

Mikrobiologisten tulosten laskeminen

1 Pesäkkeiden laskeminen maljoilta

1.1 Yleistä

Pesäkkeitä laskettaessa tarvittaessa apuna käytetään suurennuslasilla varustettua pesäkelaskijaa. Siihen kuuluu neliösenttimetrin suuruisiin alueisiin jaettu muovilevy sekä tumma pohjalevy. On varottava laskemasta pesäkkeiksi muita hiukkasia kuten liukeneamatonta näytettä, saostumia tai pölyä. Näiden erottamiseksi pesäkkeistä voidaan käyttää apuna esim. suurennuslasia tai stereomikroskooppia.

Pesäkkeet pyritään laskemaan vähintään kahdesta peräkkäisestä laimennoksesta ja tulos ilmoittamaan painotettuna keskiarvona. Laimennoksista viljellään vähintään kaksi rinnakkaismaljaa. Laskettavien pesäkkeiden maksimimäärässä/malja on menetelmäkohtaisia eroja. Esimerkiksi kokonaispesäkelukua määritettäessä lasketaan enintään 300 pesäkettä/malja, *Bacillus cereusta* määritettäessä korkeintaan 150. Pesäkelaskennan yläraja ilmoitetaan menetelmäohjeissa.

Pesäkkeet pyritään laskemaan heti inkuboinnin jälkeen. Mikäli tämä ei ole mahdollista, maljoja voidaan säilyttää jääkaappilämpötilassa enintään kolme vuorokautta. Pesäkkeiden tyypillinen ulkonäkö voi indikaattorialustoilla kärsiä kylmäsäilytyksestä, mutta lyhyt inkubointi optimilämpötilassa palauttaa tyypillisen ulkonäön.

Joissakin menetelmissä maljoilta lasketaan kaikki pesäkkeet, esimerkiksi kokonaispesäkelukua määritettäessä myös hiivat ja homeet. Toisissa menetelmissä pesäkkeiden tulee olla tietynlaisia, joko tyypillisiä ja/tai epäilyttäviä pesäkkeitä. Joissakin menetelmissä osalle pesäkkeistä suoritetaan varmistuskokeita ja varmistuneiden pesäkkeiden osuuden perusteella lasketaan määritettävän bakteerilajin tai -suvun osuus lasketuista tyypillisistä pesäkkeistä.

Pesäkkeiden laskija merkitsee tulosten yhteyteen nimikirjaimensa ja laimennokset, joista pesäkkeet on laskettu, sekä mahdolliset poikkeamat inkubointiajassa.

1.2 Pesäkkeiden laskentasäännöt

1.2.1 Pesäkkeitä enintään maksimimäärä kaikilla maljoilla

Kaikki pesäkkeet lasketaan ja tulokset merkitään muistiin.

1.2.2 Leviävät pesäkkeet

Jos alle neljännes maljasta on leviävän pesäkkeen peittämä, pesäkkeet lasketaan maljan muusta osasta ja tuloksen perusteella lasketaan koko maljaa vastaava pesäkemäärä. Petrimaljan (\varnothing 90 mm) sisäpinta-ala on 57 cm^2 .

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Mikrobiologisten tulosten laskeminen

Jos yli neljännes maljasta on leviävän pesäkkeen peittämä, malja hylätään. Laskentatulokseksi merkitään ”levinneet pesäkkeet”.

Leviävä pesäke lasketaan yhdeksi pesäkkeeksi, jos se joudutaan laskemaan (esim. pesäke keskellä, vain yksi pesäke maljalla ja se levinnyt). Samoin pesäkeketjut lasketaan yhdeksi pesäkkeeksi.

1.2.3 Ketjuuntuneet pesäkkeet ja pesäkerykelmät

Mikäli ketjuuntuneet tai rykelminä kasvavat pesäkkeet voidaan (selkeästi) laskea, lasketaan ne kaikki erikseen.

2 Tulosten laskeminen ja ilmoittaminen - pesäkelaskentatekniikka

2.1 Pesäkkeiden lukumäärä ei ylitä maksimimäärää ja ainakin yhdellä maljalla on vähintään 10 pesäkettä

Tulokset lasketaan painotettuna keskiarvona jakamalla pesäkkeiden lukumäärä tutkitulla näytetilavuudella. Painotettu keskiarvo lasketaan niiltä maljoilta, joilla on enintään maksimimäärä pesäkkeitä seuraavan kaavan mukaan:

$$N = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_n}{n_1 \times V_1 + n_2 \times V_2 + \dots + n_n \times V_n}$$

missä:

$C_1 + C_2 + \dots + C_n$ = pesäkkeiden lukumäärä jokaiselta tuloksen laskentaan käytettävältä maljalta

n_1 = ensimmäisen laskentaan käytetyn laimennoksen rinnakkaisten lukumäärä

n_2 = toisen laskentaan käytetyn laimennoksen rinnakkaisten lukumäärä

jne.

V_1 = ensimmäistä pesäkelukua vastaava näytetilavuus (alkuperäistä näytettä)

V_2 = toista pesäkelukua vastaava näytetilavuus (alkuperäistä näytettä)

jne.

Laskettaessa pesäkkeitä kahdesta peräkkäisestä laimennoksesta kahdelta rinnakkaismaljalta painotetun keskiarvon kaava on seuraava:

$$N = \frac{C_1 + C_2 + C_3 + C_4}{(2 \times 1 \text{ ml} + 2 \times 0,1 \text{ ml}) \times d}$$

d = ensimmäinen (pienempi) laskentaan käytetty laimennos

Eli yksinkertaistettuna pesäkkeiden lukumäärä ml:ssa tai g:ssa näytettä on laskettujen pesäkkeiden summa jaettuna tekijällä 2,2 ja kerrottuna ensimmäisen (pienemmän) laimennoksen laimennoskertomella. Mikäli rinnakkaismaljoja ei ole, mutta tulos lasketaan kahden peräkkäisen laimennoksen perusteella, pesäkkeiden summa jaetaan tekijällä 1,1.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Mikrobiologisten tulosten laskeminen

Esimerkki

Kokonaispesäkeluvun määrittäminen ($V = 1$ ml) laimennoksista 10^{-2} ($d = 10^{-2}$) ja 10^{-3} . Lasketut pesäkemäärät rinnakkaisilla maljoilla laimennoksessa 10^{-2} ($n_1 = 2$) ovat 80 ja 67 ja laimennoksessa 10^{-3} ($n_2 = 2$) ovat 9 ja 5.

$$N = \frac{80 + 67 + 5 + 9}{(2 \times 1 + 2 \times 0,1) \times 10^{-2}}$$

$$N = 7318 \text{ eli } 7,3 \times 10^3 \text{ tai } 7300 \text{ pmy/g tai ml}$$

Pesäkelaskennan yläraja on menetelmäkohtainen.

Saatu luku pyöristetään kahden merkitsevän numeron tarkkuudelle. Jos pyöristettävän numeron oikealla puolella oleva numero on 5, 6, 7, 8 tai 9, numero pyöristetään ylöspäin. Jos sen sijaan pyöristettävän numeron oikealla puolella oleva numero on 0, 1, 2, 3 tai 4, pyöristettävä numero jää ennalleen. Alle 100 olevat tulokset pyöristetään lähimpään viidellä jaolliseen lukuun. Tuloksia, jotka ovat alle 10, ei pyöristetä.

2.2 Pesäkkeitä yli maksimimäärän

Jos pesäkkeitä on yli maksimimäärä kaikilla maljoilla, tulos annetaan arviona. Tulos ilmoitetaan ">maksimimäärä x suurin laimennos".

Mikäli pesäkelukumäärä ensimmäisen laimennoksen laskettavilla maljoilla on suurempi kuin maksimimäärä, mutta pienempi kuin painotetun keskiarvon suurempi luottamusvälin arvo ja toisen laimennoksen laskettavilla maljoilla kasvaa vähemmän kuin 10 pesäkettä, tulos lasketaan ensimmäisen laimennoksen perusteella.

Mikäli määrittämissä:

300, luottamusvälin yläraja 324 pesäkettä

150, luottamusvälin yläraja 167 pesäkettä

100, luottamusvälin yläraja 114 pesäkettä

Esimerkki

Jos *Clostridium perfringens*ä määritettäessä laimennosten 10^{-2} maljoilla on tyypillisiä pesäkkeitä 165 ja 160 ja laimennosten 10^{-3} maljoilla 8 ja 12 pesäkettä, tulos lasketaan 2.1 kohdan mukaisesti huomioiden molemmat laimennokset.

2.3 Pesäkkeiden lukumäärä kaikilla laskettavilla maljoilla on alle kymmenen

Jos pesäkkeiden lukumäärä kaikilla laskettavilla maljoilla on alle 10, mutta yhteenlaskettu pesäkemäärä laskettavilla maljoilla on yli 4, lasketaan tulos kohdan 2.1 mukaan. Jos pesäkkeiden lukumäärä on 1 – 4, kyseessä on mikro-organismien toteaminen ennemmin kuin määrittäminen ja tulos ilmoitetaan seuraavasti:

Todettu / alle 40 pmy/g tai ml

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Mikrobiologisten tulosten laskeminen

Esimerkki

*Listeria monocytogenes*in määrittämisessä laimennoksen 10^{-1} rinnakkaismaljoilta laskettiin 2 ja 1 tyypillistä pesäkettä. Suuremmissa laimennoksissa ei esiintynyt pesäkkeitä. Tulos ilmoitetaan: *Listeria monocytogenes* todettiin / alle 40 pmy/g tai ml.

2.4 Ei pesäkkeitä

Jos yhdelläkään näytteestä viljellyllä maljalla ei kasva pesäkkeitä, tulos ilmoitetaan pienemmäksi kuin 1 x pienimmän laimennoskertoimen käänteisluku.

2.5 Leviävät pesäkkeet

Mikäli tulosta ei leviävien pesäkkeiden vuoksi saatu, merkitään "leviävät pesäkkeet".

2.6 Erityistapaukset

Jos määritettäessä tiettyä mikrobiryhmää tai -lajia maljoilla kasvaa runsaasti muuta kuin määritettävää mikrobia, ilmoitetaan tulos " ?-bakteeria $< 10^x$ ", jossa x on pienin laimennos, josta on voitu laskea ja/tai varmistaa se, että kohdebakteeria ei ole määritettävissä.

Esimerkki 1

Jos *Staphylococcus aureus* määritettäessä on tehty laimennokset 10^{-2} – 10^{-6} ja maljoja luettaessa todetaan, että maljoilla 10^{-6} ja 10^{-5} ei ole tyypillisiä pesäkkeitä ja maljoilla 10^{-2} – 10^{-4} kasvaa epätyypillisiä pesäkkeitä >150 pmy/malja, ilmoitetaan tulos *Staphylococcus aureus* $<10^5$ pmy/g tai ml näytettä.

Esimerkki 2

Jos *Staphylococcus aureus* määritettäessä on tehty laimennokset 10^{-2} – 10^{-6} ja maljoja luettaessa todetaan, että maljoilla 10^{-6} – 10^{-3} ei ole tyypillisiä pesäkkeitä ja laimennoksen 10^{-2} molemmilla maljoilla kasvaa >150 pesäkettä, joista osan on varmistettu kuuluvan lajiin *Staphylococcus aureus*, ilmoitetaan tulos *Staphylococcus aureus* yli 10^2 ja alle 10^3 pmy/g tai ml näytettä.

2.7 Varmistettujen pesäkkeiden osuuden laskeminen

Kun menetelmässä edellytetään varmistuskokeita, varmistettavat pesäkkeet, yleensä mahdollisuuksien mukaan viisi tyypillistä tai epäilyttävää pesäkettä jokaiselta tulosten laskemiseen käytettävältä maljalta, viljellään puhtaaksi ja varmistetaan menetelmäohjeen mukaisesti. Varmistettujen pesäkkeiden määrän perusteella lasketaan jokaiselta tulosten laskemiseen käytettävältä maljalta erikseen varmistuneiden pesäkkeiden osuus, joka pyöristetään kokonaisluvuksi.

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

a = varmistuneiden pesäkkeiden osuus

b = varmistuneiden pesäkkeiden määrä (yleensä ≤ 5)

A = varmistettujen pesäkkeiden määrä (yleensä 5)

C = laskettujen tyypillisten/epäilyttävien pesäkkeiden lukumäärä

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Mikrobiologisten tulosten laskeminen

Esimerkki

Bacillus cereuksen määrittäminen

Ensimmäisen laskentaan käytetyn laimennoksen (10^{-3}) rinnakkaismaljoilla tyypillisiä pesäkkeitä oli 66 ja 80 sekä toisen (10^{-4}) rinnakkaismaljoilla tyypillisiä pesäkkeitä oli 4 ja 7.

Pesäkkeiden varmistuksesta saatiin seuraavat tulokset:

66 pesäkkeestä varmistettiin 5 pesäkettä, joista 4 varmistui *B. cereukseksi*

$$a = \frac{4}{5} \times 66 \quad a = 53$$

80 pesäkkeestä varmistettiin 5 pesäkettä, joista 3 varmistui eli $a = 48$

4 pesäkkeestä varmistettiin 4 pesäkettä, joista 3 varmistui eli $a = 3$

7 pesäkkeestä varmistettiin 5 pesäkettä, joista 4 varmistui eli $a = 6$

$$N = \frac{53 + 48 + 3 + 6}{(2 + (0,1 \times 2)) \times 10^{-3}}$$

$N = 50455$ eli $5,0 \times 10^4$ pmy/g tai ml

2.8 Tuloksen ilmoittaminen

Tulos ilmoitetaan mikro-organismien määränä grammassa tai millilitrassa näytettä joko potenssilukuna esim. $1,5 \times 10^4$ tai kokonaislukuna 15 000 pmy/g tai ml.

3 Tulosten laskeminen ja ilmoittaminen – MPN-tekniikka

3.1 10-kertaiset laimennokset

Tarkemmat työohjeet ovat menetelmäkohtaisia.

Jos on tutkittu kolme peräkkäistä kymmenkertaista laimennosta, tulos lasketaan niiden positiivisten putkien antaman lukusarjan perusteella.

Jos on tutkittu enemmän kuin kolme peräkkäistä laimennosta, lukusarja valitaan seuraavien sääntöjen mukaisesti:

- 1) Ainakin yhden laimennoksen kaikki putket antavat positiivisen tuloksen.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Mikrobiologisten tulosten laskeminen

Valitaan suurin laimennos, jossa positiivisia putkia sekä sitä seuraavat kaksi suurempaa laimennosta. Jos kahta suurempaa laimennosta ei ole, valitaan kolme suurinta laimennosta, jossa on positiivisia putkia. Katso sääntö 3.

- 2) Ei ole yhtään sellaista laimennosta, joissa kaikki putket ovat positiivisia. Valitaan kolme suurinta laimennosta. Katso sääntö 3.
- 3) Jos sääntöjen 1 tai 2 mukaan saadussa lukusarjassa on enemmän kuin 1 laimennos, jossa ei ole yhtään positiivista putkea, valitaan näistä negatiiviset putket antaneista laimennoksista pienin sekä kaksi seuraavaksi pienintä laimennosta. Jos positiivisia putkia on vain ensimmäisessä laimennoksessa, valitaan se ja kaksi seuraavaa laimennosta.

Saadun lukusarjan perusteella katsotaan MPN-indeksi taulukosta (LIITE 1), se kerrotaan ensimmäisen putken laimennoskertoimella ja tulos ilmoitetaan MPN-arvona/g tai /ml. 95 %:n epävarmuusarvio liitetään tuloksiin.

3.2 Muut kuin 10-kertaiset laimennokset

Mikäli on käytetty muuta laimennossuhdetta kuin 10-kertaista laimennosta, tulos lasketaan kaavasta (Niemelä, 1983):

$$\text{MPN (mikro-organismeja/100 ml)} = 100 \times (P/\sqrt{(T \times N)})$$

P = positiivisten putkien määrä

T = siirrostetun näytteen kokonaistilavuus (ml)

N = negatiivisten putkien näytemäärä (ml)

4 Lähteet

Niemelä, S. (1983) Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations. NMKL, Report no 1, 2nd edition.

Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea. Raportti no 5/1994. Laadunvarmistusohjeita mikrobiologisille laboratorioille.

ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for the microbiological examinations.

5 Muutokset edelliseen versioon

05.6.2014 Lisätty ketjuuntuneiden pesäkkeiden ja pesäkerykelmien laskemishoje
Tämän ohjeen laatija: Tuula Johansson