



samk



Satakunnan ammattikorkeakoulu
Satakunta University of Applied Sciences

ELLE-MARIA PELTOMÄKI

Legiolert ja Colilert: ohjeet ja verifiointi Satakunnan ammattikorkeakoululle

ENERGIA- JA YMPÄRISTÖTEKNIIKAN TUTKINTO-
OHJELMA
2023

TIIVISTELMÄ

Peltomäki, Elle-Maria: Legiolert ja Colilert: ohjeet ja verifiointi Satakunnan ammattikorkeakoululle
Opinnäytetyö, AMK
Energia- ja ympäristötekniikka
Kesäkuu 2023
Sivumäärä: 26 + 3 liitettä

Opinnäytetyössä suoritettiin verifiointi kahdelle IDEXXin testille; Legiolertille ja Colilertille. Työssä haluttiin selvittää, miten nämä menetelmät soveltuvat Satakunnan ammattikorkeakoulun laboratoriokäyttöön.

Verifiointia varten kerättiin erilaisia vesinäytteitä niin koulukiinteistöistä kuin myös luonnonvesistä kuten joet, ojat ja kaivot. Näiden lisäksi tehtiin muita laboratoriotöitä, kuten esimerkiksi laimennossarjoja, näistä Legiolert ja Colilert -testit sekä maljakasvatukset.

Opinnäytetyössä on verifiointiin lisäksi myös ohjeet Legiolert ja Colilert -testien käyttöön sekä käyttöohjeet Quanti-Tray Sealer Plus -sulkijalaitteelle.

Avainsanat: *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, koliformiset bakteerit, verifiointi

Abstract

Peltomäki, Elle-Maria: Legiolert and Colilert: instructions and verification to Satakunta University of Applied Sciences

Bachelor's thesis

Energy and environmental engineering

June 2023

Number of pages: 26 + 3 appendices

In this thesis, verification was performed for two IDEXX tests; Legiolert and Colilert. The aim of the work was to determine how well these methods are suited for laboratory use at Satakunta University of Applied Sciences.

For the verification, various water samples were collected from school properties as well as from natural sources such as rivers, trenches, and wells. Additionally, other laboratory work was carried out, such as dilution series. From the dilution series, Legiolert and Colilert tests were performed, as well as plate cultivation.

In addition to the verification, the thesis also contains instructions for using the Legiolert and Colilert tests, as well as instructions for using the Quanti-Tray Sealer Plus sealing device.

Keywords: *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, coliform bacteria, verification

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	5
2 LEGIOLERT JA COLILERT	5
2.1 Mitä nämä ovat, mitä niillä tutkitaan ja miten?	5
2.1.1 Legiolert.....	6
2.1.2 Colilert	7
2.2 MPN ja PMY	9
2.3 L. pneumophila, koliformiset bakteerit ja E. coli.....	10
2.3.1 L. pneumophila	10
2.3.2 Koliformiset bakteerit ja E. coli.....	11
3 VERIFIOINTI.....	11
3.1 Verifiointisuunnitelma	13
3.1.1 Tavoite.....	13
3.1.2 Verifiointiprosessin sisältö	13
3.1.3 Vastuu	13
3.1.4 Epävarmuustekijöiden huomioiminen	14
3.1.5 Verifiointiraportti.....	14
3.1.6 Verifioinnin hyväksyminen	14
3.1.7 Käyttöönotto	15
3.2 Näytteenotot ja niiden tulokset	15
3.3 Muut laboratoriotyöt.....	15
4 VERIFIOINTIRAPORTTI.....	15
4.1 Colilert	16
4.2 Legiolert.....	22
4.3 Epävarmuustekijät ja muita huomioita.....	28
4.4 Verifioinnin hyväksyminen	29
5 KÄYTTÖOHJEET	29
5.1 Quanti-Tray Sealer Plus	29
5.2 Legiolert.....	30
5.3 Colilert	30
6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	30
LÄHTEET.....	32
LIITE 1 QUANTI-TRAY SEALER PLUS -KÄYTTÖOHJE.....	35
LIITE 2 LEGIOLERT -OHJE	38
LIITE 3 COLILERT -OHJE	44

1 JOHDANTO

Tässä opinnäytetyössä käyn läpi IDEXXin Legiolert ja Colilert -testien verifiointia Satakunnan ammattikorkeakoulun käyttöön ja luon sekä näille että testien tekemiseen tarvittavalle IDEXX Quanti-Tray Sealer Plus -sulkijalaitteelle käyttöohjeet.

Työssä käyn läpi yleisellä tasolla Legiolert ja Colilert -testauksia, sekä niiden avulla etsittäviä bakteereja. Lisäksi esittelen ja kirjaan työssä erikseen testausprosessit sekä Legiolertille että Colilertille. Molempiin kerättiin vesinäytteitä erilaisista kohteista ja käsittelin niitä sekä tein laimennossarjat muine testauksiin. Näistä kokosin verifiointiraportin, joka sisältää kootun tiedon ja päätelmät verifiointin sisällöstä.

Lopuksi pohdin yleisellä tasolla opinnäytetyöhön liittyviä aihepiirejä.

2 LEGIOLERT JA COLILERT

Tässä kappaleessa käsittelen tarkemmin sitä, mitä opinnäytetyössä tehdyt testit ovat, mitä niillä tutkitaan ja miten. Samoin avaan myös sitä, minkälaisia etsityt bakteerit tämän työn tiimoilta ovat.

2.1 Mitä nämä ovat, mitä niillä tutkitaan ja miten?

Legiolert ja Colilert ovat molemmat IDEXXin valmistamia testejä, joilla etsitään bakteereja vesinäytteistä ja voidaan laskea niiden pitoisuuksia. IDEXX on kansainvälisesti toimiva yritys, joka tarjoaa muun muassa näitä testausmenetelmiä bakteerien tutkimiseen vesinäytteistä. (IDEXX, n.d.)

2.1.1 Legiolert

Legiolert on testauspaketti, jonka avulla vesinäytteistä voidaan tutkia *L. pneumophila* -bakteeria. Legiolert on Afnorin validoima menetelmä (Afnor, 2019, s. 1). Sen on todettu olevan vähintään yhtä luotettava kuin perinteiset virallisiin standardeihin perustuvat tutkimusmenetelmät (Afnor, 2019, s. 10). Koska Legiolert -testaus tunnistaa näytteistä vain *L. pneumophila* -bakteerin, se ei ole suoraan soveltuva kaikkiin tutkimuksiin. Virallinen standardimenetelmä ei tunnista kaikkia, mutta kuitenkin isomman määrän eri legionellalajeja. (ISO 11731:2017, 2017, s. 6) Tämän vuoksi Legiolert soveltuu esimerkiksi kartoitustuotoiseeseen tutkimukseen kohteissa. Kun kohteesta löydetään legionellaa, on Legiolert hyvä keino jatkotutkimusten tekemiseen.

Legionellan kohdalla käytetään edelleen virallisesti ISO-standardin 11731:2017 mukaisia menetelmiä. Menetelmät pitävät sisällään muun muassa vesinäytteiden suodattamista ja suodatusten käsittelyä. Maljakasvatuksia tehdään usein BCYE-kasvualustalla ja riippuen oletetusta legionellamäärästä käsittelytavat vaihtelevat. Myös mahdolliset muut bakteerit vesinäytteessä vaikuttavat siihen, miten standardin mukaan näytteitä tulee käsitellä. (ISO 11731:2017, 2017, s. 9–11)

Legiolert -testauksen tulokset saadaan 7 päivän inkuboinnin jälkeen, ja bakteerimäärät on helppo laskea joko taulukkotiedon tai IDEXXin tarjoaman tietokonesovelluksen avulla. (IDEXX Legiolert, 2023)

Legiolertin käyttö itsessään ei vaadi paljon. Näytevettä kaadetaan 100 millilitraa näyteastiaan, jonne lisätään vaahtoutumisenestoainetta, Legiolert -supplementtia ja jauhemainen kasvualusta, jonka jälkeen näyteastiaa sekoitellaan hyvin. Kasvualustan liuettua kaadetaan näytevesi IDEXXin Legiolert -liuskan sisään. Legiolert -liuska on 6 isompaa ja 90 pienempää näytekuoppaa, joihin vesi asettuu. Liuska asetellaan sille soveltuvalle muoviselle alustalle ja ajetaan se sulkijalaitteen läpi, jotta liuska sulkeutuu tiiviisti eikä vesi pääse pois sen sisältä. Tämän jälkeen liuskaa pidetään 7 vuorokautta 39°C (± 0,5°C) lämpökaapissa.

Jos näytevedessä on ollut *L. pneumophila* -bakteeria, se näkyy veden ruskeaksi värjäytymisenä ja sameutumisenä liuskassa olevissa näytekuopissa. Tulkitseminen voi joissakin tapauksissa olla haasteellista, mutta pääosin ruskea

väri erottuu hyvin ja positiiviset näytekupat on helppo tunnistaa. Värjäytyneiden näytekuppien määrä kertoo sen, paljonko legionellabakteeria näytteessä on. Mikäli legionellaa ei löydy näytteestä, veden väri pysyy vaaleana ja kirkkaana.



Kuva 1. Esimerkkikuva Legiolertista. Kaksi ensimmäistä liuskaa ovat negatiivisia, viimeisessä positiivisia näytekuppia on useampia.

2.1.2 Colilert

Myös Colilertin käyttö toimii lähestulkoon samalla periaatteella. Näytevetä kaadetaan jälleen 100 millilitraa näyteastiaan, mutta tämän kohdalla riittää pelkkä jauhemaisen kasvualustan lisääminen. Näyteastiaa sekoitetaan jälleen hyvin, ja vesi kaadetaan liuskaan. Tämän opinnäytetyön tapauksessa se on kaadettu Quanti-Tray -liuskaan, jossa isohkoja näytekuppia on yhteensä 51. Liuska ajetaan jälleen sulkijalaitteen läpi, ja siirretään lämpökaappiin. Legiolertistä poiketen Colilert on lämpökaapissa 35°C ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) vain 18 tuntia, ja aika on hyvin tarkka. (IDEXX Colilert, 2023)

Colilert tunnistaa sekä koliformiset bakteerit, että myös *E. coli*. Koliformiset bakteerit tunnistaa siitä, että inkuboinnin jälkeen vesi näytekupissa on värjäytynyt keltaiseksi. *E. coli* tunnistaminen vaatii hieman lisää työtä. Liuskassa keltaiseksi värjäytyneitä näytekuppia täytyy katsella erikseen UV-lampulla. Kaikki ne näytekupat, joissa näkyy selkeää fluoresenssivaloa, ovat *E. colia*.

Mikäli vesi on edelleen kirkasta eikä ole värjäytynyt, tällöin ei ole koliformisia bakteereita tai *E. colia*.

Colilert on sekä Afnorin validoima että Terveysten- ja hyvinvoinnin laitoksen verifioima. Validoinnin se on saanut ensimmäisen kerran Afnorilta marraskuussa 2009, jonka yhteydessä on saatu myös NF-validointimerkki. (Afnor, 2009, s. 1) THL on verifioinut Colilertin käyttöönsä myös vuonna 2009. Verifiointinnissa verrattiin keskenään sekä Colilert -menetelmää, että virallista standardia ISO 9308-1. Tutkimus sisältää kuvaukset sekä näytteiden käsittelystä että niiden analysoinnista ja virhearvioinnista. Tutkimuksissa pystyttiin toteamaan Colilertin luotettavuus virallisen menetelmän rinnalla. (THL, 2009, s. 3) Suomessa tämä on siis saanut virallisen tutkimusmenetelmän roolin, jolloin se mielletään luotettavana ja varmana menetelmänä tutkimuksessa. Legiolertille tällaista verifiointia ei ole vielä saatu Terveysten- ja hyvinvoinnin laitoksen puolesta.

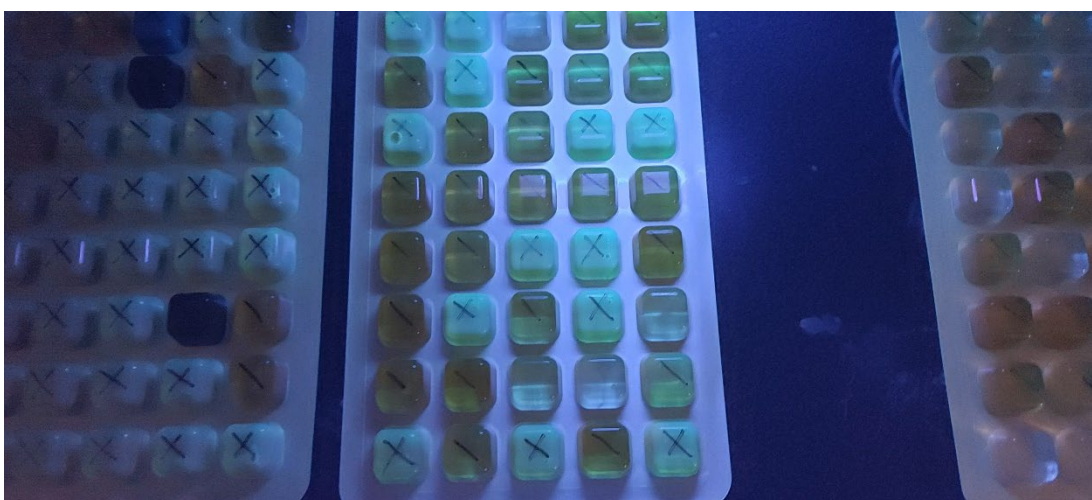
Colilertilla on täysin erilainen asema Legiolertiin verrattuna myös standarditasolla: koliformisille bakteereille ja *E. colille* olemassa oma virallinen standardinsa nimenomaan Colilertia käyttäen. Standardi ISO 9308-2 perustuu näiden bakteerien tutkimiseen vesinäytteistä kyseisen testauksen avulla. Standardi käy yksityiskohtaisesti läpi Colilertin toimintaperiaatteen ja sen, miten testaus suoritetaan. (ISO 9308-2, 2014, s. 10–16)

Tämän lisäksi myös talousvesiasetus hyväksyy Colilert -testauksen käytön muiden testausmenetelmien ohella. Tällaisia menetelmiä voi käyttää virallisten rinnalla, jos vastaavuus on voitu todentaa. (Zacheus, 2013, s. 2)

Samoin Colilertia hyödynnetään myös uimavesien tutkimisessa rannoilla. Kansanterveyslaitos teetti vuoden 2006 aikana tutkimuksen, jonka kautta Colilert hyväksyttiin yhdeksi tutkimusmenetelmäksi. (STTV, 2008, s. 43)



Kuva 2. Kuvassa Colilert -liuskoja. Keltaiset näytekuopat ovat positiivisia ja niissä on koliformisia bakteereita. Kaikki kirkkaat näytekuopat ovat negatiivisia.



Kuva 3. UV-valolla tarkasteltaessa ylemmän kuvan liuskojen keltaisista näytekuopista osa hohtaa sinivihreänä fluoresenssivaloa, joten niissä on *E. coli* -bakteereita.

2.2 MPN ja PMY

Tässä opinnäytetyössä myöhemmin käytetään käsitteitä PMY ja MPN. MPN tulee sanoista most probable number eli todennäköisin lukumäärä. Se tarkoittaa bakteerien todennäköisintä määrää, joka voidaan näytteestä havaita ja laskea. (ISO 9308-2, 2014, s. 10) Tapa perustuu todennäköisyyteen, ja se ottaa huomioon myös epävarmuusrajat. Menetelmä antaa todennäköisimmän määrän, mutta myös prosentuaaliset raja-arvot joihin lopputulos voi päättyä. (IDEXX, 2023) PMY tulee sanoista pesäkkeen muodostava yksikkö. Yksikköä

käytetään, kun puhutaan mikrobipitoisuuksista esimerkiksi kasvualustalla tai jossakin näytteessä. (Tieteen termipankki, 2023)

2.3 L. pneumophila, koliformiset bakteerit ja E. coli

2.3.1 L. pneumophila

L. pneumophila eli *Legionella pneumophila* on gramnegatiivinen bakteeri, joka on legionellabakteereista yleisin taudinaiheuttaja. *L. pneumophila* tunnistettiin ensimmäisen kerran vuonna 1976, kun joukko amerikkalaisia sotaveteraaneja sairastui Philadelphiassa Pennsylvanian osavaltiossa olleessa tapaamisessa. Tapaaminen oli hotellissa, jossa se levisi ilmastointilaitteiden mukana hengitysilmään. (Terveyskirjasto, 2020) *L. pneumophila* jaetaan 15 serotyyppiin, joista tyypit 1, 3, 5 ja 6 aiheuttavat ihmisille sairauksia. Näistä suurimman osan tauteja aiheuttaa serotyyppi 1. (Mentula & Kusnetsov, 2020, kohta ”Legionellat”) *L. pneumophilan* aiheuttamaa sairautta kutsutaan nimellä legionelloosi. Oireet alkavat yleensä melko nopeasti tartunnan saamisesta, useimmiten 2–5 päivän kuluttua. Legionelloosi voi ilmetä varsin vähin oirein tai pahimmillaan aiheuttaa vaikean keuhkokuumeinfektion, josta joskus käytetään myös nimitystä legioonalaistauti. Yleisimpiin oireisiin kuuluu muun muassa yskä, kuume, päänsärky, lihaskipu ja hengitysvaikeudet. Joskus jotkin legionellabakteerit voivat aiheuttaa Pontiac -kuumeeksi kutsutun taudin, joka usein on influenssaa muistuttava. Yleisesti legionellabakteereja esiintyy esimerkiksi maaperässä ja vesistöissä luonnostaan pieniä määriä. Tämän lisäksi legionella kasvaa vesijärjestelmissä ja tätä kautta päätyy aerosolien mukana hengitettävään ilmaan. (THL, 2022; Terveyskirjasto, 2020) Vesijärjestelmissä se kasvaa herkästi, mikäli putkistossa kulkevan veden lämpötila ei ole oikeanlainen. Kylmän veden lämpötilan tulisi olla alle 20°C ja lämpimän käyttöveden mielellään vähintään 55°C. Mikäli nämä eivät ole kunnossa, riski legionellan kasvulle nousee. (THL, 2023)

Suomessa tämän vuoden alusta voimaan astunut uudistunut talousvesiasetus asettaa raja-arvoja talousvedestä löytyvälle legionellalle ja velvoittaa entistä tarkempaan seurantaan. Talousvedessä toimenpideraja legionellan suhteen

on 1000 pmy/l. (Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista annetun sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen muuttamisesta 2/2023, 21 §)

2.3.2 Koliformiset bakteerit ja *E. coli*

Koliformiset bakteerit ovat gramnegatiivisia sekä ihmisten että eläinten ruoansulatuselimistössä eläviä bakteereita. Bakteerit elävät ja lisääntyvät myös esimerkiksi maaperässä, pintavesissä sekä erilaisissa jätevesissä. Koliformiset bakteerit vedessä kertovat useimmiten ulosteperäisestä saastumisesta. Tässä tulee kuitenkin huomioida se, että koliformisia bakteereita on luonnostaan pintavesissä ja niiden löytyminen näistä on normaalia. (Opasnet, 2023)

Koliformisiin bakteereihin kuuluva *E. coli* eli *Escherichia coli* on gramnegatiivinen sauvabakteeri, joka on yleisin suolistobakteeri ihmisillä. Sitä esiintyy myös eläinten suolistossa. *E. coli* on osa Enterobacteriaceae -heimoa, josta usein käytetään yhteisnimitystä enterobakteerit. Vaikka *E. coli* on suolistoissamme hyödyllinen, kuuluu sukuun myös joitakin patogeenisia eli tautia aiheuttavia bakteereita. *E. coli* kertoo useimmiten tuoreesta ulosteperäisestä saastumisesta. *E. colia* pidetään yhtenä parhaimmista indikaattoreista, kun puhutaan hygieniasta. Samoin kuin koliformiset bakteerit, myös *E. colia* voi löytyä luonnonvesistä löytyvistä näytteistä. (Hakanen ym., 2020, kohta "Escherichia coli") Talousvesiasetus määrää myös koliformisista bakteereista ja *E. colista* erikseen. Kumpienkin määrä juomavedessä tulee olla 0 pmy/100 ml (Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista annetun sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen muuttamisesta 2/2023, 21 §)

3 VERIFIOINTI

NMKL:n, Nordic Committee on Food Analysis, Verification of microbiological methods määrittelee, että verifiointi on osoitus siitä, että validoitu menetelmä

toimii käyttäjän laboratorioissa niiden määräysten ja ohjeiden mukaisesti, jotka on asetettu ja sopii siellä tarkoitettuun käyttöön. Validointi on jonkin virallisen tahon teettämä tutkimus siitä, että menetelmä on toimiva, luotettava ja sitä voidaan käyttää esimerkiksi virallisissa tutkimuksissa. (NMKL, 2017, s. 3–4) Sekä Colilertin että Legiolertin kohdalla validoinnit ovat tulleet Afnorilta. Afnor on ranskalainen järjestö, jonka palveluihin kuuluu muun muassa tuotteiden validointi ja sertifiointi sekä asiantuntijatyö. (Afnor, 2023) Legiolert validoitiin vuonna 2019. Validoinnissa verrattiin keskenään Legiolert -testausta ja kahta virallista standardimenetelmää: NF T90-431 ja ISO 11731. Näistä saatuja lukemia vertailtiin keskenään, ja pystyttiin toteamaan, että Legiolert antaa standardeihin verraten luotettavia tuloksia. (Afnor, 2019, s. 5–10) Colilert validoitiin vuonna 2009. Legiolertin tavoin myös Colilertin tapauksessa verrattiin keskenään kyseistä menetelmää ja virallista standardimenetelmää ISO 9308-2. Myös tästä saatiin sellaisia lukemia, jotka tukevat Colilertin luotettavuutta. (Afnor, 2009, s. 5–9) Tässä tapauksessa, kun sekä Legiolertista että Colilertista on jo olemassa viralliset validoinnit, on opinnäytetyön kannalta järkevää suorittaa verifiointi. Verifiointi on pienitöisempi, ja soveltuu tämänkaltaiseen yhteen laboratorioon kohdistuvaan tutkimukseen hyvin. Verifiointin kautta saadaan selvitettyä menetelmien sopivuus juuri Satakunnan ammattikorkeakoulun käyttöön.

Tässä opinnäytetyössä verifiointi viittaa siihen, että testauksia tehtiin Legiolertilla, Colilertilla ja Quanti-Tray Sealer Plus -sulkijalaitteella. Testauksilla pyrittiin selvittämään sen, soveltuvatko menetelmät Satakunnan ammattikorkeakoulun käyttöön. Verifiointi koostuu verifiointisuunnitelmasta, jossa suunniteltiin verifiointiprosessin kokonaisuudessaan. Tämän jälkeen käydään läpi tehtyjä laboratoriotöitä, näytteenottoa, tuloksia ja pohditaan erilaisia epävarmuustekijöitä. Verifiointisuunnitelman pohjana ja rakenteen suunnittelun apuna käytettiin NMKL:n raporttia. Raportti sisältää kaavion, joka ohjeistaa verifiointiprosessin sisällöstä. (NMKL, 2017, s. 11) Raportti kattaa varsin laajasti sen, mitä validoinnilla ja verifiointilla tarkoitetaan, millaisia mittaustekijöitä tulisi ottaa huomioon näissä prosesseissa sekä sen, mitä prosessit pitävät sisällään. Näistä kaikista ohjeistuksista kootaan työhön sopiva kokonaisuus. (NMKL, 2017, s. 11)

3.1 Verifiointisuunnitelma

3.1.1 Tavoite

Opinnäytetyön tavoitteena oli tehdä Quanti-Tray Sealer Plus -laitteelle sekä Legiolert ja Colilert -testeille käyttöohjeet. Näiden lisäksi suoritan verifiointin Legiolertille ja Colilertille, jonka suunnitelmaa tässä käydään läpi. Tutkimusten kautta saadaan tietoa siitä, millainen laatu vedellä on ja millaisia bakteerimääriä se sisältää. Tarkoituksena on verifioida menetelmä niin, että se soveltuu Satakunnan ammattikorkeakoulun laboratoriokäyttöön. Tämän vuoksi laadin myös suomenkieliset käyttöohjeet testeille ja sulkijalaitteelle, jotta käyttö helpottuu.

3.1.2 Verifiointiprosessin sisältö

Näytteitä on hyvä olla näissä tapauksissa useita, jotta niitä voidaan pitää vertailukelpoisina ja tulokset olisivat luotettavampia. Legiolertistä on olemassa noin 20 käsiteltyä näytettä, joista osan tulokset valitaan käsiteltäväksi tässä opinnäytetyössä. Nämä näytteet on haettu porilaisista kouluista, ja kaikista on tehty Legiolert -testaukset. Colilertia varten näytteitä olen kerännyt 10. Näytteitä on niin jokivedestä, ojavedestä, kaivovedestä kuin myös vesijohtovedestä vertailun vuoksi. Näin voidaan saada tuloksia useista erilaisista lähteistä, ja vertailla niitä keskenään. Varsinaisten Legiolert ja Colilert -liuskojen lisäksi suoritan myös laimennossarjojen tekoa, joista osa kasvatetaan maljalla ja teen myös liuskatestaukset. Laimennossarjoilla, maljakasvatuksella ja laimennokista tehdyillä Legiolerteilla ja Colilerteilla pyrin todentamaan sen, että menetelmät todella tunnistavat luotettavasti erilaisia bakteeripitoisuuksia.

3.1.3 Vastuu

Varsinainen vastuu kaikesta opinnäytetyöhön liittyvästä työstä on opinnäytetyön tekijällä. Tekijänä hoidan tarvittavat suunnitelmat, näytteenotot ja niiden

käsittelyt, muut laboratoriotyöt sekä näihin tarvittavat raportoinnit ja muut kirjoitustyöt.

3.1.4 Epävarmuustekijöiden huomioiminen

Epävarmuustekijöitä on arvioitava opinnäytetyössä, jotta saadaan selville millaiset asiat mahdollisesti vaikuttavat lopputuloksiin. Tässä tapauksessa käsitelen muun muassa seuraavanlaisia seikkoja. Oikeellisuus eli verrataan saatuja tuloksia ja tilastotuloksia keskenään. Pyritään siihen, että tulokset olisivat mahdollisimman luotettavia ja järjellisiä. Uusittavuus eli voidaanko tehty työ toistaa ja saada siitä sama tulos kuin aikaisemmin. Joitakin opinnäytetyön verifiointiin kuuluvia osa-alueita on toistettu muutamia kertoja, ja näiden välistä suhdetta on pohdittu myöhemmin. Mittausepävarmuus eli mahdolliset epävarmuustekijät saaduissa tuloksissa. Pohditaan, miten tulokset voivat heitellä ja miten epävarmuuksia on otettu huomioon.

3.1.5 Verifiointiraportti

Tämä raportti osa tätä opinnäytetyötä. Raportissa pohdin asetettuja tavoitteita ja sitä, miten näitä on saavutettu. Käyn myös läpi saatuja lopputuloksia, teen mahdollisia vertailuja ja johtopäätöksiä näistä.

3.1.6 Verifiointin hyväksyminen

Tässä vaiheessa pohdin sitä, miltä verifiointi kokonaisuudessaan näyttää ja olisiko saatu lopputulos sellainen, että se voisi soveltua Satakunnan ammatti- korkeakoulun laboratorion käyttöön. Tarkoitus tietysti on saada tämä käyttöön, joten pohdin toisaalta sitä, miten kaikki käytännössä toimii jatkossa.

3.1.7 Käyttöönotto

Tämä osuus on käyttöohjeille ja muille ohjeistuksille, jotka löytyvät opinnäytetyön lopusta erillisenä lukuna. Todetaan, että verifiointi toimii ja testatut menetelmät voidaan ottaa käyttöön luotettavasti.

3.2 Näytteenotot ja niiden tulokset

Opinnäytetyötä varten on kerätty useita näytteitä niin porilaisista kouluista kuin myös luonnonvesistä Porista ja sen lähialueilta. Kouluista otetut näytteet liittyvät Legiolertiin ja luonnonvesinäytteet Colilertiin. Eettisin perustein koulujen nimiä ei mainita tässä opinnäytetyössä, ja samoin myös luonnonvesien tarkemmat nimet jätetään pois selkeyden ja osin yksityisyyden vuoksi. Kouluista otettuja näytteitä on yhteensä kymmenen, samoin luonnonvesinäytteitä. Näistä olen koontanut taulukot, jotka on liitetty mukaan varsinaiseen verifiointiraporttiin.

3.3 Muut laboratoriotyöt

Varsinaisten näytteenottojen lisäksi tein joukon muita laboratoriotöitä. Näihin lukeutuvat laimennossarjat, maljakasvatukset ja laimennossarjoista tehdyt Legiolert ja Colilert -testaukset.

4 VERIFIOINTIRAPORTTI

Tämä raportti sisältää verifiointin kahdelle IDEXXin testipaketille, Legiolertille ja Colilertille. Verifiointin tavoitteena on tutkia se, miten nämä menetelmät soveltuvat Satakunnan ammattikorkeakoulun käyttöön. Tavoitteena on myös todistaa, että molemmat menetelmät ovat toimivia ja luotettavia. Verifiointisuunnitelman tavoin olen käyttänyt tässä apuna NMKL:n raporttia ja siinä esiteltyä

verifiointiraportin rakennetta. (NMKL, 2017, s. 11) Raportissani käsittelen ensin Colilertista ja Legiolertista saadut tulokset, jonka jälkeen pohdin epävarmuustekijöitä sekä muita huomioonotettavia asioita. Raportti sisältää myös varsinaisen pohdinnan ja johtopäätöksiä saaduista tuloksista. Lopuksi käyn läpi verifioinnin hyväksymistä.

4.1 Colilert

Verifiointi aloitettiin Colilertista. Prosessi aloitettiin marras-joulukuussa 2022, kun haettiin kymmenen erilaista luonnollista vesinäytettä ojista, kellarista, joista, kaivoista, vesijohtovedestä ja lisäksi yksi *E. coliin* liittyvä testausnäyte, jossa vesijohtoveteen lisättiin itse *E. coli* -bakteeria testausmielessä. Vesinäytteistä testattiin sekä koliformiset bakteerit, että mahdollinen *E. coli* IDEXXin Colilert -testillä. Jokaista näytettä on yksi kappale. Näytteiden testaamisella haluan tuoda ilmi sitä, millaisia määriä luonnonvesissä on koliformisia bakteereita ja mahdollisesti *E. coli* -bakteeria. Nämä auttavat myös vertailussa, kun myöhemmin esittelen laboratoriossa tehtyjen tutkimuksien tuloksia. Samoin tuloksilla voidaan tulkita ja tutkia sitä, millainen laatu näillä vesillä on.

Tuloksia on esitelty alla olevassa taulukossa 1.

Taulukko 1. Colilertin luonnolliset näytteet

Näytteenottopaikka	Näytteenottopäivä	Tulokset
Vesijohtovesi 1	24.11.2022	0 MPN/100 ml
Vesijohtovesi 2	11.12.2022	0 MPN/ 100 ml
Oja 1	24.11.2022	> 200,5 MPN/100 ml (koliformit), 3,1 (<i>E. coli</i>)
Oja 2	7.12.2022	> 200,5 MPN/100 ml (koliformit), 73,8 MPN/100ml (<i>E. coli</i>)
Joki 1	7.12.2022	118,4 MPN/100 ml (koliformit), 16,4 MPN/100 ml (<i>E. coli</i>)

Joki 2	11.12.2022	200,5 MPN/100 ml (koliformit), 59,1 MPN/100ml (<i>E. coli</i>)
Kaivo 1	11.12.2022	9,9 MPN/100 ml (koliformit)
Kaivo 2	11.12.2022	23,8 MPN/100 ml (koliformit)
Kellari	24.11.2022	118,4 MPN/ 100 ml (koliformit)
SAMK -laboratorio, <i>E. coli</i> -testaus	24.11.2022	> 200,5 MPN/ 100 ml (<i>E. coli</i>)

Tulokset vaihtelivat hyvin paljon keskenään, mutta olivat järkeviä ja täysin odotettavissa olevia.

Tämä siksi, että luonnonvesissä esiintyy aina vaihtelevia määriä niin koliformisia bakteereita kuin myös *E. coli* -bakteeria. Koliformiset bakteerit elävät ja lisääntyvät pintavesissä. *E. coli* -bakteeria päätyy vesistöihin ulosteperäisesti. (Hakanen ym., 2020, kohta "Escherichia coli")

Kaksi näytettä on otettu vesijohtovedestä vertailun vuoksi, ja niistä ei löytynyt mitään. Tämäkin oli odotettavissa, sillä hanavesi ei saa sisältää mitään näistä bakteereista. Lisäksi yksi näyte on testaus, jossa todennettiin, että liuskan avulla voidaan tunnistaa niin koliformit kuin myös *E. coli* erikseen. Testaus suoritettiin siten, että näyteveteen lisättiin suoraan *E. coli* -bakteeria, jolloin lopputulema oli taulukon 1 osoittama. Loput näytteistä on otettu joista, ojista, kaivoista ja kellarista. Erityisesti oja- ja jokivesinäytteissä koliformisia bakteereita on runsaasti. Osasta löytyi myös enemmän tai vähemmän *E. coli* -bakteeria. Myös kaivovesissä esiintyi jonkin verran koliformisia bakteereita. Kaivon 1 vettä ei käytetä juomavetenä, vaan silloin tällöin kasteluvetenä. Pienet bakteerimäärät saattavat olla peräisin esimerkiksi pintavesien kulkeutumisesta pohjaveteen. Kaivon 2 vettä käytetään juomavetenä. Tässä bakteerimäärä oli hieman suurempi, mutta ei vielä hälyttävän iso. Tässäkin tapauksessa pintavettä on todennäköisesti päätyneet pohjaveteen. Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 401/2001 määrittää laatuvaatimuksia myös talousvesikaivoille.

Suositus on, että koliformisten bakteerien pitoisuus olisi alle 100 pmy/100 ml (Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriön asetus 401/2001, Liite 1)

Luonnollisten näytteiden lisäksi tein testausta TSA-maljakasvatuksella, laimennossarjoilla ja näistä tehdyillä Colilert -testeillä. Tavoitteeksi tässä asetin, että saisin neljä erilaista tulosskaalaa sekä maljoilta että Colilerteilta: alle 5 MPN, 10–20 MPN, 50–100 MPN ja yli 100 MPN. Tällä pyritään osoittamaan se, että menetelmä tunnistaa luotettavasti eri bakteeripitoisuuksia.

Testausta varten täytyi valmistaa sekä PBS-lientä (Valmistaja: VWR, LOT: 274602–01) että BHI-lientä (Valmistaja: Neogen, LOT: UK307106/194). *E. coli* -bakteeria (Valmistaja: Kwikstik, kanta: 1576, LOT: 322–65–3) oli jo valmiina pakastettuna cryoputkiin. BHI-lientä pipetoin 5 ml koeputkeen, jota inkuboin 37°C lämpötilassa noin vuorokauden ajan. Tiedetään, että näin kasvatettuna *E. coli* -liuoksen vahvuus on suunnilleen 10⁸. Seuraavana päivänä tästä tein laimennossarjan välillä -1 – -8, jossa liuos laimenee sitä mukaa, mitä pienempi numero on. Laimennoksista otin tarkempaan tutkimukseen -5, -6, -7 ja -8. Näistä tein sekä maljat, että Colilert-testaukset.

Maljoihin käytin valmista TSA-agaria (Valmistaja: Biotrading, LOT: 2309512332), jota sulatin ja valoin maljat. Ennen agarin kaatamista maljoihin, kuhunkin maljaan pipetoin 1 ml:an laimennosliuosta. Maljat tein rinnakkaisina, joten jokaista oli kaksi. Näitä maljoja inkuboin 37°C vuorokauden ajan.

Aiemmin tehdyistä laimennosliuoksista tein myös Colilertit. Samoin kuin maljoille, myös näihin pipetoin 1 ml:an liuosta. Näitä inkuboin 18 tunnin ajan 35°C (± 0,5°C).

Tulokset liuskoista olivat seuraavanlaisia:

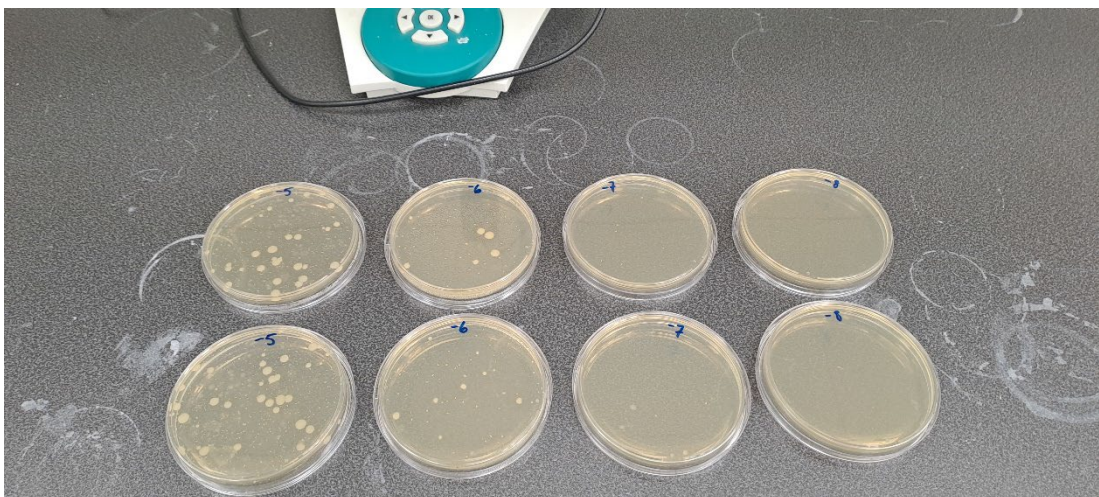
- liuska -8: tavoite alle 5, tulos 0 näytekupaa (0 MPN/ 100 ml)
- liuska -7: tavoite 10–20, tulos 6 näytekupaa (6,4 MPN/ 100 ml)
- liuska -6: tavoite 50–100, tulos 34 näytekupaa (56,0 MPN/ 100 ml)
- liuska -5: tavoite yli 100, tulos 51 näytekupaa (> 200,5 MPN/ 100 ml)



Kuva 4. Liuskat vasemmalta oikealle: -5, -6, -7 ja -8

Tulokset maljoista olivat seuraavanlaisia:

- malja -8: a-malja 0 pesäkettä ja b-malja 0 pesäkettä
- malja -7: a-malja 5 pesäkettä ja b-malja 8 pesäkettä
- malja -6: a-malja 65 pesäkettä ja b-malja 79 pesäkettä
- malja -5: a-malja 238 pesäkettä ja b-malja 226 pesäkettä



Kuva 5. Maljat vasemmalta oikealle: -5, -6, -7 ja -8

Näitä tuloksia olen vertaillut Khiin neliötestillä. Neliötestiin hyödynsin apunani seuraavaa kaavaa:

```
data = matrix(c(x,y,z),nrow=n)
```

```
chisq.test(data)
```

Kaavassa kirjaimien x, y ja z tilalle laitetaan ne luvut, joista halutaan saada tulos. Merkintä $nrow=n$ viittaa siihen, mikä on verrattavien lukujen lukumäärä. Kirjaimen n tilalle syötetään lukumäärä. Kaava itsessään laskee koodausohjelmalla automaattisesti Khiin neliötestin kautta halutun p-arvon. Jos p-arvo on pienempi kuin 0,05, on kyseessä tilastollisesti merkittävä ero. Tämän kaavan lisäksi laskeen myös keskihajontoja, jotka osaltaan kertovat enemmän tulosten vaihtelusta. Näitä on esitelty alla olevassa taulukossa 2.

Taulukossa 2 on aina kaksi lukua per pari. Vertailen jokaista liuskasta saatua MPN-tulosta sitä vastaaviin maljatuloksiin. Esimerkiksi liuskasta -7 saatua 6 MPN vertaan maljojen -6 tuloksiin 6 ja 8. Laskettavuuden takia joitakin vertailtavia lukuja on pyöristetty, jotta ne saa laskettua oikein.

Taulukko 2. Khiin neliötesti ja keskihajonta Colilert -tuloksille

Vertailtava liuska ja malja	Vertailtavat luvut	P-arvo (Khiin neliötesti)	Keskihajonta (%)
Liuska -8 ja malja -8a	0 ja 0	0	0
Liuska -8 ja malja -8b	0 ja 0	0	0
Liuska -7 ja malja -7a	6 ja 5	0,76	0,5
Liuska -7 ja malja -7b	6 ja 8	0,59	1,0
Liuska -6 ja malja -6a	56 ja 65	0,41	4,5
Liuska -6 ja malja -6b	56 ja 79	0,05	11,5

Liuska -5 ja malja -5a	201 ja 238	0,08	18,5
Liuska -5 ja malja -5b	201 ja 226	0,23	12,5

Taulukon 2 tulokset ovat melko vaihtelevia. Näistä erityisesti liuska-maljaparit -8 ja -7 ovat loogisia. Esimerkiksi liuska -7 ja malja -7a -vertailu tuotti p-arvon 0,76 ja keskihajonnan 0,5 %. Neljä ensimmäistä taulukon 2 vertailua tuottivat hyviä tuloksia, jotka osoittavat Colilert-liuskan ja maljojen välisen yhteyden. Toisaalta taas erityisesti taulukon loppuosan liuska-maljapareissa on huomattavaa vaihtelua. Erityisesti liuska -6 ja malja -6b -vertailussa p-arvo on juuri ja juuri rajalla. Erityisesti keskihajontaprosentit loppupään näytteissä ovat isompia. Erot liuskojen ja maljojen välillä näissä saattavat johtua esimerkiksi siitä, että liuskoissa MPN-lukemien laskuraja päättyy 200,5 MPN/100 ml. Esimerkiksi kahdessa viimeisessä käytetty MPN-lukema 201 verrattuna lukuihin 238 ja 226 aiheuttaa täten suuria vaihteluita. Huolimatta osittaisista eroavaisuuksista, voidaan tuloksia kuitenkin pitää luotettavana.

Toinen tapa selittää tuloksia on IDEXXin MPN-laskurin antamat todennäköisyysprosentit sille, mikä liuskasta saatu tulos olisi. Laskuri antaa varsinaisen tuloksen, mutta myös prosentuaaliset varmuusrajat sille, paljonko tulos voisi olla. Tuloksia on alla taulukossa 3.

Taulukko 3. IDEXXin laskurin varmuusrajat

Liuska	Varsinainen tulos (MPN/100 ml)	Yläraja tulokselle (MPN/100 ml)	Alaraja tulokselle (MPN/100 ml)
-8	0	3,7	0,0
-7	6,4	13,9	3,0
-6	56,0	80,1	39,7

-5	> 200,5	∞	146,1
----	---------	----------	-------

Tämän avulla on helpompi ajatella, että tulos voisi olla hieman jotain muuta kuin liuskasta laskettu tulos. Erityisesti aiemmin mainitut liuska-maljaparit -6 ja -5 voisivat selittyä tällä. Liuskasta -6 saatu 56,0 MPN ja liuskan -5 > 200,5 MPN ja niitä vastaavien maljatulosten erot helpottuisivat tämän avulla. Tämä siis pitää ottaa huomioon ja muistaa, että tulokset voivat todellisuudessa olla hieman enemmän toisiaan lähellä.

Kokonaisuudessaan Colilertin verifiointiprosessi oli varsin looginen, sillä *E. coli* -bakteerin pitoisuus liuksissa voidaan tietää jo etukäteen. Toistin koko testauksen kaksi kertaa, joista toisella kerralla tulokset olivat parhaimpia ja niitä on tässä käytetty. Verifiointi ei siis ole välttämättä täysin yksinkertainen, vaan saattaa vaatia uusintoja ja hienosäätämistä. Etenkin taulukon 2 alkupään tulokset ovat silti keskenään loogisia ja vertailukelpoisia. MPN-tuloksia voidaan varsin hyvin vertailla maljatuloksiin, ja niiden lukemat tukevat toisiaan hyvin. Etenkin kun otetaan huomioon IDEXXin laskurin antamat tulokset, loogisuus on selkeämpää.

4.2 Legiolert

Toinen osuus verifiointiprosessia on Legiolert. Legiolertia varten näytteitä kerättiin syksyn 2022 aikana. Näytteiden tuloksia on käytetty myös toisessa opinäytetyössä, ja samoja hyödynnetään tässäkin. Näytteet on haettu kymmenestä eri porilaisesta koulusta, ja niiden tuloksia on eritelty alla olevassa taulukossa. Kaikista näytteistä on tutkittu, löytyykö *L. pneumophila* -bakteeria.

Taulukko 4. Legiolertin luonnolliset näytteet

Näytteenotto- paikka	Näytteiden määrä	Näytteenotto- päivä	Tulokset
Koulu 1	1	21.9.2022	0 MPN/100 ml
Koulu 2	2	29.9.2022	0 MPN/100 ml

Koulu 3	2	12.10.2022	0 MPN/100 ml
Koulu 4	1	17.10.2022	0 MPN/100 ml
Koulu 5	1	25.10.2022	0 MPN/100 ml
Koulu 6	1	25.10.2022	0 MPN/100 ml
Koulu 7	1	26.10.2022	0 MPN/100 ml
Koulu 8	1	26.10.2022	0 MPN/100 ml
Koulu 9	2	10.11.2022	0 MPN/100 ml
Koulu 10	1	10.11.2022	267,4 MPN/ 100 ml
Koulu 10 (uusintanäytteet)	4	14.11.2022	3/4 näytteestä 0 MPN, yhdessä 2,3 MPN/ 100 ml

Yllä olevassa taulukossa 4 on Legiolert-näytteenottojen tuloksia esiteltyinä. Suurimmalta osin näytteet olivat puhtaita, mutta myös muutama positiivinen näyte mahtui joukkoon. Koulun numero 10 näytteestä löytyi ensimmäisellä testauskerralla melko iso määrä legionellaa, yhteensä 267,4 MPN/ 100 ml. Tämä on peräti 2674 MPN/l, joka ylittää talousvesiasetuksen suosituksen alle 1000 pmy/l (Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista annetun sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen muuttamisesta 2/2023, 21 §). Myös Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos vahvisti omissa tutkimuksissaan legionellan koulukiinteistössä. Tämän vuoksi koululta haettiin uusintanäytteitä, joista ei enää kovin paljon legionellaa löytynyt. Syynä on saattanut olla se, että uusia näytteitä haettaessa vettä on juoksetettu selkeästi enemmän kuin ensimmäisillä kerroilla.

Legiolertin käyttö voidaan todeta varsin varmaksi keinoksi legionellan havaitsemiseen. Sama voidaan havaita myöhemmin eräessä toisessa yhteydessä ilmi tullessa legionellalöydöksessä vanhusten palvelutalosta. Legiolert -testauksella löytyi vedestä legionellaa, jonka myös THL vahvisti omissa tutkimuksissaan. (Satakunnan kansa, 2023) THL:n tutkimus on huomattavasti laajempi ja kattaa myös monet muut legionellalajit, ei vain *L. pneumophila*. Tulokset kertovat siis selkeästi laajemmin legionellatilanteesta.

Luonnollisten näytteiden lisäksi tutkin Legiolert -testausta samantyyllisesti kuin Colilertia. Tässä tapauksessa kasvatusmaljoina käytin BCYE-maljoja, jotka sopivat parhaiten legionellabakteerin kasvattamiseen. Samalla tavoin tein myös laimennossarjat ja Legiolert -testaukset. Tavoitteeksi asetin samat tulokset kuin Colilertilla. Neljä erilaista tulosskaalaa sekä maljoilta että Colilerteilta: alle 5 MPN, 10–20 MPN, 50–100 MPN ja yli 100 MPN. Tällä pyritään jälleen osoittamaan se, että menetelmä tunnistaa luotettavasti eri bakteeripitoisuuksia.

Testausta varten täytyi valmistaa jälleen PBS-lientä (Valmistaja: VWR, LOT: 274602–01) ja BHI-lientä (Valmistaja: Neogen, LOT: UK307106/194). *L. pneumophila* -bakteeria (Valmistaja: Kwikstik, kanta: 33152, LOT: 211–65–4) käytin suoraan sellaisenaan. Sivelin bakteeria varoen BCYE-maljan pinnalle (Valmistaja: VWR, LOT: 145953), jota kasvatin 30°C lämpötilassa noin kolme vuorokautta. Bakteerimassan kasvettua siirsin sitä noin 2,5 ml:aan BHI-lientä ja tästä tein laimennossarjan välillä -1 – -8. Laimennoksista otin tarkempaan tutkimukseen -5, -6, -7 ja -8. Näistä tein sekä maljat, että Legiolert-testaukset.

Maljoina käytin valmiita BCYE-maljoja. Pipetoin jokaisen maljan päälle 100 µl:aa kutakin laimennosliuosta. Maljat tein rinnakkaisina, joten jokaista on kaksi. Näitä maljoja inkuboin 30°C kolmen vuorokauden ajan.

Aiemmin tehdyistä laimennosliuoksista tein myös Legiolertit. Samoin kuin maljoille, myös näihin pipetoin 100 µl:aa liuosta. Näitä inkuboin 7 vuorokauden ajan 39°C (± 0,5°C).

Tulokset liuskoista olivat seuraavanlaisia:

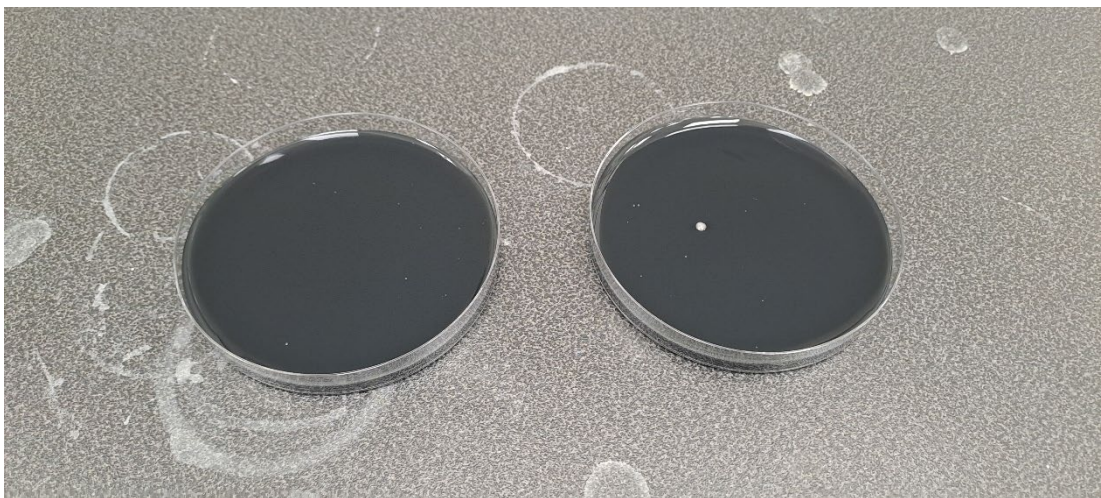
- liuska -8: tavoite alle 5, tulos 2 pientä näytekupppaa (2 MPN/ 100 ml)
- liuska -7: tavoite 10–20, tulos 8 pientä näytekupppaa (8,1 MPN/ 100 ml)
- liuska -6: tavoite 50–100, tulos 34 pientä näytekupppaa (35,2 MPN/ 100 ml)
- liuska -5: tavoite yli 100, tulos 77 pientä ja 5 isoa näytekupppaa (333,9 MPN/ 100 ml)



Kuva 6. Esimerkkikuvana liuska -7

Tulokset maljoista olivat seuraavanlaisia:

- malja -8: a-malja 2 pesäkettä ja b-malja 3 pesäkettä
- malja -7: a-malja 11 pesäkettä ja b-malja 12 pesäkettä
- malja -6: a-malja 61 pesäkettä ja b-malja 64 pesäkettä
- malja -5: a-malja +200 pesäkettä ja b-malja +200 pesäkettä



Kuva 7. Esimerkkikuvana maljat -7

Näitä tuloksia olen vertaillut Colilertin tavoin Khiin neliötestillä. Neliötestiin hyödynsin apunani jo aiemmin mainitsemaani kaavaa:

```
data = matrix(c(x,y,z),nrow=n)
```

```
chisq.test(data)
```

Taulukossa 5 on taulukon 2 tavoin kaksi lukua per pari. Vertailen jokaista liuskasta saatua MPN-tulosta sitä vastaaviin maljatuloksiin. Taulukko 4 on rakennettu täysin samalla periaatteella kuin taulukko 2. Laskettavuuden takia joitakin vertailtavia lukuja on jälleen pyöristetty, jotta ne saa laskettua oikein.

Taulukko 5. Khiin neliötesti ja keskihajonta Legiolert -tuloksille

Vertailtava liuska ja malja	Vertailtavat luvut	P-arvo (Khiin neliötesti)	Keskihajonta (%)
Liuska -8 ja malja -8a	2 ja 2	1,0	0
Liuska -8 ja malja -8b	2 ja 3	0,65	0,5
Liuska -7 ja malja -7a	8 ja 11	0,49	1,5
Liuska -7 ja malja -7b	8 ja 12	0,37	2,0
Liuska -6 ja malja -6a	35 ja 61	0,008	13,0
Liuska -6 ja malja -6b	35 ja 64	0,004	14,5
Liuska -5 ja malja -5a	334 ja +200	ei voi laskea	ei voi laskea
Liuska -5 ja malja -5b	334 ja +200	ei voi laskea	ei voi laskea

Nämä tulokset eivät ole aivan yhtä loogisia kuin Colilertilla, mutta osittain verrattavissa ja järkeviä. Jälleen alkupäästä liuska-maljaparit -8 ja -7 ovat järkeviä. P-arvot ovat hyviä ja keskihajontaprosentit pieniä. Yhteneväisyys voidaan näistä todeta. Loppupään liuska-maljapareissa haastetta on jonkin verran.

Tulokset vaihtelivat keskenään. Erityisesti liuska-maljapari -5 on haasteellinen tulkittava. Liuskoilta sain tuloksen 333,9 MPN/100 ml, ja maljoilta laskeminen oli käytännössä mahdotonta runsaan kasvun vuoksi. Tämän vuoksi olen jättänyt niiden tulokset tässä väliin. Alla olevassa taulukossa 6 on taulukon 3 tavoin esitelty varmuusrajoja liuskojen MPN-tuloksille.

Taulukko 6. IDEXXin laskurin varmuusrajat Legiolertille

Liuska	Varsinainen tulos (MPN/100 ml)	Yläraja tulokselle (MPN/100 ml)	Alaraja tulokselle (MPN/100 ml)
-8	2	3,7	0,0
-7	8,1	13,9	3,0
-6	35,2	80,1	39,7
-5	333,9	∞	146,1

Erityisesti Legiolertin kohdalla nämä varmuusrajat avittavat lopputulosten läpikäymisessä. Varsinkin liuska-maljaparissa -6 oli selkeästi heittoa. MPN-tulos 35,2 liuskasta voisi siis suurimmillaan olla 80,1, jolloin maljojen tulokset 61 ja 64 sopisivat skaalaan paremmin. Kuten Colilertissa, myös tässä varmuusrajat antavat tukea tulosten luotettavuudelle.

Kuten jo Colilertin kohdalla todettiin, ei verifiointi aina ole niin yksinkertaista. *L. pneumophila* -bakteerin kanssa oli hienosäätämistä muutaman kerran, ennen kuin sopiva liuospitoisuus löytyi. Haastetta tuotti myös bakteerin itsensä kasvattaminen. *E. coli* oli säilynyt hyvin pakastettuna, mutta legionellabakteeri ei ollut selvinnyt hengissä pakastimessa. Tämän vuoksi täytyi turvautua elävän bakteerin käyttämiseen, joka onneksi osoittautui hyvin toimivaksi keinoksi. Tulokset näistäkin ovat ihan järkeviä, vaikka eivät ihan niin loogisia kuin *E. colilla*. Tulokset ovat kuitenkin vertailukelpoisia, ja yhteyden sekä liuskojen että maljojen välillä pystyy näkemään ja toteamaan luotettavuuden.

4.3 Epävarmuustekijät ja muita huomioita

Verifioinnin kannalta tärkeää on, että ottaa huomioon erilaisia epävarmuustekijöitä. Tässä tapauksessa pohdin muun muassa oikeellisuutta, uusittavuutta ja mittausepävarmuutta. Näitä epävarmuustekijöitä olen pohtinut NMKL:n raportin ohjeistusten avulla (NMKL, 2017, s. 5–9). Käyn läpi myös vesinäytteenottoa epävarmuustekijänä.

Oikeellisuuden toteaminen perustuu tässä tapauksessa oikeiden havaintojen lisäksi myös IDEXXin laskurin antamiin mahdollisiin varmuusrajoihin, mutta yhteyden sekä IDEXXin testien, että maljakasvatuksen välillä pystyy huomaamaan. Saadut tulokset ovat keskenään vertailukelpoisia. Samoin etenkin -8 ja -7 -maljoilla sekä -8 ja -7 -testiliuskoissa kasvaa suunnilleen tai jopa lähes samat määrät bakteeria.

Uusittavuutta testattiin molempien testien kohdalla muutamaan kertaan. Jotta tulokset olisivat mahdollisimman selkeitä, joitakin osa-alueita toistettiin uudelleen. Etenkin Colilertin kohdalla uusiminen tuotti selkeästi samankaltaisia tuloksia. Legiolertin kohdalla uusiminen tuotti joka kerralla hieman erilaisia tuloksia, joista kolmannella kerralla tässä työssä käytetyt lopputulokset. Uusittavuus voi siis näissä tapauksissa joskus olla haasteellista, mutta toteutettavissa.

Mittausepävarmuus on kenties selkein epävarmuustekijä. Täysin luotettavasti etenkin maljakasvatuksen kohdalla ei pysty arvioimaan pesäkemäärää, kun niitä on huomattavasti. Laskeminen on jollain tavalla mahdollista ja luotettavaa noin 200 pesäkkeeseen asti, mutta sen jälkeen luotettavuus kärsii. Tässäkin työssä muutaman maljan kohdalla on ollut epävarmuutta pesäkelaskennassa suurien pesäkemäärien vuoksi. Onkin siis hyvä huomioida, että yksittäisiä pesäkkeitä on saattanut jäädä huomiotta tai toisaalta tullut laskettua kahteen kertaan.

Vesinäytteenoton standardi ISO 19458 opastaa oikeanlaiseen näytteenottoon. Näytteet tulisi käsitellä mahdollisimman nopeasti näytteenoton jälkeen ja kuljettaa viileässä. (ISO 19458, 2007, s. 46) Näytteenottoja olen pyrkinyt toteuttamaan siten, että näitä ohjeistuksia noudatettaisiin. Kerättyjä näytteitä on kuljetettu varsin vähäisiä aikoja, ja näytteitä on pyritty pitämään viileässä. Legiolertin kohdalla luonnolliset näytteet on otettu, kuljetettu ja käsitelty varsin

nopeasti. Muutamien näytteiden kohdalla on ollut niin, että näyte on käsitelty näytteenoton jälkeisenä päivänä. Tällöin näytettä on kuitenkin säilytetty viileässä eivätkä kuljetusajat ole olleet pitkiä. Colilertin luonnollisissa näytteissä osa on haettu myös niin, että ne on käsitelty näytteenoton jälkeisenä päivänä. Tällöinkin kuljetus on ollut nopea ja näytteitä säilytetty viileässä.

Standardi ohjeistaa myös esimerkiksi siitä, millaiseen näyteastiaan vesi tulisi ottaa ja miten näytteenottopisteen ominaisuudet voivat vaikuttaa. Näyteastian olisi hyvä olla joko lasinen tai muovinen sekä ehdottomasti steriili. Näytteenottopisteen olosuhteiden tulisi olla ominaisuuksiltaan vakaita. (ISO 19458, 2007, s. 10)

4.4 Verifioinnin hyväksyminen

Yllä läpikäymieni laboratoriotulosten ja muiden laskelmien perusteella totean, että sekä Legiolert että Colilert ovat soveltuvia Satakunnan ammattikorkeakoulun käyttöön. Aiemmin suunnitellut seikat ja erityisesti epävarmuustekijät huomioon ottaen tulokset vastaavat toisiaan riittäväällä tarkkuudella, ja vertailun perusteella loogisuus voidaan todeta. Molemmat IDEXXin testit soveltuvat hyvin käytettäväksi ammattikorkeakoulun laboratoriossa, ja toisaalta ovat sopivia myös opetuskäyttöön.

5 KÄYTTÖOHJEET

5.1 Quanti-Tray Sealer Plus

Quanti-Tray Sealer Plus on sulkijalaite, joka on tarkoitettu vesinäytteiden käsittelyyn. Näissä ohjeissa käydään läpi laitteen peruskäyttö, sekä muutamia seikkoja, joita on hyvä ottaa huomioon käytön aikana. Laitteen ohjeet on kirjoitettu sen mukana tulleen englanninkielisen ohjeen pohjalta. Ohjeita ei kuitenkaan ole käännetty sanasta sanaan, ja jokaista yksityiskohtaa ei ole tähän lisätty ylös. Laitteen käyttöohjeet ovat mukana liitteenä 1. (IDEXX, 2015)

5.2 Legiolert

Nämä ohjeet kattavat IDEXXin Legiolert -testin tekemisen, jolla etsitään vesinäytteistä *L. pneumophila* -bakteeria. Kerätty vesinäyte on hyvä ottaa huoneenlämpöön lämpenemään, mikäli sitä on säilytetty jääkaapissa. Riittää, että vesi on hetken aikaa huoneenlämmössä. Testauksen ohje on mukana liitteenä 2. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)

5.3 Colilert

Nämä ohjeet kattavat IDEXXin Colilert -testin tekemisen, jolla etsitään vesinäytteestä koliformisia bakteereja ja *E. coli* -bakteeria. Legiolertista poiketen näiden vesinäytteiden olisi hyvä olla lämpimiä, jotta jauhemainen kasvualusta liukenee veteen paremmin. Lämmittäminen onnistuu helposti laboratorion vesihauteessa. Vedellä täytetyt näyteastiat asetetaan vesihauteeseen n. 46°C muutamaksi minuutiksi. Vesinäytepullot on kuitenkin joka tapauksessa hyvä ottaa huoneenlämpöön jo hetkeksi ennen käsittelyä. Testauksen ohje on mukana liitteenä 3. (IDEXX Colilert -ohje, 2023)

6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Työn kautta todettiin, että verifiointiprosessi on toimiva ja soveltuva sille suunniteltuun käyttöön. Aivan niin yksinkertaista tämänkaltainen testaaminen ei ole, mutta menetelmät ovat riittävän luotettavia ja niistä saadaan käyttökelpoinen testausjärjestelmä Satakunnan ammattikorkeakoulun käyttöön. Erityisesti Legiolert on ollut säännöllisesti käytössä muun muassa kartoituskäytössä, ja menetelmän verifiointi on ollut täten tarpeen. Ohjeistukset IDEXXin sulkijalaitteelle ja kahdelle testausmenetelmälle ovat olleet tarpeen, ja niitä on jo onnistuneesti käytetty muun muassa opiskelijoiden laboratoriotöissä.

Voidaan myös päätellä, että etenkin *L. pneumophila* -bakteeri, mutta myös koliformiset bakteerit ovat varsin isossa roolissa nykypäivänä. Etenkin uuden

talousvesiasetuksen (Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista annetun sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen muuttamisesta 2/2023, 21 §) myötä velvoitteet legionellabakteerin seurantaan ja tutkimukseen lisääntyvät valtavasti. Tämä tulee todennäköisesti lisäämään tietoisuutta entistä enemmän, jonka myötä uusia legionellalöydöksiä tulee varmasti enenevässä määrin. Tämä johtaa väistämättä siihen, että löydöksiin on myös puututtava entistä tarkemmin. Legiolertin ja Colilertin helppous ja nopeus tutkimusmenetelminä on todennäköisesti avaintekijänä.

LÄHTEET

Afnor. (2009). Certificate No.: IDX 33/01-11/09.

Afnor. (2019). Certificate No.: IDX 33/06-06/19.

Afnor. (2023). Who we are? Haettu 8.6.2023 osoitteesta
<https://www.afnor.org/en/about-us/who-we-are/>

Hakanen, A., Kantele, A. & Salmenlinna, S. (2020). Escherichia coli. Teok-
sessa Mikrobiologia: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1.
Kustannus Oy Duodecim.

IDEXX. (2015). Quanti-Tray Sealer PLUS: User Manual.
<https://my.hach.com/asset-get.download.jsa?id=59425076276>

IDEXX. (n.d.). Haettu 28.1.2023 osoitteesta <https://www.idexx.co.uk/en-gb/>

IDEXX Colilert. (n.d.) Colilert-18. Haettu 1.5.2023 osoitteesta
<https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/colilert-18/>

IDEXX. (2023). Colilert -ohje. [Colilertin paperinen käyttöohje]

IDEXX Legiolert. (n.d.) Legiolert. Haettu 1.5.2023 osoitteesta
<https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/legiolert/>

IDEXX. (2023). Legiolert -ohje. [Legiolertin paperinen käyttöohje]

ISO 11731:2017. (2017). Water quality. Enumeration of Legionella.
<https://www.iso.org/standard/61782.html>

ISO 19458. (2007). Veden laatu. Näytteenotto mikrobiologista tutkimusta var-
ten. <https://www.iso.org/standard/33845.html>

ISO 9308-2. (2014). Veden laatu. Escherichia colin ja koliformisten bakteerien pesäkemäärän määrittäminen. Osa 2: Todennäköisimmän lukumäärän arviointi. <https://www.iso.org/standard/52246.html>

Kusnetsov, J. & Mentula, S. (2020). Legionellat. Teoksessa Mikrobiologia: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Kustannus Oy Duodecim.

NMKL Procedure No. 32. (2017) Verification of microbiological methods.

Opasnet. (2023). Koliformiset bakteerit. Haettu 4.2.2023 osoitteesta http://fi.opasnet.org/fi/Koliformiset_bakteerit

Satakunnan kansa. (10.3.2023) Legionella-bakteeria havaittiin palvelutalossa Porissa – kukaan ei ole sairastunut. Haettu 1.5.2023 osoitteesta <https://www.satakunnankansa.fi/satakunta/art-2000009446314.html>

Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista annetun sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen muuttamisesta 2/2023. Haettu 5.2.2023 osoitteesta <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2023/20230002#Pidm45843168963168>

Sosiaali- ja terveysministeriön asetus pienten yksiköiden talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista 401/2001. Liite 1. Haettu 25.5.2023 osoitteesta <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2001/20010401#Pidm45843170267136>

STTV. (2008). Soveltamisopas uimavesiasetukseen 177/2008. Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 177/2008 yleisten uimarantojen uimaveden laatuvaatimuksista ja valvonnasta. https://www.valvira.fi/documents/14444/22511/Uimavesiasetuksen_soveltamisopas_11032008.pdf

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2009. Colilert-menetelmän verifiointi sosi-aali- ja terveystieteiden tutkimuskeskuksen asetuksen 461/2000 mukaisiin koliformisten bak-terien ja Escherichia coli -bakteerin tutkimuksiin Suomessa.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. (2022) Legionella. Haettu 4.2.2023 osoit-teesta <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/legionella>

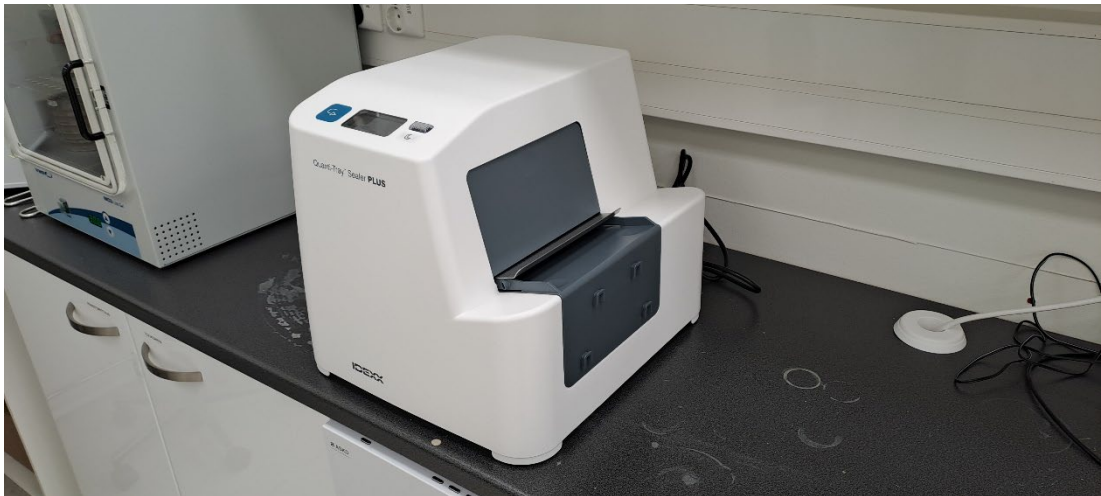
Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. (2023). Legionellan kasvuun vaikuttavat te-kijät. Haettu 29.5.2023 osoitteesta <https://thl.fi/fi/web/ymparistoter-veys/vesi/legionellabakteerit-vesijarjestelmissa/legionellan-kasvuun-vaikutta-vat-tekijat>

Terveyskirjasto. (2020) Legioonalaistauti (legionelloosi). Haettu 4.2.2023 osoitteesta <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00580>

Tieteen termipankki. (2023). PMY – Pesäkkeen muodostava yksikkö. https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:pes%C3%A4kkeen_muodos-tava_yksikk%C3%B6

Zacheus, O. (2013). Yhteenveto suurten, EU:lle raportoivien laitosten talous-veden valvonnasta ja laadusta vuonna 2013. https://www.valvira.fi/docu-ments/14444/22511/Talousvesi_2013_Tiivistelm%C3%A4.pdf

LIITE 1 QUANTI-TRAY SEALER PLUS -KÄYTTÖOHJE



1. Kuvassa IDEXXin Quanti-Tray Sealer Plus -sulkijalaite. Mitään esivalmisteluita ei tämän laitteen kanssa tarvita.



2. Laitteen takaa johdon vierestä löytyy pieni virtakytkin. Kun johto on kiinni pistorasiassa, paina laite päälle tästä napista. (IDEXX, 2015, s. 3)



3. Kun laite on päällä, oikealla oleva punainen valo syttyy. Näytössä näkyy lukema, montako liuskaa laitteen läpi on vedetty. Samoin näytössä näkyy myös punaisia palkkeja. Ne syttyvät yksitellen, kunnes kaikki viisi palavat. Niiden jälkeen syttyy vielä yksi vihreä palkki, ja oikealla oleva valo muuttuu vihreäksi. Tällöin laite on lämmennyt, ja valmis käyttöön. (IDEXX, 2015, s. 3)



4. Kun vihreä valo oikealla palaa, on laite käyttövalmis. Vasemmalla oleva nuolinäppäin työntää alustan takaisin ulos laitteesta. Jos siis liuska esimerkiksi asettuu huonosti alustalle ja se täytyy saada ulos kesken toiminnon, tämä nappi on tarkoitettu siihen. Vihreän valon alapuolella oleva kuukuvake on niin sanottu nukkumistoiminto. Sen voi aktivoida painamalla nappia, jolloin kuun kuva ilmestyy näytölle. Tämän tilan ollessa päällä laite siirtyy tunnin käyttämättömyyden jälkeen lepotilaan. Kun laite on lepotilassa ja sitä haluaa käyttää uudelleen, paina mitä tahansa nappia. Näin laite herää, ja lämpiää nopeammin uudelleen. Tätä tilaa ei toisaalta ole useinkaan tarve käyttää. (IDEXX, 2015, s. 3)

Laitteen peruskäytön lisäksi on hyvä käydä läpi myös muutamia muita seikkoja. Laitetta itsessään on turvallista käyttää, mutta varovainen on silti syytä olla. Laite toimii lämmön avulla, joten se myös kuumenee melkoisesti. Ulkopäin se on vain hieman lämmin, mutta sisäosat lämpenevät korkeisiin lukemiin. Laitetta ei saa missään tapauksessa avata, kun se on päällä tai vielä lämmin. Toisaalta sitä ei lähtökohtaisesti juuri edes tarvitse avata, ellei kyseessä ole laitteen puhdistaminen. (IDEXX, 2015, s. 6–8)

Laitteen käytössä saattaa joskus tulla ongelmia, jotka aiheuttavat laitteen näytölle kolmion näköisen error-valon. Syynä voi olla esimerkiksi se, jos laitteen läpi vie perättäin ison määrän näytteitä. Laite saattaa tällöin hetkellisesti viilentyä ja vaatia hetken lämmitäkseen uudelleen. Punainen valo syttyy, jos lämpötila laskee liian alas. Odota hetki, kunnes vihreä valo syttyy jälleen ja lämpötila on noussut takaisin oikeaan lukemaan. (IDEXX, 2015, s. 4)

Error-vikakoodin voi aiheuttaa myös se, jos laitetta ei ole pitkään aikaan puhdistettu. Tällöin laitteen sisäosat vaativat puhdistuksen, joka tulee suorittaa ohjeiden mukaisesti vain, kun laite on pois päältä ja viilentynyt. (IDEXX, 2015, s. 4)

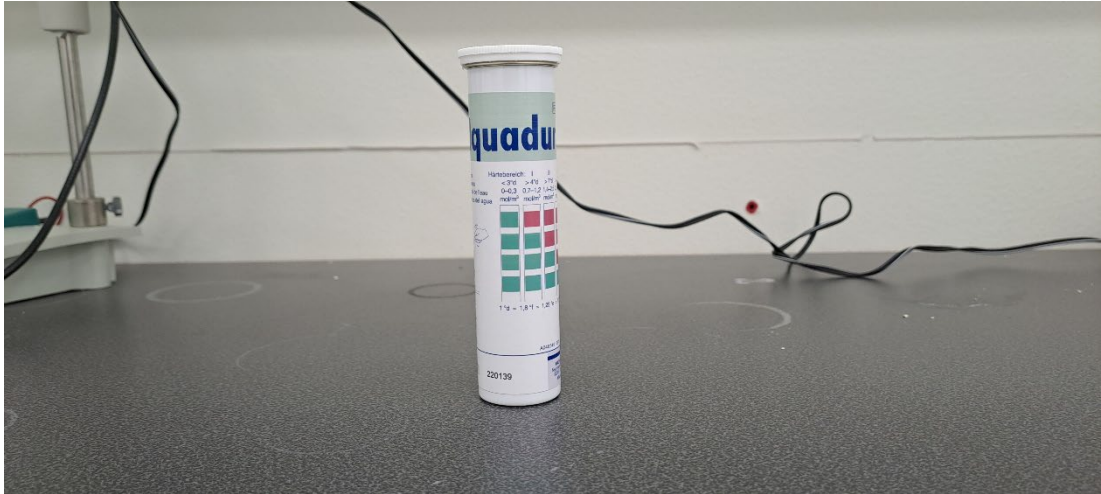
LIITE 2 LEGIOLERT -OHJE



1. Legiolert -testaukseen tarvitset IDEXXin Quanti-Tray Legiolert -alustan, joka näyttää tältä. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)



2. Alustan lisäksi tarvitset myös tämän Legiolert -liuskan. Varmista jo tässä vaiheessa, että liuska on ehjä. Mikäli liuskassa on esimerkiksi repeämiä tai jokin sivu ei ole tiivis, ota käyttöön uusi ja ehjä liuska. Liuska on hyvä nimetä sen mukaan, mikä näyte on kyseessä. Liuskan yläreunaan kannattaa kirjoittaa ainakin oma nimi/nimikirjaimet, näytteenottoaika ja päivämäärä. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)



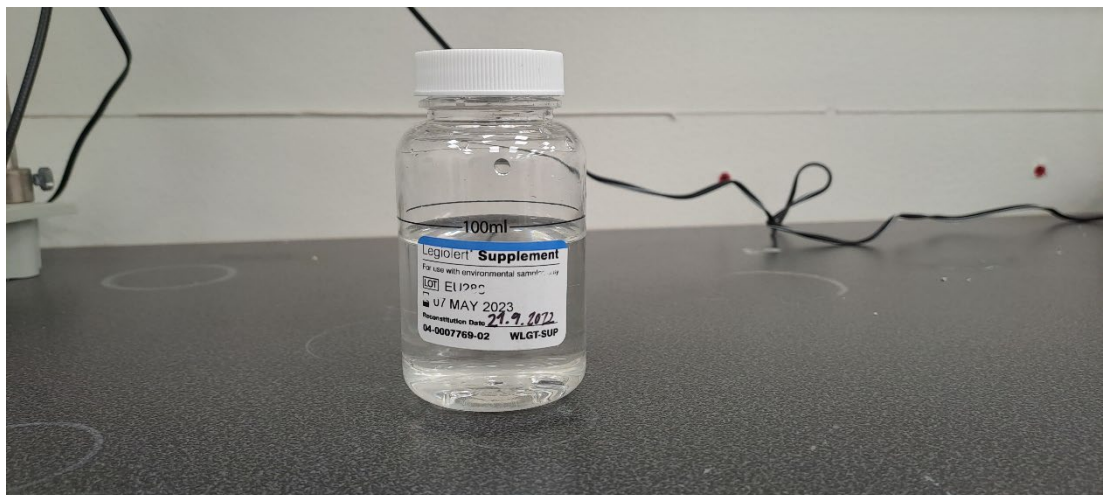
3. Tämä vaihe on valinnainen tässä tapauksessa. Virallisesti vesinäytteestä tulisi aina mitata veden kovuus, koska se vaikuttaa myöhemmin lisättävän Legiolert Supplement -liuoksen määrään. Suomessa kuitenkin vesi on aina pehmeää, joten mittaus on sinänsä tarpeeton. Halutessaan sen voi kuitenkin tehdä, ja opetella mittauksen tekoa. Astian sisällä on paperisia liuskoja, joista otetaan yksi. Tämä kastetaan näyteveeteen, jonka jälkeen paperin annetaan kuivua hetken. Liuskassa on neljä värillistä neliötä, jotka muuttavat väriään veden kovuuden mukaan. Astian kyljessä näkyy taulukko, johon liuskaa verrataan. Mitä enemmän vihreää, sitä pehmeämpää vettä. Mitä enemmän punaista, sen kovempaa vesi on. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)



4. Seuraavaksi tarvitaan 100 ml näyteastia. Nämä ovat IDEXXin kertakäyttöisiä astioita, jotka on tehty juuri tähän tarkoitukseen. Näytevettä kaadetaan tähän, ja katsotaan, että 100 ml tulee täyteen. Raja on melko tarkka, vettä ei saa olla liian vähän tai toisaalta liian paljon. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)



5. Vaahtoutumisenestoainetta lisätään muutama tippa (noin 2) näyteastiassa olevaan veteen. Tämä estää veden liiallisen vaahtoamisen. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)



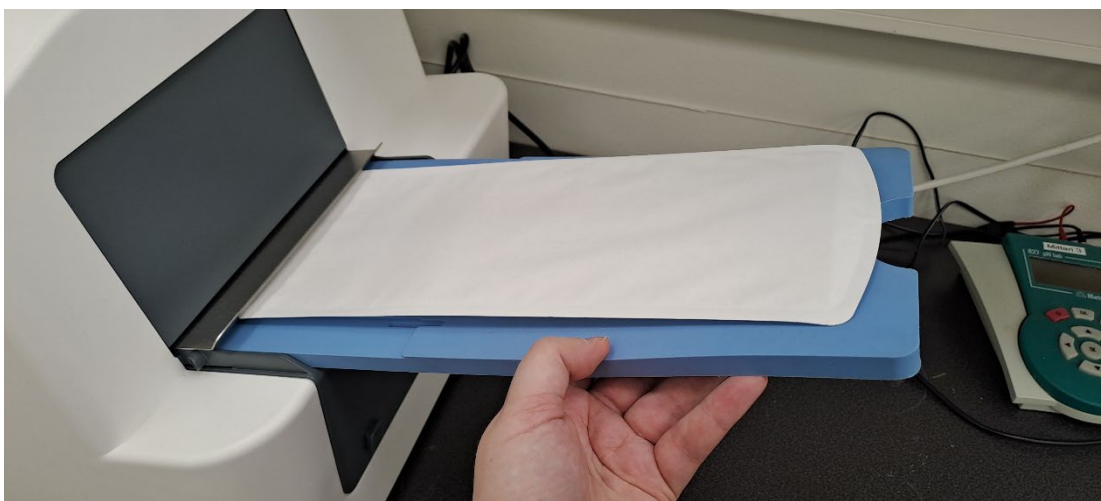
6. Legiolert Supplement -liuosta lisätään veden kovuuden mukaan. Pehmeään veteen lisätään 0,33 ml ja kovaan veteen 1,0 ml. Käytä apuna pipettiä. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)



7. Seuraavaksi tarvitset Legiolert -paketista tämän putkilon. Sisällä on jauhe-
mainen kasvualusta bakteereille, joka lisätään näyteastiaan. Putkilon ylä-
päässä näkyy kohta, joka saadaan auki napsauttamalla. Napsauta siis putkilo
auki näyteastian yläpuolella, ja kaada jauhe veden sekaan. Tämän jälkeen
näyteastiaa sekoitetaan kädessä, kunnes jauhe on liennut täysin. Sekoitus
on tärkeä vaihe, sillä jauhe täytyy saada liukenemaan kokonaan. Vedessä on
kellertävä sävy, mutta se on kuitenkin kirkasta. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)



8. Kun näyteastia on valmiina, tarvitset Legiolert -liuskan ja sille sopivan alus-
tan. Liuskan yläpää on avonainen, josta vesi voidaan kaataa sisään. Ota liuska
käteen, avaa sen yläpuoli ja kaada vesi liuskan sisälle. Varo kuitenkin, ettet
koske liuskan sisäpuolelle käsilläsi. Tässä vaiheessa liuskaa on hyvä na-
pautella sormin sen etupuolelta, jotta vedessä olevat ilmakuplat pääsevät pois.
Pyri saamaan kaikki ilmakuplat pois liuskasta. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)



9. Kun liuska on valmis, asettele se alustan päälle. Pidä liuskaa ja alustaa niin,
ettei vesi pääse valumaan ulos. Tarkista, että liuska asettuu alustalle oikein ja

kaikki näytekupat menevät kohdalleen. Tämän jälkeen liuska asetetaan suljijalaitteeseen kuvan osoittamalla tavalla. Työnnä alusta liuskoineen riittävän pitkälle, kunnes laite alkaa vetämään sitä itsestään. Odota, kunnes liuska on mennyt laitteen läpi. Seuraa liuskan liikettä laitteessa, ja vedä se ulos, kun liuskan liike pysähtyy. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)

Tarkista, että liuska on kiinnittynyt kunnolla eikä vettä ole vuotanut mistään. Valmis liuska laitetaan näytekupat ylöspäin lämpökaappiin. Lämpökaapin lämpötilan tulee olla 39°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) ja kosteusprosentin 60 %, jotta liuskassa oleva vesi ei pääse kuivumaan. Liuskaa pidetään lämpökaapissa 7 vuorokautta. Yleensä mahdolliset positiiviset tulokset alkavat näkyä vasta inkubointiajan loppupuolella. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)



10. 7 vuorokauden jälkeen liuskat ovat valmiina luettaviksi. Kuvassa näkyy vasemmalla kaksi negatiivista liuskaa, ja oikealla yksi, jossa on paljon positiivista. Liuskassa olevat näytekupat tulkitaan negatiivisiksi silloin, kun vesi on edelleen kirkasta. Positiivinen näytekuppa on silloin, kun vesi on muuttunut ruskeaksi ja/tai sameaksi. Joskus tulkinta voi olla haasteellista, mutta usein jo pelkästään veden selkeä sameus viittaa positiivisuuteen. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)

Jos näytteessä on positiivisia näytekuppia, niistä pystytään laskemaan legionellabakteerin määrä laboratorion löytyvän niin sanotun MPN-taulukon avulla. Liuskassa on 6 isoa ja 90 pientä näytekupppaa. Riippuen positiivisten näytekuppien määrästä, taulukko antaa arvot legionellan määrälle 100 millilitraa vettä kohden. Jos esimerkiksi isoja näytekupppia on 3 positiivista ja

pieniä 13, tulos olisi tällöin 23,3 MPN/ 100 ml. Litraa kohden tämä olisi 233 MPN/l. (IDEXX Legiolert -ohje, 2023)

LIITE 3 COLILERT -OHJE



1. Colilert -testaukseen tarvitset IDEXXin Quanti-Tray-alustan, joka näyttää tältä. (IDEXX Colilert -ohje, 2023)



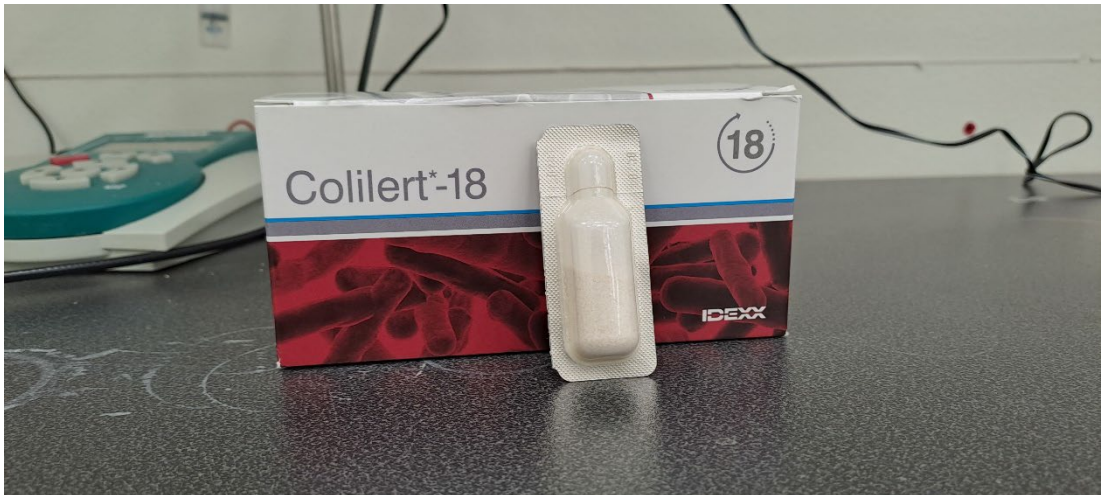
2. Alustan lisäksi tarvitset myös Quanti-Tray-liuskan. Varmista jo tässä vaiheessa, että liuska on ehjä. Mikäli liuskassa on esimerkiksi repeämiä tai jokin sivu ei ole tiivis, ota käyttöön uusi ja ehjä liuska. Liuska on hyvä nimetä sen mukaan, mikä näyte on kyseessä. Liuskan yläreunaan kannattaa kirjoittaa ainakin oma nimi/nimikirjaimet, näytteenottoaika ja päivämäärä. (IDEXX Colilert -ohje, 2023)



3. Seuraavaksi tarvitset 100 ml näyteastian. Nämä ovat IDEXXin kertakäyttöisiä astioita, jotka on tehty juuri tähän tarkoitukseen. Näytevettä kaadetaan tähän, ja katsotaan, että 100 ml tulee täyteen. Raja on melko tarkka, vettä ei saa olla liian vähän tai toisaalta liian paljon. Tässä vaiheessa, kun näytevesi on astiassa, on hyvä asettaa se hetkeksi vesihauteeseen lämpenemään. Aiemmin mainittu n. 46°C ja muutama minuutti useinkin riittää lämmittämään sen sopivaksi. (IDEXX Colilert -ohje, 2023)



4. Vaahtoutumisenestoainetta lisätään muutama tippa (noin 2) näyteastiassa olevaan veteen. Tämä estää veden liiallisen vaahtoamisen. (IDEXX Colilert -ohje, 2023)



5. Seuraavaksi tarvitset Colilert -paketista tämän putkilon. Sisällä on jauhemainen kasvualusta bakteereille, joka lisätään näyteastiaan. Putkilon yläpäässä näkyy kohta, joka saadaan auki napsauttamalla. Napsauta siis putkilo auki näyteastian yläpuolella, ja kaada jauhe veden sekaan. Tämän jälkeen näyteastiaa sekoitetaan kädessä, kunnes jauhe on liuennut täysin. Sekoitus on tärkeä vaihe, sillä jauhe täytyy saada liukenemaan kokonaan. (IDEXX Colilert -ohje, 2023)



6. Kun näyteastia on valmiina, tarvitset Quanti-Tray-liuskan ja sille sopivan alustan. Liuskan yläpää on avonainen, josta vesi voidaan kaataa sisään. Ota liuska käteen, avaa sen yläpuoli ja kaada vesi liuskan sisälle. Varo kuitenkin, ettet koske liuskan sisäpuolelle käsilläsi. Nämä liuskat ovat melko hankalia avattavia, sillä liuskan muoviosuus on todella jäykkä. Tässä vaiheessa liuskaa on hyvä napautella sormin sen etupuolelta, jotta vedessä olevat ilmakuplat pääsevät pois. Pyri saamaan kaikki ilmakuplat pois liuskasta. (IDEXX Colilert -ohje, 2023)



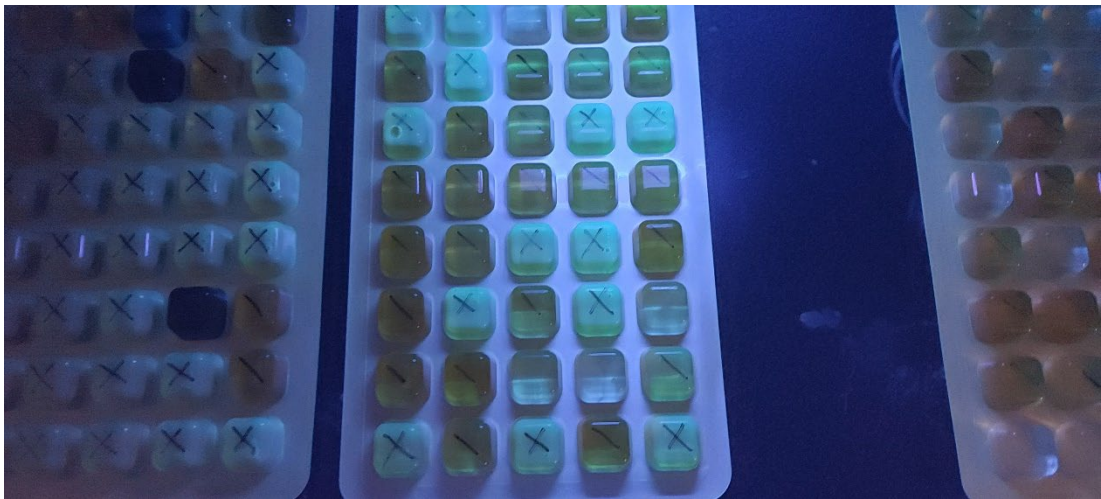
7. Kun liuska on valmis, asettele se alustan päälle. Pidä liuskaa ja alustaa niin, ettei vesi pääse valumaan ulos. Tarkista, että liuska asettuu alustalle oikein ja kaikki näytekuopat menevät kohdalleen. Tämän jälkeen liuska asetetaan suljelijalaitteeseen kuvan osoittamalla tavalla. Työnnä alusta liuskoineen riittävän pitkälle, kunnes laite alkaa vetämään sitä itsestään. Odota, kunnes liuska on mennyt laitteen läpi. Seuraa liuskan liikettä laitteessa, ja vedä se ulos, kun liuskan liike pysähtyy. (IDEXX Colilert -ohje, 2023)

Tarkista, että liuska on kiinnittynyt kunnolla eikä vettä ole vuotanut mistään. Valmis liuska laitetaan näytekuopat ylöspäin lämpökaappiin. Lämpökaapin lämpötilan tulee olla 35°C ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Tässä tapauksessa kosteusprosentilla ei ole niin suurta merkitystä. Liuskaa pidetään lämpökaapissa 18 tuntia. Tämä aikamäärä on hyvin tarkka. Jos tulokset liuskassa vaikuttavat epäselviltä, voi näytettä pitää lämpökaapissa vielä korkeintaan 4 tuntia. (IDEXX Colilert -ohje, 2023)



8. 18 tunnin jälkeen liuskat ovat luettavissa. Liuskoissa keltainen väri viittaa positiiviseen tulokseen. Joskus väri voi olla himmeä ja epäselvä, joten tällöin lisäaika lämpökaapissa voi olla tarpeen. Muista, että aika on korkeintaan 4 tuntia ylimääräistä. Yleensä 2 tuntia on riittänyt tuloksen selkeytymiseen.

Kaikki selkeästi keltaiset näytekuopat ovat positiivisia. Kirkkaat tai vain hyvin himmeästi värjäytyneet näytekuopat ovat negatiivisia. Nämä keltaiset näytekuopat kertovat koliformisista bakteereista. Mikäli liuskasta halutaan tutkia erikseen *E. coli* -bakteeri, tarvitaan apuun UV-lamppu. Laboratoriosta tulee tällöin sammuttaa valo, ja mennä mahdollisimman pimeään paikkaan. UV-lampulla osoitetaan liuskaan. Jos jokin näytekuoppa sisältää *E. colia*, se hohtaa kirkkaana ja erilaisena kuin muut näytekuopat. Kts. kuva alla. (IDEXX Colilert -ohje, 2023)



Myös nämä tulokset voidaan laskea MPN-taulukon avulla. Kyseisessä liuskassa on 51 näytekuoppaa. Riippuen jälleen positiivisten näytekuoppien määrästä, taulukko antaa arvot koliformisten bakteerien tai *E. colin* määrälle 100 millilitraa vettä kohden. Jos positiivisia näytekuoppia on esimerkiksi 25, tulos olisi tällöin 34,4 MPN/ 100 ml. Litraa kohden se olisi 344 MPN/l. (IDEXX Colilert -ohje, 2023)