

Opinnäytetyö (AMK / YAMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2016

Sanni Katajisto

STANDARDIIN PERUSTUVAN SÄILYVYYSTEHOKKUUS- TESTIN SOVELTAMINEN

Sanni Katajisto

STANDARDIIN PERUSTUVAN SÄILYVYYSTEHOJKUUSTESTIN SOVELTAMINEN

Työn tavoitteena oli kehittää ja verifioida tuotteen säilyvyyttä mittaava mikrobiologinen testimenetelmä neljälle eri tuotteelle Finnsusp Oy:lle osana heidän palvelulaboratoriahanketta. Testimenetelmä suunniteltiin ISO 11930 standardin ja Ph. Eur. 5.1.3 ohjeen mukaan. Menetelmä perustuu tuotteen inokulointiin ja siitä tietyillä aikapisteillä otettujen näytteiden testaamiseen. Aikapisteillä otetuista näytteistä määritetään enumeroimalla selviytyneiden mikrobien määrä, joiden perusteella lasketaan mikrobien vähenemisarvo. Tätä arvoa verrataan standardeissa annettuihin kriteereihin. Jos tuote täyttää kriteerit, se täyttää standardin vaatimukset säilyvyydelle.

Menetelmällä testattavat tuotteet olivat osa terveydenhuollon laitteita ja osa eläinten hoitoon tarkoitettuja tuotteita. Kaikissa tuotteissa vaikuttavana aineena oli pihkajohdos, jolla on antimikrobisia eli mikrobeja tuhoavia ja niiden kasvua estäviä vaikutuksia. Testeistä saatujen tulosten perusteella jokainen tuote täytti standardin vaatimukset säilyvyydelle. Tehokkainta tuotteiden säilyvyys oli bakteerien kohdalla, jotka tuote oli tuhonnut ensimmäisiltä aikapisteiltä lähtien lähes täydellisesti. Hiivojen ja homeiden tuhoutuminen oli hitaampaa, mutta niiden määrä väheni kuitenkin kriteerien vaatimusten mukaisesti.

Jokaiselle tuotteelle kehitetyt testimenetelmät ovat luotettavia, vaikka osaa menetelmistä olisi aiheellista vielä optimoida tarkkuuden parantamiseksi. Saadut tulokset olivat odotusten mukaisia ja niiden perusteella voidaan päätellä, että testattujen tuotteiden kontaminaatoriski ei ole suuri. Finnsusp Oy voi jatkossa käyttää kehitettyjä menetelmiä vastaavien tuotetyyppien testaukseen luotettavasti tässä työssä tehdyn onnistuneen verifiointin perusteella.

ASIASANAT:

pihka, terveydenhuollon laite, antimikrobinen, säilyvyystekkuus

Sanni Katajisto

APPLICATION OF STANDARD-BASED TEST FOR PRESERVATION EFFICACY

The aim of this study was to develop and verify a test method in order to evaluate preservation of four different products as part of a Finnsusp Ltd.'s service laboratory project. The test method was designed according to International standard ISO 11930 and *European Pharmacopoeia* 5.1.3. The method is based on the inoculation of the product and testing it at set time intervals. The amount of surviving microbes is evaluated by enumerating samples taken from the product at each set time interval. Based on the result from the enumeration, microbial log reduction values are calculated and then compared with criteria mandated by the standard. If the reduction values comply with the criteria, the product meets the requirements of the standard for preservation.

The product types tested with the method were either medical devices or animal care products. The active substance in every product was resin derivative which has antimicrobial effects. This means that it has the ability to prevent microbial growth. According to the results obtained from the test, each product met the demands for preservation. Preservation was the most efficient for bacteria which were all killed at the first set test point. The reduction of yeasts and molds was slower but it met the demands of the criteria.

The test method developed for each product type is reliable even though it would be justified to optimize part of the methods in order to improve accuracy. The results obtained were as expected and allow the conclusion to be drawn that the products are not easily contaminated. In future Finnsusp Ltd. can utilize the methods developed during this study to test the products reliably.

KEYWORDS:

resin, medical device, antimicrobial, preservation efficacy

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	7
1 JOHDANTO	8
2 KÄYTETYT STANDARDIT JA OHJEET	9
2.1 ISO 11930:2012 Cosmetics – Microbiology - Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product	9
2.2 Ph. Eur. 5.1.3. Efficacy of antimicrobial preservation (01/2008:50103)	11
2.3 ISO 11930 vs. Ph. Eur. 5.1.3.	12
2.4 Standardien käyttö työssä	13
3 TERVEYDENHUOLLON LAITTEET JA TARVIKKEET	14
4 TUTKITTAVIEN TUOTTEIDEN OMINAISUUKSISTA	18
4.1 Pihka	18
4.2 Antimikrobiset vaikutukset	20
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	21
5.1 Testattavat tuotteet	21
5.2 Standardit, ohjeet ja käytetyt mikrobikannat	21
5.2.1 Standardit ja ohjeet	21
5.2.2 Mikrobikannat	22
5.3 Reagenssit	22
5.4 Laitteet ja välineet	23
6 TYÖN SUORITUS	24
6.1 Standardisuurien valmistus	24
6.2 Kalibroidun suspension valmistus	25
6.2.1 Bakteerit ja <i>C. albicans</i>	25
6.2.2 <i>A. brasiliensis</i>	25
6.3 Neutraloijan tehokkuuden osoitus	26
6.4 Säilyvyystehokkuustesti	27
6.4.1 Tuotteet A ja B	27
6.4.2 Tuote C	28
6.4.3 Tuote D	28

7 TULOKSET	31
7.1 Neutraloijan tehokkuustesti	31
7.2 Tuote A säilyvyystehokkuustesti	33
7.3 Tuote B säilyvyystehokkuustesti	36
7.4 Tuote C säilyvyystehokkuustesti	38
7.5 Tuote D	40
8 TULOSTEN TARKASTELU	42
8.1 Varastokasvustot	42
8.2 Standardisuorat	42
8.3 Neutraloijan tehokkuustesti	42
8.4 Säilyvyystehokkuustestin tulokset	43
9 PÄÄTELMÄT	45
9.1 Varastokasvustot	45
9.2 Standardisuorat	45
9.3 Tuotteiden testaus	46
LÄHTEET	47

LIITTEET

Liite 1. ISO 11930 standardin vaatimat mikrobikannat.

Liite 2. Ph. Eur. 5.1.3. ohjeen vaatimat mikrobikannat.

Liite 3. *E. coli* standardisuora.

Liite 4. *S. aureus* standardisuora.

Liite 5. *P. aeruginosa* standardisuora.

Liite 6. *C. albicans* standardisuora.

KUVAT

Kuva 1 Abietiinihappo 18

Kuva 2 Pimaarihappo 19

KUVIOT

Kuvio 1 Ei-invasiivisten laitteiden luokittelu.	16
Kuvio 2 Tuotteen A bakteerien säilyvyystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina.	33
Kuvio 3 Tuotteen A hiivan säilyvyystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina.	34
Kuvio 4 Tuotteen A säilyvyystehokkuustestin tulokset, <i>A. brasiliensis</i> .	35
Kuvio 5 Tuotteen B bakteerien säilyvyystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina.	36
Kuvio 6 Tuotteen B hiivan säilyvyystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina.	37
Kuvio 7 Tuotteen B säilyvyystehokkuustestin tulokset, <i>A. brasiliensis</i> .	38
Kuvio 8 Tuotteen C bakteerien säilyvyystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina.	39
Kuvio 9 Tuotteen C hiivan säilyvyystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina.	39
Kuvio 10 Tuotteen C säilyvyystehokkuustestin tulokset, <i>A. brasiliensis</i> .	40

TAULUKOT

Taulukko 1 Standardin ISO 11930 kriteerit vähenemiselle.	11
Taulukko 2 Ph. Eur. ohjeen kriteerit ulkoisesti käytettävien tuotteiden säilyvyydelle.	12
Taulukko 3 Mikrobit ja niiden kannat	22
Taulukko 4 Reagenssit	22
Taulukko 5 Laitteet ja välineet	23
Taulukko 6 Mikrobien kasvatusalustat, inkubointilämpötilat ja -ajat	25
Taulukko 7 Mikrobien kasvatusolosuhteet säilyvyystehokkuus testeihin	30
Taulukko 8 Neutraloijan tehokkuustestin tulokset, <i>E. coli</i>	31
Taulukko 9 Neutraloijan tehokkuustestin tulokset, <i>S. aureus</i>	32
Taulukko 10 Neutraloijan tehokkuustestin tulokset, <i>P. aeruginosa</i>	32
Taulukko 11 Neutraloijan tehokkuustestin tulokset, <i>C. albicans</i>	32
Taulukko 12 Neutraloijan tehokkuustestin tulokset, <i>A. brasiliensis</i>	32
Taulukko 13 Mikrobien väheneminen prosentteina tuotteella A	35
Taulukko 14 Mikrobien kasvu tuotteella D.	41

KÄYTETYT LYHENTEET

Lyhenne	Lyhenteen selitys
DEB	Dey-Engley neutralizing Broth
ISO	International Organization for Standardization
PDA	Potato dextrose agar
Ph. Eur.	<i>European Pharmacopoeia</i>
SDA	Sabouraud Dextrose agar
TSA	Tryptic Soy agar

1 JOHDANTO

Työn tarkoituksena oli kehittää ja verifioida testimenetelmä standardin ISO 11930:2012 Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product sekä *European Pharmacopoeian* (Euroopan farmakopea) 5.1.3. Efficacy of antimicrobial preservation -ohjeen pohjalta. Tavoitteena oli kehittää testimenetelmä siten, että sitä voidaan jatkossa käyttää tässä työssä käytettyjen tuotetyyppien rutiininomaiseen säilyvyyden testaamiseen. Työ suoritettiin Finnsusp Oy:lle osana heidän palvelulaboratoriahanketta. Finnsusp tai tutummin Piilokset on kotimainen yritys, joka valmistaa erilaisia lääkinnällisiä laitteita muun muassa silmälasilinssejä, piilolinssien hoitonesteitä ja silmienhoitotuotteita.

Testimenetelmän kehitykseen käytetyssä standardissa ISO 11930 ja Ph. Eur. 5.1.3. ohjeessa esitetään tuotteen säilyvyyttä mittaava testimenetelmä. Kummassakin menetelmä perustuu tuotteen inokuloimiseen ja siitä tietyin aikaväleihin otettujen näytteiden testaamiseen. Näytteistä määritetään selviytyneiden mikrobien lukumäärä suorittamalla maljavalu ja laskemalla pesäkkeiden lukumäärä. Pesäkemäärän perusteella lasketaan logaritminen vähenemisarvo, jota verrataan standardissa ja ohjeessa annettuihin kriteereihin. Jos tuote täyttää nämä kriteerit, se täyttää myös standardin ja ohjeen vaatimukset säilyvyydelle.

Tässä työssä testimenetelmä kehitettiin neljälle eri tuotetyypille, joista osa oli lääkinnällisiä laitteita ja osa eläinten hoitoon tarkoitettuja tuotteita. Yhdistävä tekijä näille tuotteille oli niiden vaikuttava-aine – pihkajohdos. Pihkaa on käytetty jo vuosisatojen ajan haavojen ja palovammojen hoitoon siinä olevien antimikrobisten eli mikrobien kasvua ja lisääntymistä estäviä vaikutuksien vuoksi. Pihka on väriltään kellertävä ja huoneenlämmössä kiinteä useiden aineiden seos (Fengel ym. 2003), jota erittyy puun pinnalle suojaamaan sitä tuholaisilta ja patogeeneilta esim. puun pinnan haavoittuessa. Puun pinnalle haavautuneeseen kohtaan muodostunut kiinteähkö pihka suojaa puuta fyysisesti sekä kemiallisesti: pihka sisältää tuholaisille ja patogeeneille myrkyllisiä yhdisteitä sekä se muodostaa fyysisen esteen (McKay ym. 2013).

2 KÄYTETYT STANDARDIT JA OHJEET

2.1 ISO 11930:2012 Cosmetics – Microbiology - Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product

Standardia ISO 11930 on tarkoitus käyttää kosmeettisen tuotteen antimikrobisen suojan kokonaisvaltaiseen arviointiin, mutta sitä voidaan käyttää soveltaen myös muidenkin, kuin kosmeettistentuotteiden arviointiin. Standardi määrittelee sarjan vaiheita, jotka tulee suorittaa arvioitaessa tuotteen kokonaisvaltaista antimikrobista suojaa. Standardi sisältää säilyvyystehokkuus testimenetelmän sekä menettelytavan kosmeettisen tuotteen kokonaisvaltaisen antimikrobisen suojan arviointiin perustuen riskinarviointiin. Tuloksia säilyvyystehokkuustestistä tai riskinarvioinnista tai molemmista käytetään osoittamaan vaaditun antimikrobisen suojan taso käyttäjään kohdistuvan riskin minimoimiseksi.

Säilyvyystehokkuustesti on vertailumenetelmä, jota käytetään kosmeettisen tuotteen säilyvyyden arviointiin. Testi on suunniteltu pääasiassa vesiliukoisille tai veteen sekoittuville tuotteille. Tuotteen antimikrobisen suojan arvioinnissa tulee standardin mukaan ottaa huomioon seuraavat seikat: tulokset säilyvyystehokkuustestistä sekä formulaation ominaisuudet ja mikrobiologisen riskinarvioinnin tiedot.

Säilyvyystehokkuustesti perustuu testattavan tuotteen inokuloimiseen erikseen jokaisella standardin ilmoittamalla mikrobikannalla (Liite 1) ja sen tarkalleen määritetyllä sulupitoisuudella. Mikrobien määrä tuotteessa lasketaan ajanhetkellä 0 sekä määrättyillä aikaväleillä (7 vrk, 14 vrk ja 28 vrk). Jokaisella aikavälillä inokuloidusta tuotteesta otetaan näyte ja neutraloidaan se, eli poistetaan tuotteen mahdollinen antimikrobinen vaikutus eli mikrobeja tuhoava ja niiden kasvua estävä vaikutus.

Tämä vaikutus poistetaan käyttämällä neutraloivaa ainetta. Neutraloijan tarkoituksena on neutraloida tuotteessa olevat mikrobien kasvua estävät vaikutukset, jotta tuotteessa vielä sillä hetkellä elinkykyisenä olevat mikrobit voivat elpyä ja kasvaa maljalle viljeltäessä. Neutraloijan tehokkuus tulee osoittaa erikseen jokaiselle mikrobille. Tehokkuus osoitetaan tekemällä testiputki, jossa on tuotetta, neutraloijaa ja mikrobisuspensiota sekä kontrolliputki, jossa tuotteen tilalla on suolaliuosta. Lisäksi tehdään mikrobisuspension kontrolliputki, jossa on vain suolaliuosta ja mikrobisuspensiota. Jokaisesta putkesta viljellään rinnakkaiset maljat ja viljellään niitä kullekin mikrobille sopivalla elatusaineella ja sopivissa olosuhteissa. Inkuboinnin jälkeen mikrobien määrä testimaljoilla tulee olla

vähintään 0,5 kertainen verrattuna kontrollimaljoilla olevaan määrään. Sen lisäksi kasvun kontrollimaljoilla tulee olla lähellä kasvua mikrobisuspension kontrollimaljoilla tai muuten neutraloijan katsotaan olevan myrkyllinen mikrobille.

Tuotteessa selviytyneiden mikrobien määrä selvitetään valamalla maljalle neutraloitua näytettä. Maljavalusta saatujen pesäkelukumäärien perusteella lasketaan jokaiselle tuotteelle jokaisella mikrobikannalla logaritminen vähenemisarvo, joka lasketaan seuraavasti:

$$R_x = \lg N_0 - \lg N_x$$

Jossa

N_0 on inokuloitujen mikrobien määrä ajanhetkellä 0

N_x on selviytyneiden mikrobien määrä jokaisella testatulla ajanhetkellä

Saatua vähenemisarvoa verrataan standardissa esitettyihin kriteerien A tai B (Taulukko 1) jokaisen määrätyn aikapisteen arvoihin. Kriteeriä A käytetään ensisijaisesti. Jos tuote ei kuitenkaan täytä kriteerin A ehtoja, voidaan käyttää kriteeriä B, kun tuotteella voidaan osoittaa olevan kontaminaatiota estäviä kontrollitekijöitä (esim. pumppupullo). Vähenemisarvoissa on hyväksytty 0,5 log vaihtelu (menetelmän tarkkuus/virhe). Jotta tuote täyttää kriteerin ehdot, vähenemisarvo ei saa olla pienempi kuin kriteerin osoittama arvo sekä joissakin tapauksissa mikrobien kasvu maljoilla ei saa olla lisääntynyt verrattuna aiempaan aikapisteeseen. Jos tuote täyttää nämä ehdot, katsotaan sen olevan standardin mukainen ja näin ollen täyttävän vaatimukset säilyvyydelle.

Taulukko 1 Standardin ISO 11930 kriteerit vähenemiselle.

Logaritmiset vähenemisarvot								
	Bakteerit			<i>C. albicans</i>			<i>A. brasiliensis</i>	
Aika-piste	7 vrk	14 vrk	28 vrk	7 vrk	14 vrk	28 vrk	14 vrk	28 vrk
Kriteeri A	≥ 3	≥ 3 ja NI	≥ 3 ja NI	≥ 1	≥ 1 ja NI	≥ 1 ja NI	≥ 0	≥ 1
Kriteeri B	ei suoriteta	≥ 3	≥ 3 ja NI	ei suoriteta	≥ 1	≥ 1 ja NI	≥ 0	≥ 0 ja NI
NI: ei lisääntymistä kasvussa verrattuna edelliseen aikapisteeseen Hyväksytty tulos: 0,5 log vaihteluväli sallitaan								

2.2 Ph. Eur. 5.1.3. Efficacy of antimicrobial preservation (01/2008:50103)

European Pharmacopoeian ohjetta 5.1.3. Efficacy of antimicrobial preservation on tarkoitus käyttää apuna lääkevalmisteiden antimikrobisen säilyvyyden tehokkuuden arviointiin ja testaukseen. Ohjeessa kuvataan testimenetelmä tuotteen antimikrobisen tehokkuuden säilyvyyden testaamiseen sekä kriteerit, jotka täyttäessään tuotteen mikrobeilta suojaavat ominaisuudet ovat riittäviä.

Ohjeessa kuvatussa testimenetelmässä tuote inokuloidaan erikseen jokaisella neljällä määrättyllä mikrobilla (Liite 2) sen lopullisessa säilytysastiassa aina, kun mahdollista ja inokuloitua tuotetta säilytetään määrättyissä olosuhteissa tietyn ajan verran. Inokuloidusta tuotteesta otetaan näytteitä tietyin aikaväleihin ja lasketaan siinä olevien mikrobin lukumäärä joko kalvosuodatuksen tai maljavalun avulla. Tuotteen antimikrobinen aktiivisuus tulee poistaa ennen kasvatusalustalle viljelyä laimentamalla, suodattamalla tai käyttämällä tiettyä inaktivaattoria eli neutraloijaa.

Ohjeessa on annettu kolmelle eri tyyppiselle tuotteelle hyväksyntäkriteerit, jotka perustuvat mikrobin logaritmiseen vähenemiseen ajan mukaan. Hyväksyntäkriteerit A ja B on annettu parenteraalisille ja silmävalmisteille, ulkoisesti käytettäville valmisteille (topikaalisille) sekä suun kautta otettaville valmisteille. Kriteeriä A tulee käyttää ensisijaisesti.

Kriteeriä B voidaan käyttää, jos kriteerin A ehtoja ei saavuteta esim. haitallisten reaktioiden lisääntyneen riskin vuoksi. Ulkoisesti käytettävien valmisteiden kriteerit on esitetty taulukossa 2. Muiden tuoteluokkien kriteereitä ei esitetä, koska ne eivät ole tämän työn kannalta oleellisia.

Taulukko 2 Ph. Eur. ohjeen kriteerit ulkoisesti käytettävien tuotteiden säilyvyydelle.

Logaritmiset vähenemisarvot					
	Kriteeri	2 vrk	7 vrk	14 vrk	28 vrk
Bakteerit	A	2	3	-	NI
Sienet	B	-	-	3	NI
Bakteerit	A	-	-	2	NI
Sienet	B	-	-	1	NI
NI: ei lisääntymistä kasvussa verrattuna edelliseen aikapisteeseen					

2.3 ISO 11930 vs. Ph. Eur. 5.1.3.

Standardissa ISO 11930 ja Ph. Eur. 5.1.3. ohjeessa on kummassakin esitetty testimenetelmä tuotteen säilyvyyden arvioimiseen. Vaikka testimenetelmä kummassakin perustuu tuotteen inokuloimiseen ja siitä tietyillä aikapisteillä otettujen näytteiden testaamiseen, niistä löytyy myös muutamia eroavaisuuksia.

Vaikka testimenetelmä kummassakin on hyvin saman kaltainen, mutta ne on silti tarkoitettu erilaisten tuotteiden testaukseen: ISO standardi on tarkoitettu kosmeettisille tuotteille ja Ph. Eur. ohje lääkevalmisteille. Toinen ero löytyy testeissä käytettävistä mikro-organismeista. ISO standardissa käytetään viittä eri mikro-organismia, kun taas Ph. Eur. ohjeessa vain neljää eri mikro-organismia. Nämä käytetyt mikro-organismit ovat kuitenkin samoja kummassakin, ISO standardissa vain käytetään lisäksi myös *E. colia*.

Itse testimenetelmästä löytyy myös muutama eroavaisuus. Yksi näistä on menetelmässä käytettävä tapa selviytyneiden pesäkkeiden lukumäärän määrittämiseen. ISO standardissa pesäkkeiden lukumäärän määrittäminen tehdään maljavalulla, kun taas Ph. Eur. ohjeen mukaan sen voi tehdä joko maljavalulla tai kalvosuodatuksella. Toinen eroavaisuus on

niin sanotussa 0 -hetken (ajanhetki jolloin tuote on inokuloitu mikrobisuspensiolla) viljelyssä. ISO standardin mukaan ajanhetkellä 0 tuotteessa olevien mikrobien lukumäärä on sama, kuin tuotteen inokuloimiseen käytetyn mikrobisuspension solupitoisuus. Tämä tarkoittaa sitä, että 0 -hetken solupitoisuus saadaan tekemällä maljavalu mikrobisuspensiosta ja laskemalla siinä olevien pesäkkeiden lukumäärä. Ph. Eur. ohjeen mukaan 0 -hetken solupitoisuus taas saadaan ottamalla tuotteesta näyte heti inokuloimisen jälkeen ja testaamalla se, kuten muutkin aikapisteet.

Sekä ISO standardissa että Ph. Eur. ohjeessa jokaiselle mikrobille lasketaan jokaisella aikapisteellä logaritminen vähenemisarvo, jota verrataan asetettuihin kriteereihin annetuilla aikapisteillä. ISO standardissa nämä aikapisteet ja kriteerit ovat samat riippumatta tuotteesta. Kriteerejä on kaksi, joista toinen ottaa huomioon testitulokset ja toinen sekä testitulokset että riskianalyysin. Ph. Eur. ohjeessa taas on annettu kriteerit eri tuotetyyppien mukaan kolmelle eri tyyppiselle tuotteelle. Näistä kahdelle eri tuotetyypille on annettu vielä kahdet eri kriteerit lähes samalla tavalla kuin ISO standardissa. Aikapisteet joilla testi tehdään, taas vaihtelevat tuotetyypin mukaan.

2.4 Standardien käyttö työssä

Koska ISO standardi ja Ph. Eur. ohje ovat toistensa kanssa käytännössä identtiset, suoritettiin työ ISO standardin yksityiskohtaisempien ohjeiden mukaan ja käyttäen viittä eri testimikrobikantaa. Standardin määäämien aikapisteiden lisäksi testattiin kaksi ylimääräistä aikapistettä: 24 h ja 48 h. Tuloksia tarkasteltiin ISO standardin kriteerin A mukaan niiden aikapisteiden (kappale 2.1) osalta, joille standardi on asettanut pienimmät sallitut logaritmiset arvot. Ph. Eur. ulkoisesti käytettävien tuotteiden hyväksyntäkriteereissä taas on asetettu bakteereille pienin sallittu logaritminen arvo 48 tunnin kohdalle. Tästä johtuen tulosten arvioinnissa käytetään 48 h tunnin kohdalla Ph. Eur. ohjeen kriteeriä.

3 TERVEYDENHUOLLON LAITTEET JA TARVIKKEET

Terveydenhuollon laitteiksi ja tarvikkeiksi luokitellaan useita erilaisia tuotteita, joilla on toisistaan hyvin poikkeavia käyttötarkoituksia. Yhdistävä tekijä näille kaikille on kuitenkin se, että ne on tarkoitettu tavalla tai toisella ihmisen terveyden edistämiseen, hoitoon tai ylläpitoon, kuten osa tässä työssä testatuista tuotteista. Valviran (2016) virallisen määrittelmän mukaan ”Terveydenhuollon laitteella ja tarvikkeella tarkoitetaan instrumenttia, laitteistoa, välinettä, ohjelmistoa, materiaalia tai muuta yksinään tai yhdistelmänä käytettävää laitetta tai tarviketta sekä sen asianmukaiseen toimintaan tarvittavaa ohjelmistoa, jonka sen valmistaja on tarkoittanut käytettäväksi ihmisen

- a) sairauden diagnosointiin, ehkäisyyn, tarkkailuun, hoitoon tai lievitykseen,
- b) vamman tai vajavuuden diagnosointiin, tarkkailuun, hoitoon, lievitykseen tai kompensointiin,
- c) anatomian tai fysiologisen toiminnon tutkimiseen, korvaamiseen tai muunteluun; tai
- d) hedelmöitymisen säätelyyn.”

Terveydenhuollon laitteen tai tarvikkeen suunnittelu- ja valmistusprosessi

Terveydenhuollon laitteen suunnittelu- ja valmistusprosessi on monivaiheinen sisältäen monta direktiiveillä tarkalleen määrättyä vaihetta. Ensimmäinen tärkeä vaihe prosessissa on tuotteen käyttötarkoituksen määrittely (Ståhlberg 2015). Valmistaja antaa tuotteelleen käyttötarkoituksen, joka kertoo tarkasti, mihin tuotetta kuuluu käyttää. Tämä käyttötarkoitus taas määrittelee, onko tuote terveydenhuollon laite vai ei.

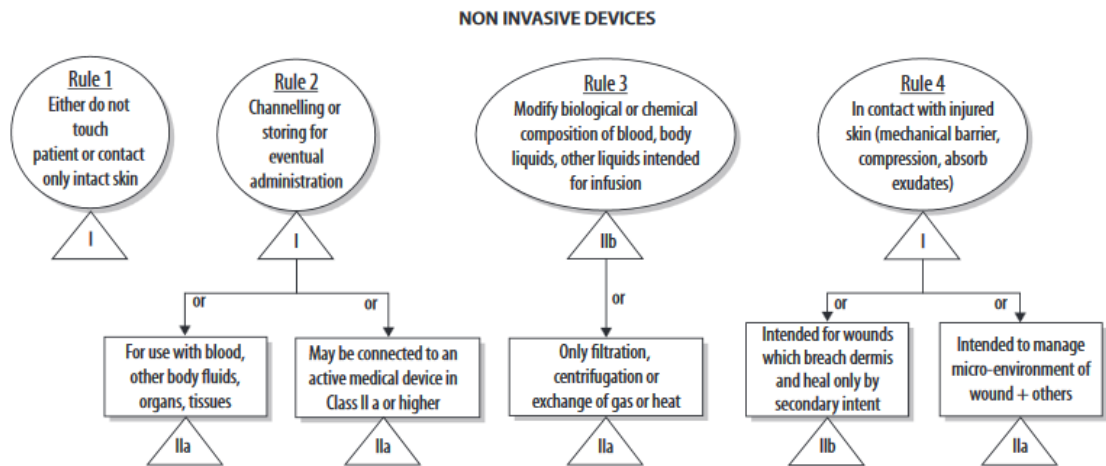
Mahdollisimman aikaisessa vaiheessa, heti käyttötarkoituksen antamisen jälkeen, tulee määritellä tuotteen luokka. Terveydenhuollon laitteet määritellään luokkiin I, II a, II b ja III riskin perusteella ja sen jälkeen tarkemmin esimerkiksi laitteen invasiivisuuden ja potilaisiin kohdistuvan kontaktiajan mukaan sekä sen perusteella, mihin kehon osaan laitteen käyttö vaikuttaa (Euroopan Komissio 2010). Pienimmän riskin aiheuttaa luokan I tuotteet ja suurimman riskin luokan III tuotteet.

Invasiivisuuden mukaan laitteet jaotellaan mm. invasiivisiin laitteisiin, kirurgisiin invasiivisiin laitteisiin sekä implantoitaviin laitteisiin ja ei-invasiivisiin laitteisiin. Invasiiviseksi

laite luokitellaan, kun se viedään osittain tai kokonaan kehon sisään joko kehon pinnan tai kehon luonnollisen aukon (esim. korva, suu) läpi. Kirurgiseksi invasiiviseksi laitteeksi taas luokitellaan sellaiset laitteet, jotka viedään kehon sisälle kehon pinnan läpi kirurgisen toimenpiteen avulla. Implantoitavat laitteet on tarkoitettu kokonaan ihmiskehoon implantoitaviksi ja sinne paikoilleen jätettäväksi kirurgisen toimenpiteen avulla. Ei-invasiiviset laitteet ovat joko kosketuksissa potilaan ihoon tai eivät ole lainkaan kosketuksissa. (Euroopan Komissio 2010, 8)

Potilasiin kohdistuva kontaktiaika laitteen kanssa jaotellaan tilapäiseen, lyhytaikaiseen ja pitkäaikaiseen keston. Tilapäiseksi käyttö luokitellaan, kun laitetta on tarkoitus käyttää yhtäjaksoisesti alle 60 minuuttia. Lyhytaikaiseksi käyttö taas luokitellaan, kun laitetta on tarkoitus käyttää yhtäjaksoisesti enimmillään 30 vuorokautta. Pitkäaikaiseen keston luokitellaan laitteet, joita on tarkoitus käyttää yhtäjaksoisesti yli 30 vuorokautta. (Euroopan Komissio 2010; 7, 8)

Luokittelussa käytetään lisäksi apuna erilaisia itsenäisiä sääntöjä (Euroopan Komissio 2010, 16). Näitä sääntöjä on yhteensä 18 kappaletta ja osa niistä koskee esimerkiksi ei-invasiivisia laitteita, osa invasiivisia laitteita ja osa on niin sanottuja erityisiä sääntöjä. Seuraavaksi tarkastellaan luokkiin jaottelua esimerkin ja kaaviokuvion avulla. Kuviossa 1 kuvataan ei-invasiivisten laitteiden jaottelua sääntöjen mukaan. Otetaan esimerkiksi laastari, jotka luokitellaan terveydenhuollon laitteeksi ja sen katsotaan olevan ei-invasiivinen, koska se on vain kosketuksissa ihoon. Ei-invasiivisten laitteiden jaottelun säännön 4 mukaan, laastari kuuluu terveydenhuollon laitteiden luokkaan I, koska sen on tarkoituksena estää veren ja muiden mahdollisten eritteiden vuoto.



Kuvio 1 Ei-invasiivisten laitteiden luokittelu. (Euroopan Komissio 2010)

Kun terveydenhuollon laitteen luokka on määritelty, seuraavana vaiheena on tuotteen vaatimusten tunnistaminen. Nämä vaatimukset ovat tuotespesifisiä (olennaiset vaatimukset) ja laadunhallintajärjestelmäspesifisiä (esim. tietyin aikaväleihin tapahtuva laadunvarmistus) (Ståhlberg 2015). Olennaisiin vaatimuksiin kuuluu tuotteesta riippuen sekä yleisiä vaatimuksia että muun muassa suunnittelua ja rakennetta koskevia vaatimuksia. Yleisiä vaatimuksia on muun muassa, että tuotteen tulee olla suunniteltu ja valmistettu siten, että kun sitä käytetään sille tarkoitetuissa olosuhteissa ja sille tarkoitettuun tehtävään, se ei aiheuta turvallisuus- tai terveysriskiä käyttäjälle (Council directive 93/42/EEC 1993). Lisäksi tuotteen tulee saavuttaa sille määritetty toimivuus ja suorituskyky, kun sitä käytetään käyttötarkoituksensa mukaisesti (Ståhlberg 2015). Suunnittelua ja rakennetta koskevia vaatimuksia taas ovat esimerkiksi kemikaalisia, fysikaalisia ja biologisia ominaisuuksia koskevat vaatimukset sekä mikrobikontaminaatioihin liittyvät vaatimukset (Council directive 93/42/EEC 1993). Osana vaatimuksiin kuuluu myös riskianalyysin tekeminen tuotteeseen liittyvien mahdollisten vaarojen tunnistamiseksi ja sekä niistä aiheutuvien mahdollisten riskien poistamiseksi ja vähentämiseksi (Ståhlberg 2015, Valvira 2016). Esimerkiksi tässä työssä testatuissa tuotteissa oleva pihkajohdos on mahdollinen allergeeni ja jotkut saattavat saada siitä allergiaoireita, mikä on otettava huomioon tuotteiden riskianalysissä.

Kun tuotteen vaatimukset on tunnistettu, seuraavana vaiheena on vaatimustenmukaisuuden osoitus, jossa kannattavaa on tukeutua EU:n yhdenmukaistettuihin standardeihin (Ståhlberg 2015). Vaatimustenmukaisuus osoitetaan mm. erilaisilla dokumenteilla,

verifioidulla, validoidulla sekä kliinisellä arvioinnilla (Ståhlberg 2015). Kliinisellä arvioinnilla valmistaja osoittaa, että tuote täyttää sille asetut vaatimukset sekä toimivuuden ja tehokkuuden että turvallisuuden osalta (Council directive 93/42/EEC 1993). Osana vaatimustenmukaisuuden osoittamista suorittavien kliinisten tutkimusten avulla arvioidaan ja määritetään laitteen ominaisuuksia ja suorituskykyä sekä haittavaikutuksia (Valvira 2016, Council directive 93/42/EEC 1993). Näiden tutkimusten tulosten, riskianalyysin ja muiden datojen perusteella laitteen valmistaja osoittaa, että laite täyttää sille asetetut olennaiset vaatimukset.

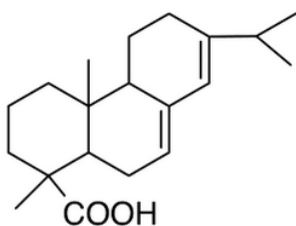
Viimeisinä vaiheina terveydenhuollon laitteen suunnittelu- ja valmistusprosessissa on vaatimustenmukaisuudenvakuutus, CE-merkintä ja tuotteen rekisteröinti. Allekirjoittamalla vaatimustenmukaisuudenvakuutuksen, valmistaja ottaa vastuulleensa, että tuote täyttää kaikki sille direktiiveissä asetetut vaatimukset ja muut mahdolliset vaatimukset (Ståhlberg 2015). CE-merkinnällä, jolla jokainen terveydenhuollon laite on varustettava, laitteen valmistaja vahvistaa, että laite täyttää sitä koskevat direktiivien ja lainsäädäntöjen vaatimukset (Valvira 2016, Council directive 93/42/EEC 1993). Merkintä on oltava laitteessa siten, että se on näkyvässä ja luettavissa. Laitteen mukana on myös oltava ohjeet turvalliseen käyttöön ja valmistajan tunnistamiseen tarvittavat tiedot (Valvira 2016). Käytännössä nämä tarkoittavat laitteen tai tarvikkeen mukana tulevia käyttöohjeita sekä niissä olevia merkintöjä. Ennen CE-merkinnän kiinnitystä tulee sen vaatimustenmukaisuus arvioida. Vaatimusten mukaisuuden arviointi vaatii Ilmoitetun Laitoksen (Notified Body) tarkastuksen ja hyväksynnän muille kuin luokan I tuotteille. Viimeinen vaihe ennen tuotteen saattamista markkinoille on laitteen rekisteröinti ja se tehdään ilmoittamalla Valviralle (Ståhlberg, 2015).

4 TUTKITTAVIEN TUOTTEIDEN OMINAISUUKSISTA

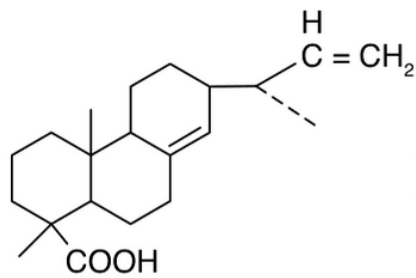
Kaikissa tutkittavissa tuotteissa yhteisenä ominaisuutena oli niissä vaikuttavana aineena oleva pihkajohdos, joka aiheuttaa tuotteille mm. antimikrobisia vaikutuksia. Pihkan antimikrobiset vaikutukset ovatkin olleet tiedossa jo pitkään, sillä sitä on käytetty vuosisatojen ajan kansanlääketieteessä esimerkiksi haavan hoitoon. Seuraavassa kerrotaan tarkemmin pihkan kemiallisista sekä antimikrobisista ominaisuuksista.

4.1 Pihka

Pihka ei tarkoita yhtä ja tiettyä kemiallista yhdistettä vaan yhdisteiden seosta ja enemmänkin fyysistä tilaa (Fengel ym. 2003). Pihka on puissa erittyvää kellertävää ja neste-mäistä hiilivetyseosta, joka koostuu pääasiassa haihtuvista ja haihtumattomista terpeenistä sekä eteerisistä öljyistä (Langenheim 2003). Pihkan kemiallinen koostumus kuitenkin vaihtelee paljon riippuen sen lähteestä (Sipponen 2013). Havupuun pihkassa esimerkiksi on suurissa määrin diterpeenisiä orgaanisia karboksyylihappoja, hartsihappoja (Sipponen 2003). Nämä hartsihapot ovat yleensä kolmirenkaisia (Fengel ym. 1983) ja ne jaetaan kolmeen eri ryhmään, joita ovat abietane, pimarane ja labdane -tyypit (Langenheim 2003). Näistä hartsihappotyypeistä mäntykasveissa eniten on abietiinihappoa (Kuva 1) sekä pimaarihappoa (Kuva 2).



Kuva 1 Abietiinihappo (Zhang 2012, 88)



Kuva 2 Pimaarihappo (Zhang 2012, 88)

Pihkan sisältämät terpeenit, joiden yleisrakenne on $C_{10}H_{16}$ (Cowan 1999), jaetaan kuuteen luokkaan sen mukaan, kuinka monta isoterpeeniyksikköä on liittyneenä terpeeniin (Fengel 1983). Näitä luokkia ovat monoterpeenit (2 yksikköä), seskviterpeenit (3 yksikköä), diterpeenit (4yksikköä), sesterterpeenit (5 yksikköä) ja triterpeenit (6 yksikköä) (Fengel ym. 1983). Terpenoideiksi kutsutaan sellaisia terpeenejä, jotka sisältävät lisäelementtejä, kuten happea (Cowan 1999).

Pihkan haihtuva osa sisältää yleensä mono- ja/tai seskviterpeenejä, joita kutsutaan usein eteeriseksi öljyiksi (Langenheim 2003). Tämän haihtuvan osan monoterpeenien haihtuminen aiheuttaa havupuille tyypillisen tuoksun. Haihtumaton osa taas sisältää di- tai triterpeenejä, aldehydejä ja estereitä (Langenheim 2003). Haihtuvien ja haihtumattomien yhdisteiden suhteellinen osuus toisiinsa nähden määrää pihkan juoksevyyden, viskositeetin (Langenheim 2003). Mitä enemmän pihka sisältää haihtuvia yhdisteitä, sitä juoksevampaa pihka on. Havupuiden pihkan haihtuva osa on suuri (20-50 %) ja se sisältää enemmän monoterpeenejä kuin seskviterpeenejä. Haihtumaton osa taas koostuu yleensä diterpeeneistä (Langenheim 2003).

Havupuiden pihkat jaetaan kahteen eri ryhmään: fysiologiseen pihkaan sekä ei-fysiologiseen pihkaan. Fysiologista pihkaa esiintyy sydänpuun ja oksien pihkatiehyissä. Tätä fysiologista pihkaa kutsutaan nimellä ”oleoresin” (Sipponen 2013). ”Oleoresin” on monimutkainen seos, joka sisältää terpenoideja, jotka koostuvat diterpeeni ja turpentiini (monoterpeeni ja seskviterpeeni) osasta (Phillips & Croteau 1999). Ei-fysiologiseksi pihkaksi taas sanotaan pihkaa, joka on erittynyt puun pinnalle kaarnan haavoittuessa. Puun pinnan haavoittuessa fysiologinen ”oleoresin” tiikuu puun pinnalle. Hiljalleen pihkan haihtuvat terpeeniset osat haihtuvat pois ja ”oleoresin” sekoittuu eritteisiin ja aineisiin puun pinnalla muodostaen muhkuramaisia kasaumia pihkaa. Tätä pihkamuodostumaa kutsutaan nimellä ”callus resin” (Sipponen 2013).

4.2 Antimikrobiset vaikutukset

Havupuiden puolustusjärjestelmä tuholaisia ja patogeenejä vastaan on monimutkainen. Tärkeää osaa tässä järjestelmässä näyttelee mm. pihka ja sen antimikrobiset vaikutukset. Havupuiden pihka syntetisoidaan siihen erikoistuneissa rakenteissa, kuten pihkatiehyissä, joissa ohutseinäiset, pitkään elävät epiteelisolut valmistavat pihkaa (Nagy 2000). Puun pinnan haavoittuessa, se asettuu alttiiksi patogeeneille ja tuholaisille. Pinnan haavoittuminen aiheuttaa reaktioiden ketjun, jossa ensimmäisenä on pihkatiehyiden muodostuminen puukudokseen haavoittumisalueelle (Nagy 2000). Hiljalleen pihka erittyy puun pinnalle haavaumaan. Pihkan haihtuvien aineiden altistuessa ilmalle, ne haihtuvat hiljalleen pois, jolloin muodostuu puuta tuholaisilta ja patogeeneiltä suojaava puolikiinteä jäännös (Nagy 2000). Tämä muodostunut pihkajäännös on tehokas suoja hyönteisiä ja patogeenejä vastaan, sillä sen ainesosat (terpeenit) ovat myrkyllisiä hyönteisille ja patogeeneille sen lisäksi, että ne muodostavat fyysisen haavaa suojaavan esteen (McKay ym. 2013).

Pihkan ja sen yhdisteiden johdannaisten antimikrobisista vaikutuksista on tehty monta tutkimusta, joissa niiden antimikrobiset vaikutukset on todistettu. Cowanin (1999) ja Pengin (2000) tutkimuksien mukaan pihka on antimikrobinen sekä bakteereita että sieniä vastaan. Erään julkaisun mukaan pihkan antimikrobiset vaikutukset johtuvat useista eri pihkan orgaanisista komponenteista, kuten esimerkiksi terpeeneistä (Dimkic ym. 2016). Cowan (1999) toteaaakin julkaisussaan terpeenien olevan antimikrobisia sekä bakteereita että sieniä vastaan, viitaten useisiin eri lähteisiin. Samassa julkaisussa hän myös toteaa, ettei terpeenien toimintamekanismia bakteereita ja sieniä vastaan tunneta täysin, mutta sen uskotaan liittyvän solukalvon häirintää lipofiilisten yhdisteiden avulla. Phillips ja Croteau taas toteavat julkaisussaan (1999) ”oleoresiinin” turpentiini osan sisältävän erilaisia mikrobisia myrkkijä sekä hyönteismyrkkijä.

Hong ym. (2004) tekemän tutkimuksen tulosten mukaan eteeriset öljyt eli pihkan haihtumaton osa, joka sisältää mm. monoterpeenejä ja seskviterpeenejä on antimikrobinen gram-positiivisia, gram-negatiivisia bakteereita sekä sieniä vastaan. Lähes kaksikymmentä vuotta aiemmin tehdyn tutkimuksen (Kartnig ym. 1991) mukaan eteeriset öljyt ovat antimikrobisia gram-positiivisia bakteereita vastaan, mutta eivät gram-negatiivisia vastaan. Edellä mainituissa tutkimuksissa käytetyt eteeriset öljyt olivat eristetty eri havupuulajeista, mikä viittaa siihen, että öljyjen antimikrobiaalinen vaikutus saattaa vaihdella sen mukaan, mistä havupuusta eteeriset öljyt on eristetty.

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Työssä kehitettiin testimenetelmä säilyvyystehokkuudelle standardin ISO 11930 ja Ph. Eur. 5.1.3. ohjeen mukaan. Testattavista tuotteista osa on terveydenhuollon laitteita ja osa eläinten hoitoon tarkoitettuja. Osa tuotteista on luokiteltu terveydenhuollon laitteiksi, koska ne on tarkoitettu ihmisten hoitoon. Tarkempi määrittely terveydenhuollon laitteelle on kappaleessa 3.

5.1 Testattavat tuotteet

Menetelmällä testattiin neljä eri tuotetyyppiä, joista jokaisessa vaikuttavana aineena on pihkajohdos. Näistä tuote A oli vesipohjainen eläinlääkete tuote korvien hoitoon. Tuote B oli myös vesipohjainen terveydenhuollon laitteeksi määritelty tuote, joka on tarkoitettu hiuspohjan hoitoon. Tuote C oli etanolipohjainen kynsienhoitoon tarkoitettu tuote, joka on myös luokiteltu terveydenhuollon laitteeksi. Tuote D on eläinten hoitoon tarkoitettu hoitopyyhe, jossa vaikuttava aine on imeytetty tekstiiliin.

5.2 Standardit, ohjeet ja käytetyt mikrobikannat

5.2.1 Standardit ja ohjeet

Työ tehtiin kansainvälisen standardin Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product (ISO 11930:2012) ja *European Pharmacopoeian* 5.1.3. Efficacy of antimicrobial preservation -ohjeen mukaan. Testattavat tuotteet eivät ole luokiteltu kosmeettisiksi tuotteiksi tai lääkevalmisteiksi, mutta siitä huolimatta niitä tässä työssä testattiin aiemmin mainittujen standardin ja ohjeen mukaisilla säilyvyystehokkuus testeillä, jotka ovat tarkoitettuja kosmetiikalle ja lääkevalmisteille. Kyseinen standardi ja ohje on valittu tuotteiden testaamiseen, koska niitä pystyy helposti soveltamaan muillekin tuoteluokille ja ennen kaikkea, koska testattaville tuotteille ei ole omia tuoteluokkakohtaisia ISO standardeja tai Ph. Eur. ohjeita.

5.2.2 Mikrobikannat

Työssä käytettiin viittä eri standardin ja ohjeen määrittelemää testimikrobia, kolmea bakteeria, yhtä hiivaa sekä yhtä hometta. Käytetyt mikrobit olivat Finnsusp Oy:n pakastettuja puhtasviljelmiä. Käytetyt mikrobikannat ja niiden kantanumerot ovat lueteltu Taulukossa 3.

Taulukko 3 Mikrobit ja niiden kannat

Mikrobi	Kanta
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404

5.3 Reagenssit

Työssä käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4 Reagenssit

Reagenssit
Tryptic soy agar, 84602.0500, lot E0203W, VWR Chemicals
Tryptic soy agar, VM717058 547; 1.05458.0500, Merck KGaA
Potato dextrose agar, 84651.0500, lot 1160, VWR Chemicals
Sabouraud dextrose 4 % agar, 84663.0500, lot 1208, VWR Chemicals
Sabouraud dextrose 4 % agar, VM703638 542; 1.05438.0500, Merck KGaA
Natriumkloridi NaCl, 27808.468, lot 15H050039, VWR Chemicals
Polysorbaatti 80, 303570ZK, lot 75664, VWR Chemicals
Difco D/E Neutralizing Broth, lot 5223996

5.4 Laitteet ja välineet

Työssä käytetyt laitteet ja välineet on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5 Laitteet ja välineet

Laitteet ja välineet
Bioturvakaappi Kojair
Spektrofotometri Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech
Autoklaavi Finnaqua E34
Vesihaude Memmert
Vesihaude Certomat Wr
pH-MITTARI Thermo Orion, model 420
Lämpökaappi Memmert
Lämpökaappi GWB, WTC binder
Lämpökaappi Termaks
Pesäkelaskija Stuart Scientific
Mikroskooppi Euromex Holland
Lämmittävä magneettisekoittaja, Heidolph MR 3001
Automaattipipetti Biohit mLine 1000
Automaattipipetti Biohit mLine 5000
Sekoittaja Merck Eurolab
Sentrifuugi Heraeus Contifuge Stratos
Bürkerin kammio, Marienfeld
Yläkuppivaaka Mettler Toledo

6 TYÖN SUORITUS

Työn kokeelliseen osaan kuului useita useita eri vaiheita, kuten standardisuorien määrittäminen, kalibroidun solususpension valmistus, neutralisoijan tehokkuuden osoitus sekä säilyvyyshokkuustesti. Työ aloitettiin määrittämällä standardisuorat, joiden avulla pystyttiin valmistamaan kalibroidut solususpensiot eli suspensiot, joiden tarkka solupitoisuus on tiedossa. Tuotteissa tiedettiin myös olevan antimikrobisia vaikutuksia omaavia ainesosia, joiden vaikutus testissä tuli neutraloida. Tätä varten tuli löytää tarkoitukseen sopiva neutraloija ja osoittaa sen tehokkuus jokaisella mikrobilla. Lopuksi tehtiin säilyvyyshokkuustesti, jonka tulosten perusteella arvioitiin tuotteen säilyvyyttä. Seuraavassa on kuvattu jokaista työn vaihetta yksityiskohtaisemmin

6.1 Standardisuorien valmistus

Työ suoritettiin käyttäen viittä eri mikrobikantaa standardin ISO 11930 mukaan. Jokaiselle mikrobikannalle tehtiin varastokasvatus, josta tehtiin aina tarvittaessa käyttökasvatus. Jokaiselle mikro-organismille (ei *A. brasiliensis*) tehtiin myös standardisuora, jonka avulla voitiin jatkossa arvioida solususpensioiden pitoisuus. Tätä varten yksittäisiä pesäkkeitä siirrostettiin siten, että putkeen 1 tuli 1 pesäke ja putkeen 2 tuli 2 pesäkettä jne. Solut pestiin 0,9 % suolaliuoksella kahteen kertaan sentrifugoimalla niitä 25 minuutin ajan 4500 1/min. Viimeisen sentrifugoinnin jälkeen solususpensioiden absorbanssit mitattiin aallonpituudella 490 nm. Jokaisesta putkesta tehtiin laimennossarjat ja sopivia laimennoksia viljeltiin kolmena rinnakkaisena kullekin mikrobille sopivalle elatusaineelle. Maljoja inkuboitettiin Taulukon 6 mukaisesti, jonka jälkeen laskettiin pesäkkeiden määrä maljoilla ja sen perusteella suspension tarkka pitoisuus. Tulosten perusteella tehtiin standardisuorat, jotka ovat esitetty liitteissä 3, 4, 5 ja 6.

Taulukko 6 Mikrobien kasvatusalustat, inkubointilämpötilat ja -ajat

Mikrobi	Kasvatusalusta	Lämpötila (°C)	Aika
<i>E. coli</i>	TSA	32,5 ± 2,5	18-24 h
<i>S. aureus</i>	TSA	32,5 ± 2,5	18-24 h
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	32,5 ± 2,5	18-24 h
<i>C. albicans</i>	SDA	32,5 ± 2,5	18-24 h
<i>A. brasiliensis</i>	PDA	22,5 ± 2,5	3-5 vrk

6.2 Kalibroidun suspension valmistus

6.2.1 Bakteerit ja *C. albicans*

Kalibroidun suspension valmistamiseksi siirrostettiin soluja käyttökasvatusmaljalta 10 ml:aan 0,9 % NaCl-liuosta. Suspensio sekoitettiin homogeeniseksi ja sen absorbanssi mitattiin aallonpituudella 490 nm. Saatua tulosta verrattiin standardisuoraan, joka kertoo suspension teoreettisen solupitoisuuden. Bakteereilla suspension tavoiteltu pitoisuus oli $10^7 - 10^8$ cfu/ml ja hiivalla (*C. albicans*) $10^6 - 10^7$ cfu/ml. Tarvittaessa suspensiota laimennettiin, jotta sen pitoisuus saatiin tavoitellulle alueelle.

Suspension todellinen pitoisuus määritettiin tekemällä suspensiosta laimennossarja ja viljelemällä sopivia laimennoksia rinnakkaisina kullekin mikrobille sopivalla elatusaineella. Inkuboinnin jälkeen laskettiin pesäkkeiden lukumäärä maljoilla ja niiden perusteella määritettiin todellinen pitoisuus.

6.2.2 *A. brasiliensis*

Täyteen kasvaneelle *A. brasiliensis* maljalle pipetoitiin 10 ml polysorbaattiliuosta (0,9 % NaCl + 0,5 g/l polysorbaatti 80). Elatusaineen pinnalta itiöt rapsuteltiin liuokseen varovasti siirrostussilmukan avulla. Tämän jälkeen itiösuspensio siirrettiin putkeen ja ravisteltiin varovasti noin 1 minuutin ajan lasihelmien (halkaisija 2 mm) kanssa. Tämä taas suodatettiin sintratun lasisuodattimen läpi (huokoisuus 2 eli 40 µm – 100 µm) ja suodatin

huuhdeltiin muutamalla millilitralla suolaliuosta. Suodatettua suspensiota tutkittiin mikroskoopilla itäneiden itiöiden ja sienirihmastojen varalta. Jos itäneitä itiöitä löytyi, tuli suspensio hävittää. Jos taas sienirihmastoja löytyi paljon, tuli suspensio pestä kahdesti sentrifugoimalla 2000 g 20 min.

Suodatetusta itiösuspensiosta valmistettiin laimennossarja ja solujen pitoisuus laskettiin Bürkerin kammiolla sopivasta laimennoksesta mikroskoopin avulla. Koska itiöitä ei värjäty elinkyvyn varmistamiseksi (värjäytyneet itiöt elinkykyisiä), jokainen havaittu itiö laskettiin. Suspension tavoiteltu pitoisuus oli $10^6 - 10^7$ cfu/ml ja se valmistettiin suodatetusta itiösuspensiosta laimentamalla suolaliuokseen. Suspension todellinen pitoisuus määritettiin viljelemällä sopivia laimennoksia maljoille ja inkuboimalla Taulukon 6 mukaan.

6.3 Neutraloijan tehokkuuden osoitus

Kuten aiemmin mainittu, työssä käytettävät tuotteet sisältävät pihkaa, jolla on antimikrobisia ominaisuuksia. Tämä tarkoittaa sitä, että tuotteella on mikro-organismien kasvua ja lisääntymistä estäviä vaikutuksia. Säilyvyystehokkuus testiä varten tämä ominaisuus tulee poistaa eli neutraloida. Ominaisuuden poistamiseen käytetään erilaisia neutraloijia, joista tähän valikoitui D/E neutralizing broth eli DEB sen perusteella, että sen vaikutus on laajakirjoinen, sitä käytetään Finnsusp Oy:lla jo valmiiksi ja, koska pihkassa on fenolisia yhdisteitä, joita DEB neutraloijan tiedetään neutraloivan.

Valitun neutraloijan tehokkuus ja mikrobeille myrkyttömyys tuli osoittaa jokaisella mikrobikannalla. Tässä käytettäväksi tuotteeksi valittiin tuote A. Tehokkuutta ei osoitettu muilla tuotteilla, koska kaikissa tuotteissa oli sama vaikuttava aine. Tehokkuuden osoitus aloitettiin tekemällä solususpensio, jonka pitoisuus on noin 10^3 cfu/ml. Tämän jälkeen tehtiin kolme näyteputkea: testi (N_{vt}), kontrolli (N_{vn}) ja mikrobisuspension kontrolli (N_v). Testiputkeen (N_{vt}) pipetoitiin tuotetta, testattavaa neutraloijaa ja kalibroituja mikrobisuspensiota. Kontrolliputkeen taas (N_{vn}) pipetoitiin suolaliuosta tuotteen tilalle, neutraloijaa ja kalibroituja mikrobisuspensiota. Mikrobisuspension kontrolli putkeen (N_v) pipetoitiin suolaliuosta ja mikrobisuspensiota. Liuokset sekoitettiin tasaiseksi ja annettiin neutraloijan vaikuttaa huoneenlämmössä noin 30 ± 15 min. Tämä jälkeen jokaisesta putkesta viljeltiin kolme rinnakkaista maljaa ja valettiin päälle kullekin mikrobille sopiva elatusaine. Bakteeri ja *C. albicans* maljoja inkuboitui $(32,5 \pm 2,5)$ °C 48 – 72 h ja *A. brasiliensis* maljoja $(22,5 \pm 2,5)$ °C 3 – 5 vrk.

Inkuboinnin jälkeen maljoilla kasvaneet pesäkkeet laskettiin. Jotta neutraloijan tehokkuus ja käytetyille mikrobikannoilla myrkyttömyys olisi osoitettu, tuli sen täyttää alla mainitut ehdot:

$$N_{vf} \geq 0,5 N_{vn} \quad \text{ja} \quad N_{vn} \text{ on lähellä } N_v$$

6.4 Säilyvyystehokkuustesti

Säilyvyystehokkuustesti tehtiin erikseen jokaiselle tuotteelle, jokaisella mikro-organisilla. Tuotteen A ja B testaus on suoritettu suoraan standardin ISO 11930 mukaan. Tuote C taas on etanolipohjainen ja veteen liukenematon, mistä johtuen se tuli esikäsittellä ennen testausta. Koska tuote D taas on tekstiili, johon vaikuttava aine on imeytetty, se testattiin standardia soveltaen. Alla on kuvattu tarkemmin jokaisen tuotteen testimenetelmä.

6.4.1 Tuotteet A ja B

Testattavaa tuotetta pipetoitiin 10 ml aseptisesti steriiliin putkeen. Joukkoon pipetoitiin 100 µl kalibroituja mikrobisuspensiota ja sekoitettiin homogeeniseksi. Seos jätettiin seisomaan huoneenlämpöön.

Inokuloidusta tuotteesta otettiin näyte ja testattiin se standardin määräämillä aikapisteillä (7 vrk, 14 vrk ja 28 vrk) sekä kahdella ylimääräisellä aikapisteellä (24 h ja 48 h). Jokaisella aikapisteellä inokuloidusta tuotteesta otettiin 1 ml näyte, joka lisättiin 9 ml:aan neutraloijaa ja sekoitettiin tasaiseksi. Neutraloijan annettiin vaikuttaa noin 30 ± 15 minuutin ajan, jonka jälkeen siitä tehtiin laimennossarja 0,9 % NaCl-liuokseen. Jokaisesta laimennoksesta (näyte + neutraloija = 10^{-1}) viljeltiin 1 ml rinnakkaisina maljoille ja valettiin päälle kullekin mikrobille sopiva elatusaine (Taulukko 7). Maljoja inkuboitiin kullekin mikrobille sopivassa lämpötilassa tietyn ajan verran (Taulukko 7).

Inkuboinnin jälkeen laskettiin pesäkkeet maljoilla ja niiden perusteella määritettiin selviytyneiden mikrobien kokonaismäärä. Näiden perusteella taas laskettiin mikrobien logaritminen vähenemisarvo R_x seuraavan kaavan mukaan:

$$R_x = \lg N_0 - \lg N_x$$

Missä

N_0 on mikro-organismien lukumäärä ajanhetkellä t_0 eli kalibroidun suspension pitoisuus

N_x on selviytyneiden mikro-organismien lukumäärä jokaisella aikapisteellä t_x

Saatua vähenemisarvoa verrattiin standardin ISO 11930 asettamaan kriteeriin A (Taulukko 4) aikapisteillä 7 vrk, 14 vrk ja 28 vrk sekä *European Pharmacopoeian* ohjeen 5.1.3 topikaalisten tuotteiden kriteeriin A (Taulukko 5) aikapisteellä 48 h. Kriteerit täyttäessään tuote täyttää standardin tai ohjeen vaatimukset säilyvyydelle.

6.4.2 Tuote C

Tuotetta C pipetoitiin 10 ml aseptisesti steriiliin putkeen ja joukkoon pipetoitiin 100 µl kalibroituja mikrobisuspensiota. Suspensio sekoitettiin homogeeniseksi ja jätettiin huoneenlämpöön.

Kuten tuotteesta A ja B, myös tuotteesta C otettiin näyte ja testattiin se standardin määrämällä aikapisteillä (7 vrk, 14 vrk ja 28 vrk) sekä kahdella ylimääräisellä aikapisteellä (24 h ja 48 h). Koska tuote C on etanolipohjainen ja veteen liukenematon, se ei sekoitu homogeenisesti neutraloijaan, joka on vesiliuos. Tästä johtuen aikapisteillä otettava näyte on esikäsiteltävä emulgoimalla. Emulgointi tehtiin *European Pharmacopoeian* 2.6.12 Microbial examination of non-sterile products: microbial enumeration tests -ohjeessa olevaa mallia soveltamalla: 2 ml emulgaattoria (polysorbaatti 80) lämmitettiin noin 45 asteeseen ja joukkoon lisättiin 1 ml inokuloitua tuotetta sekä 9 ml suolaliuosta. Aineet sekoitettiin keskenään ja saatiin aikaan homogeeninen emulsio.

Saatua emulsiota pipetoitiin 1 ml putkeen, jossa oli 9 ml neutraloijaa ja sekoitettiin taiseksi. Tästä tehtiin laimennossarja ja viljelyt maljoille, kuten kohdassa 5.4.1. Maljoja inkuboitiin kullekin mikrobille sopivassa lämpötilassa tietyn ajan verran (Taulukko 7). Tulokset laskettiin, kuten kohdassa 5.4.1 on kuvattu.

6.4.3 Tuote D

Tuote D on hoitopyyhe, jossa vaikuttava-aine on imeytetty tekstiiliin. Tästä syystä sitä ei voida testata suoraan standardin ISO 11930 mukaan, joka on tarkoitettu vesiliukoisten tuotteiden testaukseen. Alempana kuvattu testaustapa suunniteltiin standardia soveltaen

ja laskien tuotteen määräksi tekstiiliin imeytetyn vaikuttavan aineen määrä eli 4,5 g. Tuotteen D testaus tehtiin vain kahdella aikapisteellä (24 h ja 48 h).

Testiä varten 9 steriiliin säilöpulloon siirrettiin kuhunkin yksi hoitopyyhe steriileillä pinseteillä ja inokuloitiin ne 45 µl:lla kalibroitua mikrobisuspensiota. Näistä 6 jätettiin huoneenlämpöön, mutta 3 testattiin heti (0-hetki) Ph. Eur. ohjeen mukaan, jotta saatiin selville mikrobikonsentraatio pyyhkeissä inokulointi hetkellä. ISO standardin ohjeen mukaan ei voitu määrittää alkukonsentraatiota pyyhkeillä, koska standardissa ohje on annettu mikrobisuspension konsentraation määrittämiseksi. Nämä kolme heti testattua pyyhettä toimivat alkukonsentraationa eli vertailuna seuraaville aikapisteille. Tämä johtui siitä, että mikrobit kasvoivat hoitopyyhkeellä useasti lauttoina, jolloin niiden tarkkaa määrää ei pystynyt laskemaan vaan tulos arvioitiin vähenemänä. Vaikka ne kasvaisivat selvinä pesäkkeinä, niiden määrän luotettava laskeminen olisi silti haasteellista, koska pesäkkeitä on vaikea erottaa hoitopyyhkeen lankasäikeiden seasta.

Aikapisteillä tuotteen testaaminen tapahtui siten, että kolmeen säilöpulloon, jossa oli inokuloitu hoitopyyhe, pipetoitiin 44,50 ml neutraloijaa ja sekoiteltiin varovasti sen verran, että koko hoitopyyhe kastui neutraloijasta. Neutraloijan annettiin vaikuttaa 30 ± 15 minuutin ajan, jonka jälkeen hoitopyyhe poistettiin säilöpullostani steriileillä pinseteillä samalla varovasti painellen pinseteillä pyyhkeestä ylimääräiset nesteet pois. Hoitopyyhe aseteltiin suuren petrimaljan (150 mm x 15 mm) pohjalle ja päälle valettiin kullekin mikrobille sopiva elatusaine (Taulukko 7). Maljoja inkuboitettiin kullekin mikrobille sopivassa lämpötilassa tietyn ajan verran (Taulukko 7).

Inkuboinnin jälkeen tarkasteltiin mikrobien kasvua maljoilla. Mikrobien tarkkaa määrää ei laskettu, koska se oli käytännössä mahdotonta aiemmin mainituista sekoista johtuen. Tästä syystä pesäkemääriä ja sitä, täyttivätkö ne standardin ja ohjeen kriteerit (Taulukko 4 ja 5), arvioitiin silmämääräisesti. ISO 11930 standardin ja *European Pharmacopoeian* ohjeen mukaan useilla aikapisteillä hyväksymiskriteerinä on logaritmisien vähenemisarvon lisäksi ehto, jonka mukaan kasvu ei ole saanut lisääntyä edelliseltä aikapisteeltä seuraavalle. Tätä soveltaen päätettiin, että jos kasvu liinoilla silmämääräisesti vähenee aikapisteeltä seuraavalle, tuote täyttää standardin ehdot.

Taulukko 7 Mikrobin kasvatusolosuhteet säilyvyystehokkuus testeihin

Mikrobi	Kasvatusalusta	Lämpötila (°C)	Aika
<i>E. coli</i>	TSA	32,5 ± 2,5	48 – 72 h
<i>S. aureus</i>	TSA	32,5 ± 2,5	48 – 72 h
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	32,5 ± 2,5	48 – 72 h
<i>C. albicans</i>	SDA	32,5 ± 2,5	48 – 72 h
<i>A. brasiliensis</i>	PDA	22,5 ± 2,5	3 – 5 vrk

7 TULOKSET

Tuloksissa on esitetty neutraloijan tehokkuustesteistä saadut tulokset sekä säilyvyyshokkuustestin tulokset. Neutraloijan tehokkuustestin tulokset on osoitettu jokaiselle mikro-organismille ja tulos on joko hyväksytty tai hylätty. Säilyvyyshokkuustestin tulokset on esitetty kuviossa logaritmisina vähenemisarvoina. Testeistä jokaiselle aikapisteelle saatua vähenemisarvoa on verrattu ISO standardin tai Ph. Eur. ohjeen kriteereihin. Jos saatu arvo on ollut suurempi, kuin kriteerien esittämät arvot jokaisella aikapisteellä ja jokaisella mikrobilla, tuote on täyttänyt kriteerien vaatimukset ja siten, myös standardin ja ohjeen vaatimukset säilyvyydelle. Tuotteelle A mikrobien väheneminen on esitetty myös prosentteina, koska muista tuotteista poiketen väheneminen oli hitaampaa. Solupitoisuuden arviointiin käytetyt standardisuorat olivat tulosten mukaan epäluotettavia eikä niitä käytämällä päästy suoran osoittamiin solupitoisuuksiin.

7.1 Neutraloijan tehokkuustesti

Tulokset saatiin laskemalla testiputken (N_{vf}) pesäkemäärien keskiarvo ja vertaamalla sitä kontrolliputken (N_{vn}) pesäkemäärien keskiarvoon. Jos testiputken pesäkemäärien keskiarvo oli vähintään puolet kontrolliputken pesäkemäärien keskiarvosta, tulos oli hyväksytty (taulukkoissa OK). Tämän lisäksi kontrolliputken (N_{vn}) pesäkemäärien keskiarvon tuli olla lähellä mikrobisuspension kontrolliputken (N_v) pesäkemäärien keskiarvoa (taulukossa OK), muuten neutralisoija katsottiin myrkylliseksi testatulle mikrobille.

Taulukko 8 Neutraloijan tehokkuustestin tulokset, *E. coli*

	keskiarvo	keskihajonta	$N_{vf} \geq 0,5N_{vn}$	$N_{vn} \approx N_v$
N_{vf}	57	11	OK	
N_{vn}	70	8		OK
N_v	64	0		

Taulukko 9 Neutraloijan tehokkuustestin tulokset, *S. aureus*

	keskiarvo	keskihajonta	$N_{vf} \geq 0,5N_{vn}$	$N_{vn} \approx N_v$
N_{vf}	118	15	OK	
N_{vn}	103	1		OK
N_v	31	6		

Taulukko 10 Neutraloijan tehokkuustestin tulokset, *P. aeruginosa*

	keskiarvo	keskihajonta	$N_{vf} \geq 0,5N_{vn}$	$N_{vn} \approx N_v$
N_{vf}	38	6	OK	
N_{vn}	32	1		OK
N_v	38	5		

Taulukko 11 Neutraloijan tehokkuustestin tulokset, *C. albicans*

	keskiarvo	keskihajonta	$N_{vf} \geq 0,5N_{vn}$	$N_{vn} \approx N_v$
N_{vf}	68	6	OK	
N_{vn}	73	2		OK
N_v	73	4		

Taulukko 12 Neutraloijan tehokkuustestin tulokset, *A. brasiliensis*

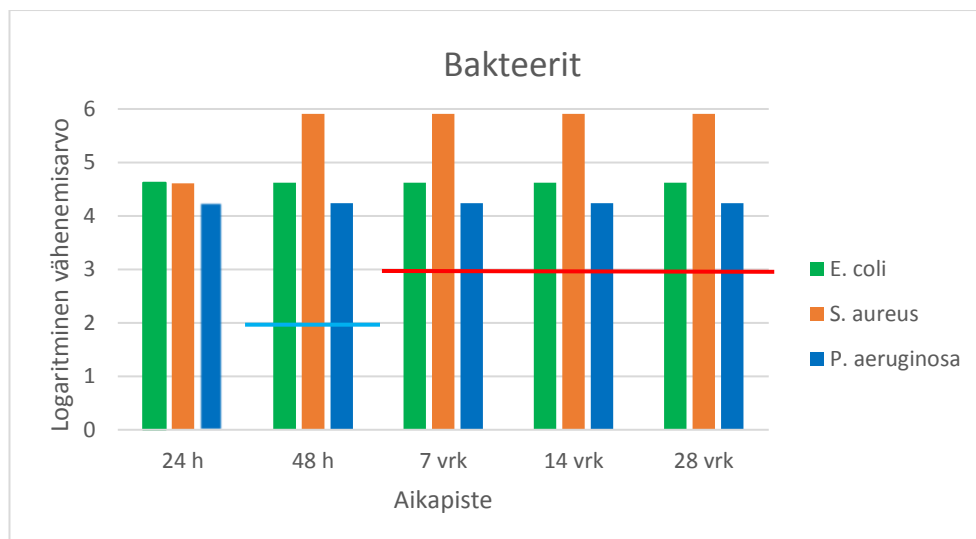
	keskiarvo	keskihajonta	$N_{vf} \geq 0,5N_{vn}$	$N_{vn} \approx N_v$
N_{vf}	6	2	OK	
N_{vn}	4	1		OK
N_v	3	1		

Tulosten mukaan neutraloija täytti vaaditut ehdot sen tehokkuuden osoittamiseksi jokaisella käytetyllä mikro-organismilla. Tulosten perusteella todettiin, että neutraloijaa voidaan käyttää tämän työn testeissä.

7.2 Tuote A säilyvyystehokkuustesti

Tuotteen A bakteeri maljoilla ei ollut kasvua millään aikapisteellä yksittäisiä pesäkkeitä lukuun ottamatta. Nämä yksittäiset pesäkkeet eivät olleet merkityksellisiä tulosten kannalta, koska tuloksia laskettaessa hyvin pienillä pesäkemäärillä ei ole juuri vaikutusta logaritmiseen vähenemisarvoon muuten kuin desimaalitasolla. Tämän lisäksi useat yksittäisistä pesäkkeistä vaikuttivat ympäristöstä tulleita kontaminaatioilta, koska ne kasvoivat elatusaineen pinnalla ja ne olivat useasti ulkonäöllisesti jonkun toisen mikrobin näköisiä. Tämän vuoksi niitä ei otettu huomioon laskuissa.

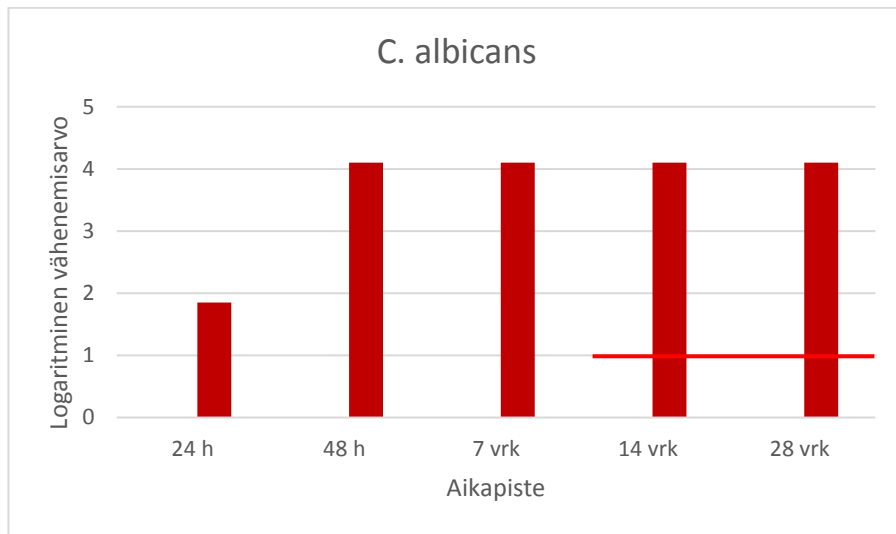
Pesäkkeiden lukumäärän perusteella jokaiselle aikapisteelle laskettu bakteerien vähenemisarvo on ollut suurempi, kuin pienin sallittu arvo, kuten Kuviosta 2 voidaan nähdä. Tämän perusteella voidaan sanoa, että tuote täyttää kriteerit kaikilla aikapisteillä.



Kuvio 2 Tuotteen A bakteerien säilyvyystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina. Kuviossa punainen poikkiviiva kuvaa ISO 11930 kriteerin A pienintä sallittua arvoa 3 log ja sininen poikkiviiva kuvaa Ph. Eur. ohjeen kriteerin A pienintä sallittua arvoa 2 log kyseisellä aikapisteellä.

Hiivamaljoilla (*C.albicans*) kasvua oli ensimmäisellä aikapisteellä (24 h), jonka jälkeen kasvua ei enää muilla aikapisteillä ollut. Hiivapesäkkeiden lukumäärän perusteella jokaisella aikapisteelle laskettiin vähenemisarvo. Tätä arvoa verrattiin kyseisen aikapisteen pienimpään sallittuun arvoon. Jos saatu arvo oli tätä suurempi, tuote täytti kriteerin ehdot. Kuten Kuviosta 3 voidaan nähdä, vähenemisarvot ovat suuremmat, kuin aikapisteiden pienimmät sallitut arvot. Hiivan osalta hyväksymiskriteerit (Taulukko 1) on annettu vain

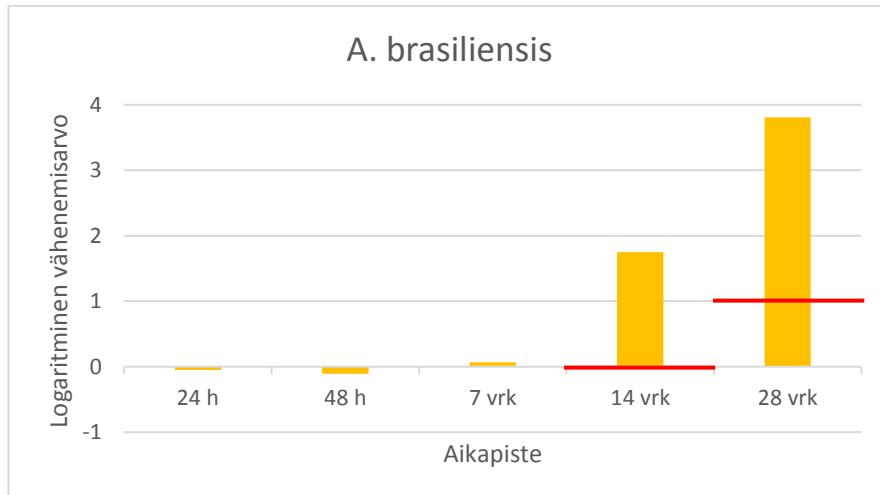
aikapisteille 14 vuorokautta ja 28 vuorokautta. Tulosten perusteella voidaan sanoa, että tuote täyttää kriteerit hiivan vähenemiselle.



Kuvio 3 Tuotteen A hiivan säilyvystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina. Kuviossa punainen poikkiviiva kuvaa ISO 11930 standardin kriteerin A pienintä sallittua arvoa 1 log kyseisellä aikapisteellä.

Tuotteen A homemaljoilla (*A. brasiliensis*) oli paljon kasvua ensimmäisillä aikapisteillä. Kahdella ensimmäisellä aikapisteellä pesäkkeiden määrä oli jopa lisääntynyt alkuperäiseen määrään verrattuna (Taulukko 13). Kolmannella aikapisteellä homeiden määrä alkoi hiljalleen vähentyä ja viimeisellä aikapisteellä kasvua ei enää ollut.

Homeiden vähenemiselle on asetettu kriteerit vain aikapisteille 14 vuorokautta ja 28 vuorokautta (Taulukko 1). Vaikka alussa pesäkkeiden määrä lisääntyikin, täytti tuote kuitenkin kriteerit: vähenemisarvo oli vaadituilla aikapisteillä suurempi, kuin pienin sallittu, kuten Kuvio 4 voidaan nähdä.



Kuvio 4 Tuotteen A säilyvyystekokkuustestin tulokset, *A. brasiliensis*. Kuviossa punainen poikkiviiva kuvaa ISO 11930 standardin kriteerin A pienintä sallittua arvoa (14 vrk = 0 log, 28 vrk = 1 log) kyseisellä aikapisteellä

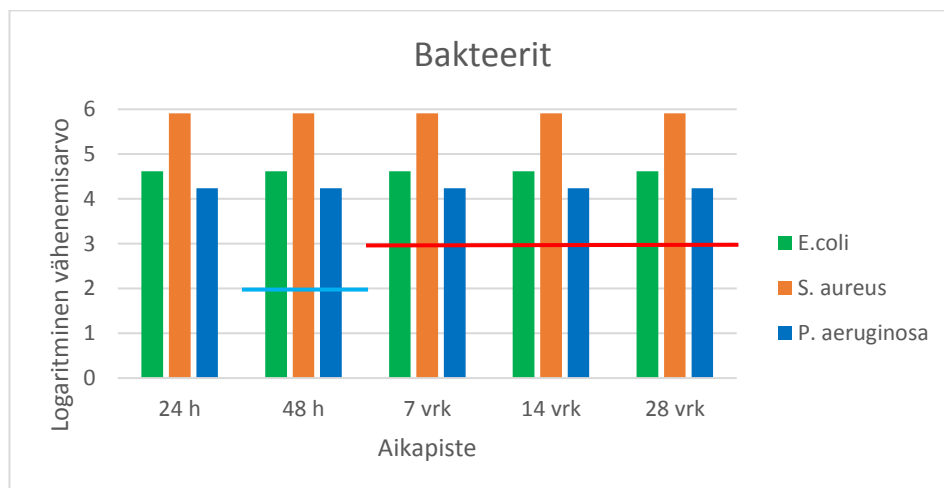
Koska mikrobien määrät ovat vähentyneet selvästi alkuperäisestä ja tuote noudattaa jokaisen mikrobien ja jokaisen aikapisteen osalta hyväksymiskriteerejä, voidaan todeta, että tuote täyttää standardin ISO 11930 vaatimukset säilyvyydelle sekä Ph. Eur. ohjeen vaatimukset 48 tunnin kohdalla.

Taulukko 13 Mikrobien väheneminen prosentteina tuotteella A

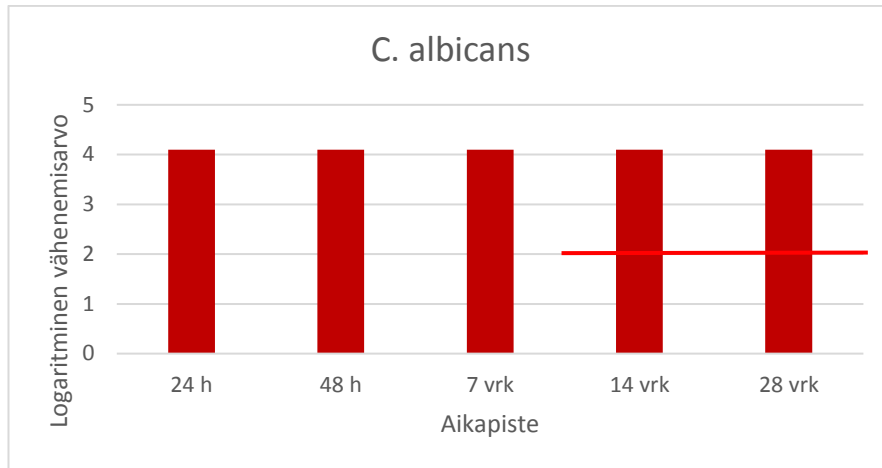
Mikrobien väheneminen prosentteina					
Mikrobi	Aikapiste				
	24 h	48 h	7 vrk	14 vrk	28 vrk
<i>E. coli</i>	- 100	- 100	- 100	- 100	- 100
<i>S. aureus</i>	- 100	- 100	- 100	- 100	- 100
<i>P. aeruginosa</i>	- 100	- 100	- 100	- 100	- 100
<i>C. albicans</i>	- 98,6	- 100	- 100	- 100	- 100
<i>A. brasiliensis</i>	+ 11,6	+ 28,7	- 14,0	- 98,2	- 100

7.3 Tuote B säilyvyystehokkuustesti

Tuotteen B säilyvyystehokkuutta testanneilla bakteeeri- ja hiivamaljoilla ei esiintynyt kasvua millään aikapisteellä muutamia yksittäisiä pesäkkeitä lukuun ottamatta. Nämä eivät olleet merkityksellisiä tulosten kannalta, eikä niitä otettu huomioon tulosten laskuissa, koska ne vaikuttivat olevan ympäristöstä tulleita kontaminaatioita. Bakteereilla pesäkkeiden lukumäärän perusteella lasketut vähenemisarvot olivat jokaisella aikapisteellä selvästi suuremmat, kuin pienimmät sallitut arvot, kuten Kuviosta 5 nähdään. Tämän perusteella tuote täyttää kriteerit bakteerien vähenemisen osalta. Kuviosta 6 taas voidaan nähdä, että myös hiivojen vähenemisarvo on selvästi suurempi, kuin sallittu pienin vähenemisarvo ja tämä perusteella voidaan sanoa, että tuote täyttää kriteerit myös hiivan vähenemisen osalta.

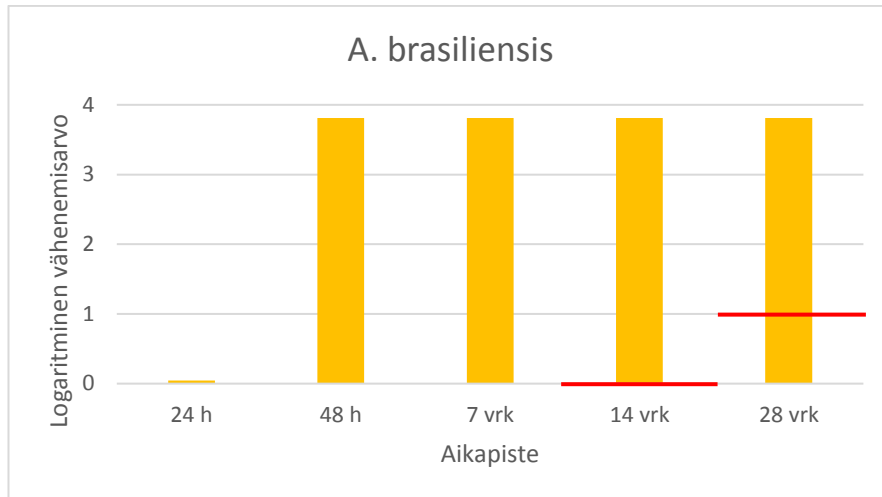


Kuvio 5 Tuotteen B bakteerien säilyvyystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina. Kuviossa punainen poikkiviiva kuvaa ISO 11930 kriteerin A pienintä sallittua arvoa 3 log ja sininen poikkiviiva kuvaa Ph. Eur. ohjeen kriteerin A pienintä sallittua arvoa 2 log kyseisellä aikapisteellä.



Kuvio 6 Tuotteen B hiivan säilyvyystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina. Kuviossa punainen poikkiviiva kuvaa ISO 11930 kriteerin A pienintä sallittua arvoa 2 log kyseisellä aikapisteellä.

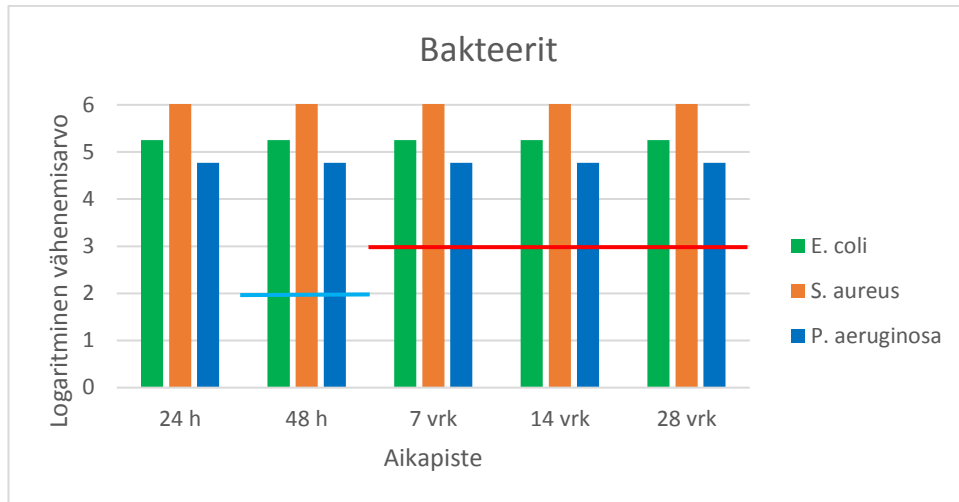
Homeita tuotteen B maljoilla kasvoi ensimmäisellä aikapisteellä runsaasti eli homeiden vähenemistä ei ollut tapahtunut. Seuraavilla aikapisteillä kasvua ei ollut enää yhtään. Kuten Kuviossa 7 voidaan nähdä, vähenemisarvo on vaadituilla aikapisteillä ollut suurempi, kuin pienin sallittu arvo. Tämän perusteella voidaan sanoa, että tuote täyttää kriteerit homeen vähenemisen osalta. Koska tuote täytti hyväksymiskriteerit jokaisella aikapisteellä ja jokaisella mikrobilla, voidaan todeta, että tuote täyttää standardin ISO 11930 vaatimukset säilyvyydelle sekä Ph. Eur. ohjeen vaatimukset bakteerien vähentämiseksi aikapisteellä 48 h.



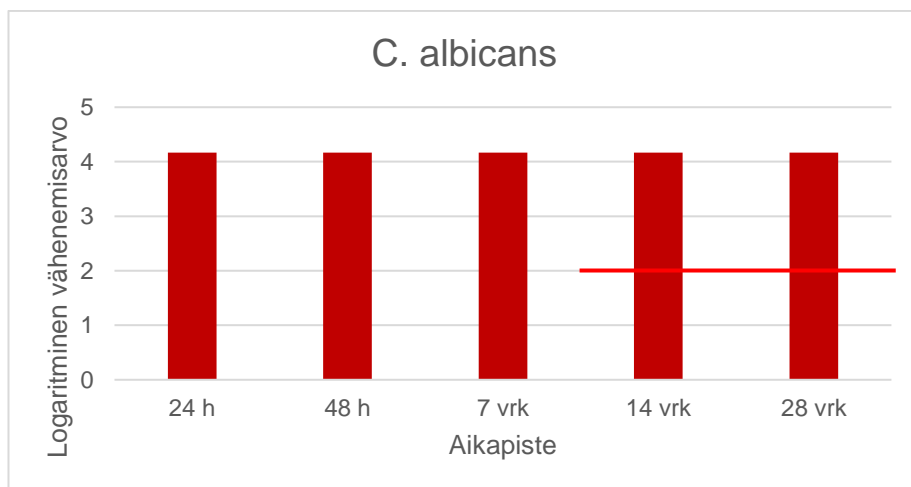
Kuvio 7 Tuotteen B säilyvyystehokkuustestin tulokset, *A. brasiliensis*. Kuviossa punainen poikkiviiva kuvaa ISO 11930 kriteerin A pienintä sallittua arvoa (14 vrk = 0 log, 28 vrk = 1 log) kyseisellä aikapisteellä.

7.4 Tuote C säilyvyystehokkuustesti

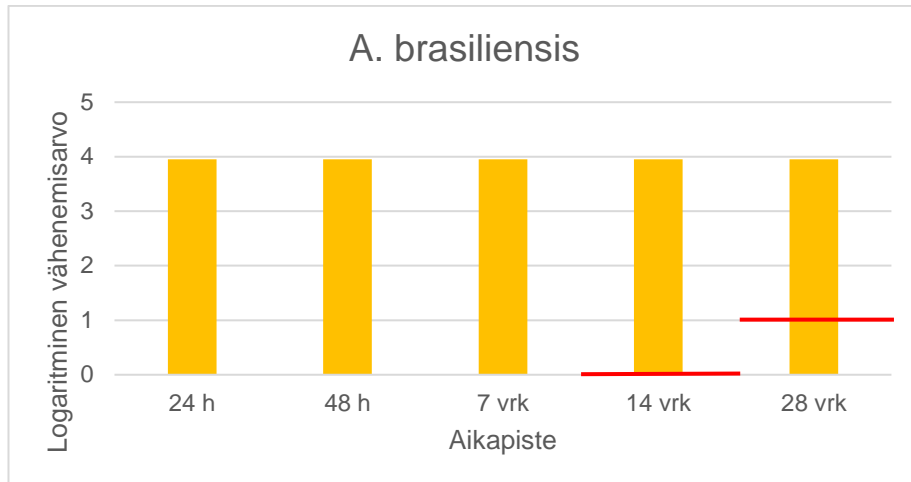
Tuotteen C bakteeri, hiiva ja home maljoilla ei millään ollut kasvua yhdelläkään aikapisteellä. Näin ollen standardin ISO 11930 ja Ph. Eur. ohjeen kriteerit täyttyvät jokaisella aikapisteellä ja jokaisella mikrobilla: vähenemisarvo on suurempi, kuin aikapisteiden pienen sallittu arvo, kuten voidaan nähdä kuvioista 8, 9 ja 10. Näiden tulosten perusteella voidaan todeta, että tuote täyttää standardin ISO 11930 vaatimukset säilyvyydelle sekä Ph. Eur. ohjeen vaatimukset bakteerien vähenemiselle aikapisteellä 48 h.



Kuvio 8 Tuotteen C bakteerien säilyvyystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina. Kuviossa punainen poikkiviiva kuvaa ISO 11930 kriteerin A pienintä sallittua arvoa 3 log ja sininen poikkiviiva kuvaa Ph. Eur. ohjeen kriteerin A pienintä sallittua arvoa 2 log kyseisellä aikapisteellä.



Kuvio 9 Tuotteen C hiivan säilyvyystehokkuustestin tulokset vähenemisarvoina. Kuviossa punainen poikkiviiva kuvaa ISO 11930 kriteerin A pienintä sallittua arvoa 2 log kyseisellä aikapisteellä.



Kuvio 10 Tuotteen C säilyvyystehokkuustestin tulokset, *A. brasiliensis*. Kuviossa punainen poikkiviiva kuvaa ISO 11930 kriteerin A pienintä sallittua arvoa (14 vrk = 0 log, 28 vrk = 1 log) kyseisellä aikapisteellä.

7.5 Tuote D

Tuotteen D 0-hetken maljat kuvasit tuotteelle inokuloidun mikrobisuspension alkupe-
räistä mikrobien määrää. Tätä määrää oli tarkoitus verrata mikrobien määrään seura-
villa aikapisteisteillä. Bakteereilla ja hiivalla näillä seuraavilla aikapisteillä kasvua ei ollut
lainkaan eli väheneminen oli ollut täydellistä (Taulukko 14). Koska standardin kriteeriä
sovelletaan ja on päätetty, että tuote täyttää kriteerit, kun kasvu edelliseen aikapiste-
eseen verrattuna on vähentynyt, täyttää tuote D kriteerit bakteereilla ja hiivalla. Home
puolestaan kasvoi toisella aikapisteellä, mutta kasvu oli selvästi vähäisempää, kuin ai-
kapisteellä 0 h, kuten Taulukosta 14 voidaan nähdä. Kolmannella aikapisteellä kasvua
ei enää ollut lainkaan. Näiden tulosten perusteella voidaan sanoa, että tuote täyttää kri-
teerit myös homeiden osalta. Koska tuote täyttää kriteerit jokaisella mikrobilla, voidaan
todeta, että tuote täyttää standardin ISO 11930 vaatimukset säilyvyydelle.

Taulukko 14 Mikrobin kasvu tuotteella D.

+++ = runsaasti kasvua, ++ = jonkin verran kasvua, - = ei kasvua.

Mikrobi	Aikapiste		
	0 h	24 h	48 h
<i>E. coli</i>	+++	-	-
<i>S. aureus</i>	+++	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+++	-	-
<i>C. albicans</i>	+++	-	-
<i>A. brasiliensis</i>	+++	++	-

8 TULOSTEN TARKASTELU

8.1 Varastokasvustot

S. aureus ja etenkin *P. aeruginosa* varastokasvustojen kanssa lähes jatkuvana ilmiönä oli kasvatuksen pinnalla olleet valkoiset epämääräiset pilkut. Mikroskoopilla tarkasteltaessa nämä pilkut olivat epäsäännöllisen muotoisia ja kulmikkaita. Ulkonäöltään ne näyttivät hieman suolarakeilta, mutta niitä ne eivät kuitenkaan voineet olla, koska suolan määrä maljoilla oli niin pieni verrattuna valkoisten pilkkujen määrään. Kun kasvustosta siirrostettiin soluja, pilkut eivät lähteneet mukaan ja ne tuntuivat siirrostussilmukkaan kovilta. Todennäköisesti pilkut eivät olleet mitään kontaminaatioita, mutta varmuutta siitä ei ole. Epätodennäköistä myös olisi, että pilkut olisivat elatusaineesta lähtöisin, sillä samaa elatusainetta käytettiin myös *E. coli* varastokasvustoilla ja niillä samaa ongelmaa ei ilmennyt. Todennäköisimmältä siis vaikuttaa, että pilkut ovat lähtöisin mikrobikannasta, mutta tarkempaa tietoa siitä mitä ne olivat, ei ole.

8.2 Standardisuorat

Työssä mikrobisuspensioiden konsentraatiot määritettiin standardisuorien avulla ISO standardissa ilmoitetun mikrobipitoisuuden kokoisiksi. Suorat kuitenkin osoittautuivat epäluotettaviksi ja harvoin suspension konsentraatio saatiin suoran avulla halutulle alueelle. Menetelmän epäluotettavaksi teki pesäkkeiden kokojen vaihtelu, vaikka suoraa tehtäessä yritettiin valita mahdollisimman samankokoisia pesäkkeitä. Mikrobimäärä pesäkkeissä saattoi myös vaihdella paljon, vaikka ne kooltaan olisivatkin olleet hyvin samankokoisia.

8.3 Neutraloijan tehokkuustesti

Neutraloijan tehokkuustestien tulokset täyttivät neutraloijan tehokkuudelle asetetut vaatimukset. Tulokset olivat luotettavia jokaisen mikro-organismin kohdalla. Tarkastellaan kuitenkin tarkemmin *S. aureus* bakteerin ja *A. brasiliensis* homeen tuloksia. Neutraloijan tehokkuuden osoittamiseksi asetettu vaatimus, jonka mukaan mikrobisuspension kont-

rolliputken ja kontrolliputken tulosten tuli olla lähellä toisiaan, ei täytynyt bakteerilla. Mikrobisuspension kontrolliputkessa kasvoi huomattavasti vähemmän pesäkkeitä. Mutta, koska testiputkessa ja kontrolliputkessa kasvoi lähes sama määrä mikrobeja, voidaan tulos hyväksyä. Paljon vähäisempi mikrobien määrä mikrobisuspension kontrolliputkessa, johtui luultavimmin pipetointi virheestä. Homeella pesäkkeiden määrä oli erittäin pieni jokaisessa putkessa ja kasvua oli vain muutaman pesäkkeen verran. Koska kasvua kuitenkin oli suunnilleen saman verran jokaisessa putkessa, hyväksyttiin tulokset.

8.4 Säilyvyyshokkuustestin tulokset

Tulosten mukaan tuotteet täyttävät ISO 11930 standardin ja Ph. Eur. 5.1.3 ohjeen kriteerit (48 h kohdalla) ja siten myös niiden asettamat vaatimukset säilyvyydelle. Kuten aiemmin kappaleessa 7 esitetyistä tuloksista voidaan nähdä, säilyvyydessä oli eroja eri mikrobien välillä. Bakteerit eivät juuri selvinneet tuotteissa, mikä tukee tutkimuksia joiden mukaan pihka eli tuotteissa oleva vaikuttava aine on antimikrobinen bakteereita vastaan (Hong 2004, Cowan 1999). Tutkimusten mukaan pihkalla on myös antifungaalisia vaikutuksia, mutta ne ovat ainakin tässä työssä tehdyissä testeissä heikompia tai ainakin hitaampia, kuin antimikrobiset vaikutukset bakteereihin. Tämä käy ilmi testattujen tuotteiden tuloksista, sillä hiiva ja varsinkin home kasvoivat ensimmäisillä aikapisteillä runsaasti ja niiden väheneminen oli hitaampaa bakteereihin verrattuna.

Sipposen ja Laitisen tutkimuksen (2011) tulosten mukaan pihkan antimikrobinen vaikutus on hitaampi gram-negatiivisiin bakteereihin kuin gram-positiivisiin bakteereihin. Neljän päivän pihkalle altistuksen jälkeen gram-negatiiviset *E. coli* ja *P. aeruginosa* olivat vielä elinkykyisiä, vaikka niiden määrä oli vähentynyt alkuperäisestä. Gram-positiivinen *S. aureus* ei taas tässä kohtaa enää ollut elinkykyinen. Samanlaista gram-negatiivisten bakteerien hitaampaa vähenemistä ei ole havaittavissa tässä työssä. Sipposen ja Laitisen tutkimusta ei kuitenkaan voi verrata suoraan tähän tutkimukseen sillä, vaikka kummassakin testatut tuotteet ovat sisältäneet pihkaa, ovat tuotteet kuitenkin hyvin erilaisia ja ne ovat sisältäneet eri pitoisuuksia pihkaa.

Työssä saadut tulokset olivat odotuksen mukaisia täyttäessään standardin kriteerit säilyvyydelle. Mielenkiintoista kuitenkin oli, että tuotteella A hometta kasvoi kahdella ensimmäisellä aikapisteellä jopa alkuperäistä enemmän. Syytä tällä ilmiöllä ei tiedetä varmaksi eikä osata sanoa, oliko se kertaluonteinen vai toistuva tapahtuma, koska testi suoritettiin

vain kerran. Yksi syy tähän ilmiöön saattaisi olla homeiden itiöryppäiden hajoaminen sekoituksen vaikutuksesta niitä homogenisoitaessa, jolloin ne näkyvät maljalla useampina pesäkkeinä. Tämä ei kuitenkaan ole varsinaista kasvua. Todellista kasvua ja itiöryppäiden hajoamista on mahdoton erottaa toisistaan, joten itiömäärän lisääntymisen todellista syytä ei voida varmentaa.

Tuotteen A ja B tuloksia voidaan pitää luotettavina, koska tulokset olivat yhdenmukaisia ja odotusten mukaisia. Osassa testeissä käytetyn mikrobisuspension pitoisuus oli matalampi, kuin tavoiteltu, mikä on voinut vaikuttaa tuloksiin. Mutta, koska mikrobikasvua joko selvästi oli tai ei ollut lainkaan, voidaan päätellä, että sillä ei ole ollut merkittävää vaikutusta tuloksiin.

Tuotteiden C ja D tuloksia voidaan myös pitää luotettavina, mutta niitä on tarkasteltava hieman kriittisemmin, koska molemmat on tehty standardin ohjeita soveltaen. Tuotteen C pitoisuus testeissä on emulgoinnista johtuen kymmenen kertaa pienempi, kuin standardin mukaan tulisi olla. Näin ollen myös mikrobien määrä testissä on kymmenen kertaa pienempi. Tämä on epäilemättä voinut vaikuttaa tuloksiin. Mutta, kuten aiemmin on mainittu, mikrobien vähentyminen on ollut 100 prosenttista heti ensimmäiseltä aikapisteeltä alkaen jokaisella mikrobilla. Tästä voidaan päätellä, että vaikka tuotteen ja mikrobisuspension pitoisuus olisi ollut standardin mukainen, kasvua tuskin olisi siltikään ollut niin paljon, että se olisi vaikuttanut tuloksiin merkittävästi.

Muihin tuotteisiin nähden poikkeuksen muodosti homeen kasvu tuotteella C. Muilla tuotteilla home kasvoi ensimmäisillä aikapisteillä selvästi, kun taas tuotteella C kasvua ei ollut lainkaan. Tämän on voinut johtua tuotteen ja mikrobisuspension laimeammasta pitoisuudesta, mutta ero muihin tuotteisiin nähden on kuitenkin niin suuri, että todennäköisempi syy siihen, ettei hometta kasva lainkaan, on tuotteen suurempi pihkapitoisuus. Kaikista tuotteista eniten pihkaa on tuotteessa C, mikä myös osaltaan selittää, miksi kasvua millään mikrobilla ei ole. Tämä taas tukee tulosten luotettavuutta, vaikka tuotteen ja mikrobisuspension pitoisuus on ollut kymmenen kertaa pienempi, kuin on ollut tarkoitus.

9 PÄÄTELMÄT

Työn tavoitteena ollut menetelmän kehitys ja verifionti onnistui jokaiselle tuotteelle. Testeistä saadut tulokset olivat odotusten mukaisia ja noudattivat standardia. Osaan testeistä jäi vielä kehittämisen varaa ja jatkossa tulisikin pohtia, olisiko näitä kohtia aiheellista optimoida ja niiden yksityiskohtia kehittää. Myös standardista poikkeavia käytäntötapoja tulisi pohtia esimerkiksi varastokasvustojen kohdalla, joilla ongelmana oli muun muassa niiden elinkykyisyys. Aiheellista olisi myös pohtia tarkempaa ja luotettavampaa menetelmää mikrobisuspension pitoisuuden määrittämiselle, sillä standardisuorat osoittautuivat epätarkoiksi. Seuraavassa tarkastellaan näitä seikkoja tarkemmin.

9.1 Varastokasvustot

Standardin mukaan varastokasvustot säilyvät elinkykyisinä noin kahden kuukauden ajan. Työskennellessä kuitenkin kävi ilmi, että varastokasvustot menettivät elinkykyään jo kuukauden jälkeen. Varastokasvustoille olisi hyvä määrittää tarkempi aika elinkykyisyydelle, jotta työskennellessä ei ilmenisi yllättäviä viivästyksiä aikataulun suhteen.

9.2 Standardisuorat

Standardisuoran määrittämisen sijaan jatkossa mikrobisuspension pitoisuus kannattaa määrittää, jollakin muulla tavalla. Yksi tällainen tapa voisi olla solujen värjääminen ja elävien solujen laskeminen Bürkerin kammiolla. Määrittäminen tulisi kuitenkin tehdä joka kerta ennen testejä, mikä veisi paljon aikaa ja myös värjäykseen tarvittavat reagenssit lisäisivät kustannuksia. Tämän vuoksi solupitoisuuden määrittäminen Bürkerin kammiollakaan ei välttämättä ole kannattavaa. Harjaantunut tekijä osaa arvioida siirrostettavan solumäärän halutun solupitoisuuden saamiseksi ilman standardisuoria tai muitakaan apuvälineitä, jonka johdosta vapaalla kädellä solujen siirrostaminen on ehkä paras tapa mikrobisuspension valmistukseen.

9.3 Tuotteiden testaus

Jatkossa, kuten mainittu, myös osaa tuotteiden testeistä tulisi optimoida ja yksityiskohtia parantaa. Tällainen yksi kehityskohta olisi tuotteen C emulgoinnin optimointi. Nyt emulgointiin käytettiin polysorbaatti 80:ntä, jota kului melko runsaasti. Aiheellista olisi tutkia löytyisikö joku toinen emulgaattori tai emulgaattoreiden seos, jolla kulutus olisi vähäisempää. Nyt tehdyllä emulgointimenetelmällä tuote myös laimeni yli 100 kertaaisesti varsinaiseen säilyvyyden testaukseen, kun standardin mukaan sen tulisi laimentua vain 10 kertaaisesti. Noin 10 kertaiseen laimentumiseen päästäisiin, kun emulgointi tehtäisiin suoraan neutraloijaan eikä suolaliuokseen. Jälkeenpäin tehdyissä muissa testeissä neutraloijan käyttö tuotteen C emulgoinnissa on havaittu toimivaksi.

Tuotteen D eli hoitopyyhkeen testausmenetelmää tulisi myös kehittää. Nykyinen menetelmä ei anna eksakteja tuloksia, koska selvinneiden pesäkkeiden määrää hoitopyyhkeellä ei pysty laskemaan. Tämän vuoksi tulokset vain arvioidaan silmämääräisesti, mikä jossain tapauksissa voi olla haasteellista ja aiheuttaa tulosten virheellistä tulkintaa. Tällainen tapaus voi syntyä, jos mikrobien kasvu on suunnilleen samaa luokkaa, kuin edellisellä aikapisteellä, eikä selvää kasvun vähentymistä ole tapahtunut. Tulosten tulkittavuutta helpottaisi, jos pesäkkeet pystyttäisiin laskemaan, mikä tarkoittaisi taas sitä, että mikrobit tulisi saada irti hoitopyyhkeestä. Tätä koitettiin useaan otteeseen ja eri tavoin työn aikana, mutta käytettävissä olleilla välineillä mikrobeja ei saatu luotettavasti hoitopyyhkeestä irtoamaan. Mikrobien hoitopyyhkeestä irrottamista voitaisiin vielä jatkossa yrittää leikkaamalla liina pienempiin osiin ja lasikuulien avustuksella ravistamalla yrittää saada mikrobit irti.

LÄHTEET

- M. Cowan. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 571-572.
- I. Dimkic, P. Ristivojevic, T. Janakiev, T. Beric, J. Trifkovic, D. Milojkovic-Opsenica & S. Stankovic. 2016. Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis. *Industrial Crops and Products* 94 (2016) 856-871.
- Euroopan Komissio. 2010. Medical devices: guidance document – Classification of medical devices.
- European Committee for Standardization. 2012. SFS-EN ISO 11930:2012 Cosmetics – Microbiology – Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product.
- European Pharmacopoeia. 2008. 5.1.3. Efficacy of Antimicrobial Preservation. 01/2008:50103.
- European Pharmacopoeia. 2010. 2.6.12. Microbial examination of a non-sterile products: microbial enumeration tests. 04/201:20612.
- D. Fengel & G. Wegener. 1983. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. De Gruyter. 184-192.
- E.-J. Hong, K.J. Na, I.-G. Choi, K.-C. Choi & E.-B. Jeung. 2004. Antibacterial and Antifungal Effects of essential Oils from Coniferous Trees. *Biol. Pharm. Bull.* 27(6) 863-866 (2004).
- T. Kartnig, F. Still & F. Reinthaler. 1991. Antimicrobial activity of the essential oil of young pine shoots (*Picea abies* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 35 (1991) 155-157.
- J. Langenheim. 2003. Plant resins: Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany. Timber Press. 23-40.
- S. McKay, W. Hunter, K.-A. Godard, S. Wang, D. Martin, J. Bohlmann & A. Plant. 2013. Insect Attack and Wounding Induce Traumatic Resin Duct Development and Gene Expression of (-)-Pinene Synthase in Sitka Spruce. *Plant Physiology*. Vol. 133, pp 368-378.
- Nagy ym. 2000. Wound-induce Traumatic Resin Duct Development in Stem of Norway Spruce (*Pinaceae*): Anatomy and Cytochemical Traits. *American Journal of Botany* 87(3): 302-313.
- G. Peng & J. Roberts. 1999. Solubility and Toxicity of Resin Acids. *Wat. Res.* Vol 34, No 10, pp 2779-2785.
- M. Phillips & R. Croteau. 1999. Resin based defenses in conifers. *Trends in plant Science Reviews*. Vol 4 No. 5. 184-190.
- A. Sipponen & K. Laitinen. 2011. Antimicrobial properties of natural coniferous rosin in the European Pharmacopoeia challenge test. *APMIS*. 119:720-724.
- A. Sipponen. 2013. Coniferous Resin Salve, Ancient and Effective Treatment for Chronic Wounds – Laboratory and Clinical Studies. Unigrafia.
- T. Ståhlberg. 2015. Terveystuotteiden laatuvaatimukset kansainvälisillä markkinoilla. Tekes.
- The Council of the European Communities. 1993. Council directive 93/42/EEC. *Official Journal of the European Communities*.

Valvira 2016. Terveysteknologian tuotteiden markkinoille saattaminen/terveydenhuollon laitteet ja tarvikkeet. Viitattu 18.10.2016
http://www.valvira.fi/terveydenhuolto/terveysteknologia/tuotteen_markkinoille_saattaminen/terveydenhuollon_laitteet_ja_tarvikkeet

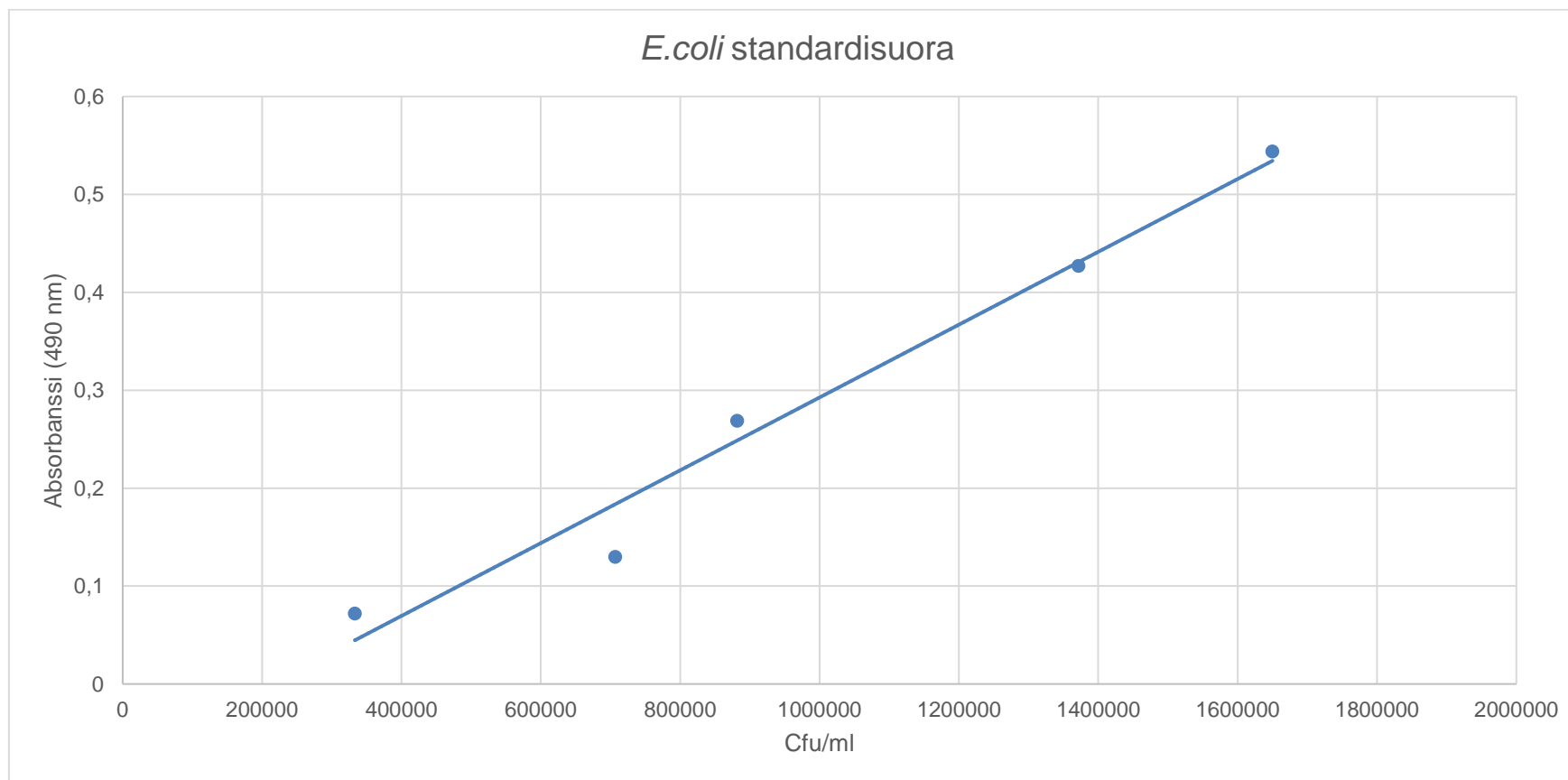
J. Zhang. 2012. Rosin-based Chemicals And Polymers. iSmithers Rapla Publishing.

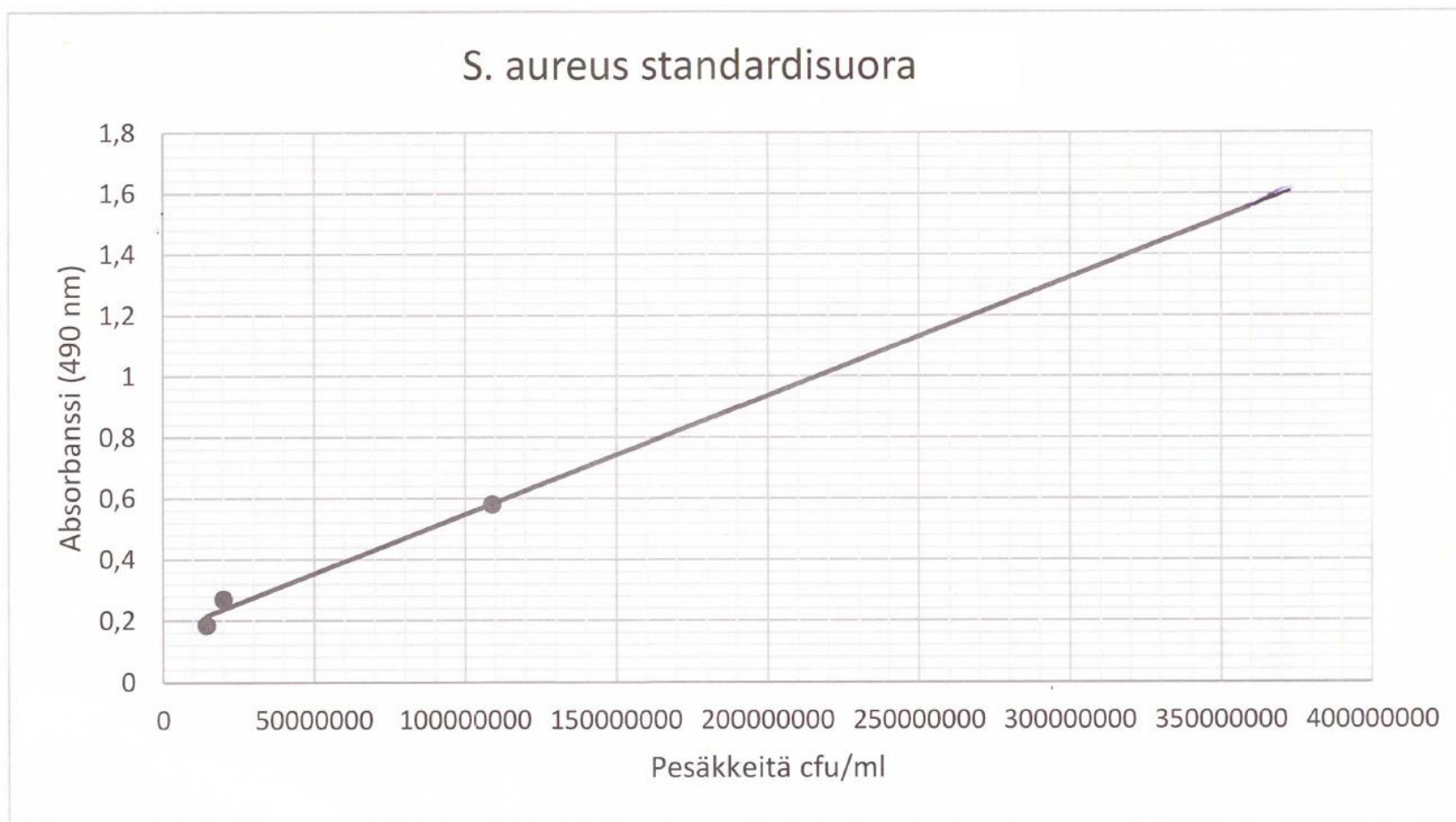
ISO 11930 standardin vaatimat mikrobikannat

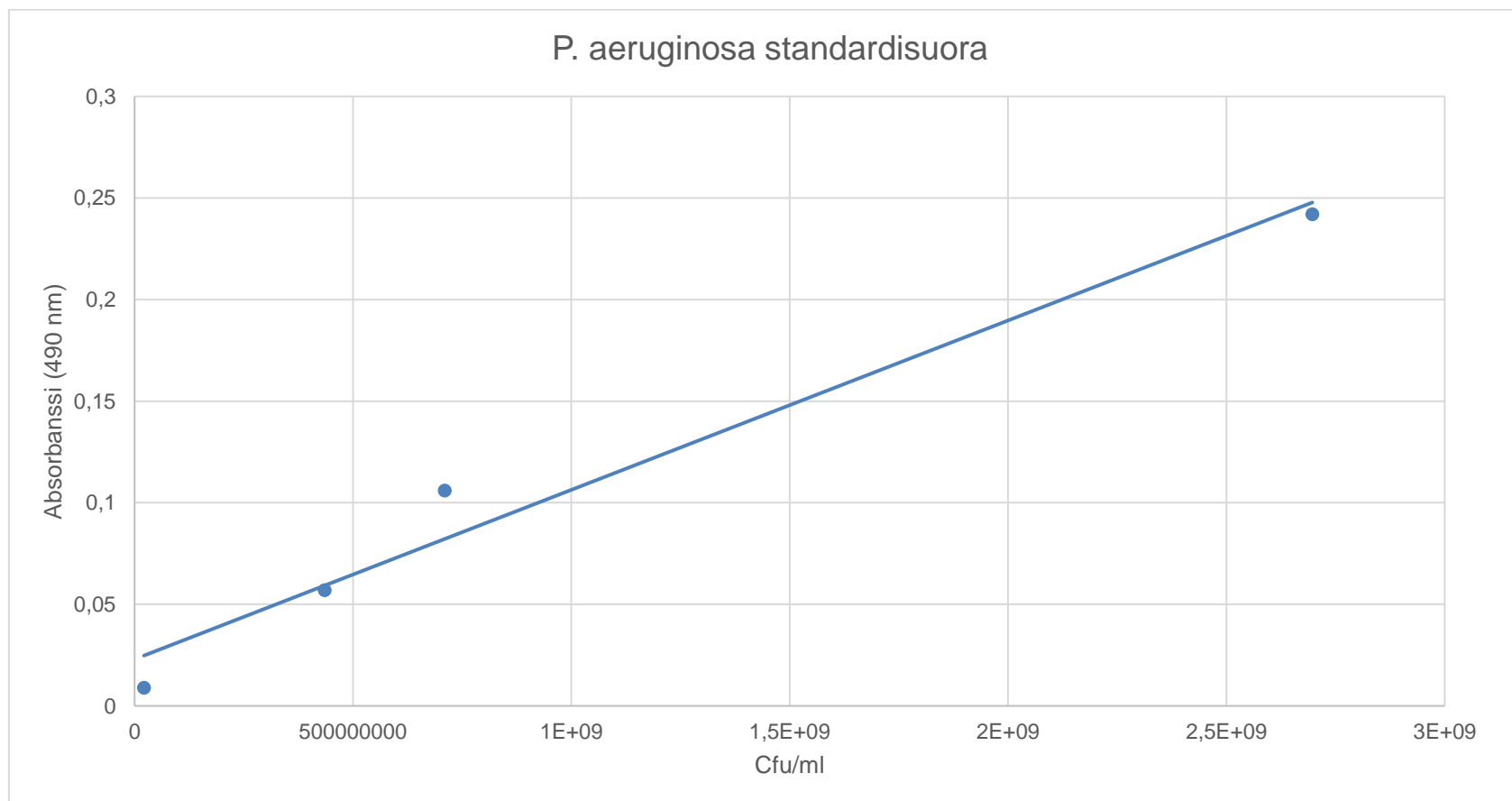
Mikrobi	Kanta
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739 tai vastaava
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 tai vastaava
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027 tai vastaava
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 tai vastaava
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404 tai vastaava

Ph. Eur. 5.1.3. ohjeen vaatimat mikrobikannat

Mikrobi	Kanta
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NCTC 10788, NCIMB 9518, CIP 4.83
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83

***E. coli* standardisuora**

***S. aureus* standardisuora**

***P. aeruginosa* standardisuora**

***C. albicans* standardisuora**