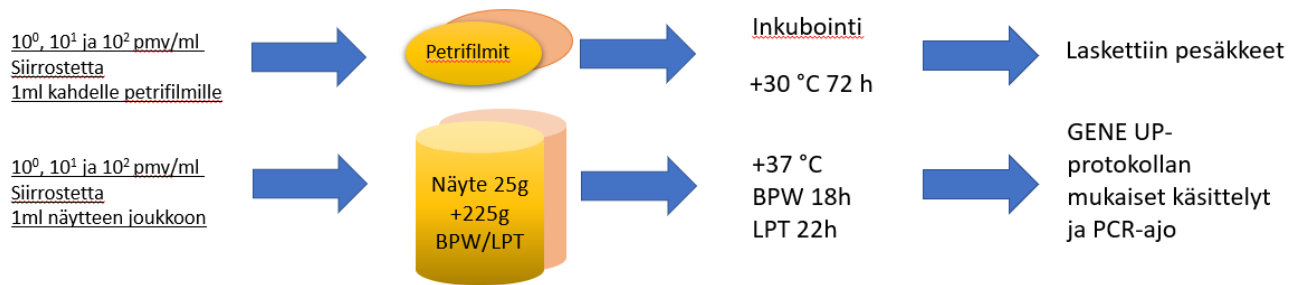
- steriilejä koeputkia
- viljelysilmukoita
- BHI-lientä
- AC-petrifilmejä (Aerobic Count, valmis elatusaineliuska kokonaisbakteerien määrittämiseen)
- laboratorion kontrollikannat

- inkubaattori, +37 °C
- Dilucup-laimennosliuoksia, joissa 9 ml MRD:tä
- Dilushaker-sekoitin
- automaattipipetti, 100 µl ja 1000 µl
- suodattimellisia pipetinkärkiä, 100 µl ja 1000 µl.

Laboration kontrollikannoista otettiin steriilillä viljelysilmukalla yksi pesäke 10 ml:aan koeputkessa olevaa BHI-lientä. Jokainen bakteeri siirrostettiin omaan BHI-liemiputkeen. Siirrostettuja BHI-liemiä kasvatettiin inkubaattorissa noin 24 tuntia +37 asteessa. Näin saatiin bakteerisuspensiot, joiden bakteeripitoisuuksien oletettiin olevan 10^9 pmy. Näistä tehtiin edelleen laimennossarjat pipetoimalla 1 ml dilucup-laimennos-liuoksiin pitoisuuksiin 10^2 , 10^1 ja 10^0 pmy asti. Joissakin matriiseissa tehtiin vielä lisälaimennos siten, että 10^1 ja 10^2 -laimennokset laimennettiin vielä 1:2. Näiden pitoisuudet on ilmoitettu salmonellan ja listerian verifiointin raakatulostaulukoissa (liite 1 ja liite 2) $10^1:2$ ja $10^2:2$. Laimennossarjojen bakteerimäärät varmistettiin viljelemällä siirrostettavasta laimennoksesta 1 ml AC-petrifilmille (Aerobic count) kahtena rinnakkaisena, samalla kun niistä tehtiin siirrostet matriiseihin. AC-petrifilmit kasvatettiin +30 °C:ssa 72 tuntia ja siirrostetut näytteet inkuboitii menetelmien mukaan, salmonella 18 tuntia ja *L. monocytogenes* 22 tuntia + 37 °C:ssa. Pesäkemäärät vaihtelivat AC-petrifilmeiltä laskettujen pesäkemäärien perusteella salmonella-siirrosteissa 0 – 190 pmy/ml välillä ja *L. monocytogenes*-siirrosteissa 0 – 230 pmy/ml välillä. Lasketut pesäkemäärät on ilmoitettu kyseisen matriisin kohdalla raakatulostaulukoissa, liitteissä 1 ja 2. Kuvassa 6 havainnollistetaan laimennossarjan tekeminen ja kuvassa 7 siirrosteiden siirto petrifilmeille ja näytematriisiin.

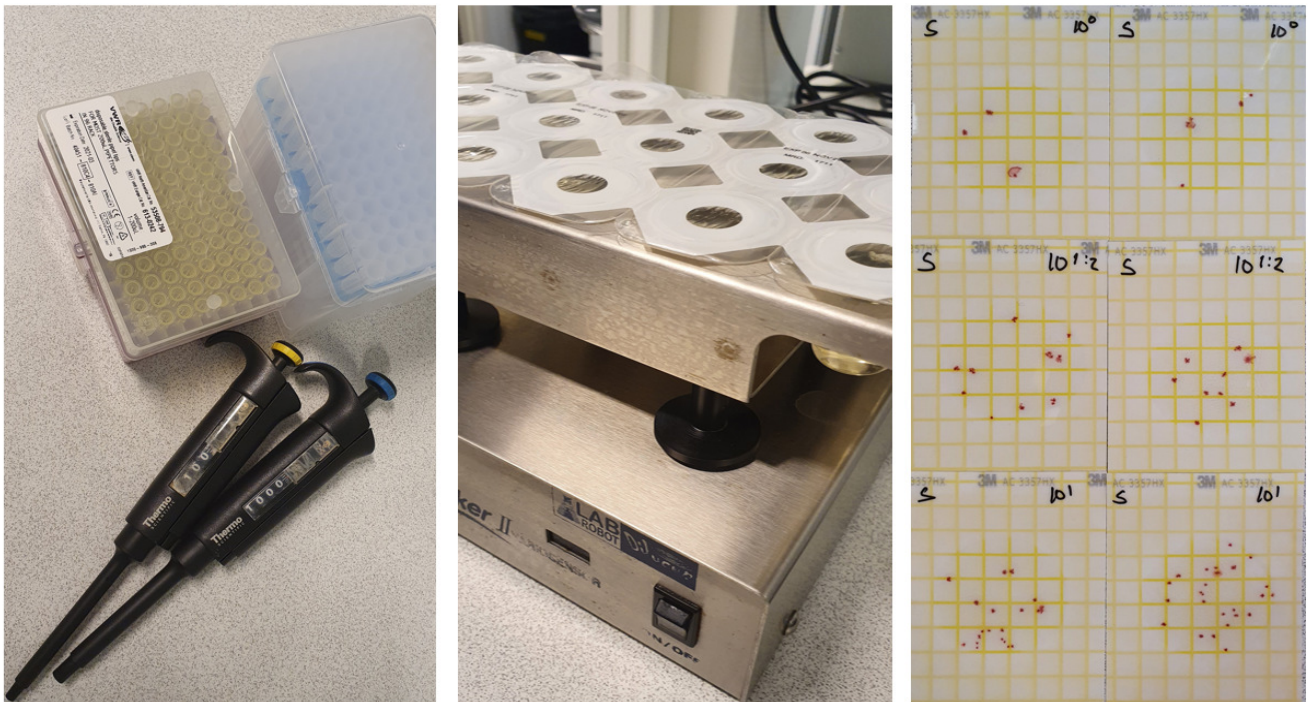


Kuva 6 Laimennossarjan tekeminen.



Kuva 7 Bakteerisiirrosteiden siirto petrifilmeille ja näytematriiseihin.

Kuvassa 8 on siirrosteiden tekemisessä käytetyt automaattipipetit, laboratoriossa käytössä oleva dilushaker-sekoitin, johon on asetettu dilukupit eli laimennosliuos-kupit, joissa on jokaisessa valmiina 9 ml MRD-lientä, sekä salmonella-kontrollikannan kasvua petrifilmeillä eri pitoisuuksissa.



Kuva 8 Bakteerisiirrosteiden valmistamisessa käytettyjä välineitä. Vasemmalla automaattipipetit ja pipetinkärkiä laatikoissa, keskellä dilushaker, jossa dilukupit ja oikealla salmonellakasvua AC-petrifilmeillä.

Salmonella-menetelmän verifiointia varten siirrostettiin kohdemikrobiksi *S. pullorum*-bakteeria ja häiritseväksi kasvuksi siirrostettiin *E. coli* - ja *Ent. faecalis* -bakteereita suunnitelman mukaisesti. *L. monocytogenes* -menetelmän verifiointinnissa siirrostettiin suunnitelman mukaan kohdemikrobiksi *L. monocytogenes* ja häiritseväksi kasvuksi *L. innocua* - ja *E. coli*-bakteereita eri pitoisuuksissa.

6.2 Näytteiden esikäsittely, rikastus

Näytteiden käsittelyssä tarvittiin seuraavia laboratoriolaitteita – ja tarvikkeita:

- stomacher-pusseja, suodattimella
- steriilejä 50 ml:n näyteputkia tuotantoympäristönäytteille + steriilit vanupuikot
- steriilejä pinsettejä ja saksia
- Dilumat -vaaka-annostelija
- BPW- ja LPT-rikastusliemet
- laborioriosekoitin
- vortex-sekoitin
- inkubaattori, +37 °C.

Jokaista verifiointiin valittua näytettä punnittiin aseptisesti kahdeksan kappaletta 25 g kukin omaan suodattimelliseen stomacher-pussiin käyttäen apuna steriilejä pinsettejä ja saksia. Näytteiden käsittelyssä noudatettiin laboratorion toimintaohjeita ja menetelmien mukaisia muita ohjeita. Jokaiseen näytteeseen lisättiin dilumat-annostelijalla 225 g BPW-rikastuslientä salmonellan näytteisiin ja LPT-lientä *L. monocytogenes* -näytteisiin. Edellä mainitut rikastusliemet olivat menetelmäohjeiden mukaisia. Sen jälkeen näytteet sekoitettiin laborioriosekoittimella.

Tuotantoympäristönäytteet otettiin verifiointia varten tuotannosta ylimääräisinä näytteinä samoista kohteista, mistä tavallisestikin näytteitä otetaan. Näytteenottoa varten numeroitiin näyteputket ykkösestä kahdeksaan ja näytteet otettiin laboratorion ohjeistuksen mukaan tuotantoympäristöstä eri kohteista steriileillä vanupuikoilla aina 6–8 vanupuikkoa yhteen näyteputkeen. Näyteputkiin lisättiin rikastusliemi laboratoriossa, näyteputkia sekoitettiin vortex-sekoittajalla ja näyteputket laitettiin inkuboitumaan menetelmien mukaisiin lämpötiloihin. Rikastusliemien määrä tuotantoympäristönäytteillä oli 20 ml.

Jokaisen matriisin kahdeksasta näytteestä kuuden joukkoon siirrostettiin bakteerisuspensioita eri pitoisuuksissa aina kaksi samaa pitoisuutta kahteen näytteeseen. Kahteen näytteeseen kahdeksan sarjoista ei siirrostettu bakteereita. Elintarvikenäytteisiin pipetoitiin siirrosteita 1 ml, tuotantoympäristönäytteisiin 0,1 ml, koska tuotantoympäristönäytteissä rikastusliemen määrä oli vain 20 ml. Siirrostetut bakteerimäärät olivat liitteinä 1 ja 2 olevien raakatulostaulukoiden mukaiset. Rikastusliemissä olevia salmonella- näytteitä inkuboitiin +37 °C:ssa 18 tuntia ja *L.*

monocytogenes- näytteitä 22 tuntia. Kuvassa 9 on näytteiden käsittelyn työpiste Nurmon laboratoriossa.



Kuva 9 Näytteiden käsittelypiste Nurmon laboratoriossa. Oikealla Dilumat-vaaka-annostelija, vasemmalla stomacher-sekoitin.

6.3 DNA:n uutto

PCR-reaktiota varten rikastettujen näytteiden jatkokäsittelyssä, eli DNA:n uutossa tarvittiin seuraavia laboratoriovälineitä ja -tarvikkeita, reagensseja sekä laitteita:

- LYSIS -liuosputket + teline
- automaattipipetti, 20 μ l
- suodattimelliset pipetinkärjet
- vortex-sekoitin
- Heavy rack -teline
- suojakansi
- Lysis-putkien kiinnitys- ja irrotusvälineet.

Ennen näytteiden rikastuksen jälkeistä jatkokäsittelyä, otettiin riittävä määrä lysis-putkia huoneenlämpöön lämpenemään. Lysis-putket kiinnitettiin telineineen heavy rack -telineeseen. Jokaisesta rikastetusta näytteestä pipetoitiin 20 μ l rikastelientä kukin omaan lysis-putkeen työlistan mukaiseen järjestykseen, jonka mukaan näytteiden tiedot oli syötetty myös PCR-laitteelle. Lysis-putkissa oli silikoniset patenttikannet, joiden läpi pipetinkärki painettiin ja rikasteliuos pipetoitiin uuttoliuosputkiin, eli putkien kansia ei tarvinnut avata, eikä niitä saanutkaan avata. GENE-UP[®] PCR -menetelmien ohjeissa lysis-liuosputkien avaaminen oli

verrattavissa kontaminaatioon ja siksi pipetoinneissa oli oltava erityisen huolellinen, ettei tapahtunut kontaminaatiota.

Näytteiden pipetoinnin jälkeen lysis-putket telineineen irrotettiin heavy rack -telineestä ja lysis-putkitelineen päälle laitettiin suojakansi. Teline putkineen laitettiin vortexiin ja sitä vortexoitiin 2200 rpm nopeudella 5 minuuttia. Vortexoinnin aikana bakteerisolut rikkoutuivat ja solujen DNA siirtyi vapaaksi lysis-liuokseen. Kuvassa 10 on kuvattu DNA:n uutossa tarvittavat välineet, laitteet ja reagenssit suorituspaikassaan eli vetokaapissa laboratorioissa. DNA:n uutovaihe tehtiin erillisessä vetokaapissa. Kuvassa on edessä vasemmalla rikastetut näytteet muovilaatikossa suljetuissa stomacher-pusseissa, lysis-putket telineessään heavy rack -telineessä, takana näytteiden siirrostuksessa käytetty 20 µl:n automaattipipetti telineessään, suodattimelliset pipetinkärjet, oikealla on vortex-laite, jonka oikealla sivulla on lysis-putkien suojakansi vortexoinnissa. Kaksi mustaa telineen näköistä on apuvälineitä lysis-putkien kiinnittämiseen ja irrottamiseen lysis-putkien telineestä, sillä lysis-putket piti olla todella hyvin kiinni telineessään, etteivät ne lähde irti vortexoinnin aikana.



Kuva 10 DNA:n uutto ja siinä tarvittavia välineitä, reagensseja ja laitteita. Vasemmalla rikastetut näytteet pusseissaan, keskellä lysis-putket, oikealla vortex-laite.

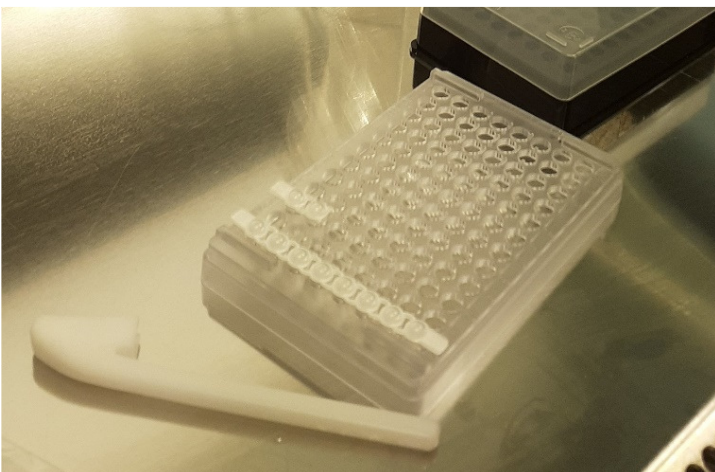
6.4 PCR-reaktion suorittaminen

DNA:n uutamisen jälkeen PCR-reaktiota varten näytteiden käsittelyssä tarvittiin seuraavia laboratoriovälineitä ja -tarvikkeita, reagensseja sekä laitteita:

- GENE-UP® Salmonella (SLM 2) -reaktioputket + teline
- GENE-UP® L. monocytogenes 2 (LMO 2) -reaktioputket
- automaattipipetti, 10 µl, 8-kanavainen ja 1-kanavainen
- suodattimelliset pipetinkärjet patentoidulla olakkeella
- PCR-putkien avaustyökalu
- optiset kannet PCR-putkiin
- kontrollipuskuri-liuos negatiiviseen kontrolliin
- mini-spinneri
- PCR-laitteisto.

DNA:n uuttovaiheessa otettiin valmiiksi myös riittävä määrä PCR-reaktioputkia lämpenemään huoneenlämpöön. Lysis-putket telineineen siirrettiin vetokaapista laminaarivirtauskaappiin. PCR-putket kiinnitettiin omaan telineeseensä ja niistä avattiin kannet yksi liuska kerrallaan käyttäen avaustyökalua. Lysis-liuoksista pipetoitiin 10 µl:n 8-kanavapipetillä näytteet PCR-reaktioputkiin. Käytetyt pipetinkärjet olivat patentoituja lysis-putkien kanssa käytettäväksi, sillä niissä oli olake, jotta pipetinkärjet eivät mene lysis-putken silikoni kannesta liian syvälle ja sekoita pohjalla olevia helmiä mukaan pipetoivaan liuokseen.

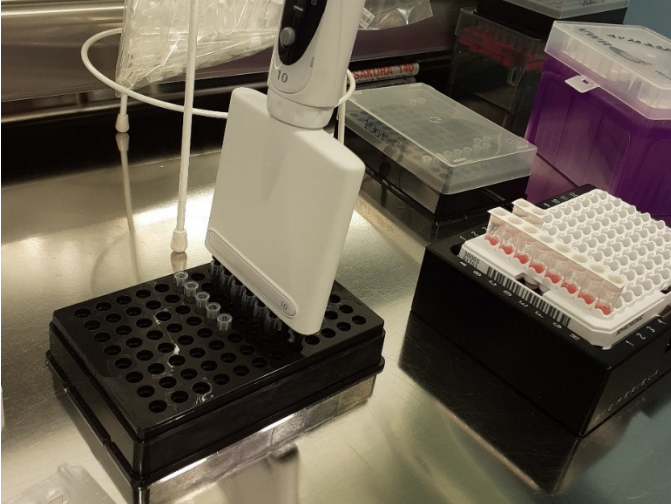
PCR-reaktioputket suljettiin optisilla kansilla ja kannet kiinnitettiin tiukasti paikoilleen. Kun näytteet oli pipetoitu PCR-putkiin, pipetoitiin 10 µl:n pipetillä vielä yhteen PCR-putkeen 10 µl kontrollipuskuriliuosta negatiiviseksi kontrolliksi. Kuvassa 11 on kuvattuna PCR-reaktioputket telineessään ja avaustyökalu, kuvassa 12 näkyy PCR-reaktioputkissa olevat siniset reagenssi-pelletit. Kuvassa 13 on vasemmalla 8-kanavapipetti ja lysis-liuokset telineessään laminaarivirtauskaapissa.



Kuva 11 PCR-reaktioputket ja avaustyökalu.



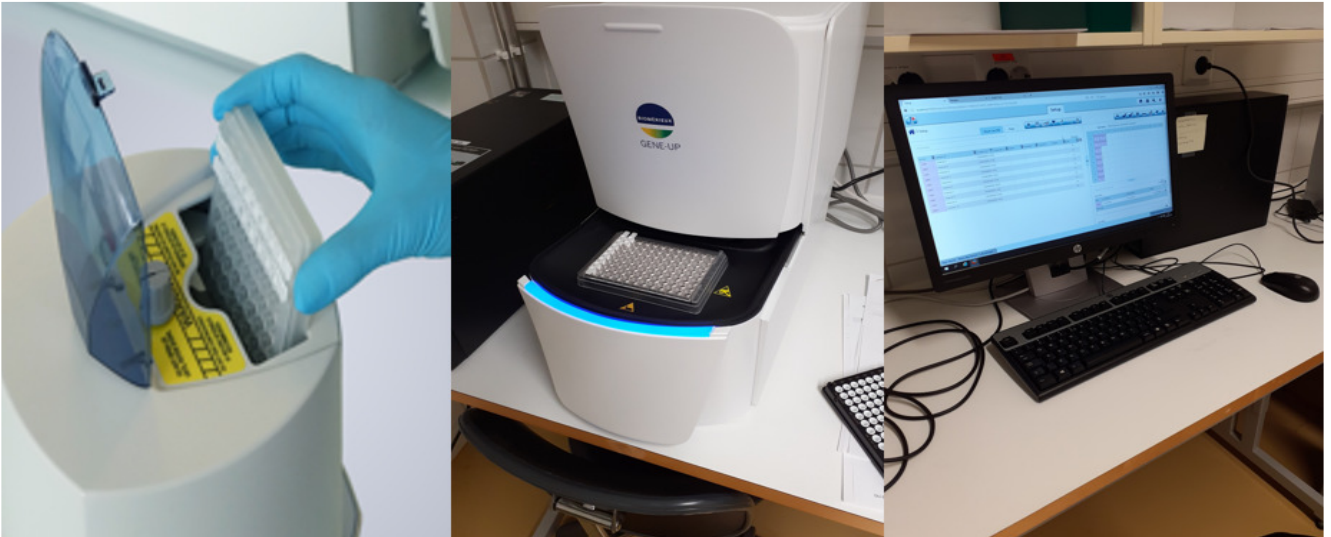
Kuva 12 Sinisiä PCR-reagenssi-pellettejä PCR-reaktioputkissa.



Kuva 13 Vasemmalla 8-kanavapipetti, oikealla lysis-liuokset telineessään.

Kun PCR-reaktioputkiin oli pipetoitu näytteiden lysis-liuokset ja putket suljettu tiiviisti optisilla kansilla, ne siirrettiin eri huoneeseen, jossa ne ensin sentrifugoitiin mini-spinnerillä, jotta pienet määrät reagensseja sekoittuivat keskenään. Sen jälkeen PCR-reaktioputket laitettiin PCR-lämpölaitteeseen ja aloitettiin ajo. Ennen PCR-ajoa laitteelle oli syötetty näytteiden ja käytettyjen kittien tiedot. Itse PCR-ajo kesti alle tunnin. Ajon aikana PCR-ohjelmistoa voitiin käyttää ja tarkastella edellisen ajon tuloksia tai syöttää seuraavan ajon näytetietoja koneelle valmiiksi. Kuvassa 14 on vasemmalta lukien mini-spinneri, PCR-lämmitysblokki kansi avoinna, jonne PCR-reaktioputket laitettiin telineessään ja sen jälkeen laitteen kansi suljettiin sekä oikealla tietokone, jossa on PCR-ajon ohjelmisto avoinna.

Ajon päätyttyä, tuloksia voitiin tarkastella tietokoneen ohjelmiston kautta. Tulokset olivat helposti luettavissa ns. Plate Map report -valikon kautta, jossa näkyi punaisella värikoodilla positiiviset tulokset ja vihreällä negatiiviset. Jos monistus oli estynyt eli tuloksena oli inhibition, se näkyi listauksella keltaisena. Tuloksista pystyi myös tarkastelemaan monistuskäyrät ja sisäisen kontrollin toiminnan. Esimerkkinä on raportit ja kuvaajat kasvis-matriiseina olleiden sipuli- ja tomaattimurskan salmonella- ja *L. monocytogenes* -PCR-ajoista liitteessä 5. Tulokset kirjattiin raakatulostaulukoihin (liitteet 1 ja 2).



Kuva 14 Mini-spinneri, PCR-lämmityslaite ja tietokone, jossa avoinna ohjelma, johon näytetietoja syötetään.

6.5 Varmistukset

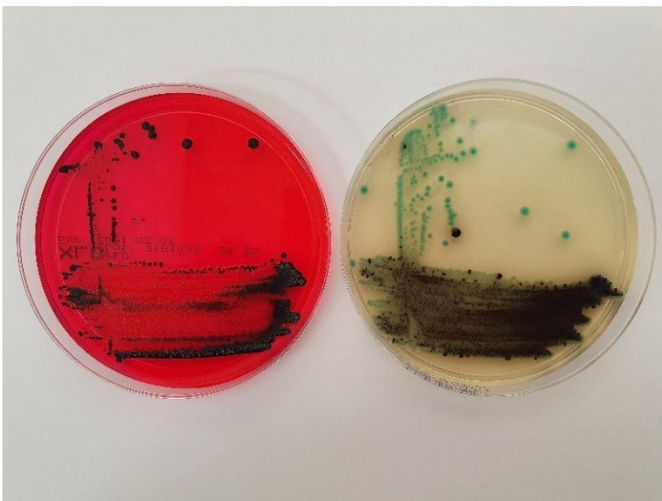
Verifiointissa tarkistettaviksi näytteiksi valittiin oletetusti pienimpien solupitoisuuksien omaavia siirrostettuja näytteitä. Kaikista siirrosteista tätä ei kuitenkaan tehty, koska siirrostetuissa näytteissä tiedettiin olevan kohdemikrobeja. Varmistukset tehtiin menetelmäohjeiden mukaisesti. Varmistuksissa käytettiin samoja maljoja, jotka olivat verifiointin aikaan laboratoriossa rutiinikäytössä. Kaikki varmistuksissa käytetyt maljat tulevat laboratorioon valmiina eri toimittajilta, ja niille on toimittajien puolesta tehty laadunvarmistukset. Varmistuksien tulokset kirjattiin raakatulostaulukoihin (liite 1 ja 2) viimeiselle sarakkeelle plus -merkillä. PCR-positiivisten tulosten tarkastaminen kuului verifiointin suorittamiseen.

PCR-positiivisten salmonella -tulosten varmistamisessa tarvittiin seuraavia laboratoriovälineitä ja -tarvikkeita, reagensseja sekä laitteita:

- XLD-agar-maljoja
- HAL-agar-maljoja
- SX2-rikastusliemi
- 10 µl:n viljelysilmukoita
- automaattipipetti, 500 µl
- suodattimelliset pipetinkärjet
- inkubaattori, +37 °C.

Varmistukset tehtiin viljelemällä siirrostettujen näytteiden alkuperäisistä BPW-rikasteliemistä 10 µl:n silmukalla XLD- ja HAL-agar-maljoille. Maljoja inkuboitii 24 tuntia +37 °C:ssa. XLD-maljoilla salmonella kasvoi tyypillisinä kirkkaina pesäkkeinä, joissa oli musta keskusta, HAL-maljoilla salmonella kasvoi vihertävinä pesäkkeinä.

Menetelmäohjeen mukaan, maljoille viljelyjen yhteydessä alkuperäisestä näytteen rikasteliemestä pipetoidaan 500 µl SX2-liemeen ja tarvittaessa siitä viljellään uudestaan XLD- ja HAL-maljoille, ellei ensimmäisen viljelyn maljoilla ole tyypillistä kasvua. Salmonella-verifioinnissa olleiden siirrostettujen näytteiden varmistuksissa maljoille viljeltäessä saatiin tyypillistä kasvua näkyville jo ensimmäisistä viljelyistä, jolloin viljelyä SX2-liemestä ei tarvinnut tehdä. Kuvassa 16 on vasemmalla salmonella -kasvua XLD-maljalla ja oikealla HAL-maljalla. HAL-maljalla näkyy mustana kasvuna häiritseväksi kasvuksi lisätty *E.coli* -kasvua



Kuva 15 Salmonella-kasvua XLD- ja HAL-maljoilla.

PCR-positiivisten *L. monocytogenes* -tulosten varmistamisessa tarvittiin seuraavia laboratoriovälineitä ja -tarvikkeita, reagensseja sekä laitteita:

- RLM- tai ALOA-agar-maljoja
- Fraser-rikastusliemi
- 10 µl:n viljelysilmukoita
- automaattipipetti, 100 µl
- suodattimelliset pipetinkärjet
- inkubaattori, +37 °C.

Varmistukset tehtiin viljelemällä siirrostettujen näytteiden alkuperäisistä LPT-rikasteliemistä 10 µl:n silmukalla RLM-agar-maljoille. Jos RLM-maljoja ei ollut käytettävissä, viljelyt tehtiin ALOA-maljoille. Kumpaakin kasvualustaa käytetään *L. monocytogenes* varmistamisen. Maljoja inkuboitiin 24 tuntia +37 °C:ssa. RLM-maljoilla *L. monocytogenes* kasvoi tyypillisinä sinisinä tai sinivihreinä pesäkkeinä, joiden ympärillä oli kellertävä, kirkas vyöhyke. ALOA-maljoilla *L. monocytogenes* kasvu on tyypillistä vihertävinä pesäkkeinä.

Menetelmäohjeen mukaan, maljoille viljelyjen yhteydessä alkuperäisestä näytteen rikasteliemestä pipetoidaan 100 µl Fraser-liemeen ja tarvittaessa siitä viljellään uudestaan RLM- tai ALOA-maljoille, ellei ensimmäisen viljelyn maljoilla ole tyypillistä kasvua. *L. monocytogenes* -verifiointissa olleiden siirrostettujen näytteiden varmistuksissa maljoille viljeltäessä saatiin tyypillistä kasvua näkyville jo ensimmäisistä viljelyistä, jolloin viljelyä Fraser-liemestä ei tarvinnut tehdä. Kuvassa 17 on *L. monocytogenes*-kasvua RLM- ja ALOA-maljoilla.



Kuva 16 *L. monocytogenes* RLM- ja ALOA-maljoilla. (Bio-Rad 2021)

7 VERIFIOINNIN TULOSTEN TARKASTELU

Verifioinnin tulokset kerättiin taulukoihin menetelmä- ja matriisiryhmittäin. Liitteessä 1 on esitetty salmonella-menetelmän verifioinnin raakatulokset matriisiryhmittäin ja liitteessä 2 *L. monocytogenes* -menetelmän raakatulokset. Taulukoissa on kirjattuna Wilrich-laskurissa käytetty näytettä vastaava numero, näytteen tunnus, mikä näytematriisi oli kyseessä, siirrosteen odotettu bakteeripitoisuus, maljoilta saatu bakteeripitoisuus, Wilrich-laskurissa käytetty bakteeripitoisuus grammaa kohti näytettä sekä PCR:llä saatu tulos ja varmistettu tulos. Varmistukset tehtiin yleensä pienimmän pitoisuuden siirrostetuista näytteistä, sillä suuremmilla pitoisuuksilla voitiin olettaa näytteistä löytyvän kohdemikrobia, koska sitä oli siirrostettu isompia määriä.

7.1 Salmonella-verifioinnin tulosten tarkastelu

Yhdistelmäelintarvikkeiden matriiseina oli leppäsavumarinadi, kevyt majoneesi ja hodari. Siirrosteissa oli pienimmässä pitoisuudessa 1,5 pmy, keskimmäisen pitoisuuden siirrosteissa 15,5 pmy ja korkeamman pitoisuuden näytteissä 28,5 pmy näytettä kohti. Jokainen siirrostettu näyte antoi positiivisen PCR-tuloksen ja jokaisessa sarjassa oli odotetusti kaksi negatiivista tulosta, sillä jokaisessa näytesarjassa oli kaksi siirrostamatonta näytettä. Positiivisista tuloksista pienimmän pitoisuuden näytteet myös varmistettiin viljelemällä maljoille ja viljelyn tulokset olivat positiiviset.

Kasvisten ryhmässä matriiseina olivat sipulimurska ja tomaattikuutio. Siirrosteissa oli pienimmässä pitoisuudessa 1 pmy, keskimmäisen pitoisuuden siirrosteissa 12 pmy ja korkeamman pitoisuuden näytteissä 79 pmy näytettä kohti. Tomaattikuutiolla kaikki siirrostetut näytteet antoivat positiivisen PCR-tuloksen, mutta sipulimurskan toinen pienimmän pitoisuuden näytteistä oli negatiivinen. Varmistettaessa pienimpien pitoisuuksien tuloksia, PCR-negatiivinen tulos oli myös maljoilla negatiivinen ja PCR-positiiviset olivat maljoilla positiivisia.

Lihat tuotteiden matriisiryhmään kuului broilerin file ja metwursti. Broilerin filen siirrostetuissa näytteissä oli pienimmässä pitoisuudessa 2 pmy, keskimmäisen pitoisuuden siirrosteissa 14 pmy ja korkeimman pitoisuuden näytteissä 73 pmy näytettä kohti. Vastaavasti metwurstinäytteisiin siirrostettiin pienimmällä pitoisuudella 1,5 pmy, keskimmäisellä 15,5 pmy ja korkeimmalla pitoisuudella 28,5 pmy näytteitä kohti. Eri pitoisuudet siirrostetuissa

lihatuotteiden matriiseissa johtui siitä, että siirrostetut tehtiin eri päivinä. Broilerin fileen toiselle pienimmän pitoisuuden siirrostetulle näytteelle PCR antoi ensin tulokseksi "inhibition". Se tarkoitti sitä, että PCR-reaktio oli estynyt ja näytteelle piti tehdä laimennos 1:3 GENE-UP® -PCR-menetelmän ohjeistuksen mukaan ja suorittaa PCR-ajo uudestaan. Näytteen laimentamisen jälkeen saatiin positiivinen tulos. Metwurstilla toinen pienimmän pitoisuuden siirrostettu näyte antoi negatiivisen tuloksen. Molemmilla matriiseilla muut siirrostetut näytteet antoivat positiivisen tuloksen. Varmistuksissa broilerin fileen pienimmän pitoisuuden siirrostetuille näytteille saatiin positiivinen tulos myös maljoilla. Metwurstilla pienimmän pitoisuuden siirrostetun näytteen PCR-negatiivinen tulos oli maljoillakin negatiivinen ja PCR-positiivinen oli maljoilla myös positiivinen.

Tuotantoympäristönäytteinä oli tuotannosta otettavat ns. salmonella-kierroksiksi sanotut näytteet. Ensimmäinen näytesarja oli otettu sikaleikkaamosta ja -teurastamosta, toinen kierros nautaleikkaamosta ja -teurastamosta. Näytteet otettiin eri päivinä, miksi myös siirrostetut niihin tehtiin eri päivinä. Siirrosteissa oli kohdemikrobia todella vähän laskennallisesti, sillä näytteisiin pipetoitiin vain 0,1 ml bakteerisuspensiota. Ensimmäisen näytesarjan siirrosteissa oli pienimmässä pitoisuudessa 2 pmy, keskimmäisen pitoisuuden siirrosteissa 24 pmy ja korkeamman pitoisuuden näytteissä 99 pmy yhtä millilitraa kohti, jolloin siirrosteissa oli laskennallisesti kymmenen kertaa pienemmät pitoisuudet kohdemikrobia. Toisessa näytesarjassa pienimmässä pitoisuudessa oli 2 pmy, keskimmäisen pitoisuuden siirrosteissa 15 pmy ja korkeamman pitoisuuden näytteissä 89 pmy yhtä millilitraa kohti ja vastaavasti siirrosteissa oli kymmenkertaisesti pienemmät määrät kohdemikrobia. Molemmilla matriiseilla PCR antoi kaikille siirrostetuille näytteille positiivisen tuloksen ja siirrostamattomille negatiivisen tuloksen. Varmistuksissa pienimpien pitoisuuksien siirrostetut näytteet antoivat myös positiiviset tulokset.

Jokaisessa salmonella -menetelmän verifiointissa olleessa matriisissa oli kaksi siirrostamatonta näytettä. Kaikista siirrostamattomien näytteiden PCR-tuloksista saatiin negatiiviset vastaukset. Se oli odotettu tulos ja se kertoo myös siitä, että on työskennelty tarkasti niin, ettei ole tapahtunut kontaminaatiota.

7.2 Tulosten tarkastelu - *L. monocytogenes*

Yhdistelmäelintarvikkeiden matriiseina olivat maksalaatikko, red hunajamarinadi, italiansalaatti ja lohileipä. Matriiseista kahdella pienimmän pitoisuuden siirrosteissa oli 1 pmy, keskimmaisessä pitoisuudessa 8 pmy ja korkeimmassa pitoisuudessa 70 pmy näytettä kohti. Toisissa kahdessa matriisissa siirrosteiden pitoisuudet olivat pienimmästä suurimpaan 11, 19 ja 207,5 pmy. Eri pitoisuudet johtuivat siitä, että näytteitä tehtiin eri päivinä ja siirrosteita varten tehtiin uudet bakteerisuspensiot. Maksalaatikon, red hunajamarinadin ja lohileivän kaikki siirrostetut näytteet antoivat positiivisen PCR-tuloksen. Italiansalaatilla pienimmän pitoisuuden siirrostetuilla näytteillä tulokset olivat negatiivisia ja seuraavan pitoisuuden siirrostettujen näytteiden PCR-tulokset olivat ensin ”inhibition”, jonka vuoksi näytteet laimennettiin ja tehtiin uusi PCR-ajo. Sen jälkeen tulokset olivat positiiviset. Pienimmän pitoisuuden näytteistä tehtiin varmistukset muiden matriisein, paitsi italiansalaatin osalta. Varmistusten tulokset olivat PCR-tulosten kanssa yhteneväiset.

Kasvisten ryhmässä matriiseina olivat tomaattikuutio ja sipulimurska. Tomaattimurskaan tehdyissä pienimmän pitoisuuden siirrosteissa oli 1,5 pmy, keskimmaisessä pitoisuudessa 11,5 pmy ja korkeimmassa pitoisuudessa 22 pmy näytettä kohti. Vastaavat pitoisuudet sipulimurskan siirrosteissa olivat pienimmästä suurimpaan 1, 12 ja 79 pmy. Tomaattikuution molemmat laimeimman pitoisuuden siirrostetut näytteet antoivat negatiivisen PCR-tuloksen, sipulimurskan laimeimman pitoisuuden siirrostetuista näytteistä toisesta saatiin negatiivinen ja toisesta positiivinen PCR-tulos. Muista ryhmän siirrostetuista näytteistä saatiin positiiviset PCR-tulokset. Varmistuksissa alimman siirrostetun pitoisuuden näytteissä, tulokset olivat PCR-tulosten kanssa yhteneväiset.

Lihatuotteita *L. monocytogenes* -menetelmän verifiointissa edustivat kaksi broilerin jauhelihaa, nakki, kalkkunaleike, metwursti ja broilerin file. Lihatuotteissa oli neljä eri siirrostesarjaa, joiden bakteeripitoisuudet olivat erilaisia. Ensimmäisen siirrostesarjan matriiseina olivat broilerin jauheliha ja nakki joihin tehtyjen siirrosteiden pitoisuudet olivat pienimmästä suurimpaan 1,5, 4,5 ja 9,5 pmy siirrostettua näytettä kohti. Toisessa sarjassa matriisina oli kalkkunaleike ja siirrosteiden pitoisuudet olivat 0,5, 11,5 ja 78 pmy näytettä kohti. Vastaavasti kolmannen sarjan siirrosteiden pitoisuudet olivat 11, 19 ja 207,5 pmy näytettä kohti ja matriisina oli metwursti. Neljännen matriisin, broilerin filen, siirrosteiden pitoisuudet olivat pienimmästä suurimpaan 1, 8 ja 70 pmy siirrostettua näytettä kohti. Broilerin jauhelihan, metwurstin ja broilerin filen pienimpien siirrostettujen pitoisuuksien näytteet antoivat positiivisen PCR-

tuloksen. Broilerin fileellä tulos saatiin vasta laimentamisen jälkeen, sillä ensimmäisen PCR-ajon tuloksena saatiin tulokseksi ”inhibition, ja näytteet piti laimentaa. Kalkkunaleikkeen ja nakin laimeimman pitoisuuden siirrostetuista näytteistä toisesta saatiin negatiivinen ja toisesta positiivinen PCR-tulos. Nakin, kalkkunaleikkeen ja broilerin fileen pienimmän pitoisuuden siirrostetuista näytteistä tehtiin varmistukset ja ne olivat PCR-positiivisista positiiviset ja PCR-negatiivisista negatiiviset.

Tuotantoympäristönäytteinä oli tuotannosta otetut ns. listeria-kierros-näytteet, kaksi eri näytesarjaa, jotka otettiin varta vasten verifiointia varten. Toisena matriisina oli ns. alkarvesi eli nakkien suolausvesi, josta tehtiin kolme näytesarjaa. Siirrostneiden pitoisuudet olivat pienimmästä suurimpaan 2,5, 18 ja 34,5 pmy näytettä kohti alkarvesinäytteillä. Listeria-kierros-näytteillä kohdemikrobia oli todella vähän laskennallisesti, sillä näytteisiin pipetoitiin vain 0,1 ml bakteerisuspensiota, jolloin kohdemikrobin määrä oli kymmenen kertaa pienempi kuin yhdessä millilitrassa siirrostetta. Toisen listeria-kierroksen pienimmän pitoisuuden siirrostettujen näytteiden molemmat PCR-tulokset olivat negatiiviset, toisessa sarjassa pienimmän pitoisuuden siirrostetusta näytteestä toisesta tuli positiivinen PCR-tulos ja toisesta negatiivinen. Muut siirrostetut näytteet antoivat positiivisen PCR-tuloksen. Alkarvesien PCR-tuloksista pienimmän ja keskimmäisen pitoisuuden siirrosteissa oli puolet negatiivisia ja puolet positiivisia. Kolmannessa alkarvesi-näytesarjassa myös korkeimman pitoisuuden siirrostetuissa näytteissä toinen antoi negatiivisen PCR-tuloksen ja toinen positiivisen. Varmistuksia tehtiin yhden alkarvesi-näytteen pienimmän pitoisuuden näytteistä ja molempien listeria-kierrosten pienimmän pitoisuuden siirrostetuista näytteistä. Varmistusten tulokset olivat PCR-tulosten kanssa yhteneväiset.

L. monocytogenes -menetelmän verifiointissa kaikissa matriisiryhmissä oli kaksi siirrostamatonta näytettä. Siirrostamattomien näytteiden tulokset olivat odotetusti negatiivisia. Se kertoo sen, että työskentely on suoritettu hyvin, eikä ole tapahtunut kontaminaatiota.

8 LOD₅₀-ARVON MÄÄRITTÄMINEN WILRICH-LASKURILLA

LOD₅₀ -arvo kuvaa menetelmän toteamisrajan. Verifiointissa saatu LOD₅₀ -arvo ei saa olla yli kolmea kertaa suurempi kuin menetelmän validoineen tahon samaa LOD₅₀ -arvo (NMKL 32, 14). Alkuperäisessä validoinnissa saadun LOD₅₀ -arvon voidaan myös olettaa olevan yksi pmy/testiannos, ellei sitä ole erikseen ilmoitettu. Tällöin verifiointille laskettu LOD₅₀ -arvo ei saa olla suurempi kuin kolme. LOD₅₀ -arvon laskemiseen käytettiin Wilrich & Wilrich:n Excell -laskuria, joka on saatavilla verkosta (Wilrich & Wilrich, 2017). Laskuri soveltuu niin validoinnin kuin verifiointinkin LOD-arvojen laskemiseen. Laskurin sivulla on opastettu, mitä tietoja sinne pitää syöttää LOD-arvon laskemiseksi ja Excel-taulukoissa on valmiit kaavat, jotka laskevat LOD₅₀ arvot (Wilrich & Wilrich 2017).

Ensin laskuriin syötettiin verifiointin taustatietoja otsikoinnin mukaan. Kohdemikrobi, testin nimi (validointi/verifiointi), päivämäärä, näytekoko, matriisien lukumäärä ja myös siirrostustasojen lukumäärät kirjattiin taulukoihin. Tässä verifiointissa siirrostuksen tasoja oli kolme, siirrostamattomia näytteitä ei laskurissa otettu huomioon. Jokaiselle matriisiryhmälle tehtiin oma taulukkonsa. (Wilrich & Wilrich, 2017.)

Matriisien lukumäärän perusteella, jokaiselle matriisille muodostui oma keltapohjainen taulukkonsa. Muodostuneisiin matriisikohtaisiin taulukoihin syötettiin ensin siirrostusten tasot, joita varten raakatulostaulukkoon oli jo laskettu valmiiksi, kuinka paljon kohdemikrobia oli siirrostetussa näytteessä yhtä grammaa tai millilitraa kohti. Tämä luku oli saatu jakamalla raakatulostaulukkoon kirjattu, elintarvikenäytteiden siirrosteissa oleva mikrobimäärä 25:llä, tuotantoympäristönäytteillä 20:lla huomioiden lisäksi pipetoitu siirrosteen määrä. Seuraavaksi laskuriin kirjattiin, montako näytettä kutakin siirrostustasoa kohti oli siirrostettu ja montako näistä siirrostetuista oli antanut positiivisen tuloksen. Kuviossa 17 on esimerkki, miltä Wilrich-laskurin tulosten syöttötaulukko näytti. Esimerkissä on käytetty salmonella -verifiointin lihatuotteiden raakatuloksia.

General information on the experiment		
Microorganism	Name of experiment	Date of experiment
Salmonella	Verifointi	13.7.2020
Sample size A_0 in g or ml	No. of matrices	No. of inoculation levels
25	2	3

Note: The values for d refer to 1 g or 1 ml and not to the sample size as given in row 10.

Input data		
Matrix 1	Designation:	S1 Metwursti
Inoculation level in cfu/g or cfu/ml	No. of inoculated tubes	No. of positive tubes
d	n	y
0,06	2	1
0,62	2	2
1,14	2	2

Matrix 2	Designation:	C46 Broilerin file
Inoculation level in cfu/g or cfu/ml	No. of inoculated tubes	No. of positive tubes
d	n	y
0,08	2	2
0,56	2	2
2,92	2	2

Kuva 17 Wilrich-laskurin (2017) taustatietojen syöttötaulukko. Esimerkkinä salmonella-verifioinnin lihatuotteet.

Wilrich-laskurin ohjeiden mukaan, seuraavaksi klikattiin "Calculate results" -ruutua ja LOD_{50} -arvot kyseiselle matriisiryhmälle muodostuivat vihreällä pohjalla olevaan taulukkoon. Kuvassa 18 on esimerkki, miltä LOD_{50} -tulostaulukko näyttää. Esimerkissä on kuviossa 17 olevien tietojen perusteella laskurilla saadut LOD_{50} -arvot, eli salmonella-verifioinnissa olleet lihatuotteet.

Results of the PODLOD calculations											
No. i	Matrix Designation $Matrix_i$	Matrix effect F_i	Log matrix effect f_i	SD of log matrix effect s_{fi}	$LOD_{50\%}$ = 50% limit of detection in cfu/g or cfu/ml			$LOD_{95\%}$ = 95% limit of detection in cfu/g or cfu/ml			Test statistic matrix effect $ z_i $
					Detection limit $d_{0,5,i}$	Lower conf. limit $d_{0,5,i,L}$	Upper conf. limit $d_{0,5,i,U}$	Detection limit $d_{0,95,i}$	Lower conf. limit $d_{0,95,i,L}$	Upper conf. limit $d_{0,95,i,U}$	
1	S1 Metwursti	0,467	-0,761	0,979	0,059	0,008	0,421	0,257	0,036	1,818	0,865
2	C46 Broilerin file	∞	∞	because every inoculated tube is positive							
Combined results		0,843	-0,171	0,626	0,033	0,009	0,115	0,142	0,041	0,497	0,272
based on the data of matrices 1 and 2											

Kuva 18 Wilrich-LOD-laskurin (2017) tulokset. Esimerkkinä salmonella-verifioinnin lihatuotteet.

Laskettaessa LOD_{50} -arvoa Wilrich:n laskurilla, se ei antanut tulosta niille siirrostetuille näytteille, joissa kaikki olivat positiivisia. Standardin EN ISO 16140-3 luonnoksen mukaan näistä näytteistä minimipitoisuuden voidaan katsoa olevan alin siirrostettu pitoisuus, koska voidaan olettaa, että sitä suuremmat pitoisuudet tulevat näkyviin. Myös Wilrich-laskurissa on käytössä tämä periaate. Wilrich-laskurilla saadut LOD_{50} -tulostaulukot koostettiin salmonellan osalta liitteeseen 3 ja listerian osalta liitteeseen 4.

8.1 LOD₅₀ -arvot GENE-UP® Salmonella (SLM2) -menetelmälle

Wilrich-laskurilla lasketut salmonella -menetelmän verifiointin LOD₅₀ -arvot koottiin matriisiryhmittäin vertailutaulukkoon, taulukko nro 3. Taulukkoon kirjattiin laboratorion saamat LOD₅₀ -arvot grammaa kohti näytettä, josta edelleen laskettiin samaan taulukkoon näytekoko kohtainen LOD₅₀ -arvo. Elintarvikenäytteillä näytekoko oli 25 g, tuotantoympäristönäytteillä 20 ml. Näitä LOD₅₀ -arvoja verrattiin menetelmän alkuperäisiin vastaaviin LOD₅₀ -arvoihin. Vertailun helpottamiseksi, taulukkoon laskettiin vielä suurin hyväksytty LOD₅₀ -arvo.

Taulukko 3 GENE-UP® Salmonella 2 (SLM2) verifiointin LOD₅₀ -arvot eri matriisiryhmille

LOD ₅₀ -arvot Matriisi	Verifiointissa saatu LOD ₅₀ - arvo/1 g	Verifiointissa saatu LOD ₅₀ - arvo/näytekoko	Alkuperäisen validoinnin LOD ₅₀ - arvo/näytekoko	Suurin hyväksytty LOD ₅₀ - arvo/näytekoko
Yhdistelmä- elintarvikkeet	0,060	1,50	1,0	3,0
Kasvikset jne.	0,020	0,50	0,9	2,7
Lihat ja niistä tehdyt valmisteet	0,033	0,83	0,5	1,5
Tuotantoympäristö- näytteet	0,12	2,40	1,4	4,2

Yhdistelmäelintarvikkeille verifiointissa LOD₅₀ -arvoksi saatiin 1,50 pmy/näytekoko. Alkuperäisessä validoinnissa vastaava arvo oli 1,0 pmy/näytekoko, jolloin suurin hyväksytty arvo olisi ollut 3 pmy/näytekoko.

Kasvituotteille verifiointissa LOD₅₀ -arvoksi saatiin 0,50 pmy/näytekoko. Alkuperäisen validoinnin vastaava arvo oli 0,9 pmy/näytekoko ja suurin hyväksyttävä arvo verifiointissa oli siten 2,7 pmy/näytekoko.

Lihat tuotteiden LOD₅₀ -arvoksi saatiin 0,83 pmy/näytekoko. Alkuperäisessä validoinnissa LOD₅₀ -arvo oli 0,5 pmy/näytekoko, josta saadaan suurimmaksi hyväksytyksi arvoksi 1,5 pmy/näytekoko.

Tuotantoympäristönäytteille saatu LOD₅₀ -arvo oli aika korkea, 2,40 pmy/näytekokoa. Mutta alkuperäisessä validoinnissa vastaava arvo oli 1,4 pmy/näytekokoa ja siitä laskettuna suurin hyväksytty arvo tuotantoympäristönäytteille oli 4,2 pmy/näytekokoa.

Vertaamalla GENE-UP® Salmonella (SLM2) -menetelmälle verifiointissa saatuja LOD₅₀ -arvoja annettuihin suurimpiin hyväksytyihin vastaaviin arvoihin, voitiin todeta verifiointi onnistuneeksi kyseisille matriisiryhmille.

8.2 LOD₅₀ -arvot GENE UP® *L. monocytogenes* (LMO2) -menetelmälle

Wilrich-laskurilla saadut *L. monocytogenes* -menetelmän LOD₅₀ -arvot koottiin yhteenvetotaulukkoon, taulukko numero 4, johon on laskettu verifiointissa saatu LOD₅₀ -arvo näytekokoa kohti, joka on edelleen laskettu grammaa kohti näytettä saadusta LOD₅₀ -arvosta. Elintarvikenäytteillä näytekokoa oli 25 g, tuotantoympäristönäytteillä 20 ml. Näin saatua tulosta on verrattu alkuperäisen validoinnin vastaavaan arvoon. Taulukossa on myös suurin hyväksytty LOD₅₀ -arvo.

Taulukko 4 GENE-UP® *L. monocytogenes* 2 (LMO2) verifiointin LOD₅₀ -arvot eri matriisiryhmille

LOD ₅₀ -arvot Matriisi	Verifiointissa saatu LOD ₅₀ - arvo/1 g	Verifiointissa saatu LOD ₅₀ - arvo/näytekokoa	Alkuperäisen validoinnin LOD ₅₀ - arvo/näytekokoa	Suurin hyväksytty LOD ₅₀ - arvo/näytekokoa
Yhdistelmä- elintarvikkeet	0,038	0,95	0,44	1,32
Kasvikset jne.	0,089	2,23	0,55	1,65
Lihat ja niistä tehdyt valmisteet	0,030	0,75	0,67	2,01
Tuotantoympäristö -näytteet	0,043	0,86	0,77	2,31

Yhdistelmäelintarvikkeille verifiointissa LOD₅₀ -arvoksi saatiin 0.95 pmy/näytekokoa. Alkuperäisessä validoinnissa vastaava arvo oli 0,44 pmy/näytekokoa, jolloin suurin hyväksytty arvo olisi ollut 1,32 pmy/näytekokoa.

Kasvistuotteille verifiointissa LOD₅₀ -arvoksi saatiin 2,23 pmy/näytekokko. Alkuperäisen validoinnin vastaava arvo oli 0,55 pmy/näytekokko ja suurin hyväksyttävä arvo verifiointissa oli siten 1,65 pmy/näytekokko, jolloin tulos ei ollut hyväksyttävä.

Lihat tuotteiden LOD₅₀ -arvoksi saatiin 0,75 pmy/näytekokko. Alkuperäisessä validoinnissa LOD₅₀ -arvo oli 0,67 pmy/näytekokko, josta saadaan suurimmaksi hyväksytyksi arvoksi 2,01 pmy/näytekokko.

Tuotantoympäristönäytteille saatu LOD₅₀ -arvo oli aika korkea, 0,86 pmy/näytekokko. Alkuperäisessä validoinnissa vastaava arvo oli 0,77 pmy/näytekokko ja siitä laskettuna suurin hyväksytty arvo tuotantoympäristönäytteille oli 2,31 pmy/näytekokko.

Vertaamalla GENE-UP® *L. monocytogenes* (LMO2) -menetelmälle verifiointissa saatuja LOD₅₀ -arvoja annettuihin suurimpiin hyväksytyihin vastaaviin arvoihin, voitiin todeta verifiointi onnistuneeksi kyseisille matriisiryhmille, paitsi kasvistuotteiden osalta, jossa LOD₅₀ -arvo ylitti suurimman sallitun arvon.

9 OIKEELLISUUS

GENE-UP® -PCR-menetelmien oikeellisuus varmistettiin osallistumalla vertailututkimuksiin. Atria Suomi Oy:n laboratoriot osallistuvat vuosittain kansainvälisiin vertailututkimuksiin. Tammikuussa 2020 oli SLV:n järjestämä vertailututkimuskierros, jossa oli kohdemikrobeina mm. salmonella ja *L. monocytogenes*. Tutkimuskierrokseen kuului kolme eri näytettä, joissa oli kylmäkuivattuja mikro-organismeja pienissä lasiampulleissa. Näytteet sisälsivät eri määrän mikrobeja ja jokainen näyte tutkittiin erikseen. Näytteet olivat ampulleissa, jotka oli merkitty laboratorion omalla numerolla ja näytetunnisteilla A, B ja C. Jokaisella vertailututkimukseen osallistuvalla laboratoriollla on oma tunnusnumerosa ja vertailunäytteet ovat satunnaisessa järjestyksessä.

Ennen analysointia näyteampullien sisältö siirrostettiin 250 ml:aan MRD-laimennosliuosta siten, että ampulliin pipetoitiin ensin 1 ml MRD, ampulli suljettiin, sitä sekoitettiin ja annettiin sisällön liueta hetken. Ampulli avattiin ja sisältö siirrettiin pasterur-pipetillä pulloon, jossa oli 250 ml MRD:tä. Ampulli huuhdeltiin samalla tavalla vielä kolmeen kertaan, niin että lopullinen näytteen tilavuus oli 254 ml. Kuvassa 19 on vertailunäyte ampulli, joista oikeanpuoleiseen on lisätty MRD:tä ja toisiin ei. Työskentelyssä huolehdittiin siitä, että jokainen nesteen lisäys ja siirrostusvaihe suoritettiin aseptisesti ja erityisellä huolellisuudella, välttäen kontaminaatiota näytteisiin ja niin ikään, etteivät näytteet kontaminoi laboratorion ympäristöä.



Kuva 19 Vertailunäyteampullit.

Tätä siirrostetta pidettiin laimentamattomana näytteenä. Siitä tehtiin salmonellan analysoimiseksi näyte siten, että pipetoitiin 25 ml laimentamatonta vertailunäytettä stomacher-pussiin ja lisättiin 225 ml BPW:tä. *L. monocytogenes* analysoimiseksi pipetoitiin laimentamattomasta vertailunäytteestä 25 ml stomacher-pussiin ja lisättiin 225 ml LPT. Jokaisesta vertailunäytteestä tehtiin kaksi rinnakkaisnäytettä, yhteensä kuusi näytettä salmonella -tutkimukseen ja kuusi näytettä *L. monocytogenes*- analyysiin, koska

vertailututkimusnäytteet laitettiin inkuboitumaan kahteen eri lämpötilaan. Salmonella-vertailututkimusnäytteitä inkuboitiin + 37 °C:ssa ja +41,5 °C:ssa, koska GENE-UP® Salmonella -menetelmän validointi oli myös tehty kahdessa eri lämpötilassa (AFNOR validointiraportti 2018). Toisena perusteena eri lämpötiloille oli se, koska standardin ISO 6579-1:2017 mukaan BPW rikastetaan +37 asteessa ja menetelmän toinen rikastus, MSRV-maljat, rikastetaan +41,5 asteessa. ISO 6579-1:2017 on laboratorion virallinen menetelmä salmonellan analysoimiseksi.

Myös *L. monocytogenes* -vertailututkimusnäytteiden rikastus tehtiin kahdessa eri lämpötilassa, koska standardin ISO 11290-1, joka on laboratorion virallinen menetelmä *L. monocytogenes* -toteamiseksi, mukaan rikastus tehdään +30 °C:ssa ja GENE-UP® *L. monocytogenes* 2 (LMO2) -menetelmän mukaan rikastus tehdään +37 °C:ssa. Molemmilla rikastuslämpötiloilla saatiin sama tulos.

SLV:n vertailututkimusraportin mukaan B-näytteessä (laboratoriossa SLV3) oli *S. enteritidis* -kantaa pitoisuudessa $\log_{10} 2$ pmy/1 ml. Kaksi muuta näytettä olivat salmonellan varalta negatiivisia (SLV 2020.)

SLV:n vertailututkimusraportin mukaan näytteessä A (SLV1) kohdemikrobina oli *L. monocytogenes* pitoisuudella $\log_{10} 2,5$ cfu/ 1 ml. Näytteessä B (SLV3) ei ollut kohdemikrobia. Näytteessä C (SLV2) kohdemikrobina oli myös *L. monocytogenes* pitoisuudella $\log_{10} 2,5$ cfu/ 1 ml. SLV:n mukaan se ei ollut identtinen näytteen A kohdemikrobin kanssa. (SLV 2020.)

SLV:n vertailututkimusten tulokset ovat taulukoituna salmonellan osalta taulukossa 5 ja *L. monocytogenes* osalta taulukossa 6.

Taulukko 5 SLV:n vertailututkimuksen tulokset. Salmonella.

Näyte	PCR Tulos	Rikastus	Laboratorion tulos	Varmistettu PCR tulos
SLV 1 (A)	ei todettu	+ 37 °C	ei todettu	
SLV 2 (C)	ei todettu	+ 37 °C	ei todettu	
SLV 3 (B)	todettu	+ 37 °C	todettu	pos
Nollakontrolli	ei todettu			
SLV 1 (A)	inhibition/ei tod	+ 41,5 °C		
SLV 2 (C)	ei todettu	+ 41,5 °C		
SLV 3 (B)	todettu	+ 41,5 °C		pos
Nollakontrolli	ei todettu			

Taulukko 6 SLV:n vertailututkimuksen tulokset. *L. monocytogenes*.

Näyte	PCR Tulos	Rikastus	Laboratorion tulos	Varmistettu PCR tulos
SLV 1 (A)	todettu	+ 30 °C	todettu	pos
SLV 2 (C)	todettu	+ 30 °C	todettu	pos
SLV 3 (B)	ei todettu	+ 30 °C	ei todettu	
Nollakontrolli	ei todettu			
SLV 1 (A)	todettu	+ 37 °C		pos
SLV 2 (C)	todettu	+ 37 °C		pos
SLV 3 (B)	ei todettu	+ 37 °C		
Nollakontrolli	ei todettu			

Kaikkien kolmen vertailunäytteen tulokset olivat salmonellan ja *L. monocytogenes* -tulosten osalta SLV:n raportin mukaan oikeat sekä yhteneväiset laboratorion muilla menetelmillä saatuihin tuloksiin nähden. Näin ollen voitiin todeta, että GENE-UP® -PCR-menetelmillä saatiin oikeellisia tuloksia tutkittavien patogeenien suhteen.

10 VERIFIOINNIN LOPPUTULOS

Työn tavoitteena oli verifioida GENE-UP® -PCR -menetelmät patogeenien, salmonellan ja *L. monocytogenes*, analysoimiseksi. Verifioinnilla haluttiin todentaa menetelmien toimivan Atria Suomi Oy:n Nurmon laboratoriossa verifioinnissa käytetyillä matriiseilla. Toisena tavoitteena oli saada menetelmille FINAS-akkreditointi.

Verifioinnissa eri matriiseille määritetyt LOD₅₀ -arvot olivat kaikki sallituissa rajoissa alkuperäisen validoinnin vastaavaan arvoon verrattuna, paitsi *L. monocytogenes*-menetelmässä kasvien osalta. Näin ollen GENE-UP® Salmonella 2 (SLM2) - ja GENE-UP® *L. monocytogenes* 2 (LMO2) -PCR-menetelmien toteamisrajoja voidaan pitää hyväksytyinä muille matriiseille paitsi kasviksille listerian osalta.

Menetelmien oikeellisuudet varmistettiin osallistamalla SLV:n vertailututkimuksiin, josta saadut tulokset salmonellan *L. monocytogenes* suhteen olivat oikein todettu.

Molemmille menetelmille haettiin FINAS-akkreditointia keväällä 2020. FINAS:n ensimmäisen arvioinnin jälkeen tehtiin jonkin verran korjauksia ja lisäverifiointia kesällä 2020. Kun FINAS oli arvioinut korjaukset, Atria Suomi Oy:n Nurmon laboratorio sai menetelmät akkreditoinnin piiriin verifioiduille matriiseille muilta osin paitsi *L. monocytogenes* osalta kasviksille. Syynä siihen oli se, että oli tulkittu alkuperäistä menetelmän validointiraporttia virheellisesti ja sieltä oli otettu väärä määritysraja-arvo, johon verifioinnissa saatuja vastavia arvoja verrattiin, eikä tätä virhettä havaittu kuin vasta FINAS akkreditointipäätöksen jälkeen. GENE-UP® *L. monocytogenes* -menetelmän saamiseksi akkreditoinnin piiriin myös kasvis-matriisille tullaan tekemään lisää verifiointia jossain vaiheessa. Kasvikset ovat kuitenkin merkittävä raaka-aine Atrian einestuotannossa.

Verifiointi voidaan todeta onnistuneeksi näiden perusteella. Menetelmät otettiin Atria Suomen Nurmon laboratoriossa käyttöön elintarvikenäytteille ja tuotantoympäristönäytteille syksyllä 2020. Vaikka *L. monocytogenes*-menetelmää ei saatu akkreditoinnin piiriin kasviksille, voidaan sitä kuitenkin käyttää omavalvonnan näytteisiin ja varsinkin silloin, kun halutaan saada nopeasti tuloksia.

GENE-UP® -PCR-menetelmien saamisella akkreditoinnin piiriin saatiin laboratorion toimintaa enemmän tuotantoa palvelevaksi, sillä PCR-menetelmillä tulokset saadaan huomattavasti

nopeammin kuin ns. maljamenetelmillä. GENE-UP® -PCR-menetelmiä on muillekin patogeeneille kuten EHEC-bakteerille ja kampylobakteereille. Myös niiden menetelmien käyttöönotto ja analysoiminen GENE-UP® -PCR-laitteistolla on helpompaa tämän verifiointin myötä.

Patogeenien analysointi PCR-tekniikkaa hyödyntäen antaa elintarviketeollisuudelle etuja nopeudellaan varsinkin silloin, kun tuloksena negatiivinen tulos, sillä sitä ei tarvitse varmistaa. PCR-menetelmien käyttöönotto antaa myös kuvan siitä, että Atria Suomi Oy:n laboratorio on ajan hermolla ja kehittää toimintaansa jatkuvasti.

LÄHTEET

- AFNOR Validointiraportti. 2018. GENE UP® Salmonella 2 (SLM2). [Verkkosivu]. [Viitattu 29.11.2020]. Saatavana: https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/Synt-BIO-12-38-06-16_en-37%C2%B0C.pdf
- AFNOR Validointiraportti. 2017. GENE-UP® Listeria monocytogenes (LMO 2). [Verkkosivu]. [Viitattu 29.11.2020]. Saatavana: https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/05/Synt-BIO-12-40-11-16_en.pdf
- BioMerieux. 2019. GENE-UP® -Koulutusmateriaali. Saatavana Atrian sisäisestä verkosta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Bio-Rad. 2021. AL (Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti medium) Agar. [Verkkosivu]. [Viitattu 6.2.2021]. Saatavana: <https://www.bio-rad.com/en-fi/product/al-agar-listeria-according-ottaviani-agosti-medium-agar?ID=LS58TL470>
- Bio-Rad. 2021. RAPID'L.mono Medium [Verkkosivu]. [Viitattu 6.2.2021]. Saatavana: <https://www.bio-rad.com/en-fi/product/rapidl-mono-medium?ID=35bad7d6-36ac-4044-b859-d5febbda101a>
- EN ISO 16140-2:2016 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Methods validation Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Saatavana: SFS Standardien verkkokauppa. Vaatii käyttöoikeuden.
- FINAS. 27.10.2016. Akkreditointi. [Verkkosivu]. [Viitattu 22.11.2020]. Saatavana: <https://www.finas.fi/akkreditointi/Sivut/default.aspx>
- FINAS. 11.6.2020a. Pätevyysalueiden muutos – elintarvikkeet ryhmitellään viiteen alaryhmään. [Verkkosivu]. [Viitattu 22.11.2020]. Saatavana: https://www.finas.fi/ajankohtaista/Sivut/Elintarvikkeet_tiedote.aspx
- FINAS. 16.9.2020b. Akkreditointipäätös. Atria Suomi Oy, Laboratoriot. [Verkkosivu]. [Viitattu 22.11.2020]. Saatavana: <https://www.finas.fi/Documents/T185%20A21%202020.pdf>
- Hatakka, M., Pakkala, P., Siivonen, P. & Turja, M. 2004. Elintarvikehygieniä. Hygieniaosaaminen ja omavalvonta. Helsinki: WSOY.
- Hägg, M. (toim.) 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Helsinki: Metrologian neuvottelukunta. VTT Technology 276.
- ISO 6579-1:2017/A1:2020:en. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp. Saatavana: SFS Standardien verkkokauppa. Vaatii käyttöoikeuden.

- ISO 11290-1. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.. Part 1: Detection method. Saatavana: SFS Standardien verkkokauppa. Vaatii käyttöoikeuden.
- ISO/DIS 16140-3. 2018. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3. Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory. Saatavana: SFS Standardien verkkokauppa. Vaatii käyttöoikeuden.
- Korkeala, H. (toim.) 2007. Elintarvikehygienia: ympäristöhygienia, elintarvike- ja ympäristötoksikologia. Helsinki: WSOY.
- NMKL Procedure No:32. 2017. Verification of microbiological methods. Nordic Committee on Food Analysis. Saatavana: SFS Standardien verkkokauppa. Vaatii käyttöoikeuden.
- Pärssinen, R., Suominen, I. & Haajanen, K. 2012. Biogeeni. Ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa. Helsinki: Opetushallitus.
- Ruokavirasto. 10.1.2019. Salmonella. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 28.11.2020]. Saatavana: <https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrytykset/ruokamyrytyksia-aiheuttavia-bakteereja/salmonella/>
- Ruokavirasto. 20.3.2020a. Salmonellavalvonta. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 28.11.2020]. Saatavana: <https://www.ruokavirasto.fi/yritykset/elintarvikeala/elintarvikealan-yhteiset-vaatimukset/omavalvonta/salmonellavalvonta/>
- Ruokavirasto. 20.7.2020b. *Listeria monocytogenes*. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 28.11.2020]. Saatavana: <https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrytykset/ruokamyrytyksia-aiheuttavia-bakteereja/listeria/>
- Ruokaviraston ohje 4095/04.02.00.01/2020/3. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset komission asetuksen (EY) No 2073/2005 soveltaminen sekä yleisiä ohjeita elintarvikkeiden mikrobiologisista tutkimuksista - Ohje elintarvikealan toimijoille
- SFS. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. [Viitattu 22.11.2020]. Saatavana: <https://sfs.fi/standardeista/mika-on-standardi/>
- SFS-EN ISO/IEC 17025:2017. Testaus- ja kalibrointilaboratorioiden pätevyys. Yleiset vaatimukset. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS Oy. Saatavana: SFS Standardien verkkokauppa. Vaatii käyttöoikeuden.
- Sivelä, C. & Saarinen, T. 1993. Laborantin Mikrobiologia. 4. painos. Helsinki: Opetushallitus.
- SLV:n vertailututkimuksen raportti. 2020. Saatavana: SLV:n verkkosivuilta. Vaatii käyttöoikeuden.

- Solunetti. 2006. Nukleiinihappojen monistaminen. [Verkojulkaisu]. [Viitattu 21.11.2020]. https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_monistaminen/2/
- Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turun ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 52. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- Ulmanen, I., Tenhunen, J. & Yläne, J. 2004. 6. uudistettu painos. Geeni ja biotekniikka. Helsinki: WSOY
- Wilrich, C. & Wilrich, P.-Th. 23.9.2017. Estimation of the POD function and the LOD of a qualitative microbiological measurement method. [Verkkosivu]. [Viitattu 30.11.2020]. Saatavana: <https://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/professoren/wilrich/index.html>

LIITTEET

Liite 1. Salmonella-verifioinnin raakatulokset

Liite 2. Listeria-verifioinnin raakatulokset.

Liite 3. Salmonella-verifioinnin LOD-tulokset.

Liite 4. Listeria-verifioinnin LOD-tulokset

Liite 5. Kasvis-matriisien PCR-ajojen tulokset ja graafit

Liite 1. Salmonella PCR-menetelmän verifiointin raakatulokset

Wilrich- taulukko nro	Näytteen tunnus	Näyte	Siirrosteen pitoisuus (odotettu pmy/25g)	Rinnakkaiset PCA -maljat (malja 1/malja2) pmy/1 ml (raakatulos)	Siirrostettu pmy/25g (ka edellisestä)	Wilrich- laskurissa käytetty laskennallinen pmy/1 g	PCR-tulos	Varmistettu tulos
1	S5/1	Leppäsavumarinadi	10 ⁰	3/0	1,5	0,06	tod	+/+
	S5/2	Leppäsavumarinadi	10 ⁰	3/0	1,5	0,06	tod	+/+
	S5/3	Leppäsavumarinadi	10 ¹ : 2	15/16	15,5	0,62	tod	
	S5/4	Leppäsavumarinadi	10 ¹ : 2	15/16	15,5	0,62	tod	
	S5/5	Leppäsavumarinadi	10 ¹	26/31	28,5	1,14	tod	
	S5/6	Leppäsavumarinadi	10 ¹	26/31	28,5	1,14	tod	
	S5/7	Leppäsavumarinadi	0		0	0	ei tod	
	S5/8	Leppäsavumarinadi	0		0	0	ei tod	
2	S9/1	Kevyt majoneesi	10 ⁰	3/0	1,5	0,06	tod	+/+
	S9/2	Kevyt majoneesi	10 ⁰	3/0	1,5	0,06	tod	+/+
	S9/3	Kevyt majoneesi	10 ¹ : 2	15/16	15,5	0,62	tod	
	S9/4	Kevyt majoneesi	10 ¹ : 2	15/16	15,5	0,62	tod	
	S9/5	Kevyt majoneesi	10 ¹	26/31	28,5	1,14	tod	
	S9/6	Kevyt majoneesi	10 ¹	26/31	28,5	1,14	tod	
	S9/7	Kevyt majoneesi	0		0	0	ei tod	
	S9/8	Kevyt majoneesi	0		0	0	ei tod	
3	S2/1	Hodari	10 ⁰	3/0	1,5	0,06	tod	+/+
	S2/2	Hodari	10 ⁰	3/0	1,5	0,06	tod	+/+
	S2/3	Hodari	10 ¹ : 2	15/16	15,5	0,62	tod	
	S2/4	Hodari	10 ¹ : 2	15/16	15,5	0,62	tod	
	S2/5	Hodari	10 ¹	26/31	28,5	1,14	tod	
	S2/6	Hodari	10 ¹	26/31	28,5	1,14	tod	
	S2/7	Hodari	0		0	0	ei tod	
	S2/8	Hodari	0		0	0	ei tod	
1	Sip 1	Sipulimurska	10 ⁰	0/2	1	0,04	ei tod	-/-
	Sip 2	Sipulimurska	10 ⁰	0/2	1	0,04	tod	+/+
	Sip 3	Sipulimurska	10 ¹	13/11	12	0,48	tod	+/+
	Sip 4	Sipulimurska	10 ¹	13/11	12	0,48	tod	
	Sip 5	Sipulimurska	10 ² : 2	79/79	79	3,16	tod	
	Sip 6	Sipulimurska	10 ² : 2	79/79	79	3,16	tod	
	Sip 7	Sipulimurska	0		0	0	ei tod	
	Sip 8	Sipulimurska	0		0	0	ei tod	
2	VRA39/1	Tomaattikuutio	10 ⁰	0/2	1	0,04	tod	-/-
	VRA39/1	Tomaattikuutio	10 ⁰	0/2	1	0,04	tod	+/+
	VRA39/1	Tomaattikuutio	10 ¹	13/11	12	0,48	tod	+/+
	VRA39/1	Tomaattikuutio	10 ¹	13/11	12	0,48	tod	
	VRA39/1	Tomaattikuutio	10 ² : 2	79/79	79	3,16	tod	
	VRA39/1	Tomaattikuutio	10 ² : 2	79/79	79	3,16	tod	
	VRA39/1	Tomaattikuutio	0		0	0	ei tod	
	VRA39/1	Tomaattikuutio	0		0	0	ei tod	

Wilrich- taulukko nro	Näytteen tunnus	Näyte	Siirrosteen pitoisuus (odotettu pmy/25g)	Rinnakkaiset PCA -maljat (malja 1/malja2) pmy/1 ml (raakatulos)	Siirrostettu pmy/25g (ka edellisestä)	Wilrich- laskurissa käytetty laskennallinen pmy/1 g	PCR-tulos	Varmistettu tulos
1	C46/1	Broilerin file	10 ⁰	2 (ei rinnakkaisia)	2	0,08	tod	+/+
	C46/2	Broilerin file	10 ⁰	2	2	0,08	inhibition	laim. 1:3/tod/+/+
	C46/3	Broilerin file	10 ¹ : 2	14 (ei rinnakkaisia)	14	0,56	tod	
	C46/4	Broilerin file	10 ¹ : 2	14	14	0,56	tod	
	C46/5	Broilerin file	10 ¹	73 (ei rinnakkaisia)	73	2,92	tod	
	C46/6	Broilerin file	10 ¹	73	73	2,92	tod	
	C46/7	Broilerin file	0		0	0	ei tod	
	C46/8	Broilerin file	0		0	0	ei tod	
2	S1/1	Metwursti	10 ⁰	3/0	1,5	0,06	ei tod	- / -
	S1/2	Metwursti	10 ⁰	3/0	1,5	0,06	tod	+/+
	S1/3	Metwursti	10 ¹ : 2	15/16	15,5	0,62	tod	
	S1/4	Metwursti	10 ¹ : 2	15/16	15,5	0,62	tod	
	S1/5	Metwursti	10 ¹	26/31	28,5	1,14	tod	
	S1/6	Metwursti	10 ¹	26/31	28,5	1,14	tod	
	S1/7	Metwursti	0		0	0	ei tod	
	S1/8	Metwursti	0		0	0	ei tod	
1	SLL2/1	Salmonellakierros S	10 ⁰	3/5	4	0,02	tod	+/+
	SLL2/2	Salmonellakierros S	10 ⁰	3/5	4	0,02	tod	+/+
	SLL2/3	Salmonellakierros S	10 ¹ : 2	22/26	24	0,12	tod	
	SLL2/4	Salmonellakierros S	10 ¹ : 2	22/26	24	0,12	tod	
	SLL2/5	Salmonellakierros S	10 ¹	89/109	99	0,495	tod	
	SLL2/6	Salmonellakierros S	10 ¹	89/109	99	0,495	tod	
	SLL2/7	Salmonellakierros S	0		0	0	ei tod	
	SLL2/8	Salmonellakierros S	0		0	0	ei tod	
2	SKK82/1	Salmonellakierros N	10 ⁰	2 (ei rinnakkaisia)	2	0,01	tod	+/+
	SKK82/2	Salmonellakierros N	10 ⁰	2	2	0,01	tod	+/+
	SKK82/3	Salmonellakierros N	10 ¹	15 (ei rinnakkaisia)	15	0,075	tod	
	SKK82/4	Salmonellakierros N	10 ¹	15	15	0,075	tod	
	SKK82/5	Salmonellakierros N	10 ² : 2	89	89	0,445	tod	
	SKK82/6	Salmonellakierros N	10 ² : 2	89	89	0,445	tod	
	SKK82/7	Salmonellakierros N	0		0	0	ei tod	
	SKK82/8	Salmonellakierros N	0		0	0	ei tod	

Liite 2. Listeria PCR-menetelmän verifiointin raakatulokset

Wilrich- taulukko nro	Näytteen tunnus	Näyte	Siirrosteen pitoisuus (odotettu pmy/25 g)	Rinnakkaiset PCA -maljat (malja 1/malja2) pmy/1 ml (raakatulos)	Siirrostettu pmy/25g (ka edellisestä)	Wilrich-laskurissa käytetty laskennallinen pmy/1 g	PCR- tulos	Varmis- tettu tulos
1	F5/1	Maksalaatikko	10 ¹	1	1	0,04	tod	+
	F5/2	Maksalaatikko	10 ¹	1	1	0,04	tod	+
	F5/3	Maksalaatikko	10 ² : 2	8	8	0,32	tod	
	F5/4	Maksalaatikko	10 ² : 2	8	8	0,32	tod	
	F5/5	Maksalaatikko	10 ²	70	70	2,8	tod	
	F5/6	Maksalaatikko	10 ²	70	70	2,8	tod	
	F5/7	Maksalaatikko	0		0	0	ei tod	
	F5/8	Maksalaatikko	0		0	0	ei tod	
2	L7/1	Red hunajamarinadi	10 ¹ : 2	14/8	11	0,44	tod	+
	L7/2	Red hunajamarinadi	10 ¹ : 2	14/8	11	0,44	tod	+
	L7/3	Red hunajamarinadi	10 ¹	21/17	19	0,76	tod	
	L7/4	Red hunajamarinadi	10 ¹	21/17	19	0,76	tod	
	L7/5	Red hunajamarinadi	10 ²	230/185	207,5	8,3	tod	
	L7/6	Red hunajamarinadi	10 ²	230/185	207,5	8,3	tod	
	L7/7	Red hunajamarinadi	0		0	0	ei tod	
	L7/8	Red hunajamarinadi	0		0	0	ei tod	
3	F1/1	Italiansalaatti	10 ⁰	1	1	0,04	ei tod	
	F1/2	Italiansalaatti	10 ⁰	1	1	0,04	ei tod	
	F1/3	Italiansalaatti	10 ¹	8	8	0,32	Inhibition	laim. 1:3 tod
	F1/4	Italiansalaatti	10 ¹	8	8	0,32	Inhibition	laim. 1:3 tod
	F1/5	Italiansalaatti	10 ² : 2	70	70	2,8	tod	
	F1/6	Italiansalaatti	10 ² : 2	70	70	2,8	tod	
	F1/7	Italiansalaatti	0		0	0	ei tod	
	F1/8	Italiansalaatti	0		0	0	ei tod	
4	L4/1	Lohileipä	10 ¹ : 2	14/8	11	0,44	tod	+
	L4/2	Lohileipä	10 ¹ : 2	14/8	11	0,44	tod	+
	L4/3	Lohileipä	10 ¹	21/17	19	0,76	tod	
	L4/4	Lohileipä	10 ¹	21/17	19	0,76	tod	
	L4/5	Lohileipä	10 ²	230/185	207,5	8,3	tod	
	L4/6	Lohileipä	10 ²	230/185	207,5	8,3	tod	
	L4/7	Lohileipä	0		0	0	ei tod	
	L4/8	Lohileipä	0		0	0	ei tod	
1	VRAS/1	Tomaattikuutio	10 ⁰	1/2	1,5	0,06	ei tod	
	VRAS/2	Tomaattikuutio	10 ⁰	1/2	1,5	0,06	ei tod	-
	VRAS/3	Tomaattikuutio	10 ¹ : 2	10/13	22	0,88	tod	+
	VRAS/4	Tomaattikuutio	10 ¹ : 2	10/13	22	0,88	tod	
	VRAS/5	Tomaattikuutio	10 ¹	19/25	11,5	0,46	tod	
	VRAS/6	Tomaattikuutio	10 ¹	19/25	11,5	0,46	tod	
	VRAS/7	Tomaattikuutio	0		0	0	ei tod	
	VRAS/8	Tomaattikuutio	0		0	0	ei tod	

Wilrich- taulukko nro	Näytteen tunnus	Näyte	Siirrosteen pitoisuus (odotettu pmy/25 g)	Rinnakkaiset PCA -maljat (malja 1/malja2) pmy/1 ml (raakatulos)	Siirrostettu pmy/25g (ka edellisestä)	Wilrich-laskurissa käytetty laskennallinen pmy/1 g	PCR- tulos	Varmis- tettu tulos
2	Sip1/1	Sipulimurska	10 ¹	0/2	1	0,04	ei tod	-
	Sip1/2	Sipulimurska	10 ¹	0/2	1	0,04	tod	+
	Sip1/3	Sipulimurska	10 ² : 2	13/11	12	0,48	tod	+
	Sip1/4	Sipulimurska	10 ² : 2	13/11	12	0,48	tod	
	Sip1/5	Sipulimurska	10 ²	79/79	79	3,16	tod	
	Sip1/6	Sipulimurska	10 ²	79/79	79	3,16	tod	
	Sip1/7	Sipulimurska	0		0	0	ei tod	
	Sip1/8	Sipulimurska	0		0	0	ei tod	
1	C106-6/1	Broilerin jauheliha	10 ⁰	3/0	1,5	0,06	tod	
	C106-6/2	Broilerin jauheliha	10 ⁰	3/0	1,5	0,06	tod	
	C106-6/3	Broilerin jauheliha	10 ¹ : 2	3/6	4,5	0,18	tod	
	C106-6/4	Broilerin jauheliha	10 ¹ : 2	3/6	4,5	0,18	tod	
	C106-6/5	Broilerin jauheliha	10 ¹	9/10	9,5	0,38	tod	
	C106-6/6	Broilerin jauheliha	10 ¹	9/10	9,5	0,38	tod	
	C106-6/7	Broilerin jauheliha	0		0	0	ei tod	
	C106-6/8	Broilerin jauheliha	0		0	0	ei tod	
2	7755/1	Nakki	10 ¹ : 2	3/0	1,5	0,06	ei tod	-
	7755/2	Nakki	10 ¹ : 2	3/0	1,5	0,06	tod	+
	7755/3	Nakki	10 ¹	3/6	4,5	0,18	tod	
	7755/4	Nakki	10 ¹	3/6	4,5	0,18	tod	
	7755/5	Nakki	10 ²	9/10	9,5	0,38	tod	
	7755/6	Nakki	10 ²	9/10	9,5	0,38	tod	
	7755/7	Nakki	0		0	0	ei tod	
	7755/8	Nakki	0		0	0	ei tod	
3	TKLL1/1	Kalkkunaleike	10 ⁰	0/1	0,5	0,02	ei tod	
	TKLL1/2	Kalkkunaleike	10 ⁰	0/1	0,5	0,02	tod	+
	TKLL1/3	Kalkkunaleike	10 ¹ : 2	14/9	11,5	0,46	tod	
	TKLL1/4	Kalkkunaleike	10 ¹ : 2	14/9	11,5	0,46	tod	
	TKLL1/5	Kalkkunaleike	10 ¹	75/81	78	3,12	tod	
	TKLL1/6	Kalkkunaleike	10 ¹	75/81	78	3,12	tod	
	TKLL1/7	Kalkkunaleike	0		0	0	ei tod	
	TKLL1/8	Kalkkunaleike	0		0	0	ei tod	
4	L1/1	Metwursti	10 ¹ : 2	14/8	11	0,44	tod	
	L1/2	Metwursti	10 ¹ : 2	14/8	11	0,44	tod	
	L1/3	Metwursti	10 ¹	21/17	19	0,76	tod	
	L1/4	Metwursti	10 ¹	21/17	19	0,76	tod	
	L1/5	Metwursti	10 ²	230/185	207,5	8,3	tod	
	L1/6	Metwursti	10 ²	230/185	207,5	8,3	tod	
	L1/7	Metwursti	0		0	0	ei tod	
	L1/8	Metwursti	0		0	0	ei tod	

Wilrich- taulukko nro	Näytteen tunnus	Näyte	Siirrosteen pitoisuus (odotettu pmy/25 g)	Rinnakkaiset PCA -maljat (malja 1/malja2) pmy/1 ml (raakatulos)	Siirrostettu pmy/25g (ka edellisestä)	Wilrich-laskurissa käytetty laskennallinen pmy/1 g	PCR- tulos	Varmis- tettu tulos
5	C46/1	Broilerin file	10 ⁰	1	1	0,04	Inhibition	laim. 1:3 tod/+
	C46/2	Broilerin file	10 ⁰	1	1	0,04	tod	
	C46/3	Broilerin file	10 ¹	8	8	0,32	Inhibition	laim. 1:3 tod/+
	C46/4	Broilerin file	10 ¹	8	8	0,32	tod	
	C46/5	Broilerin file	10 ² : 2	70	70	2,8	tod	
	C46/6	Broilerin file	10 ² : 2	70	70	2,8	tod	
	C46/7	Broilerin file	0		0	0	ei tod	
	C46/8	Broilerin file	0		0	0	ei tod	
1	A1/1	Alkarvesi 1	10 ¹	2/3	2,5	0,0125	tod	+
	A1/2	Alkarvesi 1	10 ¹	2/3	2,5	0,0125	ei tod	-
	A1/3	Alkarvesi 1	10 ² : 2	17/19	18	0,09	ei tod	
	A1/4	Alkarvesi 1	10 ² : 2	17/19	18	0,09	tod	
	A1/5	Alkarvesi 1	10 ²	31/38	34,5	0,1725	tod	
	A1/6	Alkarvesi 1	10 ²	31/38	34,5	0,1725	tod	
	A1/7	Alkarvesi 1	0		0	0	ei tod	
	A1/8	Alkarvesi 1	0		0	0	ei tod	
2	A2/1	Alkarvesi 2	10 ¹	2/3	2,5	0,0125	tod	
	A2/2	Alkarvesi 2	10 ¹	2/3	2,5	0,0125	ei tod	
	A2/3	Alkarvesi 2	10 ² : 2	17/19	18	0,09	ei tod	
	A2/4	Alkarvesi 2	10 ² : 2	17/19	18	0,09	tod	
	A2/5	Alkarvesi 2	10 ²	31/38	34,5	0,1725	tod	
	A2/6	Alkarvesi 2	10 ²	31/38	34,5	0,1725	tod	
	A2/7	Alkarvesi 2	0		0	0	ei tod	
	A2/8	Alkarvesi 2	0		0	0	ei tod	
3	A3/1	Alkarvesi 3	10 ¹	2/3	2,5	0,0125	tod	
	A3/2	Alkarvesi 3	10 ¹	2/3	2,5	0,0125	ei tod	
	A3/3	Alkarvesi 3	10 ² : 2	17/19	18	0,09	ei tod	
	A3/4	Alkarvesi 3	10 ² : 2	17/19	18	0,09	tod	
	A3/5	Alkarvesi 3	10 ²	31/38	34,5	0,1725	ei tod	
	A3/6	Alkarvesi 3	10 ²	31/38	34,5	0,1725	tod	
	A3/7	Alkarvesi 3	0		0	0	ei tod	
	A3/8	Alkarvesi 3	0		0	0	ei tod	
4	LK 1/1	Listeriakierros 1	10 ¹	2/3	2,5	0,0125	ei tod	
	LK 1/2	Listeriakierros 1	10 ¹	2/3	2,5	0,0125	ei tod	
	LK 1/3	Listeriakierros 1	10 ² : 2	17/19	18	0,09	tod	+
	LK 1/4	Listeriakierros 1	10 ² : 2	17/19	18	0,09	tod	+
	LK 1/5	Listeriakierros 1	10 ²	31/38	34,5	0,1725	tod	
	LK 1/6	Listeriakierros 1	10 ²	31/38	34,5	0,1725	tod	
	LK 1/7	Listeriakierros 1	0		0	0	ei tod	
	LK 1/8	Listeriakierros 1	0		0	0	ei tod	

Wilrich- taulukko nro	Näytteen tunnus	Näyte	Siirrosten pitoisuus (odotettu pmy/25 g)	Rinnakkaiset PCA -maljat (malja 1/malja2) pmy/1 ml (raakatulos)	Siirrostettu pmy/25g (ka edellisestä)	Wilrich-laskurissa käytetty laskennallinen pmy/1 g	PCR- tulos	Varmis- tettu tulos
5	LK 2/1	Listeriakerros 2	10 ¹	2/3	2,5	0,0125	tod	
	LK 2/2	Listeriakerros 2	10 ¹	2/3	2,5	0,0125	ei tod	-
	LK 2/3	Listeriakerros 2	10 ² : 2	17/19	18	0,09	tod	+
	LK 2/4	Listeriakerros 2	10 ² : 2	17/19	18	0,09	tod	
	LK 2/5	Listeriakerros 2	10 ²	31/38	34,5	0,1725	tod	
	LK 2/6	Listeriakerros 2	10 ²	31/38	34,5	0,1725	tod	
	LK 2/7	Listeriakerros 2	0		0	0	ei tod	
	LK 2/8	Listeriakerros 2	0		0	0	ei tod	

Liite 4. Listeria-menetelmän LOD-laskut

Results of the PODLOD calculations											
No. <i>i</i>	Matrix Designation Matrix _{<i>i</i>}	Matrix effect <i>F_i</i>	Log matrix effect <i>f_i</i>	SD of log matrix effect <i>s_{f_i}</i>	LOD _{50%} = 50% limit of detection in cfu/g or cfu/ml			LOD _{95%} = 95% limit of detection in cfu/g or cfu/ml			Test statistic matrix effect <i> z_i </i>
					Detection limit <i>d_{0.5,i}</i>	Lower conf. limit <i>d_{0.5,i,L}</i>	Upper conf. limit <i>d_{0.5,i,U}</i>	Detection limit <i>d_{0.95,i}</i>	Lower conf. limit <i>d_{0.95,i,L}</i>	Upper conf. limit <i>d_{0.95,i,U}</i>	
1	F5 Maksalaatikko	0,275	-1,292	0,771	0,101	0,022	0,471	0,436	0,093	2,037	1,420
2	L7 Red hunajamarinadi	∞	∞	because every inoculated tube is positive							
3	F1 Italiansalaatti	0,720	-0,329	0,915	0,039	0,006	0,240	0,167	0,027	1,039	0,362
4	L4 Lohileipä	∞	∞	because every inoculated tube is positive							
Combined results		0,721	-0,328	0,525	0,038	0,013	0,110	0,166	0,058	0,475	0,624
based on the data of matrices 1, 2, 3 and 4											

Results of the PODLOD calculations											
No. <i>i</i>	Matrix Designation Matrix _{<i>i</i>}	Matrix effect <i>F_i</i>	Log matrix effect <i>f_i</i>	SD of log matrix effect <i>s_{f_i}</i>	LOD _{50%} = 50% limit of detection in cfu/g or cfu/ml			LOD _{95%} = 95% limit of detection in cfu/g or cfu/ml			Test statistic matrix effect <i> z_i </i>
					Detection limit <i>d_{0.5,i}</i>	Lower conf. limit <i>d_{0.5,i,L}</i>	Upper conf. limit <i>d_{0.5,i,U}</i>	Detection limit <i>d_{0.95,i}</i>	Lower conf. limit <i>d_{0.95,i,L}</i>	Upper conf. limit <i>d_{0.95,i,U}</i>	
1	VRA5 Tomaattikuutio	0,202	-1,597	0,681	0,137	0,035	0,534	0,592	0,152	2,310	1,818
2	Sip1 Sipulimurska	0,696	-0,362	1,002	0,040	0,005	0,295	0,172	0,023	1,277	0,391
Combined results		0,312	-1,163	0,601	0,089	0,027	0,295	0,383	0,115	1,275	1,825
based on the data of matrices 1 and 2											

Results of the PODLOD calculations											
No. <i>i</i>	Matrix Designation Matrix _{<i>i</i>}	Matrix effect <i>F_i</i>	Log matrix effect <i>f_i</i>	SD of log matrix effect <i>s_{f_i}</i>	LOD _{50%} = 50% limit of detection in cfu/g or cfu/ml			LOD _{95%} = 95% limit of detection in cfu/g or cfu/ml			Test statistic matrix effect <i> z_i </i>
					Detection limit <i>d_{0.5,i}</i>	Lower conf. limit <i>d_{0.5,i,L}</i>	Upper conf. limit <i>d_{0.5,i,U}</i>	Detection limit <i>d_{0.95,i}</i>	Lower conf. limit <i>d_{0.95,i,L}</i>	Upper conf. limit <i>d_{0.95,i,U}</i>	
1	Broilerin jauheliha	0,642	-0,443	0,660	0,043	0,012	0,162	0,187	0,050	0,699	0,588
2	Nakki	0,642	-0,443	0,660	0,043	0,012	0,162	0,187	0,050	0,699	0,588
3	Kalkkunaleike	1,386	0,327	1,020	0,020	0,003	0,154	0,086	0,011	0,665	0,287
4	Metwursti	∞	∞	because every inoculated tube is positive							
5	Broilerin file	∞	∞	because every inoculated tube is positive							
Combined results		0,920	-0,084	0,421	0,030	0,013	0,070	0,130	0,056	0,302	0,196
based on the data of matrices 1, 2, 3, 4 and 5											

Results of the PODLOD calculations											
No. <i>i</i>	Matrix Designation Matrix _{<i>i</i>}	Matrix effect <i>F_i</i>	Log matrix effect <i>f_i</i>	SD of log matrix effect <i>s_{f_i}</i>	LOD _{50%} = 50% limit of detection in cfu/g or cfu/ml			LOD _{95%} = 95% limit of detection in cfu/g or cfu/ml			Test statistic matrix effect <i> z_i </i>
					Detection limit <i>d_{0.5,i}</i>	Lower conf. limit <i>d_{0.5,i,L}</i>	Upper conf. limit <i>d_{0.5,i,U}</i>	Detection limit <i>d_{0.95,i}</i>	Lower conf. limit <i>d_{0.95,i,L}</i>	Upper conf. limit <i>d_{0.95,i,U}</i>	
1	Alkarvesi 1	0,824	-0,194	0,613	0,042	0,012	0,143	0,182	0,053	0,620	0,307
2	Alkarvesi 2	0,824	-0,194	0,613	0,042	0,012	0,143	0,182	0,053	0,620	0,307
3	Alkarvesi 3	0,386	-0,952	0,643	0,090	0,025	0,325	0,388	0,107	1,404	1,506
4	Listeriakerros 1	1,265	0,235	0,672	0,027	0,007	0,105	0,118	0,031	0,454	0,372
5	Listeriakerros 2	2,932	1,076	0,881	0,012	0,002	0,069	0,051	0,009	0,298	1,702
Combined results		0,808	-0,214	0,274	0,043	0,025	0,074	0,185	0,107	0,320	0,756
based on the data of matrices 1, 2, 3, 4 and 5											

Liite 5. Kasvis-matriisien PCR-ajojen tulokset ja grafiit

Corp name here
Address here
City, state here
Phone number here
Website here
Email here

Plate Information

Plate Run Name: Riitta Bjorkman: 07/16/2020 7:08 AM

Run By: RiittaB

Plate Run Date: 7/16/2020 9:54 AM

Instrument Name: GENUP-GA-0873

Instrument ID: GA0873

Plate Map Report

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LMO S000 1 AC 1007437370 LK 10077056	LMO S000 9 AC 1007437370 LK 10077056		SLM S000 1 AC 1007801260 LK 10077056	SLM S000 9 AC 1007801260 LK 10077056		SLM VRA00 1 AC 1007801260 LK 10077056	SLM VRA00 9 AC 1007801260 LK 10077056				
B	LMO S000 2 AC 1007437370 LK 10077056	LMO S000 10 AC 1007437370 LK 10077056		SLM S000 2 AC 1007801260 LK 10077056	SLM S000 10 AC 1007801260 LK 10077056		SLM VRA00 2 AC 1007801260 LK 10077056	SLM VRA00 10 AC 1007801260 LK 10077056				
C	LMO S000 3 AC 1007437370 LK 10077056	LMO S000 Negative AC 1007437370 LK 10077056		SLM S000 3 AC 1007801260 LK 10077056			SLM VRA00 3 AC 1007801260 LK 10077056	SLM S000 Negative AC 1007801260 LK 10077056				
D	LMO S000 4 AC 1007437370 LK 10077056			SLM S000 4 AC 1007801260 LK 10077056			SLM VRA00 4 AC 1007801260 LK 10077056					
E	LMO S000 5 AC 1007437370 LK 10077056			SLM S000 5 AC 1007801260 LK 10077056			SLM VRA00 5 AC 1007801260 LK 10077056					
F	LMO S000 6 AC 1007437370 LK 10077056			SLM S000 6 AC 1007801260 LK 10077056			SLM VRA00 6 AC 1007801260 LK 10077056					
G	LMO S000 7 AC 1007437370 LK 10077056			SLM S000 7 AC 1007801260 LK 10077056			SLM VRA00 7 AC 1007801260 LK 10077056					
H	LMO S000 8 AC 1007437370 LK 10077056			SLM S000 8 AC 1007801260 LK 10077056			SLM VRA00 8 AC 1007801260 LK 10077056					

Assay Kits:

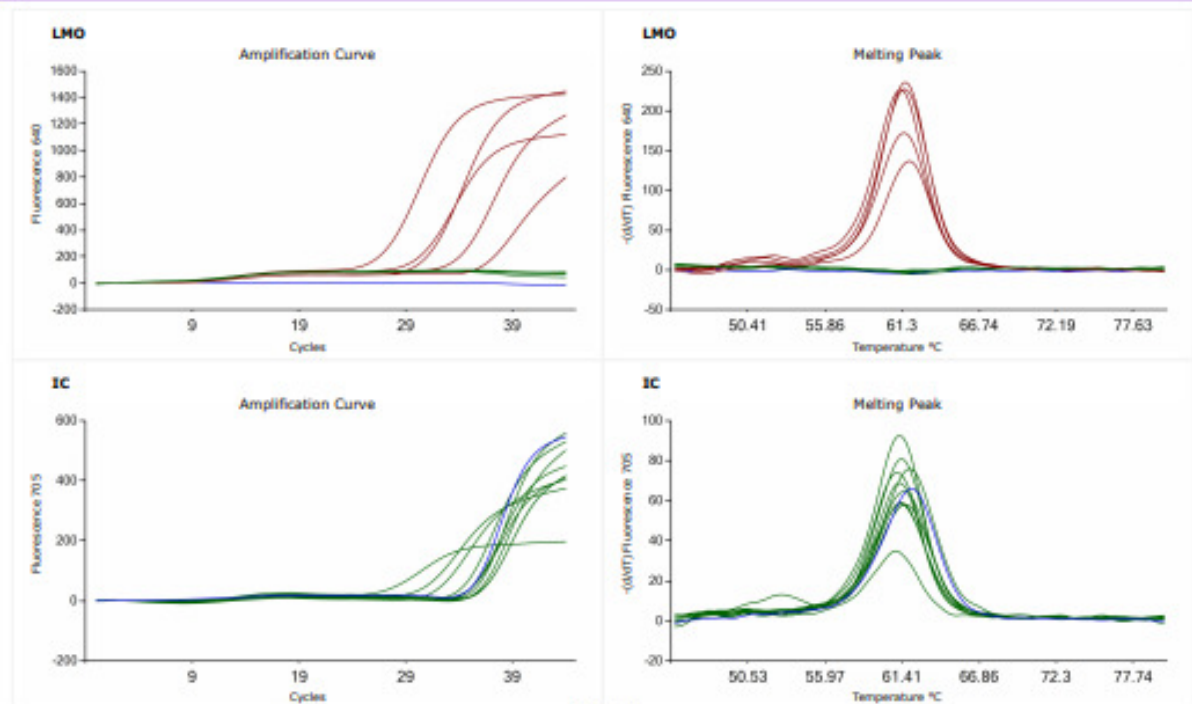
Assay	Lot Number	Expiration	Tests
LMO	1007437370	12/28/2020	11
SLM	1007801260	1/6/2022	21

Lysis Kits:

Lot Number	Expiration	Tests
1007705610	10/15/2020	32

Graphs

LMO



SLM

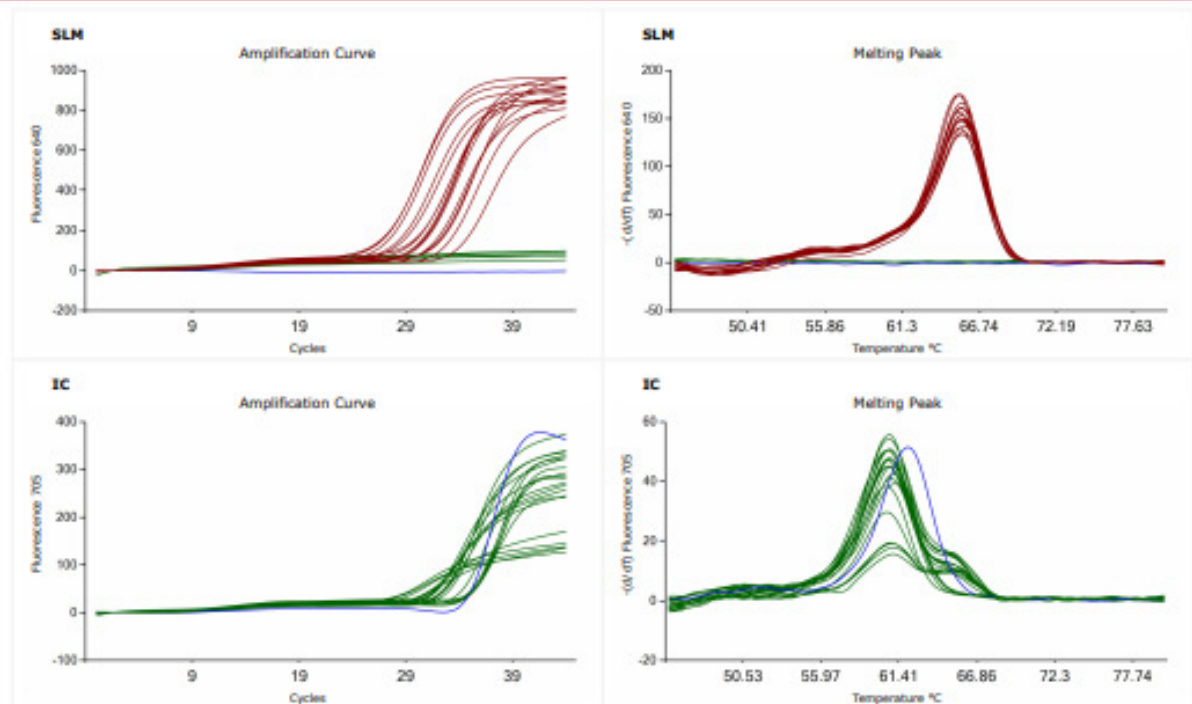


Plate List Report

LMO

Kit Lot: 1007437370 | Exp Date: 12/28/2020

Assay	Sample ID	Result	Interpretation	Status	Well
LMO	Sipul 1	➖	Absence	☐	A1
LMO	Sipul 2	➖	Absence	☐	B1
LMO	Sipul 3	➖	Absence	☐	C1
LMO	Sipul 4	➕	Presumptive presence of LMO	☐	D1
LMO	Sipul 5	➕	Presumptive presence of LMO	☐	E1
LMO	Sipul 6	➕	Presumptive presence of LMO	☐	F1
LMO	Sipul 7	➕	Presumptive presence of LMO	☐	G1
LMO	Sipul 8	➕	Presumptive presence of LMO	☐	H1
LMO	Sipul 9	➖	Absence	☐	A2
LMO	Sipul 10	➖	Absence	☐	B2
LMO	LMO-Negative	✓		☐	C2

SLM

Kit Lot: 1007801260 | Exp Date: 1/6/2022

Assay	Sample ID	Result	Interpretation	Status	Well
SLM	Sipul 1	➖	Absence	☐	A4
SLM	Sipul 2	➕	Presumptive presence of SLM	☐	B4
SLM	Sipul 3	➕	Presumptive presence of SLM	☐	C4
SLM	Sipul 4	➕	Presumptive presence of SLM	☐	D4
SLM	Sipul 5	➕	Presumptive presence of SLM	☐	E4

Generated by Kella Bjorkman on 7/16/2020 10:09 AM
Q200-UPB Software Version: 3.0.0.23

Results report

4 / 5

Assay	Sample ID	Result	Interpretation	Status	Well
SLM	Sipul 6	➕	Presumptive presence of SLM	☐	F4
SLM	Sipul 7	➕	Presumptive presence of SLM	☐	G4
SLM	Sipul 8	➕	Presumptive presence of SLM	☐	H4
SLM	Sipul 9	➖	Absence	☐	A5
SLM	Sipul 10	➖	Absence	☐	B5
SLM	VRA20/ 1	➕	Presumptive presence of SLM	☐	A7
SLM	VRA20/ 2	➕	Presumptive presence of SLM	☐	B7
SLM	VRA20/ 3	➕	Presumptive presence of SLM	☐	C7
SLM	VRA20/ 4	➕	Presumptive presence of SLM	☐	D7
SLM	VRA20/ 5	➕	Presumptive presence of SLM	☐	E7
SLM	VRA20/ 6	➕	Presumptive presence of SLM	☐	F7
SLM	VRA20/ 7	➕	Presumptive presence of SLM	☐	G7
SLM	VRA20/ 8	➕	Presumptive presence of SLM	☐	H7
SLM	VRA20/ 9	➖	Absence	☐	A8
SLM	VRA20/ 10	➖	Absence	☐	B8
SLM	SLM-Negative	✓		☐	C8

Generated by Kella Bjorkman on 7/16/2020 10:09 AM
Q200-UPB Software Version: 3.0.0.23

Results report

5 / 5