

TEKNIIKAN JA LIIKENTEEN TOIMIALA

Laboratorioala

Tutkimuspainotteinen suuntautumisvaihtoehto

OPINNÄYTETYÖ

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* -BAKTEERIN OSOITTAMINEN KOSMETIIKASTA
- MENETELMÄN VALIDOINTI**

**Työn tekijä: Noora Kanerva
Työn valvoja: Carita Sivelä
Työn ohjaaja: Olli Pensala**

Työ hyväksytty: __. __. 2007

**Carita Sivelä
Lehtori**

ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tullilaboratorion mikrobiologiselle jaostolle. Haluan kiittää työni ohjaajaa mikrobiologi Olli Pensalaa sekä tullikemisti Elina Vatusta, laborantti Raisa Männikköä ja laborantti Laila Korpelaa. Lisäksi haluan kiittää työni valvojaa lehtori Carita Sivelää.

Kiitän myös luokkatovereitani Helsingin ammattikorkeakoulu Stadian TB04 - vuosikurssilta, jotka ovat tehneet opiskelujastani merkittävän ja erityiskiitos maailman parhaimmalle tutor-opettajalle Mia Ruismäelle sekä työni opponoitsijalle Aino Palvalle.

Haluan kiittää vanhempiani sekä henkisestä että rahallisesta tuesta opiskeluaikanani. Kiitokset myös poikaystävälleni Eljakselle, joka on ollut tukenani.

Helsingissä 6.11.2007

Noora Kanerva

OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

Tekijä: Noora Kanerva

Työn nimi: *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin osoittaminen kosmetiikasta - menetelmän validointi

Päivämäärä: 6.11.2007

Sivumäärä: 41 s. + 2 liitettä

Koulutusohjelma: Laboratorioala

Suuntautumisvaihtoehto: Tutkimuspainotteinen

Työn valvoja: Lehtori ja Mikrobiologi Carita Sivelä

Työn ohjaaja: Mikrobiologi Olli Pensala

Opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida kosmetiikan laadunvalvonnassa käytetyn mikrobin, *Pseudomonas aeruginosa*, osoitusmenetelmä. Menetelmä validoitiin Tullilaboratorion mikrobiologian jaostolle, joka tutkii elintarvikkeiden lisäksi myös kosmetiikkaa. Se käyttää kosmeettisten tuotteiden tutkimisessa amerikkalaista menetelmää.

Tavoitteena oli selvittää, onko jo käytössä oleva menetelmä toimiva kyseisen bakteerin suhteen ja voidaanko se akkreditoida. Validointia varten valittiin erilaisista kosteusvoide-ryhmistä kolme matriisia, joihin siirrostettiin kohdemikrobia sekä taustaflooraa. Ensimmäiseen matriisiryhmään kuului tuote, joka sisälsi vähän säilöntäaineita, toinen matriisi oli luontaistuote ja kolmas matriisi päivittäiskaupan tuote. Näytteet viljeltiin pintalevityksenä spesifisille *Pseudomonas Isolation Agar* -maljoille.

Menetelmän toistettavuuden laskemiseksi tehtiin seitsemän toistomäärittystä ja uusittavuuden laskemiseksi viisi toistomäärittystä viljelemällä rinnakkain toisen viljelijän kanssa. Tuloksista laskettiin standardipoikkeamat käyttäen kaikkia saatuja arvoja sekä poistamalla raja-arvot. Menetelmän toistettavuus ja uusittavuus olivat tyydyttäviä, sillä standardipoikkeamat eivät olleet kovin suuria.

Spesifisyyttä varten varmistettiin viisi tyypillistä ja epätyypillistä pesäkettä kaupallisella kitillä. Menetelmä oli spesifinen, sillä kohdemikrobi pystyttiin toteamaan kaikista näytteistä, häiritsevistä taustamikrobeista huolimatta. Menetelmän toteamisrajan selvittämiseksi näytteisiin lisättiin kolme eri bakteerisiirrostetta, joiden pitoisuudet olivat melko alhaiset ja lähellä toisiaan. *Pseudomonas aeruginosa* pystyttiin toteamaan alhaisimmalla tasolla. Tuloksien perusteella voidaan todeta, että menetelmän validointi onnistui.

Avainsanat: *Pseudomonas aeruginosa*, mikrobiologisen menetelmän validointi, kosmetiikan mikrobiologinen laatu

ABSTRACT

Name: Noora Kanerva	
Title: Validation of the method of Analysis of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Cosmetics	
Date: November 6, 2007	Number of pages: 41
Department: Laboratory Sciences	Study Programme: Research
Instructor: Carita Sivelä, Lecturer, Microbiologist	
Supervisor: Olli Pensala, Microbiologist	
<p>The purpose of the final year project was to validate a method to analyse <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in cosmetic products. The method was validated to the microbiological unit of Finnish Custom Laboratory which analyses foodstuff as well as cosmetics. Currently an American method is used to analyse cosmetics there.</p> <p>The aim of the study was to analyse how the method works. The matrixes were chosen from different types of cosmetic creams. The first matrix was a face lotion which had only little preservative. The second matrix was a natural product (bought from a natural product store) and the third matrix was part of daily consumer goods / an every-day lotion. The target microorganism, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and some background flora was added to the matrix which was then cultured in a specific agar.</p> <p>For repeatability, seven definitions were produced and for reproducibility five definitions with another person were done. Standard deviation was calculated from all results and also by erasing limiting values (outliers). The repeatability and the reproducibility were moderate because the standard deviations were quite low.</p> <p>Spesifity was analysed by inspecting five typical and atypical colonies with mercantile test system. The method was specified because <i>Pseudomonas aeruginosa</i> was detected despite the presence of the background flora. The limit of detection was low, because three low and quite similar quantities of bacteria were added to the matrix and <i>P. aeruginosa</i> was detected at the lowest level. The tests showed that the method was quite reliable and the validation was successful</p>	
Keywords: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , the validation of a microbiological method, the microbiological quality of cosmetics	

SISÄLLYS

ALKULAUSE

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

1	JOHDANTO	1
2	VALIDOINTI	2
2.1	Validointi osana laatujärjestelmää	2
2.1.1	<i>Laatujärjestelmät</i>	2
2.1.2	<i>Analyysimenetelmien validointi</i>	2
2.1.3	<i>Akkreditointi</i>	3
2.2	Mikrobiologisten menetelmien validointi	3
2.2.1	<i>Validoinnin vaiheet</i>	3
2.2.2	<i>Mikrobiologisten menetelmien erityispiirteitä</i>	3
2.2.3	<i>Mikrobiologisten ja kemiallisten menetelmien erot</i>	4
2.3	Validoinnin käsitteistö	4
2.3.1	<i>Validoitava menetelmä</i>	4
2.3.2	<i>Suureet</i>	5
3	KOSMETIIKAN MIKROBIT JA MIKROBIOLOGINEN LAATU	7
3.1	Yleistä kosmetiikasta ja hygieniatuotteista	7
3.2	Ihovoiteiden kemiallinen koostumus	7
3.3	Kosmeettisten tuotteiden mikrobiologinen laatu	8
3.3.1	<i>Laadunvalvonnan alkuvaiheet</i>	8
3.3.2	<i>Tilanne nykypäivänä</i>	9
3.4	Kosmeettisissa tuotteissa esiintyvät mikrobit	10
3.4.1	<i>Pseudomonas</i>	10
3.4.2	<i>Propionibacterium</i>	10
3.4.3	<i>Staphylococcus</i>	10
3.4.4	<i>Enterobacter</i>	11
3.4.5	<i>Hiivat ja homeet</i>	11
3.4.6	<i>Bacillus</i>	11
3.4.7	<i>Streptococcus</i>	11
3.5	Raja-arvot	12
3.6	Säilöntäaineet	13
3.7	Mikrobiologiset testimenetelmät	14
3.7.1	<i>Maljaviljelymenetelmä (APC)</i>	14
3.7.2	<i>Säilöntäaineiden tehokkuustestit</i>	14

4	VALIDOINNIN KOHDEBAKTEERI JA TAUSTAMIKROBIT	15
4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
4.1.1	<i>Pseudomonas-</i> suvun yleisiä ominaisuuksia	15
4.1.2	Virulenssi	15
4.1.3	Taudinkuva	15
4.1.4	Esiintyminen ja tartunta	16
4.2	Taustamikrobit	16
4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	17
4.2.2	<i>Proteus vulgaris</i>	17
5	VALIDOINTISUUNNITELMA	17
5.1	Menetelmän esittely	17
5.1.1	Menetelmän tarkoitus	17
5.1.2	Esirikastus	18
5.1.3	Viljely ja inkubointi	18
5.1.4	Maljojen lukeminen ja tulosten käsittely	19
5.1.5	Varmistusmenetelmä	19
5.2	Menetelmän vaatimukset ja validointi	19
5.2.1	Validoinnin tarkoitus	19
5.2.2	Validoinnin suorituksen periaatteet	20
5.2.3	Validoinnin tulosten tarkastelu	20
5.3	Mikro-organismit ja matriisit	20
5.3.1	Mikrobien hankinta	20
5.3.2	Testikantojen nuorennos ja pitoisuuden määrittäminen	21
5.3.3	<i>P. aeruginosa</i> -siirrosteen mikrobipitoisuuden valinta	21
5.3.4	Taustafloora-siirrosteen mikrobipitoisuuden valinta	21
5.3.5	Matriisien valinta	21
5.3.6	Matriisien tutkiminen	22
5.4	Mittaukset ja mittaustulosten käsittely	22
5.4.1	Mittaukset	22
5.4.2	Mittaustuloksista laskettavat suureet	22
6	VALIDOINNIN SUORITUS	23
6.1	Materiaalit	23
6.2	Työn suoritus	23
6.2.1	Testikannan pitoisuuden määrittäminen	23
6.2.2	Matriisien tutkiminen ja käsittely	26
6.2.3	<i>P. aeruginosa</i> -bakteerin lisäys matriisiin	26
6.2.4	<i>P. aeruginosa</i> -, <i>E. coli</i> - ja <i>P. vulgaris</i> -bakteerien lisäys matriisiin	26
6.2.5	Pesäkkeiden varmistaminen	27

7	VALIDOINNIN TULOKSET JA TULOSTEN ARVIOINTI	27
7.1	Mittaustulosten käsittely	27
7.2	Mittaustuloksista laskettavat suureet	34
7.2.1	<i>Toistettavuus</i>	34
7.2.2	<i>Uusittavuus</i>	35
7.3	Tulosten arviointi	36
7.3.1	<i>Toistettavuus</i>	36
7.3.2	<i>Uusittavuus</i>	37
7.3.3	<i>Spesifisyys</i>	37
7.3.4	<i>Toteamisraja</i>	38
8	PÄÄTELMÄT	38
	VIITELUETTELO	40

LIITTEET

Liite 1. Elatusaineet

Liite 2. Bakteerisiirrosteiden pitoisuudet

1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön aiheena on kosmeettisessa laadunvalvonnassa käytetyn bakteerin, *Pseudomonas aeruginosa*, toteamiseen kosmeettisista näytteistä käytettävän menetelmän validointi. Menetelmä validoidaan Tullilaboratorion mikrobiologiselle jaostolle. Tullilaboratorio on Mittatekniikan keskuksen akkreditoima testauslaboratorio, joka täyttää standardin (SFS-EN ISO/EC 17025) mukaiset akkreditointivaatimukset. Tullilaboratorio huolehtii tuonnin ja viennin valvonnasta ja valmisteverotukseen liittyvistä tehtävistä. Mikrobiologinen jaosto tutkii sekä maahantuotavien että maasta vietävien elintarvikkeiden ja käyttö- ja kulutustavaroiden mikrobiologista laatua.

Ensimmäiset kosmeettiset tuotteet valmistettiin ilman minkäänlaista mikrobiologista tietoa. Kokemuksen kautta kuitenkin opittiin, miten pystyttiin estämään tuotteiden pilaantuminen. Uudet löydökset ja keksinnöt kaikissa biologian tieteenaloissa mahdollistivat myös mikrobiologian kehittymisen. [1, s. 1.] Uraaurtavat mikrobiologit olivat aluksi ensisijaisesti huolissaan lopputuotteiden mikrobiologisista kontaminaatioista ja pyrkivät osoittamaan perinteisen maljaviljelyn avulla ettei kontaminaatiota ollut tapahtunut. 1960- ja 1970-luvulla kuitenkin kosmeettisten tuotteiden tutkiminen ja laadun parantaminen tuli entistä tärkeämmäksi, sillä useista eri tuotteista löytyi Gram-negatiivisia bakteereita, jotka aiheuttivat erilaisia infektioita. [6, s. 2.] Nykypäivänä kosmetiikan laadunvalvonta on paljon laajempaa kuin aikaisemmin. Siihen kuuluu eri menetelmien kehityksiä ja validointeja, säilöntäaineiden synteesejä, mikro-organismien tutkimista, immunologiaa ja bioteknologian käyttämistä materiaalien valmistamiseen. [1, s. 1.]

Pseudomonas aeruginosa on Gram-negatiivinen opportunistibakteeri. Sitä ei saisi esiintyä kosmeettisissa tuotteissa ollenkaan. *P. aeruginosa* -bakteerin lisäksi Tullilaboratoriossa kosmeettisista tuotteista määritetään sekä aerobisten mikrobien kokonaismäärä että homeet, hiivat, koliformibakteerit ja *Staphylococcus aureus*. Tullilaboratorio käyttää kosmetiikan tutkimisessa U.S. Food & Drug Administrationin Bacteriological Analytical Manual (BAM) menetelmäkokoelman menetelmää: Microbiological Methods for Cosmetics.

Validoinnissa käytetään edellä mainittua menetelmää. Validoinnin matriisiksi valitaan kolme erilaista kosteusvoidetta, joista ensimmäinen on vähän säilöntäaineita sisältävä tuote. Toinen matriisi kuuluu luontaistuotekosmetiikan

piiriin ja kolmas tuote on päivittäistavarakaupan kosteusvoide. Menetelmän toimivuuden selvittämiseksi näytteisiin lisätään *P. aeruginosa* -bakteeria ja taustaflooraksi *Escherichia coli*- ja *Proteus vulgaris* -bakteeria.

2 VALIDOINTI

Validointi on menetelmän kelpoisuuden osoittamista. Validoinnin tarkoituksena on tuottaa vertailuarvoja suureille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. [2, s. 1.]

2.1 Validointi osana laatujärjestelmää

Validoinnilla on iso merkitys yrityksen laatujärjestelmässä. Laatujärjestelmät edellyttävät, että käytetyt analyysimenetelmät on testattu ja todettu luotettavaksi.

2.1.1 Laatujärjestelmät

Laboratorioissa tehtävät tutkimukset ja niiden tulokset ovat merkittävässä asemassa kun tehdään erilaisia päätöksiä. Laboratorioanalyysien tulokset vaikuttavat lähes aina terveydellisiin, tuotannollisiin sekä usein myös oikeudellisiin päätöksiin. Tämän takia menetelmien on oltava luotettavia. Analyysien luotettavuus varmistetaan laboratorioden laatutoimintojen avulla. Laatutoiminnot perustuvat laatujärjestelmiin, jotka pohjautuvat kansainvälisiin standardeihin (ISO 9000 -standardit) ja ohjeistoihin (Good Laboratory Practise). Testaus- ja tutkimuslaboratoriot noudattavat yleensä ISO 17025-standardin vaatimuksia laatujärjestelmiensä luomisessa, jolloin tavoitteena on kansainvälisesti hyväksyttävän pätevyyden saaminen tiettyjen testausmenetelmien käyttämiseen. [3, s. 8 - 9.]

2.1.2 Analyysimenetelmien validointi

Laboratorioiden laatujärjestelmät edellyttävät, että käytetyt analyysimenetelmät on testattu ja todettu luotettaviksi. Tämän osoittaminen tulee tapahtua validoinnilla. Validointi on menetelmän kelpoisuuden todistamista suunnitelluilla mittaussarjoilla. Mittaussarjoilla saadaan vertailuarvoja suureille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Mikrobiologisten menetelmien validoinnissa tällaisia suureita ovat muun muassa suhteellinen totuus, oikeellisuus, toistettavuus, uusittavuus, toteamisraja, spesifisyys ja herkkyys. Validoinnin tuloksena syntyvä tieto ja olemassa oleva tausta-aineisto kerätään

yhteen ja niiden perusteella todetaan menetelmän soveltavuus suunniteltuun käyttötarkoitukseen. [2, s.1; 2, s. 8 - 9.]

2.1.3 *Akkreditointi*

Akkreditointi tarkoittaa testauslaboratorioiden pätevyyden toteamista. Se on kansainvälisiin kriteereihin perustuva menettelytapa, jonka avulla toimielimen pätevyys ja sen antamien todistusten uskottavuus voidaan luotettavasti todeta. Akkreditoinnin hakeminen on vapaaehtoista ja hakija voi itse määrittellä toiminta-alueen, jolle akkreditointia hakee. Suomessa akkreditointia hoitaa Mittatekniikan keskus (MIKES). Testaus- ja tutkimuslaitokset noudattavat yleensä SFS-EN ISO/IEC17025 -standardin vaatimuksia laatu järjestelmän luomisessa. [3, s. 8; 4.]

2.2 **Mikrobiologisten menetelmien validointi**

Menetelmien validointi jaetaan useisiin eri vaiheisiin. Aluksi on hyvä tehdä validointisuunnitelma. Lisäksi pitää muistaa huomioida mikrobiologisten menetelmien erikoispiirteet.

2.2.1 *Validoinnin vaiheet*

Menetelmien validointi voidaan jakaa eri vaiheisiin. Aluksi on hyvä tehdä validointisuunnitelma, jossa otetaan huomioon kaikki validoitavalle menetelmälle asetetut vaatimukset. Keskeisiä asioita validointisuunnitelmassa ovat matriisi, mikrobit ja niiden pitoisuus, mittausten lukumäärä, tarkkuus, aikataulu sekä käytettävä referenssi eli vertailumenetelmä. Mittaukset suoritetaan suunnitelman mukaisesti. Tuloksista lasketaan halutut parametrit ja niitä analysoidaan. Niiden perusteella selvitetään menetelmän toimivuus. [2, s. 11 - 14; 3, s. 14.]

2.2.2 *Mikrobiologisten menetelmien erityispiirteitä*

Mikrobiologisissa näytteissä olevat mikrobit ovat elävää materiaalia, joten näytteiden käsittelyssä tulee ottaa huomioon useita eri asioita. Näytteiden todellisia mikrobipitoisuuksia ei tiedetä, eivätkä ne pysy vakiona. Näytteistä tehdään sopivat laimennossarjat mikä on edellytyksenä sille, että maljoilta pystytään lukemaan yksittäispesäkkeiden määrä. Rinnakkaisten laimennosten maljojen välillä voi esiintyä suurtakin vaihtelua, ilman, että kyseessä on virhe. Mikrobiologiset menetelmät vievät yleensä päiviä, sillä maljojen inkubaatioaika vaihtelee yhdestä vuorokaudesta useampaan vuorokauteen. Siir-

rostamiseen käytettäviä mikrobikantoja varastoitaessa, niiden mikrobipitoisuus saattaa muuttua. Ongelmia aiheuttavat myös vaihtelut mikrobikantojen ominaisuuksien välillä, matriisin ominaisuudet, taustamikrobit ja monet muut vaikeasti määritettävät tekijät. [2, s. 2 - 3.]

2.2.3 *Mikrobiologisten ja kemiallisten menetelmien erot*

Kemialliset ja mikrobiologiset menetelmät poikkeavat toisistaan periaatteellisesti. Kemiallisessa analyysissä analyyyti pystytään erottamaan matriisista kemiallisilla menetelmillä, kuten esimerkiksi liuottamalla. Analyytin laimentaminen tapahtuu vasta erottelun jälkeen, jos siihen on tarve. Mikrobiologiassa asiat ovat toisin. Mikrobiologiassa näyte analysoidaan mikrobeineen, materiaaleineen ja häiritsevine taustoineen. Analyytin erottelu tapahtuu vasta kasvatusalustalla. Käytetyt kasvatusalustat ja -olosuhteet määräävät menetelmän spesifisyyden, johon vaikuttavat lisäksi tutkittavien mikrobikantojen ominaisuudet ja niiden vaihtelut. Toisin kuten kemiallisissa menetelmissä, mikrobiologisissa määryksissä näyte laimennetaan aluksi sopivaksi laimennosarjaksi. Laimennosarjojen tulee olla sellaisia, että alustoilta pystytään lukemaan yksittäispesäkkeiden lukumäärä. Siten solumäärien tulee olla muutamia kymmeniä, korkeintaan muutamia satoja tutkittavassa näytemäärässä. Tällöin rinnakkaisanalyysien pesäkemäärät voivat vaihdella suurestikin ilman, että kyseessä on virhe. [2, s. 2 - 3.]

2.3 **Validoinnin käsitteistö**

Validointiin liittyy useita suureita. Mikrobiologisen menetelmän validointisuureita ovat muun muassa suhteellinen totuus/oikeellisuus, toistettavuus, uusittavuus, toteamisraja, spesifisyys, herkkyys ja lineaarisuus.

2.3.1 *Validoitava menetelmä*

Validoitava menetelmä tarkoittaa menetelmää, jonka kelpoisuus halutaan osoittaa, jotta se voidaan ottaa käyttöön. Menetelmä voi olla kansainvälisesti hyväksytty menetelmä, kuten standardimenetelmä, jo olevassa olevan menetelmän muunnos tai kokonaan uusi menetelmä. Yleensä uudet menetelmät pohjautuvat uusiin teknillisiin sovelluksiin ja ne nopeuttavat ja helpottavat analyysin suorittamista edelliseen menetelmään nähden. Uusi menetelmä on myös yleensä taloudellisempi ja turvallisempi. [2, s. 3 - 5.]

2.3.2 Suureet

Validointiin liittyvien suureiden määritelmät poikkeavat hiukan toisistaan. Tässä validoinnissa käytettävät suureet pohjautuvat Elintarvikeviraston laatimiin mikrobiologisten menetelmien validointiohjeisiin. [2, s. 6.]

Oikeellisuus

Menetelmien antamien tulosten oikeellisuuden tutkiminen edellyttää tietoa analysoitavan mikrobin todellisesta pitoisuudesta. Koska mikrobiologiassa analyysi on elävää materiaalia, ei sen todellista pitoisuutta eikä validoitavan menetelmän antamien tulosten oikeellisuutta pystytä varmuudella määrittämään. Oikeellisuus määritetään käyttämällä siirrostettuja näytteitä, joiden ilmoitettua pitoisuutta pidetään oikeana tuloksena.

Suhteellinen oikeellisuus tarkoittaa referenssimenetelmän ja validoitavan menetelmän antamien tulosten vastaavuutta/lähekkäisyyttä tutkittaessa samoja näytteitä.

Virhepositiivisuus tarkoittaa validoitavan menetelmän antamia positiivisia tuloksia silloin, kun referenssimateriaali eli siirrostettu näyte ei sisällä tutkittavaa mikrobia. Virhenegatiivinen tulos tarkoittaa sitä, että tutkittava näyte sisältää mikrobia mutta validoitava menetelmä antaa negatiivisen tuloksen. [2, s. 6 - 7.]

Täsmällisyys

Menetelmän antamien tulosten täsmällisyyttä kuvaavat toistettavuus ja uusittavuus. Mikrobiologiassa analyysien täsmällisyyteen vaikuttaa merkittävästi tutkittavan näytteen mikrobipitoisuus; mitä pienemmistä pitoisuuksista on kyse, sitä epävarmempi on tulos. Täsmällisyyteen vaikuttavat mikrobiologisen työskentelyn erityispiirteisiin liittyvät virhelähteet.

Toistettavuus on peräkkäisten toistojen antamien tulosten lähekkäisyys tutkittaessa identtisiä näytteitä, kun analyysi on suoritettu samalla menetelmällä, samoissa olosuhteissa ja samojen henkilöiden toimesta lyhyellä aikavälillä. Uusittavuus on yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyys eri henkilöiden tutkiessa identtisiä näytteitä käyttäen samoja menetelmiä joko samassa tai eri laboratoriossa. [2, s. 7.]

Toteamisraja

Toteamisrajalla tarkoitetaan pienintä mikrobipitoisuutta, joka voidaan todeta luotettavasti. Toteamisrajaan vaikuttavat menetelmän selektiivisyys, spesifisyys, mikrobin tila näytteessä sekä itse näytematriisi mikrobeineen. Toteamisraja tulee määrittää erikseen jokaiselle tutkittavalle matriisille. Mikrobiologiassa toteamisraja määritetään yleensä vain kvalitatiiviselle menetelmälle. Mikrobiologiassa toteamisraja määritetään siirrostetuista näytteistä, jolloin pienin mahdollinen referenssimateriaalin tai siirrostetun näytteen mikrobipitoisuus on 1 - 5 solua tutkittavassa näytemäärässä; yleensä viisi solua. [2, s. 7.]

Spesifisyys

Spesifisyys tarkoittaa sekä kvantitatiivisen että kvalitatiivisen menetelmän kykyä löytää tutkittava mikrobi tai tutkittavat mikrobit näytteessä olevien häiritsevien tekijöiden vaikutuksesta huolimatta. Täydellisen spesifinen menetelmä toteaa vain analysoitavan mikrobin. Harvoin mikrobiologiset menetelmät ovat käytännössä täysin spesifisiä. Pesäkkeitä varmistamalla on opittava tunnistamaan tyypilliset pesäkkeet analyysiä häiritsevän mikrobiston joukosta pesäkkeitä varmistamalla. On otettava huomioon, että pesäkkeiden laskeminen/tunnistaminen on aina subjektiivista ja että virhepositiivisten ja virhenegatiivisten määrä riippuu matriisin mikrobifloorasta. [2, s. 8.]

Herkkyys

Herkkyys on menetelmän kyky todeta vähäiset vaihtelut määritettävien mikrobien pitoisuuksissa tietyssä materiaalissa. Herkkyys on keskeinen ja tärkeä menetelmän ominaisuus kun verrataan menetelmiä toisiinsa tai kun tehdään täydellistä validointia uutta menetelmää kehitettäessä. Mikrobiologisissa kvalitatiivisissa analyyseissä herkkyys kuvaa menetelmän kykyä havaita kohdemikrobi kun sitä on näytteessä. Validoitavan menetelmän herkkyys määritetään menetelmän antamien oikeiden positiivisten tulosten määrästä. Herkkyys ilmoitetaan yleensä prosenttiosuutena. [2, s. 8.]

3 KOSMETIIKAN MIKROBIT JA MIKROBIOLOGINEN LAATU

Kosmetiikka on osa nykyihmisen arkea ja sen historia juontaa kauas menneisyyteen. Kosmetiikkaa on käytetty jo muinaisessa Egyptissä. Käytämme kosmetiikkaa päivittäin, joten sen turvallisuus on hyvin tärkeää. Sitä valvovatkin useat tahot. Tullin lisäksi Kuluttajavirasto ja lääninhallitukset yhdessä kuntien terveystarkastajien kanssa valvovat, että merkinnät ovat oikein ja että koostumus on turvallinen.

3.1 Yleistä kosmetiikasta ja hygieniatuotteista

Kosmetiikka- ja hygieniatuotteisiin kuuluu useita tuoteryhmiä: pesuaineita, deodorantteja ja antiperspirantteja, voiteita ja maitoja, erilaisia meikkituotteita sekä hajuvesiä ja raikasteita. Ne koostuvat useista eri komponenteista: säilöntäaineista, väriaineista, rasva-aineista jne. Koska kosmetiikkatuotteita ei poisteta pesuaineiden tavoin heti huuhtelemalla, raaka-aineiden puhtauden ja itse prosessin valvonta on erityisen tärkeää. [5.]

Kosmeettiset tuotteet sisältävät yleensä vettä ja muita ainesosia, jotka mahdollistavat mikrobien kasvun tuotteissa. Validoinnin matriiseina käytetään erilaisia kosteuttavia ihovoiteita joten sen tuoteryhmän peruskoostumuksia käsitellään vähän tarkemmin seuraavassa kappaleessa.

3.2 Ihovoiteiden kemiallinen koostumus

Voiteet muodostuvat yleensä kahdesta eri faasista, ulko- ja sisäfaasista. Ulompi faasi on yleensä vesi tai vesiliuos, sisäfaasi sisältää yleensä öljyjä, vahoja, rasvoja tai muita öljyliukoisia aineita. [5.]

Ihovoiteissa käytetään myös pyrrolidonikarboksyylihappoa, joka on ihon sarveisaineen hajoamistuote, jota lisätään joihinkin ihovoiteisiin, koska se sitoo vettä. [6] Säilöntäaineina käytetään usein sorbiinihappoa, formaldehydiä, isotiatsolinonia, bentsoehappoa ja dibromosyanobutaania. Lisäksi voiteissa käytetään hajusteita, jotka voivat myös olla säilöntäaineiden tavoin ihoa ärsyttäviä aineita. Muita voiteiden komponentteja ovat väriaineet ja E-vitamiini. Rasvaisimmissa voiteissa käytetään myös erilaisia luonnosta peräisin olevia öljyjä. [5.]

3.3 Kosmeettisten tuotteiden mikrobiologinen laatu

Kosmetiikkaa on valmistettu kautta aikojen, mutta sen mikrobiologiseen puhtauteen on alettu kiinnittämään tarkempaa huomiota vasta 1960-luvulla. Nykypäivänä kosmetiikkatehtaat on suunniteltu siten, että niissä on minimoitu kontaminaation vaara. Lisäksi tietoa on aikaisempaa enemmän.

3.3.1 Laadunvalvonnan alkuvaiheet

Kosmeettisten tuotteiden mikrobiologiset tutkimukset tulivat entistä tärkeämmäksi 1960- ja 1970-luvulla, kun ilmeni, että käsivoiteissa oli Gram-negatiivisia bakteereita, jotka olivat aiheuttaneet infektioita. Lisäksi oli todettu, että silmänympärysalueelle laitettavissa kosmeettisissa tuotteissa esiintyi bakteerien aiheuttamia kontaminaatioita. Asiaa alettiin tutkia tarkemmin ja kontaminaation syyt saatiin jäljitettyä. Niitä oli kolme: huolimattomuus tuotteen tuotannon aikana, huolimattomuus tuotteen purituksen/pakkauksen yhteydessä ja tehottomat säilöntäaineet. [1, s. 2 - 3.]

Kun tohtori Lars Kallings julkisti vuonna 1965 raporttinsa lääkeaineiden ja vauvatakkien mikrobiologisesta sisällöstä, nousi kosmeettisten tuotteiden mikrobiologinen laatu esille. Vaikka monilla alan yrityksillä oli tuohon aikaan jo melko tehokkaat mikrobiologisen laadun valvontamenetelmät, oli menetelmien ja säilöntäaineiden kuitenkin vielä kehityttävä ja parannuttava. Seuraavien 15 vuoden aikana raportoitiin sekä USA:ssa että Euroopassa tapauksista, joissa kosmeettisista tuotteista oli löydetty mikrobiologisia kontaminaatioita.

R. M Baird tutki 147 käyttämätöntä näytettä, jotka oli ostettu Englannista 1974. Näistä tuotteista jopa 99:stä löytyi erilaisia bakteereita. Gram-negatiivisia bakteereita eristettiin 6,1 % näytteitä. *Pseudomonas* -suvun bakteereja löydettiin 4,1 % tuotteita. Lisäksi *P. maltophiliaa* kasvoi jopa $7 * 10^5$ pesäkettä grammassa maskaraa. [1, s. 44 - 45.]

Taulukossa 1 on esitelty kosmetiikasta löydettyjä Gram-negatiivisia sauva-bakteereita.

Taulukko 1. Kosmeettisista tuotteista v. 1974 Bairdin löytämät Gram-negatiiviset bakteerit [1, s. 45]

Kontaminaatio	Tuote	Organismien lukumäärä (g ⁻¹ tai ml ⁻¹)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lanolikäsirasva	1,2 X 10 ³
<i>P. maltophilia</i>	Maskara	7,0 X 10 ⁵
<i>P. pseudoalkaligenes</i>	Puhdistusmaito	3,1 X 10 ⁴
<i>P. pseudoalkaligenes</i>	Hiusvoide	1,9 X 10 ⁴
<i>P. fluorescens</i>	Hiusöljy	4,0 X 10 ⁴
<i>P. putida</i>	Puhdistusgeeli	2,5 X 10 ⁴
<i>Moraxella osloensis</i>	Kosteusvoide	1,3 X 10 ³
<i>Enterobacter cloacae</i>	Hammasvoide	2,3 X 10 ⁵
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Hammaspulveri	3,4 X 10 ⁶
<i>K. oxytoca</i>	Hammaspulveri	
<i>Erwinia herbicola</i>	Hammaspulveri	
<i>Enterobacter cloacae</i>	Hammaspulveri	

Vuosina 1979 - 1983 kontaminoituneet maskarat aiheuttivat silmätulehduksia. Kontaminaation syyksi selvisi se, että säilöntäaineet heikkenivät käyttämättömissä maskaroissa ajan myötä ja näin ollen mikrobit pääsivät lisääntymään tuotteissa. [1, s. 44 - 45.]

3.3.2 Tilanne nykypäivänä

Opinnäytetyöni aiheesta ei löydy päivitettyä tietoa, joten otin yhteyttä Lume Groupin laadunvarmistuspäällikköön Eeva Niemelään. Hänen mukaansa

mikrobiologisen laadunvalvonnan kannalta voidaan erotella raaka-aineet, pakkausmateriaalit, valmistus ja valmiit tuotteet. Raaka-aineongelmat liittyvät usein luonnosta eristettyihin aineisiin. Pakkausmateriaalien ongelmat liittyvät usein niiden alkuperään ja pakkaustapaan. Ongelmat valmistuksessa johtuvat usein hygieniasta ja/tai valmistusmenetelmästä. Lopputuotteiden osalta haastavaa on löytää oikeat säilöntäaineet itse tuotteen, sen säilyvyyden ja käytön kannalta. Tällä alueella lainsäädäntö rajoittaa valintamahdollisuuksia. Esimerkiksi Lumene Group toimii uudessa tehtaassa, jossa hygieniariskit on minimoitu jo tilojen suunnittelussa ja laitehankinnoissa. Toki myös tietoa on ollut menneitä aikoja enemmän niin viranomaisten taholta kuin tieteellistäkin faktaa. Jokapäiväisiä mikrobiologisia ongelmia ei siis esiinny ainakaan heillä. [7.]

3.4 Kosmeettisissa tuotteissa esiintyvät mikrobit

Kosmetiikkatuotteissa esiintyy useita erilaisia mikrobeja. Seuraavissa alaot-sikoissa on lueteltuna ja lyhyesti esiteltynä kirjallisuudessa esitetyt mikrobit.

3.4.1 *Pseudomonas*

Pseudomonas -suvun bakteerit ovat Gram-negatiivisia, aerobisia sauvabakteereja. *P. aeruginosa* on opportunistipatogeeni, joka on aiheuttanut kosmeettisten tuotteiden kontaminaatioita josta on seurannut erilaisia infektioita tuotteiden käyttäjillä. [1, s. 418.]

3.4.2 *Propionibacterium*

Propionibakteerit ovat anaerobisia Gram-positiivisia bakteereita, jotka eivät tuota itiöitä. Niitä löytyy tyypillisesti karvatuppien juurelta sekä ihon talirauhasista. *Propionibacterium acnes* on varmaankin tunnetuin suvun bakteereista, sillä se on yksi aknen aiheuttajista. [1, s. 441.]

3.4.3 *Staphylococcus*

Jotkut *Staphylococcus* -sukuun kuuluvat bakteerit, kuten esimerkiksi *Staphylococcus aureus* tuottavat erilaisia kudosta tuhoavia entsyymejä ja proteiinimyrkkyjä. *S. aureus* on nenänielun normaaliflooraa ja se on myös patogeeni. *S. epidermis* on ihon normaaliflooraa ja se on opportunistipatogeeni. Se voi aiheuttaa märkäpaiseita ja verenmyrkytyksen. [1, s. 417 - 418.]

3.4.4 *Enterobacter*

Enterobakteerit ovat iso heterogeeninen bakteeriryhmä, johon kuuluu useita eri bakteereita. Esimerkiksi *Escherichia coli* on fakultatiivisesti anaerobinen Gram-negatiivinen sauva, jota esiintyy sekä ihmisten että eläinten suolistossa. Jotkut *E. coli* -bakteerin tyypeistä ovat nopeasti leviäviä ja toksisia. *Klebsiella pneumoniae* ja *E. coli* voivat saastuttaa kosmeettiset tuotteet jo tuotantoprosessin aikana. Niitä on eristetty useista kontaminoituneista tuotteista. [1, s. 9 ja 418.]

3.4.5 *Hiivat ja homeet*

Candida albicans kuuluu *Saccharomycetaceae* -heimoon. Se on ovaalinmuotoinen hiiva, jota esiintyy normaalifloorana ruoansulatuskanavassa, iholla ja naisten genitaalialueella. Se on opportunistipatogeeni joka ei aiheuta terveellä ihmisellä yleensä mitään, mutta esimerkiksi antibioottikuurin yhteydessä, ärtyneissä ihon kohdissa ja/tai immuunivasteen heikentyessä siitä voi tulla patogeeni. Palovammapotilaille *Candida albicans* voi olla hengenvaarallinen. [1, s. 478.]

Homeet, kuten esimerkiksi *Penicillium* ja *Aspergillus* ovat kaikkialla läsnä ja ne voivat pilata kosmetiikan kasvustoillaan. [1, s. 9.]

3.4.6 *Bacillus*

Bacillus -suvun bakteerit muodostavat itiöitä. Ne kestävät kuumaa, ionisoivaa säteilyä ja muita menetelmiä, jotka inaktivoivat vegetatiivisia soluja. Jotkut kyseisen suvun bakteerit ovat myös resistenttejä säilöntäaineille, mikä aiheuttaa ongelmia kosmeettisten tuotteiden valmistusprosessissa. Kirjallisuudessa on yhä useammin *Bacillus* -suvun lajin todettu muodostavan toksineja, joten niiden merkitys myös kosmeettisten tuotteiden laadunvalvonnassa voi entisestään korostua [1, s. 9.]

3.4.7 *Streptococcus*

Streptococcus -suvun bakteereista osa on patogeneja, esimerkiksi *S. pyogenes*, joka aiheuttaa hengitystietulehduksen. *S. salivarius* ja *S. mutansia* löytyy usein suusta ja ne aiheuttavat myös hammasplakkia. [1, s. 9.]

3.5 Raja-arvot

Kosmeettisten tuotteiden suhteen ei ole olemassa yleisesti hyväksyttäviä raja-arvoja. Tullilaboratoriossa sovelletaan useista eri alan kirjoista ja maiden farmakopioista löytyviä arvoja tai suosituksia. Nämä liittyvät yleisesti lääketieteellisuuden tuotteisiin, mutta osin niitä voidaan soveltaa myös kosmeettisiin tuotteisiin. Yleisesti voidaan sanoa, että patogeenejä tai opportunistipatogeenejä ei saisi esiintyä ainakaan silmänympärysalueen tuotteissa tai lapsien ihonhoitotuotteissa. Taulukossa 2 on esitelty eri tuoteryhmien osalta mitkä bakteerit ovat kiellettyjä niissä.

Taulukko 2. Ei-hyväksytyt mikrobit kosmeettisissa sekä lääketieteellisissä tuotteissa [1, s. 46.]

Tuoteryhmä	Ei-hyväksytty bakteeri	Yleensä ei-hyväksytty bakteeri
Steriilit tuotteet	Ei saa esiintyä mitään organismeja	
Silmänympärysalueen tuotteet	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>S. liquifaciens</i>
Ei-steriilit suunalueen tuotteet	Suolistoperäiset bakteerit; <i>Salmonella</i> sp., <i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., proteolyttinen <i>Clostridium</i> sp., enterotoksigeeninen <i>S. aureus</i> , patogeeniset hiivat (<i>C. albicans</i>) ja mykotoksiineja tuottavat sienet
Ei-steriilit päivittäistavara-tuotteet	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>S.marcescens</i> , <i>S. liquifaciens</i>	<i>P. putida</i> , <i>P. multivorans</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. novyi</i>
Genitaalialueen tuotteet	<i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> sp., <i>S. marcescens</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>P. nutrivorans</i>	<i>Klebsiella</i> sp., <i>Acinetobacter anitratus</i> , <i>A. calcoacetius</i>

CTFA (Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association) suosittelee raja-arvoja, jotka on esitelty taulukossa 3. Lisäksi sama ohjeistus vaatii, ettei missään tuotteessa saa olla terveydelle vaarallisia bakteereita. Ohjeet sopivat parhaiten vedettömille tuotteille, sillä veden puute hillitsee ja estää

yleensä mikrobien kasvun. Tuotteissa, jotka sisältävät vettä, ei saisi olla vegetatiivisia mikro-organismeja. Poikkeuksena sääntöihin on säilöntäaineettomat tuotteet. Tuotteissa saa esiintyä vähän hyväksytyjä bakteereita, mutta silloin tuotteen valmistajan pitää pystyä osoittamaan, ettei tuotteen fysiko-kemiallinen koostumus edesauta mikrobien kasvua [1, s. 109.]

Taulukko 3. CTFA:n raja-arvot [1, s. 109.]

Tuote	Raja-arvo (pmy/g, pmy/ml)
Lasten kosmetiikka	< 500
Silmänalueelle käytettävä kosmetiikka	< 500
Muu kosmetiikka	< 1000

Erilaisista lääketieteellisistä julkaisuista löytyy lisäksi raja-arvoja, jotka ovat melko lähellä toisiaan. Yleisesti voidaan sanoa, että tuotteissa joita käytetään ärsyntyneelle tai herkälle iholle ei saa esiintyä *Enterobacteriaceae* -suvun bakteereita, *P. aeruginosa*- tai *S. aureus* -bakteereita. Sallittujen mikrobien kokonaismäärä saa olla enintään 10^2 - 10^3 pmy/g välillä. Muissa kuin herkän ihon tuotteissa sallitaan kokonaisbakteereita enintään 10^3 - 10^4 pmy/g grammassa tuotetta. *Enterobacteriaceae* -suvun bakteereita sekä *P. aeruginosa*- ja *S. aureus* -bakteereita ei saisi esiintyä ollenkaan 1 grammassa tai millissä muita tuotteita. [8; 9; 10]

3.6 Säilöntäaineet

Bakteerien, homeiden ja hiivojen kasvu riippuu useista kemiallisista ja fysiologisista tekijöistä. Kosmeettisissa tuotteissa on yleensä vettä ja muita ainesosia, joita mikro-organismit tarvitsevat lisääntyäkseen. Säilöntäaineet estävät niiden kasvun.

Kosmeettisissa tuotteissa käytetään erilaisia säilöntäaineita. Niillä on periaatteessa kaksi päätarkoitusta: estää kosmeettisten tuotteiden pilaantuminen sekä tuhota iholta ei-toivottuja bakteereita ja sieniä.

Yleisimmät ja tunnetuimmat säilöntäaineet ovat bentsoe- ja salisyylihappo, sekä näiden johdokset. Tärkeimpiä näistä ovat paraoksibentsoehappo ja sen kemialliset johdokset, lähinnä esterit, joista käytetään myös nimitystä parabeenit tai nipaesterit. [11.]

3.7 Mikrobiologiset testimenetelmät

Mikrobiologisia perustestimenetelmiä on kaksi. Ensimmäinen on mikrobien määrittäminen raakamateriaaleista ja valmiista tuotteista normaalilla maljaviljelymenetelmällä eli APC:llä (engl. aerobic plate count). Toinen on säilöntäaineiden tehokkuustesti, jossa tutkitaan säilöntäaineen minimimäärä, jolla saadaan haluttu ja tarvittu suoja mikrobeja vastaan. [1, s. 491.]

3.7.1 *Maljaviljelymenetelmä (APC)*

APC on menetelmä, jolla määritetään elinkykyisten mikro-organismien määrä maljoilla, joissa näytettä on viljelty sopivissa olosuhteissa. Tällöin kyse on yleensä kahden vuorokauden aerobisesta viljelystä + 30 - 35° C lämpötilassa standardikasvatusalustoilla tai kasvatusliemissä kuten esimerkiksi SMA- tai TSA-agarilla. Kaikki mikro-organismit eivät kuitenkaan kasva edellä mainituissa olosuhteissa, joten APC ei aina todellisuudessa kerro kuinka paljon mikro-organismeja todellisuudessa kasvaa näytteessä. [1, s. 492.]

3.7.2 *Säilöntäaineiden tehokkuustestit*

Säilöntäaineiden tehokkuutta voidaan testata useilla eri menetelmillä. Metodeihin kuuluu standardisoidut menetelmät: USP- metodi, CTFA- metodi, brittiläisen farmakopean metodi sekä nopeat menettelytavat: lineaarinen regressio, kiihdytetty säilöntäainetestit sekä presumptiivinen altistuskoe. Tyypillistä kaikille edellä mainituille metodeille on käytetyt organismit ja niiden elvyttäminen sekä APC:n käyttäminen. Eroavuudet metodien välillä on käytetyt kasvatuslämpötilat, kasvatusajat ja altistuskokeiden käyttö. [1, s. 497.]

4 VALIDOINNIN KOHDEBAKTEERI JA TAUSTAMIKROBIT

Validoinnissa käytettiin *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria. Taustafloorana käytettiin *Escherichia coli* ja *Proteus vulgaris* -bakteereita.

4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa on opportunistipatogeeni, joka voi aiheuttaa vakavia infektiota.

4.1.1 *Pseudomonas*-suvun yleisiä ominaisuuksia

P. aeruginosa kuuluu *Pseudomonadaceae* -heimoon. *Pseudomonas* -suvun bakteereita löytyy laajalti ympäristöstä, kuten vesistöistä ja maaperästä. *Pseudomonas* -bakteerit ovat Gram-negatiivisia, yleisesti oksidaasipositiivisia, aerobisia sauvabakteereja, jotka ovat kooltaan 0,5 - 1,0 x 1,5 - 5,0 µm. Suurin osa niistä ei kykene kasvamaan happamassa ympäristössä (pH ≤ 4,5) mutta muuten niiden kasvuvaatimukset ovat erittäin vähäiset. [12, s. 95.]

P. aeruginosa -bakteerin optimikasvulämpötila on +37 °C, mutta se pystyy kasvamaan myös 42 °C:ssa. Se on kestävä ulkoisia olosuhteita vastaan. Se kasvaa hyvin kaikissa luonnon vesissä ja lisääntyy nopeasti jopa kertaalleen tislatussakin vedessä. Tavallisimmat desinfiointiaineet eivät tehoa *Pseudomonas* -suvun bakteereihin, sillä ne pystyvät jopa kasvamaan siinäkin. Ne ovat luonnostaan erittäin antibioottiresistenttejä, ja R-tekijöiden avulla ne voivat helposti muuttua vielä resistentimmiksi. [13, s. 270.]

4.1.2 Virulenssi

P. aeruginosa -bakteerin virulenssi eli taudinaiheutuskyky perustuu useisiin eri tekijöihin. Se pystyy tuottamaan erilaisia entsyymejä ja toksineja. Kaksi merkittävintä niistä on eksoentsyymi S ja eksotoksiini A. Lisäksi sen morfologiset ominaisuudet vaikuttavat myös sen virulenssiin. [1, s. 419 ja 435.]

Sen resistentti antibiootteja kohtaan johtuu R-plasmidista (engl. resistance transfer plasmid). R-plasmidi kantaa geenejä, jotka koodaavat tapahtumaa, joka tekee antibiootit ei-toksisiksi. [14, s. 371.]

4.1.3 Taudinkuva

P. aeruginosa aiheuttaa harvoin sairauksia terveillä henkilöillä, mutta se voi kolonisoida hengitysteiden ja ruoansulatuskanavan limakalvoja sairaalapotiti-

lailla, joilla vastustuskyky on heikentynyt. Se aiheuttaa kolmen tyyppisiä vakavia infektioita, jotka on esitelty taulukossa 4. *Pseudomonas aeruginosa* onkin yleinen ja vaarallinen infektioiden aiheuttaja erityisesti sairaaloissa.

Taulukko 4. *Pseudomonas aeruginosan* aiheuttamat infektiotyypit [1, s. 419.]

Infektion laatu	Kohde-elin	Seuraukset
Akuutti ja paikallinen infektio	Silmä	Sarveiskalvon vauriot
Krooninen ja paikallinen infektio	Keuhkot (potilailla, joilla on kystinen fibroosi)	Keuhkoinfektio
Disseminoinut infektio	Iho (palovammapotilailla)	Tulehdus

4.1.4 Esiintyminen ja tartunta

P. aeruginosa -bakteeria esiintyy melkein kaikkialla ympäristössä varsinkin kosteilla alueilla. Se voidaan myös eristää iholta, kurkusta tai terveen ihmisen ulosteesta. *P. aeruginosa* kolonisoii usein sairaalan ruoat, lavuaarit ja hanat sekä sairaalalaitteita. Näin se pääsee leviämään sairaalassa ja aiheuttaa infektioita ihmisille, joilla on heikentynyt vastustuskyky. Se leviää potilaasta toiseen potilaaseen oksennuksen ja kontaminoituneen ruoan ja juoman välityksellä.

Tarttuessaan se aiheuttaa vaarallisen infektion ihmisen silmässä joka saattaa johtaa jopa koko silmän menetyksen. Lisäksi se voi aiheuttaa erilaisia ihoinfektioita esimerkiksi palovammapotilailla ja Aids-potilaille. [15; 16.]

4.2 Taustamikrobit

Yksi validoinnin käsitteistä on spesifisyys, joka tarkoittaa sitä, että menetelmällä on kyky löytää tutkittava mikrobi häiritsevien mikrobien joukosta. Taustaflooraksi valittiin kaksi mikrobia, *Escherichia coli* ja *Proteus vulgaris*, joista tehtiin noin 1000 pmy/g mikrobisiirrostet, jotka siirrostettiin tutkittavan kohdebakteerin, *P. aeruginosan*, kanssa matriiseihin.

4.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli kuuluu enterobakteerien sukuun. Se on Gram-negatiivinen fakultatiivisesti anaerobi sauvabakteeri. *E. coli* tuottaa enterotoksiineja ja muita aineita, jotka tekevät sen virulenssikyvystä voimakkaan. Se aiheuttaa esimerkiksi ripulia, virtsatieninfektioita sekä sairaalassa oleville heikkokuntoisille ihmisille verenmyrkytyksiä ja aivokalvontulehdusta. [12, s. 179.]

4.2.2 *Proteus vulgaris*

Proteus -suvun bakteerit ovat suoria sauvanmuotoisia bakteereita. Ne ovat Gram-negatiivisia ja kooltaan $0,4 - 0,8 \times 1 - 3 \mu\text{m}$. Niiden optimikasvulämpötila on $+37 \text{ }^\circ\text{C}$. Niitä esiintyy ihmisen ja eläinten suolistossa sekä lannassa että maaperässä ja saastuneissa vesistöissä. Ihmiselle patogeeniset *Proteus* -suvun bakteerit aiheuttavat virtsatieninfektioita sekä erilaisia tulehduksia varsinkin palovammapotilailla. [12, s. 184.]

5 VALIDOINTISUUNNITELMA

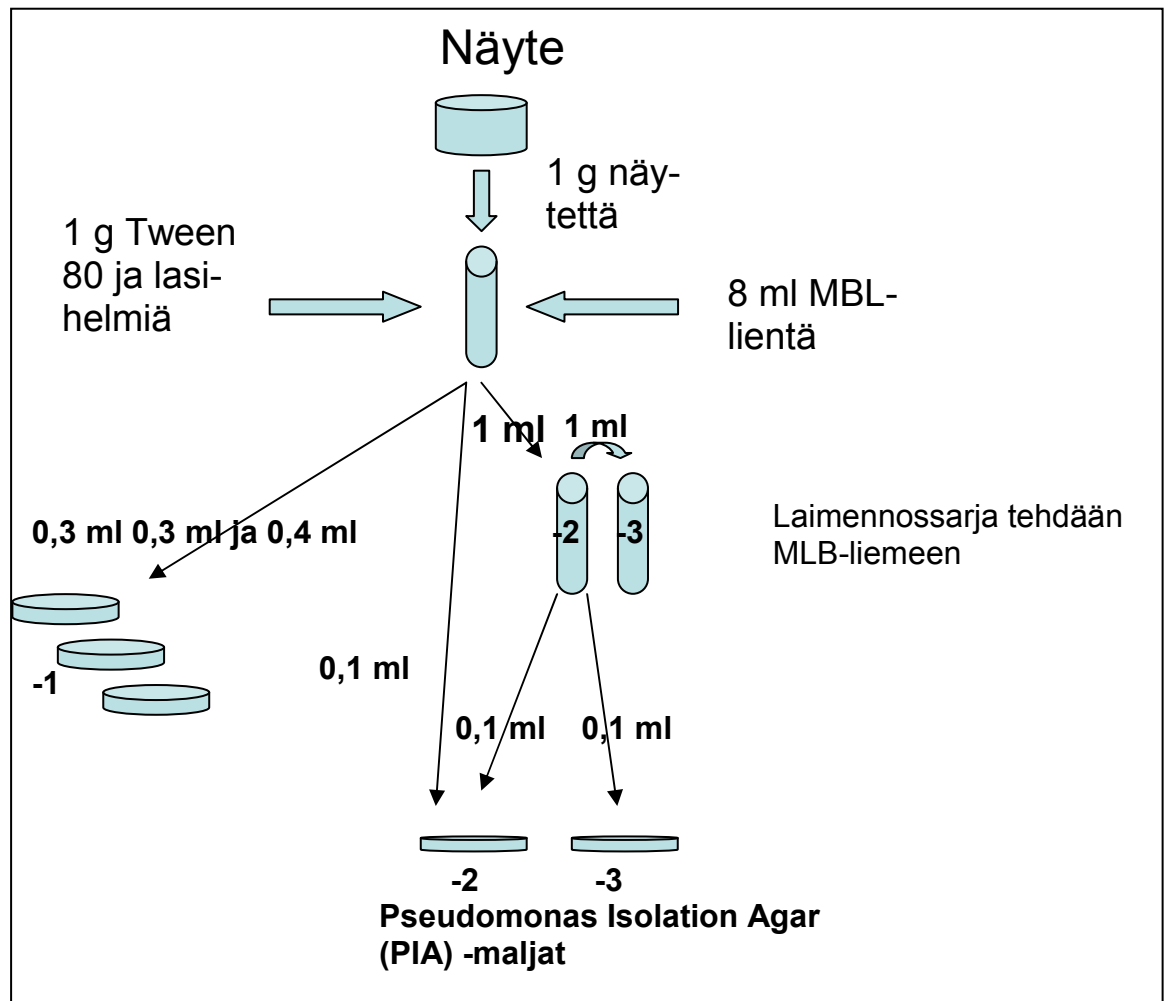
Validointi suoritettiin Elintarvikeviraston mikrobiologisten validointiohjeen mukaisesti. Menetelmänä käytettiin U.S. Food & Drug Administrationin Bacteriological Analytical Manual –menetelmäkokoelman menetelmää: Microbiological Methods for Cosmetics. Menetelmän kuvaus on esitelty kappaleessa 5.1. Validoinnissa käytettävissä matriiseissa ei oleteta olevan tutkittavaa bakteeria, joten se pitää lisätä siihen. Tämä tulee ottaa huomioon näytteiden esikäsittelyssä.

5.1 Menetelmän esittely

Käytetty menetelmä (BAM-menetelmä) on U.S. Food & Drug Administrationin menetelmäkokoelman (BAM) menetelmä, jolla tutkitaan kosmeettisten tuotteiden laatua.

5.1.1 Menetelmän tarkoitus

BAM-menetelmä (kuva 1) on tutkimusmenetelmä, jonka tarkoituksena on mikrobien osoittaminen kosmetiikkanäytteistä. Aluksi näytteet esirikastetaan minkä jälkeen ne viljellään spesifisillä maljoilla. Tämän jälkeen erillispesäkkeet lasketaan ja laimennossarjan avulla lasketaan näytteen mikrobipitoisuus. Pesäkkeet voidaan identifioida biokemiallisilla menetelmillä, kuten valmiilla kiteillä. [17, s. 1.]



Kuva 1. BAM-menetelmä

5.1.2 Esirikastus

Esirikastusvaiheessa punnitaan aseptisesti 1 gramma näytettä koeputkeen, jossa on 1 gramma steriiliä Tween 80 ja 5 halkaisijaltaan 5 mm olevaa lasihelmeä. Näyte sekoitetaan hyvin jonka jälkeen lisätään 8 ml MLB:tä. Näyteputki on laimennus -1. Tästä putkesta tehdään tarvittavat laimennukset.

5.1.3 Viljely ja inkubointi

Näyte viljellään pintalevityksenä MLA:lle, BP:lle, PD:lle ja PIA:lle. BP-maljoja ja PIA-maljoja inkuboidaan kaksi vuorokautta + 37 °C. MLA-maljat inkuboidaan 2 vrk +30 °C ja PD-maljoja samassa lämpötilassa 7 vrk. MLB-putket jätetään 7 vrk +30 °C:een. Jos MLA-maljoilla kasvaa pesäkkeitä, näyte viljellään MLB-putkista Mc Conkey- ja MLA-maljoille.

5.1.4 Maljojen lukeminen ja tulosten käsittely

Maljoilta lasketaan kaikki pesäkkeet, jotka ovat välillä 15 - 150. Tulokset merkitään ylös. Tulokset lasketaan laimennossarjan avulla ja ne ilmoitetaan pmy/g.

5.1.5 Varmistusmenetelmä

Pseudomonas aeruginosa -pesäkkeet varmistetaan maljoilta API NE:llä. API NE on standardisoitu testimenetelmä, jonka tarkoituksena on identifioida Gram-negatiiviset sauvabakteerit. Testi koostuu 20 erilaisesta biokemiallisesta testistä ja ohjelmistosta, joka sisältää tunnistuksessa käytettävät tietokannan. Testi suoritetaan siten, että bakteerisuspensiota pipetoidaan testi-liuskan putkiin. Inkuboinnin aikana metabolismituotteet muuttavat putkissa olevien reagenssien värit spontaanisti tai seuraavana päivänä lisättävien reagenssien jälkeen. Jotkut putket vaativat anaerobiset olosuhteet, jolloin putken suuosaan lisätään mineraaliöljyä. Vuorokauden inkuboinnin jälkeen havaitut värimuutokset kirjataan testin mukana tulevaan tulkintapaperiin. Paperiin kirjatut arvot syötetään testiin kuuluvaan APIWEB-tietokantaan, joka vertaa saatuja arvoja tunnistustietokantaan. Lopuksi ohjelma ilmoittaa identifioinnin tuloksen ja tuloksen todennäköisyyden prosenttilukuna.

5.2 Menetelmän vaatimukset ja validointi

Validoinnin tarkoituksena on osoittaa menetelmän kelpoisuus eli se, että sillä voidaan luotettavasti todeta kosmetiikkanäytteestä *Pseudomonas aeruginosa*. Koska Tullilaboratorio tutkii valvontaviranomaisena kosmetiikkanäytteitä, tarvitsee Tullilaboratorio akkreditoituja menetelmiä. Tämän vuoksi *P. aeruginosa* -bakteerin osoitusmenetelmä on hyvä validoida.

5.2.1 Validoinnin tarkoitus

BAM-menetelmän tarkoituksena on osoittaa suunnitelluilla toteamisrajoilla menetelmän kelpoisuus mikrobien määrittämiseksi kosmetiikkanäytteistä. Validoinnilla halutaan osoittaa, että menetelmällä saadaan oikeita tuloksia riittävällä tarkkuudella. Tällä hetkellä Tullilaboratorion mikrobiologinen jaosto käyttää kyseistä menetelmää määrittäessään kosmetiikkanäytteistä aerobisia mikrobeita, homeita ja hiivaa, koliformibakteereita, *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria *Candida albicans* -hiivaa ja *Staphylococcus aureus* -

bakteeria, mutta vain jälkimmäisen mikrobin osoittamismenetelmä on akkreditoitu.

5.2.2 Validoinnin suorituksen periaatteet

Validointi suoritetaan analysoimalla kosmetiikkanäytteitä BAM-menetelmällä. Mittaukset suoritetaan valituilla matriiseilla, joihin siirrostetaan kohdebakteeri eli *P. aeruginosa* -kanta. Aluksi määritetään bakteerikannan pitoisuus. Tämän jälkeen matriiseihin lisätään kolme eripitoista bakteerisuspensiota. Jokaisen matriisin osalta tehdään selvitys. Menetelmien mittauksista saadut tulokset kerätään yhteen ja niistä lasketaan halutut suureet. Lasketut suureet kuvaavat menetelmän kelpoisuutta.

5.2.3 Validoinnin tulosten tarkastelu

Viimeisenä vaiheena validoinnissa suoritetaan saatujen tulosten tarkastelu. Mittaustuloksista laskettujen suureiden avulla arvioidaan, onko menetelmä luotettava ja voidaanko se akkreditoida.

5.3 Mikro-organismit ja matriisit

Kohdemikrobina käytettiin *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria ja taustafloorana *Escherichia coli*- ja *Proteus vulgaris* -bakteereita.

5.3.1 Mikrobien hankinta

Kohdemikro-organismi on *P. aeruginosa*. Lisäksi käytettiin taustamikrobeina *E. coli*- ja *P. vulgaris* -bakteereita. Kannat, niiden kantanumerot ja toimittajat on esitelty taulukossa 5.

Taulukko 5. Kohdemikro-organismi ja taustafloora

Mikrobi	Kantanumero	Toimittaja
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	04849 Lot 484731 apr 03	MicroBiologics
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	MicroBiologics
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315	Difco

5.3.2 Testikantojen nuorennos ja pitoisuuden määrittäminen

Käytettävän mikrobin kasvu ja pitoisuus tutkitaan ensimmäiseksi. Mikrobi-helmi siirretään pakkasessa säilytettävästä putkesta 10 ml peptonivesiput-keen. Mikrobia inkuboidaan yön yli ja kasvatusliemestä tehdään sopiva lai-mennossarja. Halutuista laimennoksista siirrostetaan nuorennettua mikrobi-viljelmää verimaljoille ja maljoja inkuboidaan yön yli +37 °C ja seuraavana päivänä lasketaan mikrobisuspension pitoisuus. Tämä tulee toistaa aina kun valmistetaan uusi mikrobisuspensio.

5.3.3 *P. aeruginosa*-siirrosteen mikrobipitoisuuden valinta

Siirrosteen mikrobipitoisuuden valintaa varten määritetään ensin jokaisen näytteen osalta toteamisrajat. Toteamisrajoina *P. aeruginosa* -mikrobille ko-keillaan ensin 10, 50 ja 500 pmy/g. Nuorennetun mikrobisuspension pitoi-suus määritetään. Tämän pitoisuuden avulla lasketaan kuinka paljon siirros-tetta pipetoidaan, jotta saadaan haluttu mikrobipitoisuus näytteeseen.

5.3.4 Taustafloora-siirrosteen mikrobipitoisuuden valinta

Taustaflooran pitoisuuden määrittäminen tapahtuu samalla tavalla kuin *P. aeruginosa* -mikrobin pitoisuuden määrittäminen. Taustaflooran määräksi näytteessä valitaan noin 1000 pmy/g.

5.3.5 Matriisien valinta

Matriiseiksi valittiin ihovoiteet. Niitä otettiin kolmesta ryhmästä, jotka on esi-telty taulukossa 6 (s. 22). Ensimmäinen ryhmä oli säilöntäaineettomat tai vä-hän itsessään säilöviä raaka-aineita sisältävät kasvovoiteet. Toinen ryhmä oli luontaistuotteet ja kolmas ryhmä sisälsi päivittäistavaratuotteita. Jokaisesta ryhmästä valittiin yksi matriisi. Valitut matriisit ovat hyvin mielenkiintoisia, eri-tyisesti luontaistuote. Luontaiskosmetiikassa pyritään käyttämään mahdolli-simman vähän säilöntäaineita, jolloin kontaminaation riski kasvaa. Lisäksi niissä käytetään paljon luonnontuotteista saatuja uutteita. Ensimmäiseen ryhmään kuuluva kasvovoide sisältää vähän säilöntäaineita. Kolmannen ryhmän tuote on yleiskosteusvoide, jota myydään päivittäistavarakaupoissa.

Taulukko 6. Käytettävät matriisit

Kategoria	Tuote
Säilöntäaineeton / vähän itsessäänsäilöiviä raaka-aineita	Erisan kasvovoide (1)
Luontaiskosmetiikka	Sante Naturkosmetik Handcreme käsivoide (2)
Päivittäiskosmetiikka	Essex kosteusvoide (3)

5.3.6 Matriisien tutkiminen

Matriiseista tutkitaan, ettei niissä itsessään kasva validoinnissa käytettävää *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria. Matriisien tutkiminen tapahtuu BAM-menetelmän mukaisesti. Menetelmästä poiketaan sen verran, ettei näytteistä tehdä laimennossarjaa.

5.4 Mittaukset ja mittaustulosten käsittely

Mittauksia tehdään niin monta kertaa, että tilastollisia laskentakaavoja voidaan käyttää hyväksi tulosten tulkinnessa.

5.4.1 Mittaukset

Mittaukset suoritetaan siten, että jokainen matriisi testataan tutkittavan mikrobin osalta viisi kertaa. Tämän jälkeen matriiseihin lisätään kohdebakteerin lisäksi taustaflooraa, jonka jälkeen viljelyt toistetaan samalla tavalla ainakin viisi kertaa (toistettavuus). Rinnakkaiset maljat viljeli viisi kertaa eri henkilöt (uusittavuus).

5.4.2 Mittaustuloksista laskettavat suureet

Mittaustuloksista lasketaan validoinnin kelpoisuuden osoittavat suureet. Koska kyseessä on standardisoitu menetelmä, validoinnissa käytetään seuraavia suureita: toistettavuus, uusittavuus, toteamisraja ja spesifisyys.

6 VALIDOINNIN SUORITUS

Validoinnin suorituksessa on esitetty materiaalit ja työn suoritus.

6.1 Materiaalit

Validoinnissa käytetyt materiaalit on esitelty taulukossa 7. Reagenssien valmistusohjeet ovat liitteessä 1.

Taulukko 7. Validoinnissa käytetyt materiaalit

Reagenssit	Välineet	Laitteet
peptonivesi	mittapipettejä (2, 5 ja 10 ml)	autoklaavi
Modified Lethen Broth (MLB)	siirrostustikkuja	inkubaattori
Pseudomonas Isolation Agar (PIA)	levityskolmioita	(+30 °C ja +37 °C)
Tween80	steriilejä koeputkia ja korkkeja	vortex-sekoittaja
Tryptic Soy Agar (TSA)	petrimaljoja	
verimaljoja		
Perunadekstroosiagar (PD)		
Baird Parker Medium (BP)		
Modified Lethen Agar (MLA)		
API NE		
API 20 E		

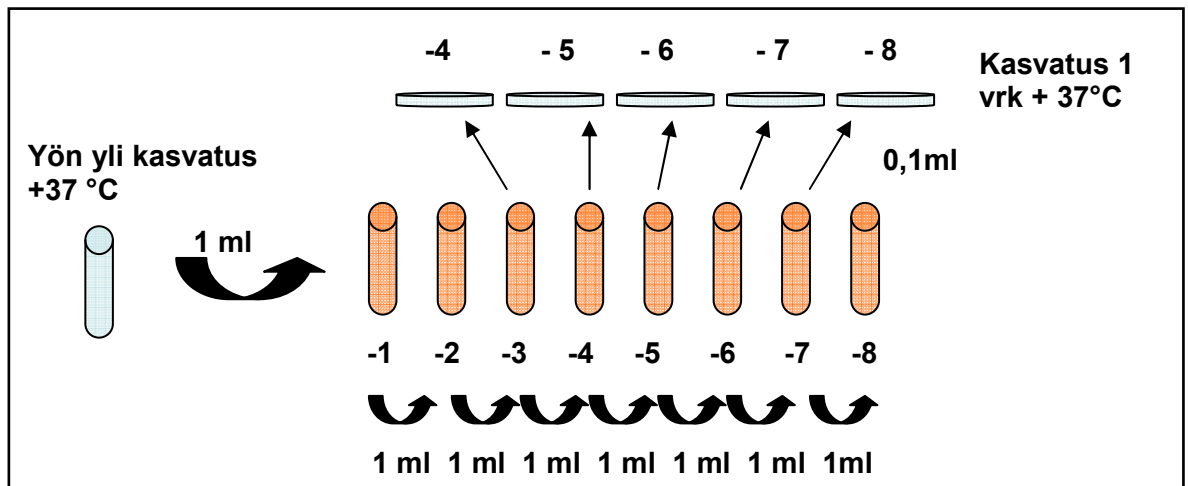
6.2 Työn suoritus

Menetelmän validoinnin kokeellinen osuus suoritettiin validointisuunnitelman mukaisesti.

6.2.1 Testikannan pitoisuuden määrittäminen

Validoinnin kokeellinen osuus aloitettiin tutkimalla miten *P. aeruginosa* ja taustafloorat *E. coli* sekä *P. vulgaris* kasvoivat pakkasessa olon jäljiltä. Jokainen kanta nuorennettiin yön yli peptonivesiputkessa (9 ml). *P. aeruginosa* -bakteerin kasvatusliuoksesta tehtiin laimennossarja 10^{-1} - 10^{-7} , josta levitet-

tiin pintalevityksenä verimaljoille 10^{-4} – 10^{-8} . Mikrobeja inkuboitiin yön yli ja seuraavana päivänä laskettiin pesäkkeet. Kuvassa 2 on esiteltyä kyseinen menetelmä.



Kuva 2. *P. aeruginosa*-siirrosteen pitoisuuden määrittäminen

Yön yli kasvatuksen jälkeen verimaljojen pesäkkeet laskettiin ja tulokset on esitelty taulukossa 8.

Taulukko 8. *P. aeruginosa* -bakteerin pesäkemäärät verimaljoilla

Laimennos	Pesäkemäärä
10^{-8}	8
10^{-7}	30
10^{-6}	yli
10^{-5}	yli
10^{-4}	yli

P. aeruginosa -bakteerin pitoisuudeksi laskettiin 10^8 . Tätä tulosta käytettiin aina oletuksena muissa viljelyissä. Pitoisuus kuitenkin tarkastettiin aina, kun tehtiin uusi bakteerisiiroste.

E. coli -bakteeristas tehtiin laimennossarja 10^{-1} - 10^{-8} MLB-liemeen, josta viljeltiin pintalevityksenä TSA-maljoille 10^{-5} - 10^{-9} . TSA on yleisagar, joka soveltuu hyvin bakteeripitoisuuksien määrittämiseen. Verimaljojen käytön korvattiin niillä.

P. vulgaris -bakteerista tehtiin laimennossarja 10^{-1} - 10^{-7} , josta viljeltiin TSA-maljoille pintalevityksenä 10^{-5} - 10^{-8} . TSA-maljojen pesäkemäärät on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. Taustamikrobien pesäkemäärät TSA-maljoilla

<i>Escherichia coli</i>		<i>Proteus vulgaris</i>	
Malja	Pesäkemäärä	Malja	Pesäkemäärä
10^{-9}	1	10^{-8}	1
	1		0
10^{-8}	1	10^{-7}	0
	1		11
10^{-7}	8	10^{-6}	36
	10		31
10^{-6}	139	10^{-5}	yli
	125		yli
10^{-5}	yli		
	yli		

E. coli -bakteerin pitoisuudeksi laskettiin 10^8 ja *P. vulgaris* -bakteerin pitoisuudeksi 10^7 . Näitä tuloksia käytettiin oletuspitoisuutena muissa viljelyissä. Pitoisuudet tarkastettiin aina kun tehtiin uusi bakteerisiirrost.

6.2.2 Matriisien tutkiminen ja käsittely

Ennen kohdemikrobien lisäämistä varmistetaan, että matriisit eivät sisällä kohdemikrobia. Tämä tutkimus tapahtuu BAM:n menetelmän mukaisesti. Ainut poikkeus on, ettei näytteistä valmisteta laimennoksia. Näytteet viljeltiin pintalevityksenä PD:lle, PIA:lle, BP:lle ja MLA:lle. Maljoilla ei kasvanut mitään.

Näytettä punnittiin 1 gramma koeputkiin, jossa oli 5 lasihelmeä sekä 1 gramma Tween80:tä. Tween 80 on aine, joka hajottaa näytteistä rasvasidoksia. Putkiin lisättiin nuorennettua kasvatusliuosta, ensin pelkkää *P. aeruginosa* -bakteeria ja seuraavilla kerroilla myös taustaflooraa, sekä MLB:tä.

6.2.3 *P. aeruginosa* -bakteerin lisäys matriisiin

Validoinnin kokeellinen osuus aloitettiin lisäämällä näytteeseen vain *P. aeruginosa* -bakteeria. Näytettä punnittiin ennalta valmistettuihin Tween80-putkiin. Putkiin pipetoitiin bakteerisuspensiota siten, että niiden pitoisuudet olivat 10, 50 ja 500 pmy/g. Lisäksi putkiin lisättiin MLB:tä 7,5 ml tai 8 ml siten että putken lopputilavuus oli 10 ml. Näytteet viljeltiin pintalevityksenä PIA-maljoille. Maljoja kasvatettiin 2 vrk +37 °C:ssa.

Ensimmäisellä kerralla pienimmässä pitoisuudessa maljalla ei kasvanut mitään. Toisella määrityskerralla otettiin mukaan neljäs bakteerisiirrostemäärä: 30 pmy/g. Määritys tapahtui samalla tavalla. Kolmannella kerralla jätettiin isoin siirrostemäärä (500 pmy/g) pois koska *P. aeruginosa* pystyttiin toteamaan näytteistä pienemmällä määrälläkin. Kolmannesta määrityskerrasta eteenpäin käytettiin vain kolmea pienintä siirrostemäärää (10, 30 ja 50 pmy/g). Koe toistettiin vielä kaksi kertaa samalla tavalla.

Ensimmäisellä määrityskerralla laimennossarja valmistettiin peptoniveteen. Toisella kerralla kokeiltiin sekä peptonivettä että MLB:tä. Tuloksissa ei ollut merkittäviä eroja ja ne ovat esiteltyinä liitteessä 2. Bakteerisiirrosten pitoisuuden määrittämisessä käytettiin Pseudomonaksen osalta verimaljoja.

6.2.4 *P. aeruginosa*-, *E. coli*- ja *P. vulgaris* -bakteerien lisäys matriisiin

E. coli -bakteerin pitoisuuden oletettiin olevan 10^8 ja *P. vulgaris* -bakteerin 10^7 . Molempia pipetoitiin niin, että näyteputkiin saatiin lopulliseksi pitoisuudeksi 1000 pmy/g. *P. aeruginosa* -bakteerin pitoisuudet pysyivät samoina (10, 30 ja 50 pmy/g). Viljely tehtiin samalla tavalla kuin aikaisemmassa koh-

dassa. Bakteerisiirrostien pitoisuudet tarkistettiin tekemällä laimennossarja MLB-liemeen ja viljelemällä kasvatuslientä pintalevityksenä TSA-maljoille. Tämä toistettiin seitsemän kertaa, joista viisi kertaa oli sellaisia joissa toinen osaston työntekijä viljeli rinnakkaiset maljat. Näistä tuloksista saatiin laskettua uusittavuus ja toistettavuus.

6.2.5 *Pesäkkeiden varmistaminen*

Menetelmän spesifisyys tutkittiin varmistamalla PIA-maljoilta viisi epätyypillistä ja tyyppillistä pesäkettä API NE:llä. Maljoilta valittiin sopivat pesäkkeet, jotka nuorennettiin yön yli verimaljoilla. Pesäkkeet varmennettiin API NE:n ohjeiden mukaisesti.

7 VALIDOINNIN TULOKSET JA TULOSTEN ARVIOINTI

Näytteiden viljely toistettiin 12 kertaa, joista viidellä kerralla mukana viljeli rinnakkaiset maljat joko Laila Korpela tai Raisa Männikkö.

7.1 Mittaustulosten käsittely

Tulokset ovat kirjattuna taulukkoihin näytekohtaisesti. Näyte 1 on Erisan Kasvovoide, näyte 2 Sante Naturkosmetik Handcreme ja näyte 3 Essex Plus Emulsiovoide. Taulukoissa 10 - 15 on esitettyinä bakteerisiirrosteen määrä, saadut pesäkemäärät ja laskettu pesäkemäärä näytegrammaa kohden.

Taulukoissa 10, 12 ja 14 on merkittynä neliön sisään ne tulokset, joita on käytetty toistettavuuden laskemisessa. Taulukoissa 11, 13 ja 15 on merkittynä vaalealla harmaalla ne tulokset, joita on käytetty toistettavuuden laskemiseen ja tummalla harmaalla ne tulokset, joita on käytetty uusittavuuden sekä toistettavuuden laskemiseen. Pesäkeluvut on kerrottu laskuissa kymmenellä, jolloin ne vastaavat todellista pitoisuutta.

Taulukossa 10 on esitelty 1. näytteen tulokset. Näissä mittauksissa näytteen on lisätty pelkästään *P. aeruginosa* -bakteeria.

Taulukko 10. Näyte 1, pesäkemäärät

Lisätty (pmy/g)	Pesäkemäärät		Keskiarvo	PMY/G
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
10	0	0	0	0
50	1	3	2	20
10	1	0	0,5	5
30	3	4	3,5	35
50	8	3	5,5	55
10	2	0	1	10
30	4	2	3	30
50	3	8	5,5	55
10	4	1	2,5	25
30	14	4	9	90
50	13	16	14,5	145
10	4	2	3	30
30	5	2	3,5	35
50	6	21	13,5	135

Taulukossa 11 on esitelty näyte 1 tulokset. Näissä tuloksissa näytteeseen on lisätty kohdemikrobin lisäksi taustaflooraa.

Taulukko 11. Näyte 1, pesäkemäärät taustaflooran kanssa

Lisätty (pmy/g)	Pesäkemäärät		KESKIARVO	PMY/G	Toinen viljelijä		KESKIARVO	PMY/G
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
<i>Escherichia coli</i> 1000 pmy/g								
<i>Proteus vulgaris</i> 1000 pmy/g								
10	4	2	3	30				
30	8	6	7	70				
50	17	10	13,5	135				
10	5	2	3,5	35				
30	21	16	18,5	185				
50	24	17	20,5	205				
					Pesäkemäärät			
10	2	1	1,5	15	2	0	1	10
30	4	4	4	40	3	5	4	40
50	15	4	9,5	95	10	8	9	90
10	4	0	2	20	1	0	0,5	5
30	6	5	5,5	55	3	6	4,5	45
50	14	11	12,5	125	5	8	6,5	65
10	1	2	1,5	15	1	3	2	20
30	6	4	5	50	6	4	5	50
50	6	10	8	80	11	11	11	110
10	3	0	1,5	15	0	0	0	0
30	1	4	2,5	25	10	3+2A	7,5	75
50	2	6	4	40	11+1A	3	7,5	75
10	1	1	1	10	1	2	1,5	15
30	2	1	1,5	15	2	1A	2	20
50	1	3	2	20	2A	3	2,5	25

Taulukossa 12 on esitelty 2. näytteen tulokset. Näytteeseen on lisätty vain *P. aeruginosa* -bakteeria.

Taulukko 12. Näyte 2, pesäkemäärät

Lisätty (pmy/g) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pesäkemäärät		KESKIARVO PMY/G	
10	0	0	0	0
50	2	0	1	10
10	2	3	2,5	25
30	4	1	2,5	25
50	6	14	10	100
10	2	3	2,5	25
30	1	7	4	40
50	10	7	8,5	85
10	2	3	2,5	25
30	8	4	6	60
50	13	15	14	140
10	5	2	3,5	35
30	12	5	8,5	85
50	16	9	12,5	125

Taulukossa 13 on esitelty näytteen 2 tulokset. Näytteeseen on lisätty kohdemikrobin lisäksi myös taustaflooraa.

Taulukko 13. Näyte 2, pesäkemäärät taustaflooran kanssa

Lisätty (pmy/g)	Pesäkemäärät			Keskiarvo PMY/G	Toinen viljelijä		Keskiarvo PMY/G	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
<i>Escherichia coli</i> 1000 pmy/g								
<i>Proteus vulgaris</i> 1000 pmy/g								
10	2	4	3	30				
30	10	8	9	90				
50	8	12	10	100				
10	5	0	2,5	25				
30	15	13	14	140				
50	19	17	18	180				
					Pesäkemäärät			
10	1	4	2,5	25	2	0	1	10
30	3	3	3	30	2	3	2,5	25
50	11	1	6	60	11	3	7	70
10	1	2	1,5	15	1	1	1	10
30	3	3	3	30	4	6	5	50
50	14	11	12,5	125	12	8	10	100
10	2	0	1	10	1	1	1	10
30	2	1	1,5	15	3	3	3	30
50	2	2	2	20	0	5	2,5	25
10	3	1	2	20	0	0	0	0
30	4	0	2	20	3	4	3,5	35
50	6	3	4,5	45	0	3	1,5	15
10	2	3	2,5	25	1	1	1	10
30	3	0	1,5	15	8	5	6,5	65
50	7	5	6	60	9	9	9	90
10	3	2	2,5	25	0	2	1	10
30	7	9	8	80	4	5	4,5	45
50	8	10	9	90	10	4	7	70
10	0	0	0	0	1	1	1	10
30	0	0	0	0	4	2A	3,5	35
50	3	1	2	20	5	3+1A	4,5	45

Taulukossa 14 on esitelty näyte 3 tulokset pelkän *P. aeruginosa* -bakteerin lisäyksen osalta.

Taulukko 14. Näyte 3, pesäkemäärät

Lisätty (pmy/g)	Pesäkemäärät		KESKIARVO	PMY/G
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
10	2	0	1	10
50	6	3	4,5	45
10	1	2	1,5	15
30	4	4	4	40
50	7	7	7	70
10	1	1	1	10
30	4	5	4,5	45
50	9	12	10,5	105
10	5	1	3	30
30	10	8	9	90
50	11	15	13	130
10	2	2	2	20
30	11	4	7,5	75
50	6	12	9	90

Taulukossa 15 on esitelty näyte 3 tulokset. Näytteeseen on lisätty kohdemikrobin lisäksi taustaflooraa.

Taulukko 15. Näyte 3, pesäkemäärät taustaflooran kanssa

Lisätty (pmy/g)	Pesäkemäärät		KESKIARVO	PMY/G	Toinen viljelijä		KESKIARVO	PMY/G
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
<i>Escherichia coli</i> 1000 pmy/g								
<i>Proteus vulgaris</i> 1000 pmy/g								
10	3	4	3,5	35				
30	4	13	8,5	85				
50	15	9	12	120				
10	6	4	5	50				
30	12	8	10	100				
50	20	20	20	200				
					Pesäkemäärät			
10	0	0	0	0	1	2	1,5	15
30	6	6	6	60	6	7	6,5	65
50	11	11	11	110	6	10	8	80
10	2	2	2	20	2	1	1,5	15
30	8	9	8,5	85	17	3	10	100
50	5	12	8,5	85	6	6	6	60
10	1	0	0,5	5	3	2	2,5	25
30	4	5	4,5	45	6	2	4	40
50	6	9	7,5	75	5	11	8	80
10	3	1	2	20	4	1	2,5	25
30	5	6	5,5	55	7	1+1A	4,5	45
50	29	26	27,5	275	10+2A	23+1A	18	180
10	1	0	0,5	50	0	0	0	0
30	3	3	3	30	2	4	3	30
50	1	4	2,5	25	1+1A	5	3,5	35

Spesifisyyden laskemiseksi PIA- maljoilta varmistettiin viisi tyyppillistä ja epätyypillistä pesäkettä API NE:llä ja API 20 E:llä. Pesäkkeiden varmistus suoritettiin ohjeiden mukaisesti. API :en tulokset on esitelty taulukossa 16.

Taulukko 16. API NE:n ja API 20 E:n tulokset

Pesäke	Merkittävin taksoni	% ID	Huomaus
Epätyypillinen 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,9	
Epätyypillinen 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,9	
Epätyypillinen 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,9	
Epätyypillinen 4	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	53,5	Ei-hyväksytty identifiointi
Epätyypillinen 5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	xxxxxxx	Tehty API 20 E:llä
Tyyppillinen 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,4	
Tyyppillinen 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99	
Tyyppillinen 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,9	
Tyyppillinen 4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,9	
Tyyppillinen 5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,6	

7.2 Mittaustuloksista laskettavat suureet

Tuloksien laskemista varten valittiin sopivat pesäkemäärät. Jokaisen näytteen ja bakteerisiirrostemäärän kohdalta laskettiin toistettavuuden sekä uusittavuuden standardipoikkeamat.

7.2.1 Toistettavuus

Toistettavuus on peräkkäisten toistojen antamien tulosten lähekkäisyys tutkittaessa identtisiä näytteitä. Analyysi on suoritettu samalla menetelmällä, samoissa olosuhteissa ja saman henkilön toimesta. Saatujen arvojen oletetaan noudattavan normaalijakautumaa. Ääriarvojen poistamisen jälkeen lasketaan s_r -arvo, joka on arvio toistettavuuden standardipoikkeamista. S_r koskee tässä tapauksessa työn suorittaneen henkilön osalta sekä matriisia että näytteen bakteeripitoisuutta. S_r -arvo laskettiin kaavalla:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (1)$$

jossa x = saadut mikrobiluvut logaritmisinä arvoina

\bar{x} = mikrobilukujen keskiarvo

n = tulosten lukumäärä, sen jälkeen kun ääriarvot on poistettu

Aikaisemmin katsottiin että luotettavasti toimivan menetelmän S_r -arvo on kaavalla 1 laskettuna välillä 0,10 - 0,15. [18, s. 54 - 55] Nykyisin kuitenkin ajatellaan, että mitä isompi s_r -arvo on, sitä epäluotettavampi menetelmä on.

Toistettavuuden standardipoikkeamat laskettiin käyttämällä arvoja, jotka ovat merkittynä tulostaulukoissa 10 - 15, sekä vertailun vuoksi käytettiin myös kaikkia saatuja arvoja, nollia lukuun ottamatta. Tulokset on esitetty taulukossa 17.

Taulukko 17. Toistettavuuden standardipoikkeamat

Siirrostetaso (pmy/g)	Näyte 1		Näyte 2		Näyte 3	
	Kaikki arvot	Raja-arvot poistettu	Kaikki arvot	Raja-arvot poistettu	Kaikki arvot	Raja-arvot poistettu
10	0,25	0,24	0,2	0,17	0,26	0,19
30	0,34	0,17	0,35	0,11	0,19	0,07
50	0,37	0,17	0,4	0,16	0,32	0,09

7.2.2 Uusittavuus

Uusittavuus on yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyys eri henkilöiden tutkiessa identtisiä näytteitä käyttäen samoja menetelmiä. Uusittavuutta varten joka kerran näytteet merkitään esimerkiksi a ja b. Erotus (a - b) noudattaa silloin normaalijakaumaa. Ääriarvojen poistamisen jälkeen laskettiin s_r kaavasta

$$sR = \sqrt{\frac{\sum (a - b)^2}{2k}} \quad (2)$$

jossa a = saatu mikrobiluku logaritmisena arvona

b = toisen viljelijän saama mikrobiluku logaritmisena arvona

k = erotusten lukumäärä ääriarvojen poistamisen jälkeen

Aikaisemmin katsottiin, että luotettavasti toimivan menetelmän sR -arvo on kaavalla 2 laskettuna välillä 0,20 - 0,25. [18, s. 54 - 55]. Nykyisin kuitenkin ajatellaan, että mitä isompi sR -arvo on, sitä epäluotettavampi menetelmä on.

Uusittavuuden standardipoikkeamat ovat esiteltynä taulukossa 18. Ne on laskettu tuloksista, jotka ovat merkittynä taulukoissa 11, 13 ja 15. Lisäksi vertailun vuoksi laskuissa käytettiin kaikkia saatuja arvoja, nolliä lukuun ottamatta.

Taulukko 18. Uusittavuuden standardipoikkeamat

Siirrostetaso (pmy/g)	Näyte 1		Näyte 2		Näyte 3	
	Kaikki arvot	Raja-arvot poistettu	Kaikki arvot	Raja-arvot poistettu	Kaikki arvot	Raja-arvot poistettu
10	0,2	0,2	0,17	0,17	0,18	0,2
30	0,34	0,09	0,2	0,1	0,2	0,17
50	0,35	0,15	0,21	0,11	0,15	0,06

7.3 Tulosten arviointi

Kvantitatiivisen menetelmän osalta tarkastellaan, todettiinko analysoitava mikrobi.

7.3.1 Toistettavuus

Validoitavan menetelmän toistettavuudessa vertailtiin peräkkäisiä tuloksia. Tuloksissa oli huomattavan paljon vaihteluja. Varsinkin ylimmällä tasolla eli 50 pmy/g vaihtelut olivat erittäin suuria. Toistettavuuden standardipoikkeamat laskettiin jokaisen näytteen jokaiselle tasolle. Mitä pienempi kyseinen arvo on, sitä luotettavampana menetelmää voidaan pitää. Taulukossa 17 esitetyjä tuloksia tarkastellessa voidaan todeta näytteen 1 osalta, että kaikkia tuloksia käytettäessä, suurin taso 50 pmy/g on epäluotettavin. Poistettaessa raja-arvot, tilanne kääntyy toisin päin, ja suurin taso saa pienimmän s_r -arvon. Näiden kahden s_r -arvon (0,37 ja 0,17) välillä on myös suurin ero. Pienimmällä tasolla näiden kahden eri arvon välillä ei ole suurta eroa. Näytteessä 2 tilanne on kaikkien arvojen standardipoikkeaman kohdalta samanlainen kuin näytteessä 1; 50 pmy/g on epäluotettavin taso. Raja-arvojen poistamisen jälkeen se kuitenkin on yhtä luotettava kuin pienin taso 10 pmy/g. Näytteessä 3 kaikkien tasojen arvoissa on huomattavaa poikkeavuutta. Keskimäinen taso, 30 pmy/g, osoittautui luotettavimmaksi kun tulokset on laskettu siten, että raja-arvot on poistettu.

7.3.2 Uusittavuus

Validoitavan menetelmän uusittavuutta testattiin kahden eri henkilön suorittamien testituloksien yhteensopivuudella. Testitulokset olivat keskenään melko samanlaisia. Tarkasteltaessa menetelmän uusittavuuden standardipoikkeamia huomataan, että kaikilla näytteillä tasolla 10 pmy/g, arvot eivät poikkea toisistaan merkittävästi. Seuraavilla kahdella tasolla erot ovat jo merkittävämmät. Standardiarvot ovat näytteestä ja tasosta riippuen välillä 0,10- 0,35. Voidaan todeta menetelmän uusittavuuden osalta, että sen laskemisessa on suositeltavaa poistaa tuloksista raja-arvot ja käyttää jäljelle jääneitä tuloksia standardipoikkeaman laskemiseksi. Näin saadaan luotettavampia tuloksia.

7.3.3 Spesifisyys

Spesifisyys on menetelmän kyky löytää tutkittava mikrobi tai tutkittavat mikrobit näytteessä olevien häiritsevien tekijöiden vaikutuksesta huolimatta. Täydellisen spesifinen menetelmä toteaa vain analysoitavan mikrobin.

P. aeruginosa -bakteeri kasvaa PIA-maljalla sinivihertävänä ja kiiltävänä pesäkkeenä. Se muodostaa välillä leviäviä pesäkkeitä, mikä vaikeuttaa laskeamista. Tyypillistä pesäkkeelle on karkkimainen makea tuoksu. Tyypilliset pesäkkeet ovat näin helposti tunnistettavissa. Valtaosa maljoilla kasvaneista pesäkkeistä oli tyypillisiä. Maljoilla kasvoi myös epätyypillisen näköisiä pesäkkeitä. Ne olivat harmaita ja plakkimaisia pesäkkeitä. Niistä ei lähtenyt makeaa tuoksua. Näitä pesäkkeitä lähdettiin varmistamaan epätyypillisinä pesäkkeinä. Muun tyypisiä pesäkkeitä ei maljoilla ollut.

Spesifisyyttä varten varmistettiin viisi tyypillistä ja epätyypillistä pesäkettä API NE:llä ja API 20 E:llä. Tulokset on esitelty taulukossa 16. Epätyypilliset ja tyypilliset pesäkkeet 1, 2, 3 ja 4 varmistettiin uusittavuuskokeiden aikana eri maljoilta. Epätyypillinen pesäke 5 varmistettiin API 20 E:llä, sillä sen epäiltiin aluksi olevan *Escherichia coli* -bakteeria. Se osoittautui kuitenkin *P. aeruginosa* -bakteeriksi. Se ja tyypillinen pesäke nro 5 varmistettiin saman viljelykerran samalta maljalta. Epätyypillinen pesäke nro 4 antoi ei-hyväksyttävän tuloksen, API NE ilmoitti sen olevan *Pseudomonas oryzae*. Syytä tähän ei selvitetty, koska muut tulokset olivat luotettavia. Muiden tuloksien perusteella voidaan kuitenkin todeta, ettei menetelmä anna virhepositiivisia tuloksia. Koska epätyypilliset pesäkkeet osoittautuivat *P. aeru-*

ginosa -bakteeriksi, virhenegatiivisten tulosten välttämiseksi kuvatus kaltaiset epätyypilliset pesäkkeet tuli varmistaa. Menetelmä on lisäksi selektiivinen, sillä kohdemikrobi havaittiin häiritsevistä taustamikrobeista huolimatta.

7.3.4 Toteamisraja

Toteamisraja on pienin mikrobipitoisuus, joka voidaan todeta luotettavasti. Toteamisrajan määrittäminen aloitettiin lisäämällä pelkkää *P. aeruginosa* -bakteeria viisi kertaa. Kun tuloksia tarkastellaan taulukoissa 10, 12 ja 14, voidaan huomata, että ensimmäisillä viljelykerroilla pienimmällä tasolla (10 pmy/g) maljoilla ei kasvanut mitään näytteen 1 ja 2 osalta. Tämän jälkeen lisättiin yksi taso, 30 pmy/g, ja koe toistettiin. Tällä kertaa myös pienimmällä tasolla saatiin tuloksia maljoilta. Koe toistettiin vielä kolme kertaa ja tällöin voitiin todeta, että 10 pmy/g on pienin mikrobipitoisuus joka voidaan todeta luotettavasti.

Taustaflooraa ja *P. aeruginosa* -bakteeria lisättiin näytteeseen 7 kertaa. Matriisin aiheuttamasta mikrobimäärien vaihtelusta huolimatta, toteamisrajan voidaan katsoa olevan 10 pmy/g.

8 PÄÄTELMÄT

Opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida menetelmä, jolla osoitetaan *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeri kosmetiikasta. Validoinnin onnistumista tarkastellaan tässä tapauksessa toistettavuuden ja uusittavuuden standardipoikkeamilla ja sekä toteamisrajan alhaisuudella että menetelmän spesifisyydellä.

Alhaisemmalla tasolla (10 pmy/g) menetelmän toistettavuuden ja uusittavuuden voidaan katsoa olevan lähellä yleisiä suositusarvoja ja käytännössä menetelmä toteaa 10 pmy grammassa näytettä. Muilla tasoilla (30 ja 50 pmy/g) ääriarvojen poistamisen jälkeen s_r- ja sR- arvot ovat suositusarvojen tasoa. Menetelmä on spesifinen, sillä pystytään toteamaan kohdemikrobi näytteestä taustamikrobeista huolimatta.

Suurimmaksi ongelmaksi validoinnissa nousi näytteen homogenointi. Bakteerisiiroste ei jakautunut tasaisesti matriiseihin niiden rasvaisen koostumuksen takia. Mitä rasvaisempi tuote, sitä vaikeammin se on homogenoitavissa. Tämän vuoksi koeputkia kannattaisi lämmittää vesihautteessa ennen

viljelyn aloittamista. Näin olisi voitu saada reunoille jäänyt vähäinen määrä näytettä liukenemaan koeputken pohjalla olevaan muuhun näytteeseen. Lämmitysmenettelyä kannattaa jatkossa kokeilla ja vertailla saatuja tuloksia opinnäytetyössä esitettyihin tuloksiin.

Koska monet kosmeettiset tuotteet sisältävät homogenointia vaikeuttavia komponentteja kuten rasvaa, on erittäin tärkeätä, että erilaisille kosmeettisille tuotteille tarkoitettua menetelmää voidaan käyttää myös rasvaisille tuotteille. Validointia kannattaisi jatkaa kokeilemalla menetelmää erilaisilla matriiseilla ja yrittää homogenoida matriisit paremmin.

Yhteenvetona voidaan todeta, että tässä opinnäytetyössä suoritettun validoinnin perusteella menetelmä soveltuu *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin toteamiseen kosmetiikasta ja tuloksia voidaan pitää luotettavina.

VIITELUETTELO

- [1] Orth, Donald. S: *Handbook of Cosmetic Microbiology*. Los Angeles: Neutrogena Corporation, 1993.
- [2] Elintarvikevirasto: *Mikrobiologisten menetelmien validointiohje*. Helsinki: Oy Edita Ab, 1997
- [3] Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka: *Laboratorion analyysitekniikka*. Helsinki: Oy Edita Ab, 1997.
- [4] MIKES, *Akkreditointipalvelut* [verkkodokumentti, viitattu 27.6.07]. Saatavissa: www.mikes.fi
- [5] *Kosmetiikan kemiaa* [verkkodokumentti, viitattu 19.3.07] Saatavissa: <http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/aineistot/kosmetiikka/kemia.html>
- [6] Duodecim, terveyskirjasto [verkkodokumentti, viitattu 13.9.07] Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_haku=pyrrolidonikarbok+syylihappo&p_artikkeli=dlk00216
- [7] Niemelä, Eeva, Lumene Group. RE: *Kosmetiikan laadunvalvonta* [sähköpositiiviesti]. Lähetetty 2.10.07 Vastaanottaja Kanerva, Noora [Viitattu 2.10.07]
- [8] *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 51. Nr. 3 (1976)
- [9] Joint report by the Committee of Laboratories and Official Drug Control Services, and the Industrial Pharmacists Section of the International Pharmaceutical Federation FIP¹, April 1972
- [10] *Microbiological Quality of Pharmaceutical Preparations*. European Pharmacopoeia 5.6 [verkkodokumentti, viitattu 5.10.07] Saatavissa: <http://uk.vwr-cmd.com/ex/downloads/?datasheets/pheur/dok4.pdf>
- [11] Willamo, Harri: E-kirja *Kosmetiikan kemiaa*. Otava/Oppimateriaalit. Helsinki, 2005.
- [12] Krieg - Sneath, Staley - Williams: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore, MD, USA, 1993.
- [13] Sarvas, Matti: Pseudomonas ja vähän patogeeniset gram-negatiiviset sauvat. Teoksessa- *Lääketieteellinen mikrobiologia*. Vammala: Vammalan kirjapaino, 1978.
- [14] Madigan M.T - Martinko J.M - Parker J, *Brock Biology of Microorganisms*. Tenth edition. New Jersey: Psentice Hall. 2003
- [15] *Pseudomonas aeruginosa, esiintyminen ja tartunta* [verkkodokumentti, viitattu 29.5.07] Saatavissa: <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
- [16] *Pseudomonas aeruginosa, esiintyminen ja tartunta* [verkkodokumentti, viitattu 24.8.07] Saatavissa: <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch027.htm>

- [17] U.S. Food & Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Online. August 2001. Chapter 23. Microbiological Methods for Cosmetics. [verkkodokumentti, viitattu 24.9.07]. Saatavissa: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-23.html>
- [18] Pohjoismainen Elintarvikkeiden Metodiikkakomitea. Laadunvarmistusohjeita mikrobiologisille laboratorioille. Raportti nro 5. 2. painos. 1994.
- [19] Tullilaboratorio: Elatusainerekisteri. Espoo, 2004.

Elatusaineet

Kiinteät elatusaineet

Baird-Parker Medium, pH 6,8 ± 0,2

OXOID CM0275

Koostumus:	Tryptoni	10,0 g/l
	"Lab-Lemco"-pulveri	5,0 g/l
	Hiivauute	1,0 g/l
	Natriumpyruvaatti	10,0 g/l
	Glysiini	12,0 g/l
	Litiumkloridi	5,0 g/l
	Agar	20,0 g/l

Valmistus: Sekoita 63 g yhteen litraan tislattua vettä ja keitä kunnes elatusaine on kokonaan liennut. Annostele putkiin tai pulloihin ja steriloi autoklaavissa 121 °C:ssa. Jäähdytä 50 °C:een ja lisää aseptisesti 50 ml munankeltuaistelluriittiemulsiota (Egg Yolk-Tellurite Emulsion SR 54). Sekoita hyvin ennen maljoille kaattamista. [19]

Pseudomonas Agar Base, pH 7,1 ± 0,2

LAB 108

Koostumus:	Happohydrolysoitu kaseiini	10,0 g/l
	Gelatiinipeptoni	16,0 g/l
	Kaliumsulfaatti	10,0 g/l
	Magnesiumkloridi	1,4 g/l
	Agar No.2	11,0 g/l

Valmistus: Punnitse 48,4 g elatusainetta ja sekoita 1 litraan tislattua vettä. Lisää 10 ml glyserolia. Steriloi autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuuttia. Jäähdytä seos 47 °C:een ja lisää 2 pulloa joko X107

C.N supplementtia tai X108 C.F.C supplementtia. Sekoita hyvin ja kaada maljoille. [19]

Peruna Dekstroosi Agar (PD), pH 5,6 ± 0,2

DIFCO

Koostumus:	Perunatärkkelys	4,0 g/l
	Dekstroosi	20,0 g/l
	Agar	15,0 g/l

Valmistus: Punnitse 39 g elatusainetta ja sekoita 1 litraan tislattua vettä. Steriloi autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuuttia. Jäähdytä seos 45- 50 °C:een ja lisää aseptisesti 0,8 ml lisäainetta 200 ml PD-agaria. Sekoita hyvin ja kaada maljoille.

Lisäaineen valmistus: Punnitse 1 g klooritetrasykliinihydrokloridia 100 ml:n 0,01M HCl:n. Annostele 0,8 ml putkiin ja säilytä putket pakkasessa. Lisää 0,8 ml 200 ml:n PD-agaria. [19]

Trypticase Soy Agar, pH 7,3 ± 0,2

BBL

Koostumus:	Peptoni C	15,0 g/l
	Peptoni S	5,0 g/l
	Natriumkloridi	5,0 g/l
	Agar	15,0 g/l

Valmistus: Punnitse 40 g elatusaineita ja sekoita 1 litraan tislattua vettä. Steriloi autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuuttia. Vala maljoille. [19]

Lethen Agar (Modified), pH 7,2 ± 0,2

DIFCO

Koostumus:	Lethen agar	32,0 g/l
------------	-------------	----------

Tryptoni	10,0 g/l
Proteoosi peptone No. 3	10,0 g/l
Hiivauute	2,0 g/l
Natriumkloridi	5,0 g/l
Natriumbisulfiitti	0,1 g/l

Valmistus: Punnitse 59,1 g yhteen litraan tislattua vettä. Steriloi autokla voimalla 121 °C:ssa 15 minuuttia. Vala maljoille. [19]

Veri-agar Tullilaboratorio tilaa lammasveriagarmaljat valmiina.
TAMMERTUTKA

Nestemäiset elatusaineet

Maximum Recovery Diluent (Peptonivesi)

LAB 103

Koostumus:	Peptoni	1,0 g/l
	Natriumkloridi	8,5 g/l

Valmistus: Punnitse 9,5 g yhteen litraan tislattua vettä. Steriloi autoklavoi malla 121 °C:ssa 15 minuuttia. [19]

Lethen Broth (Modified), pH 7,2 ± 0,2

DIFCO

Koostumus:	Lethenliemi	25,7 g/l
	Tryptoni	5,0 g/l
	Proteosipeptoni No. 3	10,0 g/l
	Hiivauute	2,0 g/l
	Natriumbisulfaatti	0,1 g/l

Valmistus: Punnitse 42,8 g litraan tislattua vettä. Steriloi autoklavoi malla 121°C:ssa 15 minuuttia. [19]

Mikrobisiirrosteiden pitoisuudet

Pseudomonas aeruginosa -bakteerin yön yli nuorennetun kasvatusliuoksen pitoisuus

1.				
P-vesi		MLB		
Laimennos	Pesäkkeitä	Laimennos	Pesäkkeitä	
-8	2	-8	2	
-7	7	-7	17	
-6	110	-6	143	
-5	yli	-5	yli	
-4	yli	-4	yli	
Pitoisuus	1,1*10⁸	1,5*10⁸		
2.				
MLB				
Laimennos	Pesäkkeitä			
-8	3	5		
-7	23	11		
-6	174	133		
-5	yli	yli		
-4	yli	yli		
Pitoisuus	2,4*10⁸			
3.				
MLB				
Laimennos	Pesäkkeitä			
-8	2	3		
-7	22	23		
-6	174	163		
-5	yli	yli		
-4	yli	yli		
Pitoisuus	1,7*10⁸			
4.				
MLB				
Laimennos	Pesäkkeitä			
-8	2	3		
-7	24	31		
-6	yli	yli		
-5	yli	yli		
-4	yli	yli		
Pitoisuus	2,7*10⁸			
5.				
MLB				
Laimennos	Pesäkkeitä			
-8	2	3		
-7	16	27		
-6	yli	yli		
-5	yli	yli		
-4	yli	yli		
Pitoisuus	2,2*10⁸			

Escherichia coli-, *Pseudomonas aeruginosa*- ja *Proteus vulgaris* -bakteerien yön yli nuorennettujen kasvatusliuoksien pitoisuudet

1.	E.coli			P.aeruginosa			P. vulgaris		
	Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä	
	-9	0	0	-8	2	0	-8	0	0
	-8	3	0	-7	26	22	-7	5	2
	-7	18	7	-6	yli	yli	-6	32	34
	-6	110	134	-5	yli	yli	-5	yli	yli
	-5	yli	yli	-4	yli	yli			
	PITOISUUS	1,2*10⁸		PITOISUUS	4,2*10⁸		PITOISUUS	3,2*10⁷	
2.	E.coli			P.aeruginosa			P. vulgaris		
	Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä	
	-9	0	0	-8	5	6	-8	1	0
	-8	2	2	-7	40	44	-7	2	0
	-7	13	10	-6	yli	yli	-6	5	1
	-6	95	103	-5	yli	yli	-5	61	66
	-5	yli	yli	-4	yli	yli			
	PITOISUUS	1,0*10⁸		PITOISUUS	4,3*10⁸		PITOISUUS	6,2*10⁶	
3.	E.coli			P.aeruginosa			P. vulgaris		
	Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä	
	-9	1	0	-8	3	1	-8	ei kasvua	
	-8	2	0	-7	18	12	-7	ei kasvua	
	-7	13	7	-6	yli	yli	-6	ei kasvua	
	-6	113	91	-5	yli	yli	-5	ei kasvua	
	-5	yli	yli	-4	yli	yli			
	PITOISUUS	1,0*10⁸		PITOISUUS	1,5*10⁸				
4.	E.coli			P.aeruginosa			P. vulgaris		
	Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä	
	-9	0	0	-8	3	1	-8	1	0
	-8	1	0	-7	11	16	-7	3	9
	-7	10	14	-6	yli	yli	-6	44	47
	-6	90	105	-5	yli	yli	-5	yli	yli
	-5	yli	yli	-4	yli	yli			
	PITOISUUS	9,9*10⁷		PITOISUUS	1,4*10⁸		PITOISUUS	4,7*10⁶	
5.	E.coli			P.aeruginosa			P. vulgaris		
	Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä	
	-9	0	0	-8	1	1	-8	1	0
	-8	2	0	-7	12	11	-7	2	1
	-7	10	15	-6	123	125	-6	30	32
	-6	90	83	-5	yli	yli	-5	yli	yli
	-5	yli	yli	-4	yli	yli			
	PITOISUUS	9*10⁷		PITOISUUS	1,23*10⁸		PITOISUUS	2,9*10⁷	
6.	E.coli			P.aeruginosa			P. vulgaris		
	Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä	
	-9	0	0	-8	3	0	-8	1	0
	-8	1	2	-7	15	21	-7	4	20
	-7	8	5	-6	yli	yli	-6	27	38
	-6	75	75	-5	yli	yli	-5	yli	yli
	-5	yli	yli	-4	yli	yli			
	PITOISUUS	7,4*10⁷		PITOISUUS	1,9*10⁸		PITOISUUS	4,0*10⁷	
7.	E.coli			P.aeruginosa			P. vulgaris		
	Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä		Laimennos	Pesäkkeitä	
	-9	0	0	-8	4	8	-8	1	1
	-8	1	0	-7	53	65	-7	3	1
	-7	6	13	-6	yli	yli	-6	28	33
	-6	91	89	-5	yli	yli	-5	yli	yli
	-5	yli	yli	-4	yli	yli			
	PITOISUUS	9*10⁷		PITOISUUS	5,9*10⁸		PITOISUUS	2,9*10⁷	