

UIMARANTAVESILLE SOVELTUVAT *Escherichia coli* - MENETELMÄT – Suomalaisen vertailututkimuksen tulokset

Pitkänen Tarja^{1,*}, Kalso Seija², Rapala Jarkko³, Koskentalo Helena⁴, Tuhkalainen Terhi⁵, Luoma Aija⁶, Laamanen Virpi⁷, Airaksinen Piia¹ ja Niemelä Seppo I.⁸

¹Kansanterveyslaitos (KTL), Ympäristömikrobiologian laboratorio, PL 95, 70701 Kuopio

²Helsingin kaupunki, ympäristölaboratorio, PL 500, 00099 Helsingin kaupunki

³Sosiaali- ja terveydenhuollon tuotevalvontakeskus (STTV), PL 210, 00531 Helsinki

⁴Seinäjoen elintarvike- ja ympäristölaboratorio, Vaasantie 1 C, 60100 Seinäjoki

⁵Viljavuuspalvelu Oy, Graanintie 7, 50190, Mikkeli

⁶Jyväskylän kaupunki, Yhdyskuntatoimi, Ympäristöosaston laboratorio, Eeronkatu 10, 40720 Jyväskylä.

⁷Lappeenrannan elintarvike- ja ympäristölaboratorio, Pohjolankatu 14, 53100 Lappeenranta

⁸Pikkukoskentie 3, 00650 Helsinki

*Vertailukokeen koordinaattori. Puhelin: 017-201153, Sähköposti: tarja.pitkanen@ktl.fi.

Kuopiossa, 22.2.2008

TIIVISTELMÄ

Uimakaudella 2006 Suomessa järjestetyn vertailututkimuksen tarkoituksena oli testata uuden uimavesidirektiivin (2006/7/EY) mukaista referenssimenetelmää ja vertailla, olisiko sille vaihtoehtoisia menetelmiä *Escherichia coli* -bakteerin toteamiseksi suomalaisista uimavesistä. Vertailussa mukana olleet kuusi suomalaista vesimikrobiologian alan laboratoriota toteuttivat vertailun yhteistyössä. Jotta mahdollinen maantieteellinen vaihtelu ja sekä sisämaan vedet että rannikkovedet tulisivat mukaan vertailuun, laboratoriot ja näytteenottokohteet sijaitsivat eri puolilla Suomea.

Vertailun referenssimenetelmänä oli ISO 9308-3 (pienen mittakaavan MPN) ja vaihtoehtoisena menetelmänä testattiin Colilert-18® Quantitray menetelmää. Lisäksi kahdessa laboratoriossa testattiin kalvosuodatusmenetelmään sovellettua kromogeenistä agarmenetelmää Cromocult® Coliform ES (Enhanced Selectivity). Vertailututkimus suoritettiin menetelmien vastaavuuden testaamiseksi standardissa ISO 17994:2004 annettujen kriteereiden mukaisesti. Vertailussa käytetyt elatusalustat tilattiin keskitetysti Sosiaali- ja terveydenhuollon tuotevalvontakeskuksen (STTV) kustannuksella. Osallistuvat laboratoriot vastasivat itse vertailussa tarvittujen näytteiden hankinnasta, työvoiman riittävydestä sekä työssä tarvituista laboratoriotarvikkeista ja -laitteista. Osallistuville laboratorioille järjestettiin perehdyttämistilaisuus ennen töiden aloittamista toukokuussa 2006.

Jokainen vertailussa mukana ollut laboratorio tuotti kesän 2006 aikana itse hankkimiensa uimavesinäytteiden avulla vähintään 40 raportointikelpoista tulosta yhteisesti hyväksytyyn tutkimussuunnitelman mukaisesti analysoituina. Kaikki alustavat *E. coli* -löydökset varmistettiin Fluorocult® LSB menetelmällä +44°C:ssa ja lisäksi varmistettiin Colilert-18® Quantitray -menetelmästä alustavia koliformisia löydöksiä (keltaiset kaivot, jotka eivät fluoresoi). Kaikkiaan vertailun aineisto koostui 264 näytteestä, joiden avulla verrattiin uimavesidirektiivin määrittämää referenssimenetelmää (ISO 9308-3) ja Colilert-18® Quantitray menetelmää toisiinsa ja 91 näytteestä, joiden avulla referenssimenetelmää verrattiin Chromocult® Coliform Agar ES pesäkemenetelmään.

Vertailun tuloksena Colilert-18® Quantitray menetelmän saanto oli noin 9 % matalampi kuin referenssimenetelmän. Menetelmien välisen suhteellisen erotuksen laboratoriokeskiarvot vaihtelivat välillä – 24 % ja + 13 % ja myös laboratorioden sisäinen välinen vaihtelu oli suurta. Tämä kertoo suuresta vaihtelusta näytteiden välillä. Varmistustestien perusteella selvisi, että vaihtoehtona testatulla Colilert -menetelmällä todettu hivenen huonompi saanto johtui Colilert -menetelmän virhenegatiivisista tuloksista: noin 7 % Colilertin keltaisista kaivoista, jotka eivät fluoresoineet, sisälsivät *E. coli* -bakteereita. Virhenegatiivisia todettiin enemmän luontaisesti likaisissa kuin jätevedellä terästetyissä näytteissä. Virhenegatiivisten korjaus johtaisi vähintään samantasoiseen saantoon kuin referenssimenetelmällä.

Tuloksia tarkasteltaessa todettiin, että n. 9 % ero Colilertin ja referenssimenetelmän välillä ei ole merkitsevä, ja että näitä menetelmiä voidaan pitää toisiaan vastaavina. Todettiin, että uimavesivertailuissa ei ole tarkoituksenmukaista käyttää sallittuna

poikkeamana talousvesivertailuille hyväksyttävää rajaa $D = 10 \%$, muun muassa koska verrattuna talousvesiin uimavesien raja-arvo ei ole nolla. Tämän johdosta työryhmä päätti käyttää tässä vertailussa sallitun poikkeaman arvoa $D = 20 \%$, jonka katsottiin olevan uimavesille soveltuvampi. Tämän lisäksi Colilertin nopeutta, helppokäyttöisyyttä ja referenssimenetelmää alemmaa määrittäysrajaa pidettiin päätöstä tehtäessä tärkeinä seikkoina menetelmän absoluuttisen *E. coli* -saannon lisäksi.

Chromocult ES -menetelmän saanto oli keskimäärin 16% alhaisempi kuin referenssimenetelmän ja näytelukumäärän alhaisuuden vuoksi vastaavuutta ei voitu todeta tilastollisesti. Näin ollen Chromocult ES -menetelmää ei katsottu soveltuvaksi vaihtoehtoiseksi menetelmäksi.

Vertailun tulosten perusteella Suomen laboratoriot saavat käyttää uuden uimavesidirektiivin (2006/7/EY) mukaisille vesille uimakauden 2008 alusta lukien *E. coli* -analyysissä direktiivin mainitsemien referenssimenetelmien (ISO 9308-3 ja ISO 9308-1) lisäksi Colilert-18® Quantitray menetelmää. Kunkin tutkivan laboratorion tulee täyttää standardin SFS-EN ISO/IEC 17025 vaatimukset ja hankkia ulkopuolinen arviointi käyttämilleen menetelmille ennen uimakautta 2008.

Escherichia coli -bakteerin määrittämiseksi direktiivissä annettuja menetelmiä ISO 9308-3 (pienen mittakaavan MPN liuosmenetelmä) ja 9308-1 (kalvosuodatusmenetelmä käyttäen Laktoosi TTC Tergitol kasvualustaa) ei ole Suomessa aiempina vuosina käytetty varsinkaan uimarantavesitutkimuksissa ja menetelmistä jälkimmäisen on todettu soveltuvan ainoastaan hyvin puhtaille ja desinfioituille talousvesille. Tämän vuoksi on todennäköistä, että useat laboratorioista ottavat käyttöönsä nimenomaan tämän vertailututkimuksen perusteella vastaavaksi todetun Colilert-18® Quantitray menetelmän uimarantavesitutkimuksiin. Colilert -menetelmää käytettäessä laboratorioiden pitää kuitenkin olla tietoisia mahdollisesta virhenegatiivisten esiintymisestä ja varmistua siitä, että heikostikin fluoresoivat kaivot tulkitaan *E. coli* -positiivisiksi esim. positiivikontrollin ja menetelmää käyttöönotettaessa tehtävien validointien, kuten rinnakkaisluentojen, varmistustestien ja inkubointiajan optimoinnin avulla.

Sisällysluettelo

| | |
|---|----|
| Tiivistelmä..... | 2 |
| Sisällysluettelo..... | 4 |
| 1. Taustaa..... | 5 |
| 1.1 Esikoe..... | 6 |
| 2. Työn toteutus..... | 7 |
| 2.1 Työryhmä..... | 7 |
| 2.2 Perehdyttämistilaisuus..... | 8 |
| 2.3 Näytteiden hankinta, laimennokset ja ympäykset..... | 8 |
| 2.4 Verrattavat menetelmät..... | 9 |
| Tarvikkeet | |
| Työn suoritus | |
| Levyjen/liuskojen/maljojen laskenta | |
| Varmistustestit | |
| Laadunvarmistus | |
| 2.5 Tulosten käsittely..... | 13 |
| Tulosten laskenta | |
| Tilastollinen käsittely | |
| Raportointi | |
| 3. Tulokset..... | 16 |
| 3.1 Aineisto..... | 16 |
| 3.2 Menetelmien herkkyys..... | 18 |
| 3.3 Virhenegatiivisten määrät ja varmistuvuus..... | 19 |
| 3.4 Colilert-18 – ISO 9308-3 vertailu..... | 19 |
| 3.5 Chromocult ES -menetelmän vertailu..... | 23 |
| 4. Jatkotutkimus..... | 24 |
| 5. Tulosten tarkastelu..... | 25 |
| 6. Johtopäätökset..... | 28 |
| Kirjallisuus..... | 30 |

- LIITE 1. Pipetointijärjestys kolmen menetelmän tapauksessa
LIITE 2. Laskenta- ja varmistustestilomakkeet
LIITE 3. Tulostaulukko

1. TAUSTAA

Uusi Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi (2006/7/EY) uimaveden laadun hallinnasta on julkaistu ja sen kansallista täytäntöön panoa valmistellaan parhaillaan. Aiempi direktiivi on peräisin vuodelta 1976, joten uusi versio direktiivistä on erittäin tervetullut ja odotettu. Uusi direktiivi on varsin edistyksellinen ja tuo tullessaan muutoksia myös uimavesistä tutkittaviin mikrobiologisiin muuttujiin. Aiemmin lainsäädännössä mainitut koliformiset bakteerit, fekaaliset koliformiset bakteerit, fekaaliset streptokokit, enterovirukset, bakteriofaagit ja salmonella tulevat jäämään pois uudistetusta lainsäädännöstä. Jatkossa uuden uimavesidirektiivin mukaisesti mikrobiologisista muuttujista seurataan ainoastaan suolistoperäisten enterokokkien ja *Escherichia coli* –bakteerin esiintymistiheyksiä (pmy/100 ml) uimavesissä.

Uuden uimavesidirektiivin liitteessä I on annettu suolistoperäisille enterokokeille ja *Escherichia coli* –bakteerille ne pesäkelukumäärät (pmy/100ml), jotka 95-prosenttipisteen arvioon perustuen määrittävät seurattavan uimaveden laadun joko erinomaiseksi tai hyväksi. Lisäksi annetaan ne pesäkelukumäärät, jotka määrittävät 90-prosenttipisteen arvioon perustuen uimaveden laadun riittäväksi. Edellä mainitut lukuarvot on annettu erikseen sisämaan vesille ja rannikkovesille.

Direktiivin liitteessä I on esitetty myös analyysin vertailumenetelmät, joita käyttäen mikrobiologinen seuranta on suoritettava. Jäsenvaltiot voivat kuitenkin sallia muiden menetelmien käytön, jos ne voivat osoittaa, että saadut tulokset vastaavat liitteessä I esitettyjä menetelmiä. Jäsenvaltioiden, jotka sallivat tällaisten vastaavien menetelmien käytön, on toimitettava komissiolle kaikki asiaankuuluvat tiedot käytetyistä menetelmistä ja niiden vastaavuudesta. Mikrobiologisten tutkimusmenetelmien vastaavuutta koskevan EN/ISO –standardin määrittäminen on direktiivissä annettu komissiota avustavan komitean tehtäväksi.

Suolistoperäisten enterokokkien määrittämiseksi direktiivissä annetaan menetelmät ISO 7899-1 tai ISO 7899-2. Kyseiset menetelmät ovat pienen mittakaavan MPN liuosmenetelmä ja kalvosuodatusmenetelmä käyttäen Slanetzin ja Bartleyn kasvualustaa. MPN menetelmää 7899-1 ei juuri ole Suomessa aiemmin käytetty. Sen sijaan kalvosuodatusmenetelmä ISO 7899-2 on Suomessa jo laajasti käytetty vesitutkimuksissa ja sen on todettu soveltuvan hyvin myös uimavesinäytteille. Tästä johtuen erityistä tarvetta vaihtoehtoisille enterokokkimenetelmille ei ole todettu.

Escherichia coli –bakteerin määrittämiseksi direktiivissä annetut menetelmät ovat ISO 9308-3 tai 9308-1. Kyseiset menetelmät ovat pienen mittakaavan MPN liuosmenetelmä ja kalvosuodatusmenetelmä käyttäen Laktoosi TTC Tergitol (LTTC) -kasvualustaa. Standarditestin lisäksi ISO 9308-1 sisältää nopean testin TSA/TBA-kasvualustoilla. MPN liuosmenetelmästä ISO 9308-3 on vain hyvin vähän käyttökokemuksia Suomessa. Kalvosuodatusmenetelmän 9308-1 standarditestiä (LTTC) on taas testattu laajasti Suomen laboratorioissa talousvesitutkimuksissa. Sen on todettu soveltuvan ainoastaan hyvin puhtaille ja/tai desinfioituille vesille suuren herkkyytensä takia. *E. coli* -menetelmien osalta tarve vaihtoehtoisille menetelmille on koettu suureksi. Toisaalta myös entistä laajempia käyttökokemuksia pienen mittakaavan MPN liuosmenetelmästä tarvitaan. Tässä esitettävän työn tarkoituksena oli saada selville testatuissa Suomen olosuhteissa uimavesien *E. coli* -seurantaan parhaiten sopiva menetelmä.

1.1 Esikoe

Esikoe suoritettiin Kansanterveyslaitoksen ympäristömikrobiologian laboratoriossa Kuopiossa kevään 2006 aikana. Kokeen tulosten perusteella valittiin ne menetelmät, jotka sisältyvät varsinaiseen vertailututkimukseen.

Referenssimenetelmänä oli SFS-EN ISO 9308-3; pienen mittakaavan MPN liuosmenetelmä, + 44 °C, 36-72 h, johon verrattiin seuraavia mahdollisia vaihtoehtoisia menetelmiä:

- 1) ISO 9308-1; LTTC Tergitol-7, + 44 °C, 21 ± 3 h
- 2) Colilert®-18 ja 51-well Quanti-tray® (IDEXX), + 35 °C, 18 h
- 3) SFS 4088; mFC, + 44 °C, 24 h
- 4) Chromocult® COLIFORM Agar ES (Merck), + 35 °C, 24 h
- 5) Selective *E. coli* / coliform chromogenic medium (Oxoid), + 35 °C, 24 h
- 6) Rapid *E. coli* 2 (Bio-Rad), + 35 °C, 24 h
- 7) Chromocult® COLIFORM Agar + Selective Supplement (Merck), + 35 °C, 24 h

Työssä kiinnitettiin huomiota työjärjestykseen satunnaistamalla menetelmien pipetointi/suodatusjärjestys. Esikokeessa tutkittiin 18 näytettä, joista 10 oli rinnakkaisia referenssimateriaalilla (DW2004:A, Livsmedelsverket, Ruotsi) tehtyjä validointinäytteitä ja 8 jätevedellä ympättyjä avantouintinäytteitä. Työ suoritettiin vastaavalla tavalla, kuin jäljempänä kuvattu varsinainen vertailututkimus, ainoastaan vaihtoehtoisten menetelmien lukumäärä oli suurempi.

Esikokeessa vaihtoehtoiset menetelmät SFS 4088 (mFC) ja Chromocult® COLIFORM Agar + Selective Supplement (Merck) antoivat merkitsevästi alhaisempia *E. coli* -saantoja kuin referenssimenetelmä ISO 9308-3. Sen sijaan muiden menetelmien saantojen osalta aineisto ei ollut riittävä lopullisten johtopäätösten tekemiseen.

Menetelmä ISO 9308-1 (uimavesidirektiivin määrittelemä toinen referenssimenetelmä) oli erittäin hankala luettava epäselvän värireaktion ja runsaan taustakasvun vuoksi, eikä sen siksi katsottu soveltuvan lainkaan uimavesien tutkimiseen. Merckin, Oxoidin ja Bio-Radin kromogeeniset alustat eivät poikenneet käytettävyydeltään ratkaisevasti toisistaan. Merckin tuotteen (Chromocult ES) saanto oli kuitenkin näistä vaihtoehdoista paras suhteessa referenssimenetelmään ja lisäksi pesäkkeet olivat helpoimmin laskettavissa.

Todettiin, että alle 200 kpl lisänäytteitä riittää mahdollisten menetelmävastaavuuksien todistamiseen, mikäli laajennettu epävarmuus ei kasva merkittävästi. Laboratoriokokemusten ja esikokeessa todettujen saantojen perusteella Colilert ja Chromocult ES –menetelmät valittiin varsinaisessa vertailututkimuksen vaihtoehtoisiksi menetelmiksi.

2. TYÖN TOTEUTUS

Tutkimuksessa verrattiin uimavesille soveltuvia vaihtoehtoisia menetelmiä *Escherichia coli* -bakteerin määrittämiseksi. Työ suoritettiin menetelmien vastaavuuden testaamiseksi standardissa SFS-EN ISO 17994:2004 annettujen kriteereiden mukaisesti. Referenssimenetelmänä, johon vaihtoehtoisia menetelmiä verrattiin, käytettiin pienen mittakaavan MPN liuosmenetelmää SFS-EN ISO 9308-3. Vaihtoehtoisena menetelmänä varsinaisessa vertailututkimuksessa testattiin kaikissa osallistuvissa laboratorioissa Colilert-18® Quantitray (IDEXX) MPN liuosmenetelmää. Alustavassa tutkimussuunnitelmassa mukana ollut SFS 4088 menetelmä (mFC) jätettiin varsinaisesta vertailusta pois, koska se antoi esikokeissa 70 % alempia tuloksia kuin referenssimenetelmä. Esikokeessa testatuista kalvosuodatusmenetelmään sovelletuista kromogeenisistä agarimetelmistä parhaimmaksi osoittautui Cromocult Coliform ES (Merck). Kaksi vertailuun osallistuvista laboratorioista jatkoi varsinaisen vertailukokeen rinnalla myös tämän kromogeenisen agaralustan testaamista.

Työ toteutettiin yhteistyössä vesimikrobiologian alan laboratorion kesken Suomessa. Mukana vertailussa oli kuusi laboratoriota, joista kullakin oli tavoitteena tutkia noin 40 itse omalta alueeltaan hankkimaansa uimavesinäytettä tässä suunnitelmassa esitetyllä tavalla vuoden 2006 uimakauden aikana. Tarvittavien raportoitujen vertailumittauksien tarkkaa lukumäärää ei vertailun suunnitteluvaiheessa vielä pystytty arvioimaan, koska tarve riippuu siitä, kuinka paljon vertailtavien menetelmien suhteelliset erot vaihtelevat näytteiden ja vertailulaboratorioiden välillä. Vertailussa katettiin koko kyseessä oleva maantieteellinen alue (Suomi) ja sekä rannikko- että sisämaan vedet. Suomen uimarannoista 99 kpl on merivesiä ja 280 kpl sisämaan vesiä. Tämä jakauma näkyi myös tämän vertailun aineistossa: suurin osa tutkittavista näytteistä oli sisämaan vesiä ja ainoastaan kahdessa laboratorioissa osa tutkittavista vesistä oli rannikkovesiä.

Vertailuun osallistuvien laboratorioiden oli ennen työn aloittamista sitouduttava suorittamaan analyysit yhteisesti sovittujen ja jäljempänä tässä raportissa esitettyjen sääntöjen mukaisesti. Kaikilla laboratorioilla oli käytössä laatujärjestelmä. Vertailuun osallistuvien laboratorioiden edustajille järjestettiin ennen vuoden 2006 uimakauden alkua Helsingissä koulutuspäivä, jonka aikana yhtenäistettiin käytetyt työtavat mahdollisimman pitkälle. Aineiston tilastollisesta käsittelystä vastasi Seppo I. Niemelä. Vertailun tuloksista tiedotettiin kansallisesti tammikuussa 2007 ja osallistuvat laboratoriot saivat tuottamansa aineiston käyttöönsä.

2.1 Työryhmä

Tämän menetelmien vertailututkimuksen suunnittelusta, toteutuksesta ja raportoinnista vastasi työryhmä, joka koostui osallistuvien laboratorioiden ja kansallisten viranomaistahojen edustajista. Työryhmään kuului myös tilastollinen asiantuntija.

2.2 Perehdyttämistilaisuus

Perehdyttäminen järjestettiin keskiviikkona 24.5.2006 klo 9-16 Helsingin ympäristökeskuksen mikrobiologian laboratoriossa. Kustakin osallistuvasta laboratoriosta oli tässä tilaisuudessa läsnä vähintään kaksi edustaja: sekä tulosten laskennasta vastaava mikrobiologi että työn käytännön toteutuksesta vastaava laborantti. Kukin laboratorio vastasi itse matkakustannuksista. Päivän aikana osallistujille esiteltiin vertailun työvaiheet, joita kukin pääsi itse laboratoriotiloissa harjoittelemaan. Keskustelujen, kysymysten ja vastausten avulla muodostettiin yhteinen toimintamalli vertailun toteuttamiseksi.

2.3 Näytteiden hankinta, laimennokset ja ymppäykset

Näytteinä käytettiin laboratorioihin saapuneita tai kerättyjä uimarantavesinäytteitä, joita tarvittaessa terästettiin paikallisilta jäteveden puhdistamoilta kerätyillä jätevesinäytteillä. Samasta näytestä otettuja erillisiä näytepulloja pidettiin tässä vertailussa erillisinä näytteinä. Verrattavat analyysit tehtiin aina samasta näytepullosta. Tarkoituksena oli tutkia niin monta näytettä, että raportointikelpoisia näytteitä kertyy jokaisesta osallistuvasta laboratoriosta mahdollisuuksien mukaan vähintään 40 kappaletta.

Laboratorioiden välisen hajonnan minimoimiseksi pyrittiin siihen, että laboratorioista raportoidut näytemäärät eivät poikkeaisi paljon toisistaan. Poikkeamien välttämiseksi laboratorioita pyydettiin ilmoittamaan sekä kesäkuun että heinäkuun 2006 loppuun mennessä saamiensa raportointikelpoisten näytteiden lukumäärät sekä sen hetken arviot tulevista näytemääristä vertailututkimuksen koordinaattorille.

Tutkittavana tilavuutena käytettiin 10 ml (referenssimenetelmä: 9,6 ml) näytevetä. Toivottavaa oli, että tutkittavat näytteet jo luontaisesti antaisivat tulokseksi noin 5 – 20 positiivista kuoppaa/kaivoa/pesäkettä tässä tilavuudessa (50-200 pmy/100ml). Mikäli tämä ei toteutunut, näytteestä riippuen, sopivaan positiivisten määrään pyrittiin joko laimennosten tai ymppäysten avulla. Liian paljon bakteereita sisältäneet näyteerät hylättiin liian suuren työtaakan vuoksi, koska työssä varmistettiin kaikki positiiviset löydökset. Toisaalta myös sellaiset näytteet, joissa molemmat tai toinen testattavista menetelmistä ei antanut yhtään positiivista kuoppaa/kaivoa/pesäkettä, hylättiin.

Ennalta tuntemattomia näytteitä tutkittaessa meneteltiin siten, että näytteen saapuessa laboratorioon, tehtiin analyysi vain yhdellä menetelmällä (alkutestaus). Laboratoriot käyttivät alkutestausmenetelmänä joko tässä vertailussa varmistustestialustana käytettyä Chromocult Coliform Agar (CC) -alustaa, Chromocult Coliform Agar ES (CC-ES) -alustaa tai laboratoriossa tilaajan pyynnön vuoksi joka tapauksessa tehtäväksi tullutta muuta menetelmää, kuten Colilert -menetelmää. Menetelmän tuli joka tapauksessa olla sellainen, jolta alustava *E. coli* -tulos oli mahdollista saada yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen.

Seuraavana päivänä saadut alkutestauksen tulokset kirjattiin ja niiden perusteella päätettiin,

- 1) onko näyte kelvollinen vertailuun sellaisenaan. Mikäli näyte oli kelvollinen (ts. tuotti noin 5 – 20 alustavaa *E. coli* -pesäkettä tai kaivoa / 10 ml), analysoitiin näyte uudelleen käyttäen kaikkia vertailussa mukana olevia menetelmiä samanaikaisesti (vaikka alkutestaus olisi tehty Colilert-menetelmällä, vertailuun kelvollinen Colilert -analyysi oli tehtävä uudestaan aloittamalla se samanaikaisesti referenssimenetelmän kanssa);
- 2) hylätäänkö näyte;
- 3) tarvitseeko näytettä laimentaa. Jos laimennoksia tarvittiin, tärkeintä oli, että molemmat testattavat menetelmät laimennetaan samalla tilavuudella samaan laimennosveteen. Laimennosvetenä oli käytettävä mielellään samalla viikolla otettua ja kylmässä säilytettyä sellaisen rannan uimavettä, jossa *E. coli* -bakteereja esiintyi vain vähän. Kyseeseen tullut suurin tarvittava laimennos oli 1/10 eli pienin käytettävä näytilavuus oli 1 ml. Laimennosvetenä ei saanut käyttää puskuroituja ”normaaleja” laimennosvesiä.
- 4) tarvitseeko näytteeseen ympätä jätevetä. Mikäli tällaista mahdollisuutta epäiltiin, jätevedestä tehtiin ensimmäisenä päivänä näytteiden saapuessa laboratorioon laimennossarja pintalevityksenä CC-alustoille. Tällöin seuraavana päivänä samaan aikaan uimavesien alkutestauksen tulosten kanssa saatiin jätevesien alustava *E. coli* -lukumäärä. Sen perusteella laskettiin ymppitilavuus ja tehtiin tarvittaessa jätevedestä välilaimennokset tuoreeseen uimarantaveteen tai steriiliin veteen.

2.4 Verrattavat menetelmät

Tässä tutkimuksessa referenssimenetelmän SFS-EN ISO 9308-3 tuottamia uimarantavesien *E. coli* -tuloksia verrattiin mahdollisen vaihtoehdoisen menetelmän Colilert-18® Quantitray antamiin *E. coli* -tuloksiin. Molemmissa menetelmissä *E. coli* -bakteerin havaitseminen perustuu fluorogeeniseen reaktioon (β -glukuronidaasi-positiivisuus, MUG+). Colilert-18 menetelmä sisältää lisäksi kromogeeniseen reaktioon perustuvan koliformisten bakteerien havaitsemisen (β -galaktosidaasi-positiivisuus, ONPG+) siten, että positiivinen *E. coli* -tulos Colilert-18 menetelmällä vaatii sekä kromogeenisen että fluorogeenisen reaktion tapahtuneeksi ja havaituksi samassa kaivossa (MUG+ ja ONPG+). Menetelmällä 9308-3 ei saa määritetyksi koliformisia bakteereita.

Edellä esitettyjen menetelmien lisäksi kahdessa vertailuun osallistuvassa laboratoriossa verrattiin referenssimenetelmään nähden myös kalvosuodatusmenetelmään SFS-EN ISO 9308-1 sovellettua kromogeenistä agarmenetelmää Cromocult Coliform ES (Enhanced Selectivity, CC-ES). Tällä menetelmällä *E. coli* -bakteerin havaitseminen perustuu kromogeeniseen reaktioon (β -glukuronidaasi-positiivisuus). CC-ES -alustalta voidaan määrittää *E. coli* -bakteerin lisäksi myös koliformisten bakteerien pesäkelukumäärä niinikään kromogeenisen reaktion (β -galaktosidaasi-positiivisuus) avustamana.

Tarvikkeet

Kullekin laboratoriolle hankittiin keskitetysti seuraavat reagenssit:

Bio-Rad 53782 Microplate *E. coli* mug transparent

Bio-Rad 53784 Diluant special microplate

IDEXX 98-08876-00 Colilert-18 reagenssi

IDEXX 98-21378-00 Quanti-tray liuskat

IDEXX 98-21904-00 Antifoam
Oxoid CM0131B Tryptone Soya Agar
Merck 1.12588.0500 Lauryl Sulfate Fluorocult
Merck 1.10426.0500 Coliform Agar Chromocult
Merck 1.00850.0500 Coliform Agar Chromocult ES (vain kahdelle laboratoriolle)

Laboratorioilla tuli itsellään olla seuraavat tarvikkeet/laitteet:

Mikrotiitterilevyjen pipetointiin soveltuva 8-kanavainen pipetti

Steriilejä pipetinkärkiä

UV-lamppu ja suojalasit

Colilert sulkijalaite

Tyhjiä petrimaljoja

0,45 µm kalvosuodattimia (esim. Millipore HAWG 047 S1)

Koeputkia esim. Tamro SWG2613111

Durham –putkia esim. Tamro SCP024300

Koeputkitelineitä

Steriloituja Eppendorf tai vastaavia putkia (esim. á 0,5 ml tilavuudeltaan)

Steriilejä neuloja ja ruiskuja (esim. 1 ml:n insuliiniruisku)

Kertakäyttöisiä viljelysauvoja

Inkubaattori $36 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

Inkubaattori $44 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$

Reagenssit ja tarvikkeet oksidaasitestin suorittamista varten

Kovac'sin reagenssia

Työn suoritus

Työssä kiinnitettiin huomiota työjärjestykseen. Laimennossarjat testattavia menetelmiä varten valmistettiin erikseen juuri ennen käyttöä. Joka toisella näytteellä ensin suoritettiin referenssimenetelmä (9308-3) ja joka toisella näytteellä ensin tehtäväksi tuli vaihtoehtomenetelmä (Colilert). Niissä kahdessa laboratoriossa, jotka testasivat myös kolmatta menetelmää (CC-ES), käytetty pipetointijärjestys on esitetty liitteessä 1. Analyysit suoritettiin laboratoriossa verrattavilla menetelmillä kustakin tutkittavasta näytteestä välittömästi peräkkäin, ilman minkäänlaisia taukoja. Inkuboinnit aloitettiin yhtä aikaa, välittömästi levyn (9308-3) ja liuskan (Colilert) sulkemisen (sekä suodattamisen (CC-ES)) jälkeen.

Pienen mittakaavan MPN liuosmenetelmässä käytettiin näytteistä ½ laimennosta (valmistajan ohjeissa ja standardissa esitettyä 1/20 laimennosta ei käytetty tässä vertailututkimuksessa). Yhdellä laimennoksella kokonaisen kuoppalevyn pipetoiminen vaati nestettä $96 \times 200 \mu\text{l} = 19,2 \text{ ml}$, josta näytteen osuus oli puolet: 9,6 ml. Laimennos ½ saatiin, kun sekoitettiin sama tilavuus (esim. 25 ml) tutkittavaa näytettä (luontainen/laimennettu/ympätty) vastaavaan tilavuuteen (25 ml) erikoislaimennosvettä (synteettinen merisuola). Kuoppalevyt suljettiin tiiviisti muovikalvolla ja inkuboitiiin $+ 44 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa. Päällekkäin inkuboitiiin korkeintaan kaksi levyä, elleivät kaikki levyt mahtuneet vierekkäin inkubaattoriin.

Colilert tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. 10 ml näytettä (samasta pullosta kuin referenssimenetelmää varten; luontainen/laimennettu/ympätty) sekoitettiin 90 ml:aan steriiliä deionisoitua vettä. Tämän jälkeen lisättiin Colilert-reagenssi, antifoam-tipat ja

sekoitettiin uudelleen. Täytetty ja suljettu 51-kaivoinen Quantitray -liuska inkuboituiin $+36 \pm 2$ °C:ssa.

CC-ES menetelmässä suodatettiin 10 ml näytettä 0,45 µm kalvosuodattimelle lisäämällä suodatussuppiloon n. 100 ml steriiliä deionisoitua vettä kantovedeksi, jonka päälle näyte pipetoitiin. Suodatuksen jälkeen kalvo siirrettiin pintakuivatulle (n. 30 min laminaarissa kansi raollaan) CC-ES -alustalle ja inkuboituiin $+36 \pm 2$ °C:ssa.

Levyjen/liuskojen/maljojen laskenta

- 1) 9308-3: Kaikki fluoresoivat kuopat ovat positiivisia kuoppia (MUG+), joiden lukumäärä laskettiin 48 ± 3 ja 69-72 tunnin kuluttua. Jatkoviljelmät varmistustestejä varten voitiin ottaa jo 48 ± 3 h inkuboinnin jälkeen, jolloin 69 - 72 tunnin inkuboinnin jälkeen jatkoviljelmät otettiin vain sellaisista fluoresoivista kuopista, jotka eivät vielä edellisena päivänä fluoresoineet.
- 2) Colilert: Keltaiset kaivot, jotka myös fluoresoivat, ovat alustavasti *E. coli* – positiivisia. Laskenta tehtiin 18 - 21 tunnin inkuboinnin jälkeen, jonka jälkeen tehtiin jatkoviljelmät. Laskentalomakkeeseen merkittiin erikseen a. keltaisten ja fluoresoivien (ONPG+ ja MUG+), b. vain keltaisten (ONPG+ ja MUG-) ja c. vain fluoresoivien (ONPG- ja MUG+) kaivojen lukumäärä.
- 3) CC-ES: Sinivioletit pesäkkeet ovat alustavia *E. coli* -pesäkkeitä. Laskenta tehtiin 21 ± 3 tunnin inkuboinnin jälkeen, jonka jälkeen tehtiin jatkoviljelmät. Laskentalomakkeeseen merkittiin a. siniviolettien ja b. punaisten pesäkkeiden lukumäärä. Muun väristen pesäkkeiden määrä arvioitiin asteikolla: 1 = ei taustaa, 2 = muutamia tausta pesäkkeitä ja 3 = runsas/häiritsevä tausta.

Käytettävät laskenta- ja varmistustestikaavakkeet sekä MPN-taulukot on esitetty liitteessä 2. Kaikki alustavat positiiviset *E. coli* -löydökset (fluoresoiva kuoppa/kaivo tai sinivioletti pesäke) varmistettiin.

Koska Colilert -menetelmään kuuluu myös koliformisten bakteerien määrittäminen, myös keltaisista kaivoista, jotka eivät fluoresoi, otettiin mahdollisten virhenegatiivisten läsnäolon poissulkemiseksi/toteamiseksi vähintään 5 kaivoa /liuska varmistustesteihin. Samoin CC-ES –maljoilta otettiin vähintään 5 punaista pesäkettä /malja varmistuksiin. Mikäli kaikkia alustavia koliformipesäkkeitä ei otettu varmistuksiin, kyseessä oli osittainen varmistus, ja valinta jatkoviljelmiin satunnaistettiin. Colilert -menetelmän satunnaistaminen toteutettiin siten, että aloitettiin vain keltaisten kaivojen poimiminen liuskan vasemmasta alakulmasta ja otettiin sieltä lukien järjestyksessä vähintään nuo 5 kpl jatkoihin. CC-ES:ltä punaisten pesäkkeiden poimiminen satunnaistettiin siten, että piirrettiin maljan pohjaan säde, josta lähdettiin myötäpäivään kiertäen ottamaan järjestyksessä vähintään nuo 5 kpl jatkoviljelmiä.

Laskennan jälkeen näyte oli hylättävä ennen jatkoviljelmiä, mikäli näytteen bakteeritiheys oli liian pieni (toinen tai molemmat menetelmistä eivät antaneet yhtään positiivista kuoppaa/kaivoa/pesäkettä). Harkinnanvaraisesti näytteen sai hylätä myös liian suuren bakteeritiheyden takia (liian suuri työtaakka varmistettavaksi).

Varmistustestit

Varmistukset koostuivat seuraavista vaiheista:

- Jatkoviljelmä Chromocult -alustalle
- Puhdasviljelmä TSA -alustalle
- Oksidaasitesti
- Fluorocult -testi (kasvu, indoli, fluoresenssi ja kaasu)
- Mahdollinen kantojen talteenotto ja edelleen lähetys

Kuopista (9308-3) ja kaivoista (Colilert) tehtiin jatkoviljelmät selektiivisille Chromocult coliform –alustoille (CC), joita inkuboitiin $+ 36 \pm 2$ °C, yön yli. Kustakin positiivisesta kuopasta/kaivosta otettiin kalvon/taustapaperin läpi neulalla liuosta pieneen eppendorf-putkeen, josta viljely tehtiin 1 µl:n silmukalla. Yhdelle pintakuivatulle (30 min laminaarissa tai yön yli valolta suojattuna huoneenlämmössä) CC:lle (halkaisija 90 mm) viljeltiin 4 viljelmää. Seuraavana päivänä kirjattiin viljelmien väri (sinivioletti/punainen/seka/muu). Mikäli pesäkkeitä ei ole muodostunut, kirjattiin ”ei kasvua”. Testattavien kantojen puhtauteen kiinnitettiin huomiota ja pyrittiin tekemään puhdasviljelmät erillispesäkkeestä. Mikäli oli aihetta epäillä sekakasvua tai CC-alustalta ei ollut mahdollista saada erillispesäkkeitä jatkoon, kannat viljeltiin puhtaaksi uudelle CC-alustalle. Sinivioleteista ja punaisista erillispesäkkeistä CC -alustalla jatkettiin viljelyä TSA-alustalle ($+ 36 \pm 2$ °C, yön yli). Mahdollisista muun värisistä pesäkkeistä (keltaiset, valkeat, turkoosit, ruskeat) ei tehty jatkotestejä.

CC-ES -alustoilta tehtiin puhdasviljelmät suoraan TSA-alustoille, mikäli pesäkkeet olivat hyvin erillään toisistaan eikä maljoilla esiintynyt pesäkkeiden puhtauden kannalta häiritsevää taustakasvua.

TSA -alustalta tehtiin oksidaasitesti ko. laboratorioissa käytössä olevan normaalin käytännön mukaisesti, kiinnittäen erityistä huomiota viljelmien puhtauteen. Positiivi- ja negatiivikontrollikantojen käyttö jokaisella testikerralla oli suositeltavaa.

Oksidaasinegatiiviset viljelmät siirrostettiin esilämmitettyihin Fluorocult® Lauryl Sulfate Broth (Merck) -putkiin, joiden sisällä oli durham-putki kaasunkeräystä varten. Jokaisella testikerralla inkuboitiin testattavien kantojen lisäksi putket positiivi- ja negatiivikannoista. Putkista luettiin inkuboinnin ($+ 44 \pm 0,5$ °C, 21 ± 3 h) jälkeen fluoresenssi UV-valossa, tarkasteltiin onko muodostunut kaasua ja tehtiin indolikoe Kovac'sin reagenssilla. Inkuboinnissa oli huomioitava, että käyttää tehokasta inkubaattoria ja ettei täytä inkubaattoria liiaksi kerralla, jotta lämpötila saavuttaa halutun arvon mahdollisimman nopeasti. Vaihtoehtoisesti voitiin käyttää myös vesihaudetta inkubaatioon.

Taulukossa 1. on esitetty mahdolliset varmistustestien tulosityhdistelmät (1-8). Varmistetuiksi *E. coli* -bakteereiksi tulkittiin ne kannat, jotka olivat olleet oksidaasinegatiivisia, indolipositiivisia ja fluoresoineet Fluorocult –putkissa, eli vaihtoehdot 1 ja 2. Kaasunmuodostus $+ 44$ °C:ssa ja sinivioletti väri CC -alustalla tukivat tätä tulkintaa, mutta eivät olleet edellytyksenä *E. coli* -bakteeriksi tulkitsemiselle.

Taulukko 1. Mahdolliset varmistustestien tulosityhdistelmät (biotyypit).

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | Oks-, ind44+, fluor44+ ja kaasu44+ | 5 | Oks-, ind44- , fluor44+ ja kaasu44+ |
| 2 | Oks-, ind44+, fluor44+ ja kaasu44- | 6 | Oks-, ind44- , fluor44+ ja kaasu44- |
| 3 | Oks-, ind44+, fluor44- ja kaasu44+ | 7 | Oks-, ind44- , fluor44- ja kaasu44+ |
| 4 | Oks-, ind44+, fluor44- ja kaasu44- | 8 | Oks-, ind44- , fluor44- ja kaasu44- |

Mikäli tulos jäi varmistustestien jälkeen vielä epäselväksi, otettiin kanta talteen jatkotutkimuksia varten. Epäselviä tuloksia olivat taulukon kohtien 3 – 8 antamat tulosityhdistelmät, mikäli ko. testattava kanta oli alun perin ollut alustava *E. coli* eli fluoresoinut 9308-3:lla, ollut keltainen ja fluoresoinut Colilertilla tai ollut sinivioletti CC-ES:llä. Kantoja säilytettiin TSA-maljoilla noin 1 kk:n ajan kylmiössä ja pidempää säilytystä varten kanta pakastettiin – 70 °C:een lihaliemessä, johon oli lisätty 15 % glyserolia. Vaihtoehtoisesti ainoastaan DNA-määrittelyä varten kannat voitiin säilöä – 20 °C:een steriiliin deionisoituun veteen.

Laadunvarmistus

Osallistuvalla laboratoriolle tuli olla käytössään laatuvarmistusjärjestelmä. Vertailussa käytettävät mikrotiiterilevy-, Colilert- ja CC-ES -reagenssierät oli testattava ennen työn aloittamista tunnetulla näytteellä. Varmistustesteissä käytettävien elatusalustojen (CC, TSA, Fluorocult) sekä CC-ES -alustojen jokainen keittoerä tuli testata tunnetulla *Escherichia coli* -kannalla ja lisäksi tunnetulla ei-fekalisella koliformisella bakteerikannalla ennen käyttöä. Chromocult ja Fluorocult -alustojen testaamiseen voitiin käyttää esimerkiksi kantoja *Escherichia coli* ATCC 8739 (CC ja CC-ES: sinivioletti; Fluorocult: gas+, fluor+, ind+) ja *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 (CC ja CC-ES: punainen; Fluorocult: gas-, fluor-, ind-). Mikäli laboratoriolle ei ollut käytössään em. kantoja, myös muita ulkoisen arvioijan hyväksymiä ao. tarkoitukseen sopivia bakteerikantoja voitiin käyttää.

Laboratorioiden tuli dokumentoida edellä esitetyt elatusalustojen laadunvarmistustoimet jäljitettävästi.

2.5 Tulosten käsittely

Laboratoriot tallensivat tuottamansa raportointikelpoiset tulokset tulostiedostoon (LIITE 3) ja lähettivät nämä tiedostot sekä kopiot laboratoriossa täytetyistä laskenta- ja varmistustestikaavakkeista syyskuussa 2006 vertailukokeen koordinaattorille. Tulokset yhdistettiin ja tarkastettiin Kansanterveyslaitoksen ympäristömikrobiologian laboratoriossa ja lähetettiin edelleen Seppo I. Niemelälle, joka vastasi aineiston tilastollisesta käsittelystä ja standardin 17994:2004 mukaisten tunnuslukujen laskemisesta.

Tulosten laskenta

Menetelmien vertailussa tarvittavien testimuuttujien laskemiseksi MPN-menetelmissä (ISO ja Colilert) havainnoista laskettiin jokaisessa näytteessä erikseen varmistetut positiiviset kuopat/kaivot kaavalla

$$(1) \quad P_{pos} = F \frac{K}{N}$$

P_{pos} = alustavasti positiivisten varmistettu määrä

F = alustavasti positiivisten (fluoresoivien) kuoppien/kaivojen lukumäärä

N = onnistuneesti varmistukseen eristetty kuoppien/kaivojen lukumäärä

K = *E. coli* -bakteeriksi varmistuneiden kuoppien/kaivojen lukumäärä

Pääosassa näytteistä kaikki alustavasti positiiviset onnistuttiin testaamaan ($N=F$), jolloin $P_{pos}=K$.

Pesäkemenetelmässä (Chromocult ES) varmistetut pesäkemäärät laskettiin samalla periaatteella.

$$(2) \quad c_{pos} = z \frac{k}{n}$$

c_{pos} = alustavasti positiivisten varmistettu pesäkemäärä

z = alustavasti positiivisten pesäkkeiden (sinivioletit) lukumäärä

n = onnistuneesti varmistukseen eristetty pesäkemäärä

k = varmistunut pesäkemäärä

Virhenegatiivisten viljelmien arvioitu määrä saatiin korvaamalla kaavoissa 1 ja 2 alustavasti positiivisten lukumäärä alustavasti negatiivisten lukumäärällä.

$$(3) \quad P_{neg} = Y \frac{K}{N}$$

P_{neg} = alustavista negatiivisista varmistettu positiivisten määrä

Y = alustavasti negatiivisten ('vain keltaisten') kasvukenttien lukumäärä

N = onnistuneesti varmistukseen eristetty kasvukenttien lukumäärä

K = *E. coli*ksi varmistuneiden kasvukenttien lukumäärä

Vastaavasti pesäkemenetelmässä

$$(4) \quad c_{neg} = y \frac{k}{n}$$

c_{neg} = alustavasti negatiivisten joukosta varmistunut lukumäärä

y = alustavasti negatiivisten pesäkkeiden (punaiset) lukumäärä

n = onnistuneesti varmistukseen eristettyjen viljelmien lukumäärä

k = *E. coli*ksi varmistuneiden viljelmien lukumäärä

Menetelmissä, missä sekä alustavasti positiiviset että alustavasti negatiiviset tulokset varmistettiin (Colilert ja Chromocult ES), tuli mahdolliseksi laskea myös korjatut pitoisuusestimaatit. Niiden pohjana olivat korjatut perushavainnot, jotka olivat Colilert menetelmässä

$$(5) \quad P_{corr} = P_{pos} + P_{neg}$$

ja Chromocult ES menetelmässä vastaavasti

$$(6) \quad c_{corr} = c_{pos} + c_{neg}$$

Koeannosten yhteenlaskettu tilavuus luontaisen tai valmistetun näytteen tilavuutena ilmaistuna oli eri menetelmissä: ISO 9,6 ml, Colilert 10 ml, Chromocult ES 10 ml. Tulosten vertailukelpoisuuden saavuttamiseksi perusmuokatuista havainnoista laskettiin mikrobipitoisuuden estimaatit 100 millilitraa kohti.

MPN-menetelmissä se tarkoitti alustavan, varmistuneen tai korjatun tuloksen (F , P_{pos} tai P_{corr}) sijoittamista MPN-kaavoihin. Chromocult ES-menetelmässä tarvittiin ainoastaan alustavan, varmistetun tai korjatun pesäkemäärän kertominen kymmenellä.

Positiivisten muuntaminen mikrobipitoisuudeksi referenssimenetelmässä (ISO 9308-3)

$$(7) \quad R = 1000 \ln\left(\frac{96}{96 - P}\right)$$

R = referenssimenetelmän MPN estimaatti 100 ml kohti (kokonaisen tarkkuudella)
 P = positiivisten kasvukenttien (alustava, varmistettu tai korjattu) lukumäärä

Positiivisten muuntaminen mikrobipitoisuudeksi Colilert-18 menetelmässä

$$(8) \quad A = 510 \ln\left(\frac{51}{51 - P}\right)$$

A = Colilert-tulos 100 ml kohti (kokonaisen tarkkuudella)
 P = positiivisten kasvukenttien (F , P_{pos} tai P_{corr}) lukumäärä

Varmistettu tai korjattu Chromocult ES-tulos 100 ml kohti kokonaisen tarkkuudella laskettiin kaavasta

$$(9) \quad B = 10 c$$

c = *E. coli*ksi varmistuneiden pesäkkeiden lukumäärä (c_{pos} tai c_{corr})

Menetelmien ISO 17994 standardin mukaista vertailua varten muodostettiin testisuure: *suhteellinen erotus* (x), tavoitteesta riippuen joko alustavista, varmistetuista tai korjatuista tuloksista.

Colilert-18 verrattuna referenssimenetelmään

$$(10) \quad x_{AR} = 100 [\ln(A) - \ln(R)]$$

(R ja A kaavojen 7 ja 8 mukaan)

Chromocult ES verrattuna referenssimenetelmään

$$(11) \quad x_{BR} = 100 \ln(B) - \ln(R)]$$

(R ja B kaavojen 7 ja 9 mukaan)

Tilastollinen käsittely

Suhteellisten erotusten jatkokäsittelyssä oli kolme päävaihetta: aineiston normaalisuuden tutkiminen, laboratorioden välisten erojen tutkiminen ja menetelmien välisten erojen tutkiminen.

Suhteellisten erotusten normaalisuuden tutkimisessa käytettiin Wilk-Shapiro/Rankit Plot proseduuria ja frekvenssijakaumien silmämääräistä arviointia.

Laboratorioiden välisiä suhteellisten erotusten keskiarvojen eroja tutkittiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä.

Menetelmien vastaavuusvertailu perustui standardin ISO 17994:2004 ohjeeseen, jota tuettiin yhden otoksen t-testillä (one-sample t-test). Tulokset analysoitiin ensisijaisesti standardin ISO 17994:2004 ohjeita seuraten, mutta syy-yhteyksien, korrelaatioiden ja selitysten tutkimiseksi tarkasteltiin lisäksi joitakin standardimenettelyn ulkopuolisia taustatekijöitä.

Raportointi

Työryhmä raportoi vertailututkimuksen tulokset kansallisella tasolla laboratorioita yksilöimättä joulukuussa 2006. Jotta laboratoriot tunnistaisivat omat tuloksensa raportista ja voivat hyödyntää itse tuottamansa aineiston, kukin laboratorio sai tietoonsa sen numeron, jolla heidän tuloksensa on raportissa koodattu.

3. TULOKSET

3.1 Aineisto

Näytevalikoima eri laboratorioissa koostui vaihtelevasti luontaisista, laimennetuista tai jätevedellä ympätyistä sisämaan ja rannikkovesistä. Sisävesinäytteet voidaan tarvittaessa luokitella tarkemmin järvi-, joki- ym. näytteisiin. Koska laimentaminen ei muuta populaation rakennetta, laimennettujen näytteiden voitiin katsoa kuuluvan luontaisten näytteiden luokkaan. Laboratorioiden näyteprofiilit erosivat huomattavasti (Taulukko 2.).

Taulukko 2. Laboratorioiden tutkimat näytteet luokiteltuina kuuteen tyyppiin.

| Näytetyyppi | Lab 1 | Lab 2 | Lab 3 | Lab 4 | Lab 5 | Lab 6 | Yht. |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 1 Sisävesi , luontainen | 35 | 8 | 1 | 16 | 21 | 4 | 85 |
| 2 laimennettu | 14 | | 1 | | 7 | 3 | 25 |
| 3 ympätty | | 26 | 46 | | 8 | 35 | 115 |
| 4 Merivesi , luontainen | | 1 | | 25 | | | 26 |
| 5 laimennettu | | 9 | | 2 | | | 11 |
| 6 ympätty | | 5 | | | | | 5 |
| Yhteensä | 49 | 49 | 48 | 43 | 36 | 42 | 267 |
| % luontaisia näytteitä* | 100 | 37 | 4 | 100 | 78 | 17 | 55 |

*Luontaisten näytteiden ryhmään sisältyvät sekä laimentamattomat että laimennetut näytteet.

ISO 9308-3-menetelmän perushavainto *Escherichia coli*-bakteerin havaitsemiseksi oli fluoresoivien (MUG-positiivisten) kuoppien lukumäärä. Colilert-18 menetelmän perushavainto oli keltaisten, fluoresoivien (ONPG- ja MUG-positiivisten) kaivojen lukumäärä. Chromocult-menetelmän perushavainto oli siniviolettien (MUG-positiivisten) pesäkkeiden lukumäärä.

Jotta epäiltyä virhenegatiivisten esiintymistä voitiin tutkia, alustavien positiivisten (MUG+) lisäksi Colilert ja Chromocult ES menetelmissä laskettiin myös alustavat negatiiviset (MUG-ONPG+) kaivot ja pesäkkeet. Alustavan oletuksen mukaan ne sisältävät muita koliformisia bakteereita kuin *E.coli* -bakteeria. Niistäkin eristettiin viljelmiä varmistettavaksi. ISO-menetelmässä virhenegatiivisia ei etsitty, koska menetelmä ei sisällä muiden koliformisten bakteerien kuin *E.colin* havaitsemista.

ISO 17994 standardin periaatteet edellyttävät viljelymenetelmien vertailun perustuvan varmistettuihin lukumääriin. Kaikki alustavasti positiiviset kuopat, kaivot ja pesäkkeet pyrittiin varmistamaan, eli toteamaan sisälsivätkö ne sovitun kriteerin mukaisia *E. coli* -bakteerisoluja.

Eristykset onnistuivat lähes täydellisesti. ISO menetelmän havaituista 2543 positiivisesta (fluoresoivasta) putkesta testaamatta jäi vain 10 viljelmää. Colilert menetelmän 2203:sta fluoresoivasta viljelmästä jäi kasvamatta yksi. Lasketuista sinivioleteista Chromocult ES-pesäkkeistä (yht. 820) onnistuttiin testaamaan 817 kpl.

Escherichia coli -bakteerina pidettiin viljelmää, joka on ensinnäkin oksidaasi-negatiivinen ja sen lisäksi sekä indoli-positiivinen +44 °C:ssa (IND+) että β-glukuronidaasipositivinen +44 °C:ssa (MUG+). IND ja MUG tulosten lisäksi Fluorocult LSB putkista luettiin kaasunkehitys +44 °C:ssa (GAS).

Kolmen ryhmittelytestin (IND, MUG, GAS) perusteella viljelmät jaettiin kahdeksaan (2³) 'biotyypin' (Taulukko 1). Niistä (IND+MUG+)-tyypit kaasun muodostuksesta riippumatta katsottiin *E. coli* -bakteeriksi. Alustavasti positiivisten viljelmien tulokset on yksityiskohtaisesti esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Eri biotyypin (taulukko 1.) frekvenssit ISO ja Colilert menetelmien alustavasti positiivisissa (fluoresoivissa) kasvukannoissa laboratorioittain ryhmiteltyinä.

| Lab. | ISO 9308-3 biotyypit | | | | | | | | Colilert-18 biotyypit | | | | | | | | | |
|-------------|----------------------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|----------|-----------------------|-------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|---|----------|-------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | yht. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | yht. |
| 1 | 477 | 3 | 5 | 1 | | | | | 486 | 398 | | | 1 | | 10 | | 2 | 411 |
| 2 | 402 | 43 | 2 | | 9 | 4 | 2 | 2 | 464 | 372 | 19 | 2 | 1 | 9 | 1 | | 2 | 406 |
| 3 | 362 | 26 | 1 | | 5 | 3 | | 1 | 398 | 303 | 22 | 1 | 1 | 4 | 1 | | 2 | 334 |
| 4 | 549 | 2 | | | 3 | | 2 | 1 | 557 | 423 | 10 | | | 2 | | | | 435 |
| 5 | 154 | 4 | 8 | 1 | | | | | 167 | 152 | 4 | | 9 | | 1 | | | 166 |
| 6 | 407 | 3 | | | | | | | 410 | 396 | 1 | | | | | | | 397 |
| yht. | 2351 | 81 | 16 | 2 | 17 | 7 | 4 | 4 | 2482 | 2044 | 56 | 3 | 12 | 15 | 13 | | 6 | 2146 |

Virhenegatiivisten etsimiseksi alustavasti negatiivisia (Colilert menetelmässä 'vain keltaisia', Chromocult ES menetelmässä punaisia) eristettiin varmistettavaksi. Näytettä kohti pyrittiin testaamaan viisi satunnaisesti valittua viljelmää. Alustavia negatiivisia oli useimmissa näytteissä enemmän kuin viisi, joten varmistus oli enimmäkseen osittaista. Colilert-menetelmällä yhteensä lasketusta 5706:sta 'vain keltaisesta' (ONPG+MUG-) kaivosta testattiin 1257 kpl (22 %). Chromocult ES-menetelmässä testattujen osuus oli pienempi. Yhteensä lasketuista punaisista pesäkkeistä (4083 kpl) testattiin 345 kpl (8 %). Viljelmät luokiteltiin kahdeksaan biotyyppiin kuten alustavat positiivisetkin. Kootut tulokset on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Eri biotyypin frekvenssit Chromocult ES ja Colilert-18 menetelmien alustavasti negatiivisissa tuloksissa ryhmiteltyinä laboratorioittain.

| Lab | Chromocult Agar ES | | | | | | | | | Colilert-18 Quanti Tray | | | | | | | | | | |
|-------------|--------------------|----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|------------|-------------------------|-------------|-----------|----------|-----------|------------|----------|-----------|-----------|------------|------------|
| | N | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | yht. | N | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | yht. |
| 1 | | | | | | | | | | | 239 | 28 | 1 | 1 | 15 | 0 | 2 | 2 | 115 | 164 |
| 2 | 228 | 4 | 0 | 4 | 15 | 0 | 6 | 3 | 93 | 119 | 233 | 13 | 0 | 2 | 25 | 1 | 1 | 8 | 145 | 195 |
| 3 | | | | | | | | | | | 238 | 7 | 0 | 5 | 28 | 0 | 3 | 9 | 149 | 201 |
| 4 | | | | | | | | | | | 180 | 20 | 1 | 3 | 26 | 0 | 6 | 1 | 90 | 147 |
| 5 | | | | | | | | | | | 176 | 6 | 0 | 6 | 10 | 3 | 3 | 2 | 75 | 105 |
| 6 | 132 | 5 | 0 | 6 | 11 | 1 | 0 | 10 | 61 | 94 | 191 | 14 | 0 | 1 | 6 | 2 | 6 | 1 | 64 | 94 |
| Yht. | 360 | 9 | 0 | 10 | 26 | 1 | 6 | 13 | 154 | 213 | 1257 | 88 | 4 | 18 | 110 | 6 | 21 | 23 | 638 | 906 |

N= testattujen viljelmien lukumäärä

3.2 Menetelmien herkkyys

Tulosten varmistuvuutta eli menetelmän herkkyyttä (SFS-ENV ISO 13843) mitataan varmistuneiden osuudella testatuista alustavasti positiivisista viljelmistä. Kaikilla menetelmillä tulosten varmistuvuus oli korkea (Taulukko 5.).

Taulukko 5. Varmistettavaksi onnistuneesti eristettyjen, alustavasti positiivisten ja sovitun kriteerin mukaan *E.coli* -bakteeriksi varmistuneiden, kuoppien, kaivojen ja pesäkkeiden määrät eri menetelmillä.

| Menetelmä | Eristetty (kpl) | Varmistunut (kpl) | Herkkyys (%) |
|-------------------------|-----------------|-------------------|--------------|
| ISO 9308-3, 72h 44°C | 2533 | 2482 | 98,0 |
| Colilert, 18h 35°C | 2202 | 2149 | 97,6 |
| Chromocult ES, 24h 35°C | 817 | 798 | 97,7 |

Testatuilla menetelmillä *E. coli* -bakteerien varmistuvuus (herkkyys) oli niin korkea (n. 98%), että sen mukaan päivittäisessä rutiinityöskentelyssä ei tarvita varmistuksia vastaavissa näytetyypeissä. Menetelmien väliset pienet herkkyyserot selittyvät täysin itse varmistusmenettelyn epävarmuudella. Koska kaikkien menetelmien herkkyys oli suunnilleen sama, menetelmien suhde toisiinsa ei voi näyttää kovin erilaiselta perustuipa arvio varmistettuihin tai varmistamattomiin tuloksiin. Menetelmien vertailu olisi voitu perustaa pelkkiin alustaviin tuloksiin.

3.3 Virhenegatiivisten määrät ja varmistuvuus

Colilert-18 ja Chromocult ES menetelmien yhteydessä eristetyt alustavat negatiiviset viljelmät testattiin samojen varmistuskriteerien (IND, MUG, GAS) suhteen kuin alustavasti positiiviset. Varmistustyön määrä näkyy taulukossa 6 ja testattujen viljelmien yksityiskohtainen biotyypijako laboratorioittain on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 6. Virhenegatiivisten osuus. Varmistettavaksi onnistuneesti eristettyjen, alustavasti negatiivisten, mutta sovitun kriteerin mukaan *E.coliksi* varmistuneiden, kasvukemnojen ja pesäkkeiden määrät eri menetelmillä.

| Menetelmä | Alustavat negatiiviset (kpl) | Eristetty (kpl) | Varmistunut (kpl) | Virhenegatiivisten osuus (%) |
|-------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------|------------------------------|
| Colilert, 18h 35°C | 5706 | 1257 (22%) | 92 | 7,32 |
| Chromocult ES, 24h 35°C | 4083 | 345 (8,5%) | 9 | 2,61 |

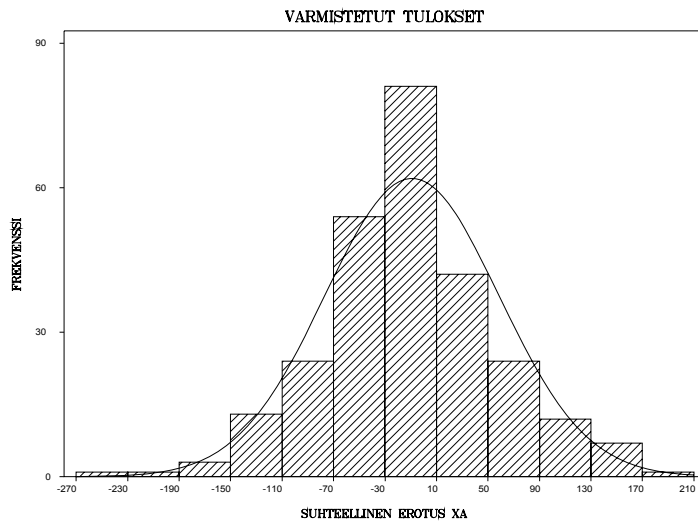
Virhenegatiivisten osuus oli epäilyksittä suurempi Colilert-18 menetelmässä kuin Chromocult ES menetelmässä. (Nelikenttätestissä ylitystodennäköisyys alle 1%.)

3.4 Colilert-18 – ISO 9308-3 vertailu

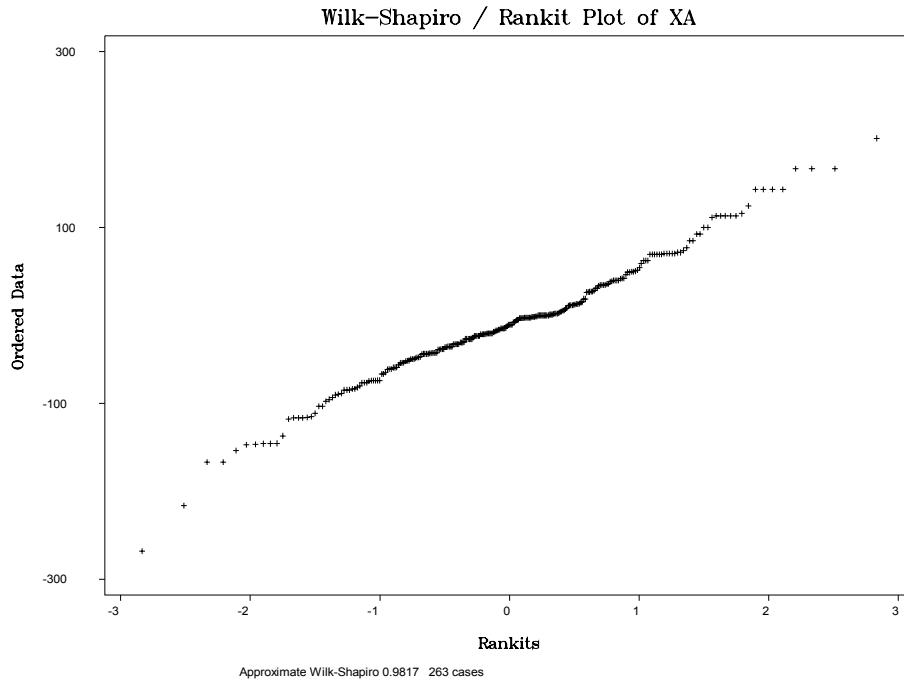
ISO 17994 standardin mukainen vertailu perustuu suhteelliseen erotukseen x_{AR} (kaava 10). Silloin kyseessä on suhteellisen erotuksen painottamaton keskiarvo. Se laskettiin varmistamattomista, varmistetuista ja korjatuista tuloksista.

Testimuuttujan normaalisuus oli kaikissa tapauksissa tyydyttävä, tärkeimpänä esimerkkinä varmistetut tulokset (kuvat 1 ja 2), joihin standardin ISO 17994:2004

mukainen standardianalyysi perustui. Alustaviin tuloksiin perustuvan jakauman normaalisuus oli hiukan parempi kuin varmistetuilla tuloksilla.



Kuva 1. Varmistetun suhteellisen erotuksen (Colilert vs. ISO 9308-3) arvojen jakauma verrattuna normaalijakaumaan (käyrä).



Kuva 2. Varmistettujen suhteellisen erotuksen (Colilert vs. ISO 9308-3) arvojen jakauman normaalisuus rankit-plot-käyrän ja Wilk-Shapiro kertoimen perusteella.

Standardin ISO 17994:2004 mukaiset analyysit yksittäisten laboratorioiden ja kaikkien laboratorioiden yhteisillä tuloksilla antoivat taulukon 7 osoittamat tulokset. Luotettavan yleiskuvan saamiseksi siitä, miten varmistukset ja korjaukset vaikuttivat ISO ja Colilert menetelmien suhteelliseen saantoon, vertailu oli rajoitettava näytteisiin, joilla kaikki kolme vertailua olivat mahdollisia. Sen vuoksi vertailussa oli neljä näytettä vähemmän kuin aineistossa oli kaikkiaan (vrt. Taulukko 2).

Taulukko 7. Colilert-18 ja ISO 9308-3 menetelmien *E. coli* tulosten suhteellisten erotusten kvantitatiivinen vertailu laboratorioittain ISO 17994:n mukaan.

| Laboratorio | N | Alustava | | Varmistettu | | Korjattu | | Kasvu |
|--------------------------|----|----------|-------|-------------|-------|----------|-------|-------|
| | | KA | SD | KA | SD | KA | SD | |
| 1 | 48 | -20,41* | 54,30 | -23,67* | 55,77 | 5,90 | 57,11 | 29,56 |
| 2 | 47 | -2,95 | 65,26 | -2,10 | 64,82 | 13,35 | 77,38 | 15,45 |
| 3 | 48 | -11,16 | 68,50 | -11,30 | 71,62 | 3,63 | 79,31 | 14,93 |
| 4 | 43 | -24,04* | 68,11 | -24,05* | 66,99 | -4,50 | 70,83 | 19,55 |
| 5 | 36 | 12,61 | 80,52 | 12,12 | 80,27 | 18,09 | 86,71 | 5,97 |
| 6 | 41 | -0,58 | 64,90 | -0,58 | 64,90 | 13,68 | 53,95 | 14,26 |
| Keskiarvojen ero, F-arvo | | 1,69 | | 1,84 | | 0,55 | | |
| todennäköisyys | | 0,137 | | 0,105 | | 0,737 | | |

N= näytteiden lukumäärä, KA= keskiarvo, SD= keskihajonta, Kasvu= keskiarvon muutos, kun varmistetut tulokset korjattiin virhenegatiivisten suhteen.

*Keskiarvo nolasta poikkeava alle 5 % erehtymisen riskillä.

Varianssianalyysin mukaan laboratorioiden keskiarvojen väliset erot eivät olleet laboratorioiden sisäiseen vaihteluun verrattuna merkitseviä Colilert ja ISO vertailun missään sarjassa (alustavat, varmistetut, korjatut). Sattuma riittäisi selittämään erot ja menetelmien yleistä vastaavuutta voidaan sen mukaan arvioida laboratorioiden yhteisten tulosten perusteella (Taulukko 8.).

Taulukko 8. Colilert-18 ja ISO 9308-3 menetelmien *E. coli* tulosten kvantitatiivinen vertailu standardin ISO 17994:2004 mukaan. Kuuden laboratorion yhteinen tulos.

| Aineisto | N | KA | SD | SE | U | LO | HI | vastaavuus* |
|-------------|-----|-------|------|------|------|--------|--------|-------------|
| alustava | 263 | -8,58 | 67,2 | 4,14 | 8,28 | -16,86 | -0,30 | kyllä |
| varmistettu | 263 | -9,12 | 67,8 | 4,18 | 8,36 | -17,48 | -0,76 | ei |
| korjattu | 263 | +7,99 | 71,2 | 4,39 | 8,78 | -0,79 | +16,77 | kyllä |

N= näytemäärä, KA= keskiarvo (painottamaton), SD= keskihajonta, SE= keskiarvon keskivirhe, U= laajennettu mittauserävarmuus, LO= alempi n. 95% luottamusraja, HI= ylempi n. 95% luottamusraja.

*Menetelmien vastaavuutta arvioitaessa tässä vertailussa käytettiin sallitun poikkeaman arvoa D = 20 % ja menetelmiä arvioitiin 2-suuntaisesti. 2-suuntaisessa tarkastelussa menetelmät ovat toisiaan vastaavia, jos kumpikaan menetelmistä ei anna merkittävästi korkeampia tai matalampia tuloksia kuin toinen. Pyöristyssääntöjen mukaisesti arvon -0,30 katsottiin olevan yhtä suuri kuin nolla ja arvojen -0,76 ja -0,79 pienempiä kuin nolla.

ISO 17994 analyysin mukaan Colilert menetelmän *E. coli* saanto oli kaikkien laboratorioiden yhteisissä tuloksissa keskimäärin noin 9 % matalampi kuin referenssimenetelmän. Alustavien *E. coli*-pitoisuuksien osalta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä, joten Colilertin ja ISO 9308-3:n tuloksia voidaan keskimäärin pitää vastaavina. Sen sijaan varmistettujen *E. coli* -pitoisuuksien osalta verratuilla

menetelmillä saadut tulokset poikkesivat toisistaan juuri ja juuri merkittävästi. Tulos oli sama t-testin mukaan (t.n.< 5%).

Kun Colilertin tulokset korjattiin siten, että virhenegatiivisetkin huomioitiin, tilanne kääntyi päinvastaiseksi. Colilertin keskimääräinen tulos oli suurempi (+8%) kuin referenssimenetelmän. Virhenegatiivisten korjaus aiheutti siis noin 17 prosenttiyksikön nousun suhteellisen erotuksen arvoon.

Koska laboratorioden väliset erot pienenevät virhenegatiivisten korjauksessa (Taulukko 7.), oli tilastotestin tuloksesta huolimatta kiinnostavaa tutkia löytyisikö edes viitteitä syy-yhteyksistä laboratorioden varsin huomattavien erojen ja taustatekijöiden välillä.

Jokainen virhenegatiivinen vähentää yhden oikean positiivisen. Virhenegatiiviset tulokset vaihtoehtoisessa menetelmässä (tässä tapauksessa Colilert-18) johtavat väistämättä siihen, että sen saanto näyttää alentuneelta vertailumenetelmään (ISO 9308-3) nähden. Sen seurauksena keskimääräinen suhteellisen erotuksen arvo tulee väistämättä negatiiviseksi.

Edellä (Taulukko 6.) kuvaillut suorat havainnot virhenegatiivisista Colilert tuloksissa ovat siis oletettavasti selityksenä Colilert ja ISO menetelmien suhteellisen erotuksen negatiivisille arvoille.

Mahdollisten syy-yhteyksien etsimiseksi taulukkoon 9 on koottu laboratoriokohtaisia eroja kuvaavia, lähinnä virhenegatiivisiin ja tulosten varmistukseen liittyviä lukuja.

Taulukko 9. Virhenegatiivisuuteen ja varmistukseen liittyvien muuttujien arvoja laboratorioden mukaan ryhmitetyssä aineistossa verrattuna havaittuun suhteelliseen erotukseen ja laboratorioden tutkimien näytteiden jakaumaan..

| Muuttuja | Lab 1 | Lab 2 | Lab 3 | Lab 4 | Lab 5 | Lab 6 |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Varmistuvuus (herkkyys) % | 96,5 | 96,3 | 97,4 | 99,1 | 94,3 | 100,0 |
| Virhenegatiivisuus % (a) | 11,9 | 5,8 | 2,9 | 12,8 | 3,4 | 7,3 |
| Piilopositiiviset % (b) | 21,8 | 13,5 | 9,2 | 15,6 | 11,6 | 7,2 |
| Keltaisia kaivoja levyä kohti | 29 | 35 | 30 | 36 | 25 | 22 |
| Keltaisia kaivoja yhtä fluoresoivaa kaivoa kohti | 2,34 | 3,08 | 3,21 | 2,48 | 4,14 | 1,30 |
| Suhteellinen erotus % (c) | -20,4 | -2,9 | -11,2 | -24,0 | 12,6 | -0,6 |
| Luontaisten näytteiden osuus % | 100 | 37 | 4 | 100 | 78 | 17 |

- (a) Keltaisista, fluoresoimattomiksi tulkituista kaivoista löytyneiden *E.coli* viljelmien prosenttiosuus testatuista keltaisista kaivoista (Colilert-18)
- (b) Vain keltaisten kaivojen (Colilert-18) estimoidut positiiviset (p_{neg}) prosentteina kaikista positiivisista ($p_{pos}+p_{neg}$)
- (c) Alustavien tulosten perusteella

Taulukon 9. luvuissa on viitteitä siitä, että sekä virhenegatiivisuuden että suhteellisen erotuksen arvot voisivat olla syy-yhteydessä laboratorioden tutkiman näytejakauman kanssa. Sen sijaan keltaisten kaivojen absoluuttisella määrällä tai niiden määrällä fluoresoivaa kaivoa kohti näyttäisi olevan melko vähän merkitystä esimerkiksi suhteellisen erotuksen arvon ennustajana.

Suhteellinen erotus näytti olevan yhteydessä näytetyyppiin selvemmin kuin mikään aineiston virhenegatiivisuuteen liittyvä mittaluku (Taulukko 10). Silti ryhmien välinen ero ei ollut täysin vakuuttavasti merkitsevä.

Taulukko 10. Näytetyypin vaikutus keskimääräiseen suhteellisen erotuksen arvoon. Kaikkien laboratorioiden yhteistulos. Laimennetut näytteet sisällytetty luontaisten ryhmään. Sisämaan ja rannikon vesinäytteet yhdistetty.

| | | Suhteellinen erotus | |
|---------------------------|-----|---------------------|-------------|
| Näytetyyppi | N | Alustava | Varmistettu |
| Luontainen | 147 | -13,8 | -15,7 |
| Ympätty | 118 | -2,1 | -1,0 |
| Varianssianalyysi: F-arvo | | 2,00 | 3,11 |
| todennäk. | | 0,15 | 0,08 |

3.5 Chromocult ES -menetelmän vertailu muihin menetelmiin

Chromocult ES -tuloksia tuotti vain kaksi laboratoriota (2 ja 6) yhteensä 91 näytteestä. Tuloksia verrattiin referenssimenetelmän tuloksiin, minkä lisäksi tehtiin yhtenäisyyden vuoksi myös Colilertin ja referenssimenetelmän vertailu samoissa näytteissä. Analyysin yhteenveto näkyy taulukossa 11.

Taulukko 11. Chromocult ES (CC-ES), Colilert-18 (CL18) ja ISO 9308-3 (ISO) menetelmien *E.coli* -tulosten kvantitatiivinen vertailu ISO 17994:n mukaan.

| Vertailu | N | KA | SD | SE | U | LO | HI | vastaavuus |
|------------------------------|----|-------|------|------|------|-------|------|------------|
| CC-ES vs. ISO, alustava | 91 | -15,8 | 85,4 | 8,96 | 17,9 | -33,7 | 2,1 | epävarma |
| CC-ES vs. ISO, varmistettu | 91 | -15,5 | 86,5 | 9,07 | 18,1 | -33,6 | 2,6 | epävarma |
| CC-ES korjattu vs. ISO varm. | 91 | -11,8 | 89,1 | 9,34 | 18,7 | -30,5 | 6,9 | epävarma |
| CL18 vs. ISO, alustava | 91 | -2,1 | 64,0 | 6,75 | 13,5 | -15,6 | 11,4 | kyllä |
| CL18 vs. ISO, varmistettu | 91 | -1,6 | 63,8 | 6,72 | 13,4 | -15,0 | 11,8 | kyllä |
| CL18 korj. vs. ISO varm. | 88 | +13,5 | 67,1 | 7,15 | 14,3 | -0,8 | 27,8 | epävarma |

Sarakkeiden otsikot ja vastaavuuden arviointi kuten taulukossa 8. Varmistettu= molempien menetelmien tulokset varmistettu. Korjattu= CC-ES ja CL18 tuloksissa väärin negatiivisten korjaus, ISO menetelmän tulos vain varmistettu.

Niiden kahden laboratorion tuloksissa, johon Chromocult ES vertailu voidaan perustaa, Colilert ja ISO 9308-3 antoivat lähes ekvivalentit tulokset (saaliin ero vain n. -2 %). Tulos poikkeaa hieman siitä noin -9 % erotuksesta, joka saatiin kaikkien kuuden laboratorion tulosten perusteella (Taulukko 8).

Chromocult ES näytti antavan selvästi pienemmän (n. -16 %) sekä alustavan että varmistetun saaliin kuin referenssimenetelmä. Päätelmä on kuitenkin kaikissa tapauksissa ISO 17994:n riittävyyskriteerin mukaan hieman epävarma pienen havaintomäärän takia.

4. JATKOTUTKIMUS

Vuoden 2006 lopussa vertailukokeet tulosten arvioinnin jälkeen päätettiin toteuttaa jatkotutkimus Colilert -menetelmän inkubointilämpötilan noston vaikutuksesta virhenegatiivisten esiintymiseen. Vertailututkimuksen tuloksena todettiin + 36 °C:ssa inkuboidussa Colilert -menetelmässä esiintyvien virhenegatiivisten vaikuttavan menetelmän saantoon siten, että Colilert antaa noin 9 % alhaisempia *E. coli* -pitoisuuksia verrattuna + 44 °C:ssä inkuboituun referenssimenetelmään ISO 9308-3.

Työn tarkoituksena oli testata, voisiko Colilertin inkubointi samassa lämpötilassa kuin referenssimenetelmä (+ 44 °C) poistaa todetut virhenegatiiviset vaikuttamatta negatiivisesti Colilert -menetelmän saantoon.

Jatkotutkimuksessa verrattiin valmistajan ohjeiden mukaisesti inkuboitua Colilert Quantitray (IDEXX) MPN liuosmenetelmää (+ 36 ± 2 °C, 18 h) vastaavasti tehtyyn Colilertiin, jota inkuboitiin korkeammassa lämpötilassa (+ 44 ± 0,5 °C, 18 h). Valmistajan ohjeen mukaan inkuboitu Colilert -menetelmä (Colilert36) sisältää fluoresenssin reaktioon perustuvan *E. coli* -detektion lisäksi kromogeeniseen reaktioon perustuvan koliformisten bakteerien havaitsemisen. Korkeammassa lämpötilassa inkuboidulla Colilertillä (Colilert44) ei saa määritetyksi koliformisia bakteereita, mutta lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrittäminen on mahdollista.

Tässä jatkotutkimuksessa varmistukset keskitettiin ainoastaan alustaviin negatiivisiin kaivoihin (muut koliformiset bakteerit: keltaiset kaivot, jotka eivät fluoresoi). Kaikki tällaiset kaivot, sekä Colilert36- että Colilert44 -menetelmillä, varmistettiin jatkoviljelmillä Chromocult Coliform Agar (CC) -alustalle. Niistä alustavasti negatiivisista kaivoista, joista todetaan *E. coli* CC -alustalla (sinivioletit pesäkkeet), kerättiin varmistustesteihin ja jatkotunnistusta varten yksi kutakin havaittua pesäkemorfologiatyyppiä (a, b, c, ...) / kaivo viljelemällä ne edelleen TSA-alustoille. Varmistustesteinä käytetään kaikille morfologiatyypeille (violetit/punaiset/muut värit) oksidaasitestiä ja oksidaasinegatiivisille violeteille tai punaisille pesäkkeille tehdään Fluorocult LSB-testi + 44 °C:ssa. Varmistetut kannat (kaikki pesäkemorfologia tyytit) lähetettiin TSA-maljoilla KTL:n ympäristömikrobiologian laboratorioon myöhempiä tunnistustestejä varten.

Työ suoritettiin soveltuvien osien menetelmien vastaavuuden testaamiseksi standardissa ISO 17994:2004 annettujen kriteereiden mukaisesti. Referenssimenetelmänä, johon vaihtoehtoisia menetelmiä verrattiin, käytettiin valmistajan ohjeen mukaan inkuboiden saatuja tuloksia.

Työ toteutettiin yhteistyössä niiden varsinaiseen vertailuun kesällä 2006 osallistuneiden vesimikrobiologian laboratorioden kanssa, jotka ovat halukkaita ja jotka pystyvät jatkamaan työtä tässä jatkotutkimuksessa. Mukana vertailussa oli kolme laboratoriota, jotka analysoivat rinnakkain näillä kahdella menetelmällä esikokeena noin 30 näytettä, joista saatujen tulosten valossa päätettiin, jatketaanko koetta suuremmalla näytemäärällä.

Näytteinä käytettiin kunkin laboratorion itsensä hankkimia uimavesinäytteitä tammi-maaliskuussa 2007. Näyteenotto keskitettiin sellaisiin näytteisiin, joissa

virhenegatiivisten esiintyminen oli todennäköistä. Kesän 2006 vertailututkimuksen perusteella virhenegatiivisia esiintyi enemmän luontaisesti likaantuneissa kuin ympätyissä näytteissä. Tutkittavana tilavuutena käytettiin 10 ml tai 100 ml näytevettä. Muilta osin työ suoritettiin vastaavalla tavalla kuin mitä varsinaisessa vertailututkimuksessa. Jatkotutkimuksessa tutkitut näytteet on esitetty taulukossa 12.

Taulukko 12. Laboratorioiden jatkotutkimuksessa tutkimat näytteet.

| Näytetyyppi | Lab 1 | Lab 2 | Lab 3 | Yht. |
|----------------------|----------|----------|----------|-----------|
| Sisävesi, luontainen | 9 | 3 | | 12 |
| Merivesi, luontainen | | | 8 | 8 |
| Yhteensä | 9 | 3 | 8 | 20 |

Colilert-18 inkubointilämpötilan nosto keskimäärin alensi *E. coli* -saantoa jatkotutkimuksessa tutkituilla näytteillä, eikä koetta tämän vuoksi jatkettu pidemmälle. Aineiston pienuuden vuoksi tulos jäi kuitenkin epävarmaksi (Taulukko 13.).

Taulukko 13. Colilert36 ja Colilert44 menetelmien alustavien *E. coli* -tulosten kvantitatiivinen vertailu standardin ISO 17994:2004 mukaan.

| Vertailu | N | KA | SD | SE | U | LO | HI | vastaavuus |
|------------------|----|-------|-------|------|------|-------|------|------------|
| Sisävesinäytteet | 12 | -14,2 | 108,8 | 31,2 | 62,8 | -77,0 | 48,6 | epävarma |
| Merivesinäytteet | 8 | -30,5 | 42,8 | 15,1 | 51,4 | -81,9 | 20,9 | epävarma |
| Koko aineisto | 20 | -20,7 | 87,2 | 19,5 | 39,0 | -59,7 | 18,3 | epävarma |

Sarakkeiden otsikot ja vastaavuuden arviointi kuten taulukossa 8.

5. TULOSTEN TARKASTELU

Vaihtoehtoisena menetelmänä tässä tutkimuksessa testattu Colilert -menetelmä antoi keskimäärin 9 % alhaisemman *E. coli* -saaliin kuin referenssimenetelmä. Suoraksi syyksi tälle osoittautuivat virhenegatiiviset havainnot. Colilert menetelmän saanto oli virhenegatiivisten vaikutuksen korjaamisen jälkeen vähintään referenssimenetelmän tasolla. Kumpikin MPN menetelmä (Colilert-18 ja ISO 9308-3) antoi keskimäärin korkeampia *E. coli* -saaliita kuin Chromocult ES -menetelmä. Tämä tulos jäi kuitenkin tilastollisesti hiukan epävarmaksi vähäisen aineiston vuoksi.

Colilert -menetelmällä todetut virhenegatiiviset tulokset voivat johtua fluoresenssin heikosta kehittymisestä Colilert kaivoissa, joissa kasvaa *E. coli* lisäksi joitakin muita mahdollisesti nopeakasvuisempia koliformisia bakteereita. Jos heikkokin fluoresenssi tulkitaan alustavasti positiiviseksi, virhenegatiivisten määrä alenee väistämättömästi. Vastaavasti, jos vain selvä fluoresenssi katsotaan positiiviseksi, saanto alenee osan positiivisista jäädessä piiloon mahdollisesti heikosti fluoresoiviin kaivoihin.

Kaksi ilmeisintä syytä laboratorioiden tulosten välisiin eroihin menetelmien vertailussa voisivat olla niiden tutkimien näytteiden erilaisuus ja tietyt tekniset syyt, joko erot työtavoissa tai ennen kaikkea alustavien positiivisten tulosten tulkinnoissa. Molemmista on viitteitä tässä tutkimuksessa. Esimerkiksi laboratorio 4:n korkea varmistuvuuden arvo (99,1 %) viittaa siihen, että siellä olisi alustaviksi positiivisiksi luettu lähinnä 'varmat tapaukset'. Heikot fluoresenssit on oletettavasti tulkittu negatiivisiksi, minkä johdosta varmistuksessa löytyi paljon 'piilossa' olevia positiivisia eli virhenegatiivisia (virhenegatiivisuus 12,8 %). Sen seurauksena menetelmien suhteellinen erotus tuli vahvasti negatiiviseksi. Sama selitys varmaan sopii osittain myös laboratorioon 1. Laboratoriossa 5 puolestaan on kaikesta päättäen alustavasti positiivisiksi luettu kenties heikomminkin fluoresoivia kaivoja, minkä takia varmistuvuus jäi 94,3 %:iin mutta virhenegatiivisuus oli vastaavasti alhainen (3,4 %). Laboratoriossa 1 ja 4 virhenegatiivisten tulosten korjaus nosti keskiarvoa huomattavasti, kun taas laboratoriossa 5 vaikutus oli vähäinen.

Käytössä olleista tulosnumeroista ei kuitenkaan voi lukea täysin varmasti lukea, ovatko laboratoriot todella tulkinneet alustavat positiiviset eri tavalla. Colilert menetelmän työohjeen mukana tulevan värikartan mukaan tietyn asteinen aivan heikko fluoresenssi olisi luettava negatiiviseksi tulokseksi. Kokemus kuitenkin on osoittanut (Corrie Allaert, suullinen tieto 2006), että vähäisenkin fluoresenssi kannattaa tulkita positiiviseksi, koska se useimmiten osoittautuu varmistuksissa positiiviseksi. Fluoresenssitulosten tulkinnan lisäksi on mahdollista, että Colilert-liuskojen inkubointiajat ovat vaihdelleet eri tavoin tavoitteena olleesta 18 tunnista eri laboratorioissa, mikä on osaltaan voinut vaikuttaa saatuihin tuloksiin. Se, että alentuneen saannon ja Colilert menetelmän virhenegatiivisten välillä oli vain heikko yhteys, johtunee suureksi osaksi osittaisesta varmistamisesta. Kun vain noin viidesosa (22 %) alustavasti negatiivisista viljelmistä testattiin, niin virhenegatiivisten tulosten korjaus ja kvantitatiivinen arvio jäävät pakosta epävarmoiksi.

Ei ole mahdotonta, että myös ISO menetelmän yhteydessä esiintyisi vääriä negatiivisia. Siitä ei tässä tutkimuksessa edes yritetty ottaa selvää. Tosin korkean inkubointilämpötilan ja pidemmän inkubaatioajan vuoksi ei ole kovin luultavaa, että virhenegatiivisia olisi ainakaan yhtä paljon kuin Colilert menetelmässä. On aivan

mahdollista, että Colilert menetelmän levyillä todella kasvaa hieman enemmän *E. coli* -bakteeria (vrt. korjatut tulokset), mutta *E. coli* -bakteerin kasvua häiritseviä muiden koliformisten bakteereiden vuoksi varmistamaton saanto jää hieman referenssimenetelmää alhaisemmaksi.

Varsinkin silloin, kun tilastollisen testin tulos on merkitsevän rajoilla, kuten edellä, on hyvä tarkastella miten suuressa määrin johtopäätökset voisivat riippua satunnaisista seikoista. Kuinka paljon päätelmät muuttuisivat, jos esimerkiksi osallistuvat laboratoriot tai tutkitut näytteet olisivat olleet muuta kuin olivat? Jos laboratorio 1 ei olisi sattunut olemaan mukana tässä vertailussa, vertailu olisi tehty viiden laboratorion tuloksilla. Silloin Colilert ja ISO menetelmien suhteellinen erotus olisi varmistamattomilla tuloksilla ollut -6,0 (vrt. -8,58) ja varmistetuilla tuloksilla -5,9 (vrt. -9,12). Tällöin keskimääräinen ero menetelmien välillä olisi ollut pienempi, mutta toisaalta ISO 17994:n mukaan menetelmiä ei olisi myöskään voitu julistaa ekvivalenteiksi liian vähäisen näytemäärän takia. Tämä suurehko vaikutus johtuu siitä, että laboratorio 1 sattui olemaan yksi niistä, joiden käsissä menetelmät vaikuttivat aika erilaisilta. Toisaalta päätelmät olisivat muuttuneet vieläkin enemmän, jos laboratorion 1 tilalla olisi ollut esimerkiksi jokin laboratoriota 5 muistuttava, korkeita vertailuarvoja tuottanut toinen laboratorio.

Analyysituloksen herkkyyttä satunnaisille tapahtumille kuvaa myös seuraava esimerkki. Jos aineiston ensimmäinen näyte, yksi ainoa havainto, olisi syystä tai toisesta puuttunut, varmistamattomien tulosten suhteellinen erotus (keskiarvo) olisi ollut -7,83 (näytteen 1 kanssa keskiarvo oli -8,58).

Jätevedellä ympätyissä näytteissä menetelmien keskimääräinen saanto oli lähes sama; suhteellinen erotus oli lähellä nollaa. Luontaisissa näytteissä Colilert -menetelmän saanto oli selvästi alempi kuin referenssimenetelmän. Luontaisten näytteiden osuus laboratorioden tutkimissa näytteissä näytti selittävän huomattavan osan laboratorioden välisistä eroista, mutta ei kaikkea.

Ei ole kansainvälisesti eikä kansallisesti sovittua rajaa suurimmalle poikkeamalle, joka kahden menetelmän keskisaantojen välillä voidaan sallia uimavesiä tutkittaessa. Talousvesimenetelmillä sovelletaan varsin tiukkaa enimmäispoikkeamaa ($D = 10\%$). Lisäksi aikaisemmissa talousvesimenetelmien vertailututkimuksissa on saatettu käyttää vastaavuuden arvioinnissa 1-suuntaista tarkastelua. Tällöin vaihtoehtoinen menetelmä voidaan hyväksyä, kun sen keskimääräinen saanto on vastaava tai suurempi kuin referenssimenetelmän. Tässä vertailussa käytettiin menetelmien vastaavuutta arvioitaessa sallitun poikkeaman arvoa $D = 20\%$ ja menetelmiä arvioitiin 2-suuntaisesti. 2-suuntaisessa tarkastelussa menetelmät ovat toisiaan vastaavia, jos kumpikaan menetelmistä ei anna merkittävästi korkeampia tai matalampia tuloksia kuin toinen.

5. JOHTOPÄÄTÖKSET

Vertailun lähtökohtana oli uusi uimavesidirektiivi, jonka *E. coli* –menetelmille tässä vertailussa haettiin vaihtoehtoja. Direktiivissä annetuista *E. coli* –menetelmistä ISO 9308-3:n käytöstä ei ollut ennen tätä vertailua juuri kokemuksia Suomen laboratorioissa. Tässä vertailussa vaihtoehtomenetelmiä ei verrattu suhteessa menetelmään ISO 9308-1, joka on uimavesidirektiivin sallima toinen referenssimenetelmä. Esikokeessa saadut tulokset ja aiemmat kokemukset menetelmästä osoittivat, että ISO 9308-1 menetelmän standarditesti (LTTC-kasvualustaa käyttäen) on täysin sopimaton uimavesille.

Vertailusta koitui osallistuville laboratorioille huomattava työmäärä, sillä kaikki alustavasti positiiviset kuopat ja kaivot viljeltiin puhtaaksi kaksivaiheisesti ja kannoille tehtiin oksidaasitesti ja Fluorocult -varmistus. Lisäksi testattiin alustavasti negatiivisia kuoppia, kaivoja ja pesäkkeitä.

Tulokset laskettiin standardin ISO 17994:2004 mukaisesti. Testattujen menetelmien herkkyys (varmistuvuus) oli todella hyvä, käytännössä 100 %. Aineisto oli normaalisti jakautunut, painotettu ja painottamaton kesiarvo olivat lähes samat. Suhteellisissa erotuksissa oli todettavissa suuret erot laboratorioiden välillä ja myös laboratorioiden sisäinen vaihtelu on suuri. Korjatuissa tuloksissa todettiin isompi hajonta, koska niille tehtiin osittainen varmistus.

Erot laboratorioiden välillä johtuvat todennäköisesti siitä, että näyteprofiilit olivat eri laboratorioissa erilaisia. Aineistoa tarkastellessa erojen todettiin johtuvan luontaisten näytteiden osuudesta. Kesä 2006 poikkeuksellinen, koska koko kesänä ei satanut ja huuhtoumavesien uimavesien mikrobiologista laatua heikentävä oli pienempi kuin tavallisesti. Tästä syystä tässä vertailussa jouduttiin käyttämään suunniteltua enemmän jätevedellä terästettyjä näytteitä. Koko aineistossa oli terästettyjä ja luontaisia näytteitä suunnilleen yhtä paljon. Laboratorioiden väliset erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, eikä syitä eroihin ISO 17994:n mukaan tarvitsisi tällöin etsiä.

Tässä tutkimuksessa todettiin, että noin 7 % alustavasti negatiivisista, keltaisista Colilert -menetelmän kaivoista sisälsi *E. coli* -bakteeria. Tietyt näytetyypit (luontaiset näytteet, kuten pintavesiseokset) lisäsivät virhenegatiivisten esiintymistiheyttä. Havaittujen erojen menetelmien välillä voidaan olettaa johtuvan erilaisista inkubointilämpötiloista (36 °C vs. 44 °C). Korkeammassa lämpötilassa inkuboitavassa referenssimenetelmässä ei ole muiden koliformisten bakteerien häirintää siinä määrin, kuin alhaisemmassa lämpötilassa inkuboitavassa Colilert -menetelmässä. Jatkotutkimuksessa testattiin Colilertin inkubointia +44 °C:ssa, mutta lämpötilan nosto näytti vaikuttavan *E. coli* –saantoihin siinä määrin niitä vähentäen, että 20 näytteen analysoimisen jälkeen jatkotutkimus keskeytettiin.

Uimavesien menetelmävertailun tuloksia tarkastellessa ei tarvitse olla samat tiukkuusvaatimukset kuin talousvesivertailuissa. Tässä vertailussa päätettiin, että uimavesille sallitaan suurempi vaihtelu (D = 20 %), koska raja-arvokin on reilusti nollassa suurempi.

Colilertin hyväksymistä puoltaa sen nopeus verrattuna referenssimenetelmään. Uimavesien monitoroinnissa tulisikin painottaa riskinarviointia, erityistilanteita ja lyhytaikaisten saastehuippujen aiheuttamia toimenpiteitä. Laboratorioiden kannalta Colilertin hyväksyminen on hyvä asia, koska Colilert on yleisesti laboratorioissa käytössä, jolloin ei tarvitse ottaa täysin uutta menetelmää käyttöön. Colilert analyysi on myös helpompi suorittaa kuin referenssimenetelmä ISO 9308-3.

ISO 9308-3 ei pysty antamaan numeerista tulosta pitoisuustasoilla alle 10 / 100 ml. Suomen puhtaissa vesissä on hyödyllistä, että Colilert -menetelmä antaa tuloksen myös pitoisuustasoilla 1-9 / 100 ml.

Tämän vertailun perusteella Colilert -menetelmän antaa yli 90 %:sti referenssimenetelmää ISO 9308-3 vastaavia tuloksia. Todettu alle 10 %:n ero menetelmien saannoissa ei ole merkitsevä ja Colilert voidaan hyväksyä Suomessa uimavesille käytettäväksi *E. coli* -menetelmäksi direktiivissä mainittujen menetelmien lisäksi.

Kirjallisuus

- Airaksinen, P. (2006) Uimavesille soveltuvien *Escherichia coli* -määrittymenetelmien vertailututkimus –Esikoe. Luk-tutkielma, Kuopion yliopisto.
- Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2006/7/EY, annettu 15 päivänä helmikuuta 2006, uimaveden laadun hallinnasta ja direktiivin 76/160/ETY kumoamisesta. Euroopan unionin virallinen lehti, L 64, 37-51.
- SFS-EN ISO 9308-3, 1999. Veden laatu - *Escherichia colin* ja koliformibakteerien havaitseminen ja laskeminen - Osa 3: Pienen mittakaavan MPN (todennäköisin lukumäärä) liuosmenetelmä *Escherichia colin* havaitsemiseen ja laskemiseen pinta- ja jätevesistä. Suomen standardoimisliitto SFS.
- SFS-EN ISO 17994, 2004. Veden laatu – Kriteerit mikrobiologisten menetelmien vastaavuuden osoittamiseksi. Suomen standardoimisliitto SFS.
- SFS-ENV ISO 13843:2001. Veden laatu. Opas mikrobiologisten menetelmien validoinnista.