

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2011

Suvi Parkkali

PIIOLINSSIEN
HOITONESTEIDEN
AKANTAMEBA-AKTIIVISUUDEN
MÄÄRITYSMENETELMÄN
KEHITYS SEKÄ
HOITONESTEIDEN
TEHOKKUUKSIEN VERTAILU



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

Kevät 2011 | Sivumäärä: 76

Ohjaajat: FM Kai Rosenberg, FT Riikka Järvinen, FL Kirsi Koskinen, Ins. (AMK) Jarkko Holopainen ja Ins. (AMK) Maria Lilja

Suvi Parkkali

PIILOLINSSIEN HOITONESTEIDEN AKANTAMEBA-AKTIIVISUUDEN MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITYS SEKÄ HOITONESTEIDEN TEHOKKUUKSIEN VERTAILU

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää Piilokset by Finnsusp Oy:n käyttöön sopiva menetelmä piilolinssien hoitonesteidien akantameba-aktiivisuuden määrittämiseen. Toistaiseksi virallista ISO-standardia tai vaatimuksia akantameba-aktiivisuudelle ei ole. Tavoitteena oli kehittää menetelmä uusien hoitonesteidien tuotekehitykseen jo ennen viranomaisten valmistelemää standardimenetelmää. Lisäksi työn tarkoituksena oli vertailla yhdeksän kaupallisen tai vasta tuotekehityksessä olevien hoitonesteidien tehokkuuksia. Analysoitaviin hoitonesteiisiin kuului toimeksiantajan omien kaupallisten ja tuotekehityksessä olevien hoitonesteidien lisäksi muita kaupallisia hoitonesteitä. Työn käytännön osuus suoritettiin Turun ammattikorkeakoulun mikrobiologian ja biotekniikan laboratorioissa.

Testimenetelmä kehitettiin kirjallisuudessa julkaistujen tutkimusten sekä aiheeseen liittyvien FDA:n kokouspöytäkirjojen perusteella. Menetelmällä pyrittiin simuloimaan tuotteiden oikeaa käyttöympäristöä. Analyysimenetelmän toimivuutta testattiin yhdellä hoitonestenäytteellä *A. castellanii* -akantameballa positiivisen- ja negatiivisen kontrollin lisäksi. Lopullisella alustavien testien jälkeen kehitetyllä menetelmällä analysoitiin yhdeksän hoitonesteen tehokkuudet kahdelle eri akantameballe (*A. castellanii* ja *A. polyphaga*). Hoitonesteidien tehokkuus arvioitiin subjektiivisesti jakamalla ne aktiivisuuden mukaan neljään luokkaan.

Kehitetty subjektiivinen analyysimenetelmä osoittautui toimivaksi, vaikka tarkkoja arvoja amebojen vähentymiselle ei saatu laskettua. Käytetyllä menetelmällä saatiin toisistaan poikkeavia tuloksia eri hoitonesteille. Testien aikana havaittiin eri akantameba-lajien ja -kantojen eroavan herkkyksiltään toisistaan. Standardimenetelmän kehityksessä ongelmana tulee olemaan käytettävän akantameba-lajin ja kannan valinta. Sopiva akantamebojen säilytysaika, -olosuhteet ja uudelleensiirrostuksien lukumäärä ovat oleellisia selvittää, jotta akantamebat eivät herkisty käsittelyistä ja säilytyksestä liikaa pysyen siten mahdollisimman luonnollisina.

ASIASANAT:

Acanthamoeba, akantameba, alkueläin, keratiitti, piilolinssien hoitoneste, sarveiskalvon tulehdus

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

Spring 2011 | Total number of pages: 76

Instructors: Kai Rosenberg (MSc), Riikka Nieminen (PhD), Kirsi Koskinen(PhL), Jarkko Holopainen (BSc) and Maria Lilja (BSc)

Suvi Parkkali

DEVELOPMENT OF METHOD TO EVALUATE THE ACTIVITY OF CONTACT LENS CARE SOLUTIONS AGAINST *ACANTHAMOEBA* SPECIES AND COMPARISON OF DISINFECTION EFFICIENCY OF DIFFERENT CONTACT LENS CARE SOLUTIONS

The purpose of this thesis was to develop a method to evaluate the disinfection efficacy of different contact lens care solutions against *Acanthamoeba* species for the use of Piilosep by Finnsusp Ink. So far, there are no official ISO standard or other requirements. The aim was to develop a method which could be used in product development already before the standard method is available. A further aim was to compare the disinfection efficacy of different contact lens care solutions against the *Acanthamoeba* species. There were nine different contact lens care solutions in the study. Some of the analyzed solutions were produced by the commissioner and either commercial or under development. Some other commercial solutions were studied, too. The practical part of this project was performed in microbiology and biotechnology laboratories of Turku University of Applied Sciences.

The testing method was developed on the grounds of previous publications and FDA minutes. The testing method aspired to simulate the real conditions of use of the product. The analysis was tested for one *Acanthamoeba* species (*A. castellanii*) with one contact lens care solution and with positive and negative controls. After performance tests, nine contact lens care solutions were analyzed for two *Acanthamoeba* species (*A. castellanii* and *A. polyphaga*) using the final method. The efficiency of the contact lens care solutions was evaluated subjectively, grouping the solutions into four categories based on efficiency.

The developed subjective method proved to be functional although the exact reduction of *Acanthamoeba* was hard to determine. Diverging results were obtained for different solutions. During the tests it was observed that different *Acanthamoeba* species and strains had different sensitivities to disinfectants. In the development of a standard method, the choice of *Acanthamoeba* species or strain will present a problem. It is essential to determine a suitable curing period, curing conditions and number of reinoculations to prevent excessive sensitization of the *Acanthamoeba* species during handling and storage. Correct handling and storage will keep the amoebas as natural as possible.

KEYWORDS:

Acanthamoeba, protozoa, ceratitis, contact lens care solution

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

1 JOHDANTO	1
2 AKANTAMEBA	3
2.1 Yleistä	3
2.2 Akantamebakeratiitti (AK)	8
2.2.1 Yleistä	8
2.2.2 Piilolinssit ja AK	9
2.2.3 Diagnosointi	10
2.2.4 Hoito	11
3 PIILOLINSSIEN HOITONESTEET	14
3.1 Yleistä	14
3.2 Piilolinssien puhdistus	14
3.3 Piilolinssien desinfiointi	16
3.3.1 Yleisimpiä desinfiointiaineita	17
3.4 Muut aineet	21
4 VIRANOMAISVAATIMUKSET	24
4.1 Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkevirasto (FDA)	24
4.2 Lääkintälaitedirektiivi (Medical Device Directive, MDD)	25
4.2.1 Laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista (629/2010)	26
4.3 Vaatimusten mukaisuuden osoittaminen	27
5 PIILOLINSSIEN HOITONESTEIDEN AKANTAMEBA-AKTIIVISUUS- TUTKIMUKSET	29
5.1 Tutkimusten tarkoitus, tutkitut hoitonestet ja tutkimuksissa käytetyt akantamebat	29
5.2 Menetelmät	31
5.3 Tulokset	36
5.4 Pohdinnat	41
6 KOKEELLINEN OSA	44
6.1 Kontrolliliuokset sekä tutkitut hoitonestet	44
6.2 Käytetyt mikrobit	46
6.3 Liuokset ja kasvatusalustat	46
6.4 Laitteistot	47
6.5 Välineet	48

7 MENETELMÄN KEHITYS JA TOIMIVUUDEN TESTAUS	49
7.1 Menetelmän valinta	49
7.2 Menetelmän toimivuuden testaus	50
7.2.1 Alkuvalmistelut	50
7.2.2 Testien suoritus	51
7.3 Amebojen mikroskopointi	51
7.4 Menetelmän testauksesta saadut tulokset ja päätelmät	52
8 VARSINAISET TESTIT	54
9 TULOKSET	58
9.1 Tulosten tarkastelu	58
9.2 Hoitonesteiden tehokkuuksien arviointi	59
9.3 Varsinaisten testien tulokset	64
10 PÄÄTELMÄT	69
LÄHTEET	73

KUVAT

Kuva 1. 400 x suurennos <i>A. polyphagan</i> trofotsoiitti- ja kystamuodosta.	5
Kuva 2. 100 x suurennos <i>A. castellaniin</i> trofotsoiitti- ja kystamuodoista.	6
Kuva 3. Piilolinssikoteloitten merkintä varsinaisissa testauksissa.	54
Kuva 4. AC-maljan jako paloihin.	55
Kuva 5. Kystaryypäitä positiivisen (A) ja negatiivisen (B) kontrollin maljoilla.	58
Kuva 6. Kystaryypäitä ryhmän 1 (+++) maljoilla.	60
Kuva 7. Kystaryypäitä ryhmän 2 (++) maljoilla.	61
Kuva 8. Kystiä ryhmän 3 (+) maljoilla.	62
Kuva 9. Kystiä ryhmän 4 (+) maljoilla.	63
Kuva 10. Kolibakteereja negatiivisen kontrollin maljalla.	64

KUVIOT

Kuvio 1. Varsinaisten testien suoritus	57
--	----

TAULUKOT

Taulukko 1. AK:a ja GAE:ta aiheuttavia akantameba-lajeja. ⁷	3
Taulukko 2. Tutkittujen akantameba-kantojen genotyyppien jakautuminen. ⁹	4
Taulukko 3. Akantamebojen aiheuttamia sairauksia. ⁷	7
Taulukko 4. Pinta-aktiiviset ainesosat hoitonesteissä.	15
Taulukko 5. Yleisimpiä hoitonesteissä käytettäviä desinfiointiaineita.	17
Taulukko 6. Muita piilolinssien hoitonesteiden ainesosia.	22
Taulukko 7. Tutkitut hoitonesteet ja niiden desinfiointi ainesosat. ^{5,54,55,56}	30
Taulukko 8. Tutkimuksissa käytetyt akantameba-kannat. ^{5,54,55,56}	31
Taulukko 9. Tiivistelmä aiempien hoitonesteiden akantameba-aktiivisuustutkimusten menetelmistä. ^{5,54,55,56}	35
Taulukko 10. Johnston ym. ⁵ akantameba-aktiivisuustulokset.	37
Taulukko 11. Shoff ym. ⁵⁴ akantameba-aktiivisuustulokset.	38
Taulukko 12. Borazjani ym. ⁵⁵ akantameba-aktiivisuustulokset.	40
Taulukko 13. Buck ym. ⁵⁶ akantameba-aktiivisuustulokset.	41
Taulukko 14. Testauksissa käytetyt kontrolliliuokset.	45
Taulukko 15. Varsinaisissa testeissä tutkitut hoitonesteet.	45
Taulukko 16. Käytetyt mikrobit.	46
Taulukko 17. Käytetyt liuokset sekä kasvatusalustat.	47
Taulukko 18. Käytetyt laitteet.	47
Taulukko 19. Toimivuuden testauksen tulokset.	53
Taulukko 20. Hoitonesteiden tehokkuuksien arviointiperusteet.	59
Taulukko 21. Hoitonesteiden tehokkuudet.	66
Taulukko 22. Hoitonesteiden kvalitatiiviset tulokset.	67

LIITTEET

Liite 1. Mediumien koostumukset

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

AC	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
Aerobinen	1. Happipitoinen; 2. Hapen käyttöön liittyvä, happea tarvitseva ¹
Absorptio	Aineiden imeytyminen johonkin materiaaliin ¹
AIDS	Immuunikato; Acquired Immunodeficiency Syndrome
AK	Akantamebakeratiitti; akantameban aiheuttama sarveiskalvon tulehdus
Amfoteerinen	Kuvaa yhdisteitä, joilla on vastakkaisia ominaisuuksia, ne esim. voivat reagoida sekä happoina että emäksinä. ¹
Anioni	Negatiivisesti varautunut ioni ¹
Antiseptinen	Mikrobien kasvua estävä ¹
AP	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
ATCC	Amerikkalainen biologisen materiaalin kokoelma; American Type Culture Collection
Biopsia	Koepalan otto elävästä kudoksesta ja sen tutkiminen. ¹
Biosidi	Kemiallisia aineita, valmisteita tai pieneliöitä, joiden tarkoituksena on tuhota, torjua tai tehdä haitattomaksi haitallisia eliöitä sekä estää niiden vaikutusta tai rajoittaa niiden esiintymistä. ²
CDC	Taudintorjuntakeskus; Centers for Disease Control
CDRH	Lääkinnällisten ja säteilevien laitteiden keskus; Center for Devices and Radiological Health
CSF	Aivo-selkäydinneste; Cerebrospinal Fluid
Detergentti	Pintajännitystä vähentävä aine ¹
DNA	Deoksiribonukleiinihappo; Deoxyribonucleic Acid
DNV	Det Norske Veritas
Emulsio	Toisiinsa liukenemattomien nesteiden kolloidinen seos. Verbi emulgoida. ¹
Enukleaatio	Elimen tai kasvaimen poisto; <i>enucleatio bulbi</i> , silmän poisto. ¹
Epiteeli	Eläinten ulkopintaa sekä sisäisiä onteloita, tiehyitä ja suonia peittävä verisuoneton kerros (pintakerros). ¹

Fakultatiivinen anaerobi	Mikrobi, joka kykenee elämään sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa. ¹
FDA	Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkevirasto; Food and Drug Administration
GAE	Keskushermostoinfektio; <i>Granulomatous amebic encephalitis</i>
Genotyyppi	Peruasu, perimä; yksilön geenien eli perintötekijöiden kokonaisuus. ¹
Granulooma	Sidekudoksen liikakasvu, esimerkiksi makrofageista ja lymfosyyteistä koostuva tulehdussolukertymä. ³
Hus	Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri
HusLab	Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratoriot
Invasiivisuus	1. Elimistössä syöpäsolujen tai mikrobien tunkeutuminen kudokseen; 2. Kajoava, elimistön sisälle ulottuva, esim. tutkimustoimenpide. ¹
In vitro	Lasissa, pullossa, koeputkessa (<i>in</i> = sisässä, <i>vitrum</i> = lasi). Tutkimustekniikka, jossa koe suoritetaan koeputkessa, lasimaljassa tai yleisesti elävän organismin tai solun ulkopuolella. ¹
In vivo	Elävässä eliössä tehty tutkimus (<i>vivus</i> = elävä). ¹
ISO	Kansainvälinen standardisointijärjestö; International Organization for Standardization
Kationi	Positiivisesti varautunut ioni ¹
Kelatoiva aine	Orgaaninen molekyyli, joka sitoo metallikationeja, esim. kalsiumia (Ca ²⁺) tai magnesiumia (Mg ²⁺) ja muodostaa näiden kanssa liukoisen kompleksiyhdisteen. ¹
Keratiitti	Sarveiskalvon tulehdus, jonka voi aiheuttaa bakteeri, virus, sieni tai alkueläin. ⁴
Keratoplastia	Sarveiskalvon siirto ⁴
Krooninen	Pitkäaikainen, pitkälinen. ¹
Kvalitatiivinen	Laadullinen
Kvantitatiivinen	Määrällinen
Laktaatti	Maitohapon suola, esterit tai ioni. ¹
Lipidi	Yhteisnimi eliöiden solukoissa ja kudoksissa syntyneille rasvoille ja rasvamaisille aineille. Lipidit eivät edusta rakenteeltaan yhtenäistä yhdisteryhmää. Lipideille on ominaista, että ne liukenevat hyvin orgaanisiin liuottimiin ja ovat veteen

	liukenemattomia. ¹
MD	Lääkinnällinen laite; Medical Device
MDD	Lääkintälaitedirektiivi; Medical Device Directive
Metabolia	Aineenvaihdunta
Mitokondrio	Soluelin, jossa soluhengitys tapahtuu. ¹
Mitoosi	Tuman ja sen sisältämän perimän jakautuminen kahdeksi identtiseksi kopioksi. ¹
Morfologia	Muoto-oppi
MPS	Piilolinssien monikäyttönestee; Multipurpose Solution
Patogeeninen	Tautia aiheuttava; patogeeni, tautia aiheuttava mikrobi ¹
PCB	Polyklooratut bifenyyl-yhdisteet; Polychlorinated Biphenyl
PCR	Polymeraasiketjureaktio; Polymerase Chain Reaction
Pinosytoosi	Solun aktiivista nestemäisten ravintoaineiden ottoa (vrt. endosytoosi). Pinosytoosissa solukalvoon muodostuu pieni sisäänpainuma (<i>caveola</i>), joka solunulkoisen nesteen täyttämänä työntyy solun sisälle ja kuroutuu irti kalvosta erilliseksi rakkulaksi. ¹
ppm	Miljoonasosa; Parts Per Million
Polygonaalinen	Epäsymmetrinen
Proteaasi	Proteiineja hajottavien entsyymien yleisnimitys ¹
RPM	Kierrosta minuutissa; Revolutions Per Minute
rRNA	Ribosomaalinen RNA; Ribosomal Ribonucleic Acid
RT	Huoneenlämpö; Room Temperature
Sekvenssi	Makromolekyylien sisältämien monomeerien järjestys. Esimerkiksi proteiinien aminohappojen tai nukleinihappojen nukleotidien järjestys. ¹
Sytotoksinen	Soluille myrkyllinen ¹
TFU	Vyöhykkeitä muodostavia yksiköjä; Track-forming units
Valvira	Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirasto
VTT	Valtion teknillinen tutkimuskeskus

1 JOHDANTO

Akantamebat (*Acanthamoeba spp.*) ovat yleisesti ympäristössä esiintyviä alkueläimiä, joiden tiedetään aiheuttavan ihmisillä monenlaisia infektoita. Akantameban aiheuttama akantamebakeratiitti (AK) on vakava, näköä uhkaava sarveiskalvon tulehdus. Piilolinssien käyttö lisää AK:n riskiä, minkä vuoksi piilolinssien hoitonesteidien akantameba-aktiivisuuden määrittämiseen tarvitaan menetelmä.⁵

Työn tarkoituksena oli kehittää sopiva menetelmä piilolinssien hoitonesteidien akantameba-aktiivisuuden määrittämiseen, sekä testata ja vertailla menetelmää hyödyntäen kaupallisten- ja vasta tuotekehityksessä olevien hoitonesteidien tehokkuuksia akantameboja vastaan.

Mahdollisimman luonnollisia piilolinssien käyttöolosuhteita jäljittelevä testimenetelmä kehitettiin aiheesta aiemmin julkaistujen tutkimusten perusteella. Kehitysvaiheessa menetelmää testattiin positiivisen- ja negatiivisen kontrollin lisäksi yhdellä hoitonestenäytteellä sekä yhdellä akantameballa. Virallisissa tutkimuksissa testattiin yhdeksän eri hoitonesteen tehokkuuksia kahdelle eri akantameballe. Työn kokeellinen osuus suoritettiin kokonaisuudessaan Turun ammattikorkeakoulun, Lemminkäisenkadun toimipisteen mikrobiologian ja biotekniikan laboratorioissa.

Kirjallisuusosiossa perehdytään tutkittavaan amebasukuun sekä käsitellään lyhyesti akantameban aiheuttamaa keratiittia ja sen hoitoa. Lisäksi kirjallisuusosiossa käydään läpi piilolinssien hoitonesteitä ja niihin liittyviä viranomaisvaatimuksia sekä vertaillaan neljää menetelmän kehitykseen hyödynnettyä julkaisua sekä niiden tuloksia keskenään.

Työn toimeksiantajana toimi Piilokset by Finnsusp Oy, joka on kotimainen vuonna 1978 perustettu optisen alan perheyrytys. Yrityksen toiminta alkoi piilolinssien hoitonesteidien tuotekehityksestä ja valmistuksesta ja johti Piilokset -tuoteperheen syntyyn. Hoitonesteidien valmistuksen lisäksi liiketoiminta on laajentunut Free-Form – tekniikkaa hyödyntävään silmälasilinssien valmistukseen. Liiketoimintaan kuuluu myös optisen alan tuotteiden

maahantuonti sekä optisen alan koneet ja laitteet sekä näiden huolto. Vientiä yrityksellä on n. 30 maahan.⁶

2 AKANTAMEBA

2.1 Yleistä

Akantamebat ovat yksisoluisia, yleisesti sekä maaperässä että vesistöissä esiintyviä alkueläimiä. Niitä on eristetty myös vedenjakelujärjestelmistä sekä uima-altaiden vesistä. Akantamebilla on kaksi elinmuotoa; aktiivinen trofotsoiitti- sekä inaktiivinen kystamuoto.⁵ Tämän hetkisen tiedon mukaan akantameboja tunnetaan yli 20 lajia⁵, joista 11 tiedetään olevan ihmiselle patogeenisia ja ainakin kahdeksan aiheuttavan akantamebakeratiittiä (AK)⁷. Yleisin AK:a aiheuttava laji on *Acanthamoeba castellanii*⁸. Taulukossa 1 on esitelty AK:a sekä keskushermostoinfektiota (GAE; *Granulomatous amebic encephalitis*) aiheuttavat akantameba-lajit.

Taulukko 1. AK:a ja GAE:ta aiheuttavia akantameba-lajeja.⁷

Keskushermostoinfektio	Akantamebakeratiitti
<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. castellanii</i>
<i>A. castellanii</i>	<i>A. polyphaga</i>
<i>A. polyphaga</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. hatchetti</i>
<i>A. healyi</i>	<i>A. rhyodes</i>
<i>A. divionensis</i>	<i>A. griffini</i>
	<i>A. quina</i>
	<i>A. lugdunensis</i>

Jaottelu

Akantamebat voidaan jaotella joko muodon eli morfologian tai genotyypin eli perintötekijöiden perusteella. Morfologisesti akantamebat jaotellaan kolmeen ryhmään (I - III). Jaottelu tehdään pääasiassa kystien morfologisten ominaisuuksien sekä trofotsoiittien koon ja muotojen perusteella.⁹ Genotyyppiin perustuva jaottelu tehdään tuman tai mitokondrion ribosomaalisen RNA:n (rRNA) pienten alayksikköjen (16S ja 18S) sekvenssien analysoinnin perusteella. Tähän mennessä on löydetty 15 erilaista genotyyppiä (T1-T15),

joista yleisin, sekä ympäristössä että potilaseristyksissä, on T4.^{5,9} Gregory C. Booton ym.⁹ määrittivät tutkimuksissaan 249 eri lähteistä eristettyjen akantamebojen genotyypit. Taulukossa 2 on esitelty tutkimuksessa määritettyjen eri genotyyppien yleisyys ympäristössä, AK:ssa sekä muissa infektoissa.⁹ Keratiittia aiheuttavat akantameba-lajit ovat olleet genotyypeiltään T3, T4, T6 tai T11^{9,10}.

Taulukko 2. Tutkittujen akantameba-kantojen genotyyppien jakautuminen.⁹

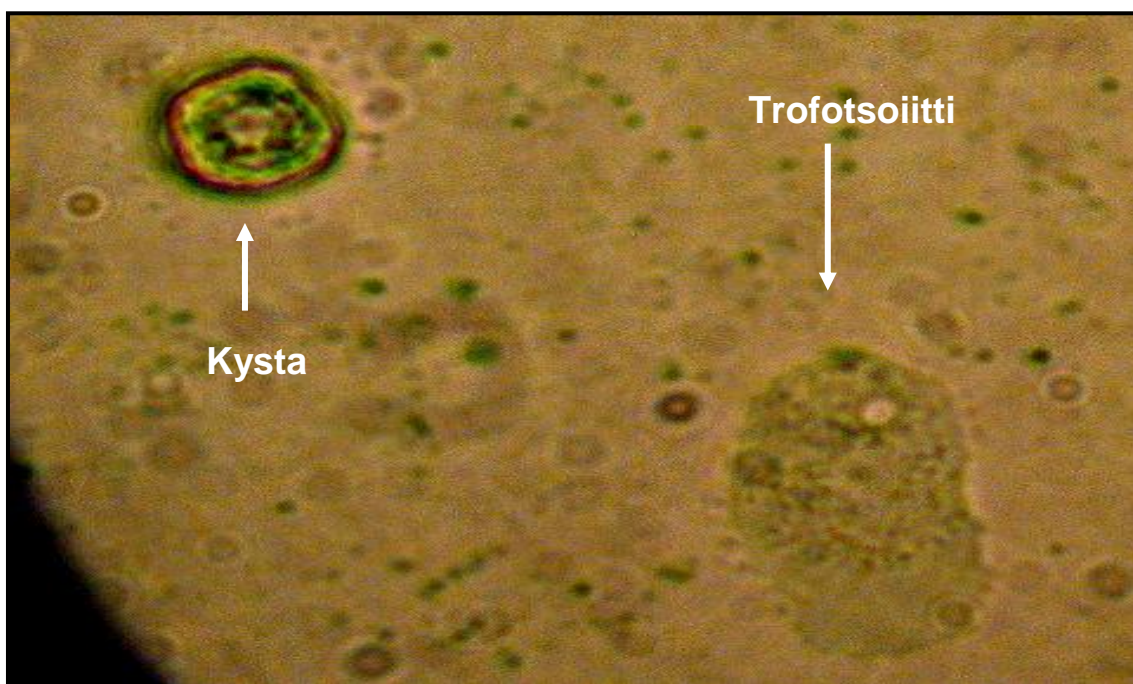
		Lähde				
		Ympäristö	AK	Muu infektio	Morfologinen ryhmä	YHTEENSÄ
Tutkittujen akantamebojen lukumäärä sekä jaottelu	T1	0	0	3	II	3
	T2	3	0	0	III	3
	T3	8	2	0	II	10
	T4	73	83	23	II	179
	T5	19	0	0	III	19
	T6	1	1	0	III	2
	T7	3	0	0	I	3
	T8	1	0	0	I	1
	T9	2	0	0	I	2
	T10	1	0	2	III	3
	T11	6	2	0	II	8
	T12	0	0	1	III	1
	T13	2 ^a	0	0	E	2
	T14	7	0	0	III	7
	T15	6	0	0	III	6
YHTEENSÄ		130	88	29		249
Selitteet:		E = Ei määritetty ^a Näytteet eristetty piilolinssikotelosta ja nenän limakalvolta				

Elinkierto ja morfologia

Akantameban elinkierto käsittää kaksi vaihetta; aktiivisen trofotsoiitti- ja inaktiivisen kystavaiheen (kuva 1). Elinolojen ollessa suotuisat, amebat esiintyvät liikkuvassa trofotsoiitti-muodossa, jolloin ne lisääntyvät jakautumalla

ja käyttävät ravinnokseen mikrobeja. Epäedullisissa ympäristöoloissa, kuten ravinnon loppuessa, lämpötilan tai happamuuden muuttuessa, trofotsoiitit koteloituvat kestromuotoisiksi kystiksi.⁵ Akantamebojen kystat ovat erittäin kestäviä ja kestävät jopa vuosia epäsuotuisissa oloissa⁸. Niitä on eristetty alueilta, joilla on suuret pitoisuudet myrkyllisiä aineita, kuten erilaisia torjunta- ja lääkeaineita, raskasmetalleja sekä PCB-yhdisteitä (polykloorattuja bifenyyliryhdisteitä)⁵. Kystat kestävät hyvin myös kloorausta⁷, mistä johtuu niiden esiintyvyys myös uima-altaiden vesissä¹¹. Olosuhteiden muuttuessa suotuisiksi, kystat muuntuvat takaisin aktiiviseen trofotsoiitti-muotoon⁷.

Trofotsoiitit ovat halkaisijaltaan 25 – 40 µm ja muodostavat pinnoilla liikkuessaan akantameballe tunnusomaisia neulamaisia ulokkeita, ns. acanthopodeja¹². Trofotsoiitille tunnusomaista on suuri tuma, jossa selkeästi erottuva tumajyvänen¹³. Kystat ovat halkaisijaltaan 10 – 30 µm, kaksoiseinällisiä ja muodoiltaan polygonaalisia eli epäsymmetrisiä¹².



Kuva 1. 400 x suurennos *A. polyphagan* trofotsoiitti- ja kystamuodosta.

Mikroskoopilla tarkasteltaessa kystat on helpompi havaita niiden paksumman, kaksoiseinällisen rakenteen vuoksi. 100 x suurennoksessa kystat (kuva 2) näkyvät pieninä ja epäsymmetrisinä, ryppäisiin kerääntyneinä hahmoina. Trofotsoiitit (kuva 2) ovat kystia hieman suurempia ja haaleampia. Liikkuessaan ne muuttavat muotoaan neulamaisten ulokkeiden muodostuessa.



Kuva 2. 100 x suurennos *A. castellanii* trofotsoiitti- ja kystamuodoista.

Luonnossa trofotsoiitit käyttävät ravinnokseen pääasiassa bakteereja, leviä ja homeita, mutta ne pystyvät hyödyntämään myös liuenneita ravintoaineita pinosytoosin avulla⁷.

Akantamebojen patogeenisuus

Akantameban patogeenisuus perustuu sen kykyyn tarttua pintoihin ja tunkeutua kudoksiin. Akantamebat voivat aiheuttaa monenlaisia sairauksia ihmisillä. Vakavin näistä on keskushermostoinfektio eli GAE. Ne voivat infektoida myös ihoa (*Acanthamoeba dermatitis*) aiheuttaen laajan ihotulehduksen, joka voi muodostaa iholle leesioita eli haavaumia. Ihon lisäksi amebat voivat kolonisoida poskionteloja aiheuttaen sinuiitin eli poskiontelotulehduksen. Lisäksi amebojen

tiedetään aiheuttavan silmän sarveiskalvotulehdusta; AK:a. Ameba erittää lukuisia proteaaseja sekä happiradikaaleja, jotka helpottavat sarveiskalvon epiteelisolujen hajoamista ja mahdollistavat siten ameban tunkeutumisen kudoksiin.⁷ Taulukossa 3 on esitelty akantameban aiheuttamia sairauksia.

Taulukko 3. Akantamebojen aiheuttamia sairauksia.⁷

Sairaus	GAE	AK	Muut infektiot
Yleiskuvaus sairaudesta	Krooninen, hitaasti etenevä keskushermoston infektio (saattaa levitä keuhkoihin), esiintyy yleensä pitkäaikaissairailla ja muilla immuunipuutteisilla henkilöillä.	Kivulias, näköä uhkaava sarveiskalvotulehdus; esiintyy yleensä terveillä ihmisillä.	Yleisimpiä AIDS potilailla ja muilla immuunipuutteisilla henkilöillä (esim. elinsiirtopotilailla).
Kulkeutuminen	Hengityselimet, iho, sivuontelo	Sarveiskalvon hankauma	Iho, sivuontelo, hengityselimet
Taudin itämisaika	Viikkoja tai kuukausia	Päiviä	Viikkoja tai kuukausia
Kliiniset oireet	Sekavuus, päänsärky, niskan jäykkyys, ärtyneisyys	Voimakas kipu, näön heikkeneminen, valonarkuus, tulehdus, rengasmainen kuvio sarveiskalvossa	Ihon haavaumat, pahkurat, sivuontelon vamma, sivuontelon tulehdus
Patologisuus	Paikallinen kuolio, granulooma	Sarveiskalvon haavauma, jopa sokeutuminen	Granuloomia sisältävä ihoreaktio, tulehdus
Diagnosointi	Aivobiopsia, CFS sivelynäyte, viljely, epäsuora kudoksen immunofluoresenssi, PCR	Sarveiskalvon biopsia tai kaavinnäyte, värjäys, viljely, mikroskopointi	Ihobiopsia, viljely, epäsuora kudoksen immunofluoresenssi

2.2 Akantamebakeratiitti (AK)

2.2.1 Yleistä

Akantamebakeratiitti on vakava, näköä uhkaava sarveiskalvon tulehdus, jonka oireita ovat muun muassa voimakas kipu, valonarkuus, nopeasti muutamassa päivässä heikentynyt näkökyky sekä runsas kyynelnesteen erityys. AK:n tunnusomaisin oire on sarveiskalvoon muodostuva rengasmainen kuvio, joka muodostuu kuitenkin vasta 4-8 viikon kuluttua ensimmäisten oireiden alkamisesta.⁸ Huonosti hoidettuna AK aiheuttaa sarveiskalvon haavautumista, näön heikentymistä ja voi lopulta johtaa sokeutumiseen⁵.

AK tunnistettiin ensimmäisen kerran Yhdysvalloissa, eteläisessä Texasissa vuonna 1973⁵. Vuosina 1973–1981 raportoitiin vain viidestä keratiittitapauksesta. Keratiittitapausten määrä lisääntyi vähitellen vuoteen 1984 ja nousi räjähdysmäisesti 1980-luvun lopulla.¹³ Vuoteen 2003 mennessä AK-tapauksia oli dokumentoitu maailmanlaajuisesti arviolta jopa yli 1350¹⁰. Viimeisten vuosien aikana AK on selvästi yleistynyt maailmanlaajuisesti: CDC (Centers for Disease Control) raportoi vuosien 2005–2007 aikana 136 tapauksesta Yhdysvalloissa¹⁴. Suomessa tapauksia on ollut 2000-luvulla noin 20, kaikki piilolinssien käyttäjillä (Taru Meri 7.12.2010, HUS, henkilökohtainen tiedonanto).

Akantameboille altistuminen on erittäin yleistä. Tutkimusten mukaan 50–100 %:lta väestöstä (jotka eivät ole koskaan sairastaneet akantameban aiheuttamaa infektiota) on eristetty akantamebojen antigeeneille spesifisiä seerumin vasta-aineita.¹⁵ Lisäksi akantameboja on eristetty jopa täysin terveiden, oireettomien ihmisten sieraimista ja nieluista. Vaikka akantameboille altistuminen vaikuttaa olevan melko yleistä, on yllättävää kuinka harvinainen niiden aiheuttama sarveiskalvon tulehdus on.¹³ Ihmisen omalla immuunijärjestelmällä, etenkin synnynnäisellä, on suuri rooli AK:n ehkäisyssä¹⁵.

Tutkimuksissa on havaittu, että akantameban samanaikainen infektio muiden mikrobien (bakteerien tai sienien) kanssa on yleistä. Yhteisinfektio muiden mikrobien kanssa tarjoaa ameboille ravintoa.⁸ Badenoch ym.¹⁶ tutkimuksessa

rotilla tehdyllä tautimallinnuksella huomattiin, että kehittyäkseen AK:ksi akantamebat tarvitsivat bakteerikasvustoa ympärilleen. Bakteerit toimivat kudoksessa ikään kuin kofaktoreina mahdollistaen infektion.¹⁶

2.2.2 Piilolinssit ja AK

Jopa 85 % akantamebakeratiittiin sairastuneista on piilolinssien käyttäjiä⁵. AK:lle altistavia tekijöitä ovat muun muassa sopimaton piilolinssien hoito, etenkin kotitekoisten suolaliuosten käyttö piilolinssien puhdistuksessa ja säilytyksessä. Lisäksi sarveiskalvon vammat ja hiertymät altistavat keratiitille.¹³ Myös uiminen piilolinssit silmissä lisää akantamebakeratiitin riskiä¹⁴. AK:ta esiintyy poikkeuksetta yleiskunnon terveillä henkilöillä, kun taas keskushermosto- sekä muita infektioita tavataan yleensä vain heikon vastustuskyvyn omaavilla ihmisillä, esimerkiksi AIDS-potilailla⁵. Vaikka AK useimmiten yhdistetäänkin piilolinssien käyttöön, infektion voi saada myös henkilö, joka ei käytä piilolinssiä⁷.

Piilolinssien vaikutus sarveiskalvoon

Verisuoneton sarveiskalvo on riippuvainen kaasujen vaihdossa kyynelnesteen ja ilman rajapinnasta, jotta aerobinen metabolia onnistuisi. Piilolinssien käyttö vähentää hapen ja hiilidioksidin vaihtoa sarveiskalvon pinnalla ja siten heikentää sarveiskalvon pinnan kaasumetaboliaa.¹⁷ Kaasumetabolian heikentymisen johdosta hapen puute sekä hiilidioksidimäärän lisääntyminen vähentävät epiteelisolujen happiaineenvaihduntaa. Happiaineenvaihdunnan vähenemisen seurauksena laktaatin (maitohapon suola) tuotanto lisääntyy, mikä aiheuttaa mitoosin hidastumista ja siitä johtuvaa epiteelisolukon ohentumista ja haurastumista.¹⁸ Vähäinen hapensiirto voi johtaa epiteelisolukon rakoiluun, mikä johtaa sarveiskalvon sähköisen potentiaalin laskuun, paikallisiin syöpymiin, epiteelisolukon hankaumiin ja kasvaneeseen mikrobi-infektoriskiin¹⁹.

Jopa aivan pienien epiteelivaurioiden on osoitettu paljastavan keratosyyteissä mannoositähteitä, joihin akantameban trofotsoitti pystyy tarttumaan mannoosia sitovalla pintaproteiinilla. Tarttuessaan se alkaa tuottaa sarveiskalvostrooman

kollageenia pilkkovaa proteaasia. Piilolinssien käyttö riittää paljastamaan mannoositähteitä, jolloin infektioherkkyys kasvaa.⁴

Van Klink ym.²⁰ tutkimuksessa kiinanhamstereilla tehdyllä tautimallinnuksella pystyttiin todistamaan, ettei AK puhjennut ilman sarveiskalvon hankaumaa tai hiertymää.

2.2.3 Diagnosointi

Alkueläinten aiheuttamat sarveiskalvon tulehdukset eivät ole vielä tarpeeksi hyvin tunnettuja. Niitä ei myöskään tunnisteta kliinisistä näytteistä tarpeeksi hyvin, sillä menetelmät niiden diagnosoimiseksi ovat vielä vieraita eikä rutiinotoimenpiteitä tai edes valmiuksia diagnoosin tekemiseen ole monissakaan laboratorioissa.⁷

Akantameban aiheuttaman keratiitin diagnosointi on yleensä ongelmallista, koska tauti muistuttaa usein yleisimpiä bakteeri- tai virusperäisiä sarveiskalvon tulehduksia. AK sekoitetaan usein *Herpes simplex*-viruksen aiheuttamaan keratiittiin.⁴ Mahdollisimman nopea diagnoosi parantaa huomattavasti toipumisennustetta¹⁴. AK:ta voidaan epäillä kliinisten oireiden, taudin kulun ja etenkin mikroskooppisen tutkimuksen perusteella. Varmaan diagnoosiin tarvitaan ameban osoitus viljelemällä. Suomen kaikki alkueläin tartuntaepäilyt tutkitaan keskitetysti Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin (HusLab), parasitologian yksikössä. Viljely voidaan tehdä piilolinssistä, hoitonesteistä tai silmästä otetusta näytteestä. Linssit ja niiden säilyttämiseen käytetty neste voidaan lähettää laboratorioon sellaisenaan, silmänäyte otetaan elatusaineeseen lähetettävässä yksikössä. Positiivisen tuloksen varmistuttua amebat lähetetään Lontooseen genotyyppattavaksi. (Taru Meri 7.12.2010, HUS, henkilökohtainen tiedonanto)

Viljely on AK:n diagnosointiin käytetyistä menetelmistä yleisin. Sen etuja ovat edullisuus ja yksinkertaisuus, mutta se ei ole kovinkaan herkkä. Viljelyä uudempi menetelmä AK:n diagnostiikassa on *in vivo* – konfokaalimikroskopia, joka mahdollistaa kystien ja trofotsoiittien tutkimisen suoraan silmän

sarveiskalvolta. *In vivo* -konfokaalimikroskopian etuja ovat noninvasiivisuus sekä nopeus. Lisäksi sen avulla voidaan myös seurata infektion kulkua ja hoitovastetta. AK voidaan osoittaa myös polymeerasiketjureaktiolla (PCR), jolla on saavutettu parempi herkkyys kuin viljelyllä. Lisäksi PCR:ään perustuva diagnosointi on viljelyä nopeampi ja sillä voidaan samanaikaisesti määrittää näytteestä löytyneen akantameban laji. Vielä toistaiseksi PCR on vain tutkimuskäytössä.⁴

2.2.4 Hoito

AK voi olla vaikeahoitoinen, etenkin diagnoosin ja oikean hoidon viivästyttyä. Hoito koostuu yleensä monien eri lääkkeiden yhdistelmistä sekä kirurgisista toimenpiteistä.⁴ Pitkälle kehittyneen AK:n hoito saattaa kestää useista kuukausista jopa yli vuoteen ja epäonnistuminen on melko yleistä⁷.

Lääkehoito

AK:n hoitoon käytetään monenlaisia lääkkeitä. Osa lääkkeistä annostellaan oraalisesti, osa voiteina tai tippoina suoraan silmän pinnalle.¹⁴ Lääkehoito aloitetaan yleensä intensiivisesti. Alussa lääkkeitä annostellaan paikallisesti 1-2 kertaa tunnissa, yleensä ympäri vuorokauden. Hoitojen edetessä lääkkeiden annostelua vähitellen harvennetaan. Ylläpitohoitoa jatketaan vasteen mukaan muutamista viikoista muutamiin kuukausiin.⁴

Akantamebakeratiitin paikallishoidoksi suositellaan biguanideihin kuuluvia polyheksametyleenibiguanidia (PHMB) ja klooriheksidiiniä sekä bentsamidiiniryhmän propamidiinia ja heksamidiinia⁴. Biguanidit ovat tehokkaita yksin käytettyinä, mutta yleensä niitä käytetään yhdessä muiden lääkkeiden, esimerkiksi bentsamidiinien, kanssa²¹.

Lisäksi lääkehoidossa voidaan käyttää myös erilaisia antibiootteja kuten muun muassa gramisidiinia, polymyksiiniä sekä metronidatsolia, joiden merkitys on kuitenkin vähäinen. Antibioottien tarkoituksena on ehkäistä bakteerien aiheuttamaa niin sanottua superinfektiota. Lisäksi antibiootit myös heikentävät

akantameban elinoloja vähentämällä saatavilla olevan bakteeriravinnon määrää.⁴

Lääkehoidon yhteydessä voidaan käyttää myös kortikosteroideja¹⁴, vaikka niiden käyttöön liittyykin ristiriitaisia näkökulmia⁴. Kortikosteroidit lievittävät tehokkaasti tulehdusreaktioita ja siten helpottavat oireita⁴. Lisäksi ne ehkäisevät sarveiskalvosiirränäisen hylkimisreaktiota¹⁵. Kortikosteroidien on kuitenkin huomattu estävän akantamebojen tuhoamisessa tärkeiden makrofagien toimintaa⁴ ja niiden myös tiedetään lisäävän trofotsoiittien koteloitumista kystiksi¹⁵.

Kirurginen hoito

Pitkälle edenneissä tulehduksissa joudutaan usein turvautumaan keratoplastiaan eli sarveiskalvon siirtoon⁷. Yleensä siirtoon joudutaan turvautumaan tapauksissa, joissa lääkehoito ei tehoa tai sarveiskalvo on korjaantumattomasti vaurioitunut ja näkökyky heikentynyt. Keratoplastiaa ei kuitenkaan tulisi tehdä vielä infektion aktiivivaiheessa sillä myös siirre saattaa infektoitua.⁴ Infektoitumisriskin vuoksi keratoplastia tehdään yleensä vasta hoitojen lopuksi, jotta voidaan olla varmoja, että horrostilassa olevia kystia ei ole jäänyt sarveiskalvon reunamille. Potilaita, joilla AK on edennyt pitkälle, täytyy tarkkailla jatkuvasti, koska kystien on huomattu olevan erittäin vastustuskykyisiä hoidoille.⁷

Ennen keratoplastiaa voidaan sarveiskalvosta poistaa pinnalliset kerrokset ja peittää aukko sidekalvokielekkeellä. Tämä keratoplastiaan valmisteleva toimenpide lievittää kipua ja tulehdusta sekä lisäksi vähentää infektoitunutta sarveiskalvokudosta.⁴ Lisäksi sarveiskalvon (ameboja ja kuollutta solukkoa sisältävän) pintakerroksen poisto tehostaa paikallisten lääkkeiden tehoa ja imeytymistä⁷.

Ennuste

Suosituksen mukaisella lääkehoidolla AK paranee suurimmassa osassa tapauksista. Englannissa Radford ym.²² tekemässä monikeskustutkimuksessa

noin 250 potilaan aineistosta ainakin 60 %:lle lääkehoito oli riittävä. Keratoplastiaan tai muuhun kirurgiseen toimenpiteeseen jouduttiin turvautumaan 15 %:lla tapauksista ja kahdelle potilaalle jouduttiin tekemään enukleatio eli silmän poisto.²²

Potilaiden näkökyvyn on huomattu palautuvan ennalleen vaihtelevin tuloksin. Osalla potilaista näkökyky palautuu ennalleen pelkän lääkehoidon ansioista, kun taas osalla vasta keratoplastian avulla. Osalla näkökyky jää aiempaa heikommaksi. Useista tutkimuksista käy ilmi, että mitä aiemmin oikean hoito on aloitettu, sitä parempia tuloksia hoidoilla on saavutettu. Diagnoosin viivästymisen on huomattu lisäävän suuremman operatiivisen hoidon tarvetta. Hoidon lopputulokseen vaikuttavat myös eri akantamebakantojen erot patogeneisyydessä ja lääkeresistenssissä.^{4,22}

3 PILOLINSSIEN HOITONESTEET

3.1 Yleistä

Piilolinssit sekä niiden hoitonesteet luokitellaan lääkinällisiksi laitteiksi (Medical device, MD), joten niiden valmistusta ja kehitystä säätelevät monet direktiivit ja lait²³.

Piilolinssien hoitonesteiden tarkoituksena on puhdistaa ja desinfioida linssi epäpuhtauksista ja mikrobeista sekä kostuttaa linssiä²⁴. Piilolinssien puhdistuksessa voidaan käyttää joko useita eri nesteitä puhdistuksen eri vaiheissa tai vain yhtä nestettä. All-in-one eli ns. monikäyttönesteiden (MPS) tarkoituksena on puhdistaa, huuhdella, desinfioida sekä säilyttää linssit käyttökertojen välissä.²⁵

Eri linssityypeille (kovat vs. pehmeät piilolinssit) on olemassa omanlaisensa hoitonesteet. Pehmeille piilolinssille tarkoitetuissa nesteissä aktiiviset aineet ovat molekyylikooltaan suurempia kuin kovalle piilolinssille tarkoitetuissa nesteissä. Kovalle piilolinssille tarkoitettujen hoitonesteiden molekyylit voivat kulkeutua pienen kokonsa vuoksi pehmeiden piilolinssien sisälle ja muuttaa niiden parametreja. Lisäksi piilolinssiin jäädessään puhdistusaine saattaa myös aiheuttaa ärsytystä silmässä.²⁶

3.2 Piilolinssien puhdistus

Piilolinssien käytön ja käsittelyn aikana niiden pinnalle kertyy runsaasti erilaisia epäpuhtauksia kuten proteiineja, lipidejä, epäorgaanisia suoloja, mikrobeja, ilman epäpuhtauksia ja kosmeettisia aineita²⁵. Piilolinssien puhdistus on tärkeää kertyneiden epäpuhtauksien poistamiseksi. Kertyneet epäpuhtaudet saattavat aiheuttaa allergisia reaktioita, sarveiskalvon turvotusta, silmien punoitusta, epämiellyttävää tunnetta sekä lyhentää linssien käyttöikää. Saostumat heikentävät myös näön tarkkuutta ja muodostavat linssin pinnalle biofilmiä, joka toimii alustana mikrobikasvustoille.²⁴

Pinta-aktiiviset aineet puhdistuksessa

Puhdistavia eli pinta-aktiivisia aineita käytetään hoitonesteissä erityisesti niiden puhdistusominaisuuksien vuoksi. Pinta-aktiiviset aineet ovat ionittomia, anionisia, kationisia tai amfoteerisia detergentejä, jotka nesteen pintajännitystä alentamalla liuottavat sakkaa ja edesauttavat lipidien emulgoitumista. Puhdistettavasta linssityypistä riippuen käytetään eri sähkövarauksista detergenttiä. Puhdistusominaisuuksien lisäksi pinta-aktiiviset aineet saattavat myös lisätä desinfioivien aineiden tehoa.²⁴ Taulukossa 4 on listattuna piilolinssien hoitonesteissä käytettyjä pinta-aktiivisia aineita.

Taulukko 4. Pinta-aktiiviset ainesosat hoitonesteissä.

Pinta-aktiiviset ainesosat
Aminometyylipropanoli (AMP)
Aminometyylipropanoliglykoli (AMPD)
Hydroksialkyylifosfonaatti (Hydranate®)
Makrogolglyseroli hydroksistearaatti 60
Pluronic F68
Pluronic F87
Pluronic F127
Tetronic 1107
Tetronic 1304
Propyleeniglykoli

Piilolinssien hoitonesteissä käytetyimpiä pinta-aktiivisia aineita ovat polymeereihin kuuluvat poloksameerit (kaupalliselta nimeltään Pluronic) sekä poloksamiinit (kaupalliselta nimeltään Tetronic). Molemmat polymeerit koostuvat eteenioksideista ja propeenioksideista, mutta eroavat toisistaan rakenteiltaan. Poloksameerit ovat suoraketjuisia kopolymeerejä, joiden päissä on primääriset hydroksyyliiryhmät. Poloksamiinit ovat haarautuvia, x-muotoisia kopolymeerejä, joissa neljä haaraa on kiinnittyneinä keskellä olevaan etyleenidiamiiniin. Poloksamiinin jokaisen haaran päässä on primäärinen hydroksyyliiryhmä. Sekä poloksameereja että poloksamiineja käytetään vaahdonestoaineina, kosteuttavina-, dispergoivina- tai emulgoivina ainesosina. Niitä voidaan käyttää

myös sakeuttajina. Poloksameerit ja poloksamiinit ovat ionittomia, molekyylikooltaan suuria ja suhteellisen myrkyttömiä käyttää. Suuri molekyylikoko auttaa ehkäisemään molekyyliä kulkeutumasta linssimatriksin sisään ja siten ehkäisemään silmän ärsytystä.^{27,28}

3.3 Piilolinssien desinfiointi

Desinfiointimenetelmät

Piilolinssien desinfiointiin on olemassa useita fysikaalisia sekä kemiallisia menetelmiä. Fysikaalisia menetelmiä ovat esimerkiksi lämpökäsittely, ultraääni, ultravioletti- sekä mikroaaltosäteily, mutta näitä käytetään vain hyvin harvoin kotioiloissa.²⁵ Lämpökäsittely on kylmädesinfiointimenetelmiä tehokkaampi akantameba trofotsoitteja ja kystia vastaan⁷. Kemialliset desinfiointimenetelmät ovat fysikaalisia menetelmiä huomattavasti yleisempiä²⁵.

Kemiallinen desinfiointi

Piilolinssien kemialliseen desinfiointiin tarkoitettujen tuotteiden tarkoituksena on vähentää mikrobiologista kontaminaatiota piilolinssien käytön ja käsittelyn aikana sekä puhdistaa ja säilyttää piilolinssit käyttäjien välissä. Niiden tulee sisältää antimikrobiologisia ainesosia edellä mainittujen tavoitteiden saavuttamiseksi. On erittäin tärkeää, että kaikki piilolinssien nestemäiset hoitotuotteet ovat steriilejä pullon avaukseen asti.²⁹

Desinfiointiaineiden tarkoituksena on poistaa tauteja aiheuttavia mikrobeja mm. esineistä ja pinnoilta. Hyvä desinfiointiaine on tehokas mikrobeja vastaan ja sen teho säilyy myös orgaanisen materiaalin läsnä ollessa. Desinfiointiaine ei saa vaurioittaa käsiteltäviä materiaaleja, ärsyttää limakalvoja tai ihoa eikä aiheutaa allergiaoireita käyttäjälleen.³⁰ Kemiallisten desinfiointiaineiden tulee olla tarpeeksi toksisia tappaakseen mikrobeja, mutta ne eivät saa olla toksisia silmälle²⁴.

3.3.1 Yleisimpiä desinfiointiaineita

Piilolinssien desinfiointissa käytetään monenlaisia desinfiointiaineita, jotka eroavat toisistaan niiden teholla tappaen eri mikrobeja sekä mahdollisilla sytotoksisilla vaikutuksilla³¹. Desinfiointiaineet voidaan jaotella niiden vaikutustapojen mukaan. Jotkin aineet vaikuttavat mikrobien solukalvoon, toiset taas tunkeutuvat solun sisään. Desinfiointiaineet voivat saostaa mikrobien proteiineja, vähentää entsyymiaktiivisuutta, hydrolysoida tai hapettaa solurakenteita. Monesti desinfiointiaineet ovat useiden vaikuttavien aineiden seoksia.²⁵

Seuraavilla sivuilla on esiteltynä muutamia yleisimpiä hoitonesteissä käytettyjä desinfiointiaineita (taulukko 5).

Taulukko 5. Yleisimpiä hoitonesteissä käytettäviä desinfiointiaineita.

Yleisimmät desinfiointiaineet	
Biguanidit	Polyaminopropylibiguanidi (PAPB) Polyheksametyleenibiguanidi (PHMB) Klooriheksidiini Alexidiini
Kvaternääriset ammonium-yhdisteet	Polyquaternium-1 (PQ-1) Alkyylitrietanoliammoniumkloridi Bentsalkoniumkloridi (BAK)
Hapettavat yhdisteet	Vetyperoksidi Natriumkloriitti
Hapot ja niiden johdannaiset	Sorbiinihappo Boorihappo
Aminoyhdisteet	Myristamidopropyli dimetyyliamiini (MAPB)

Biguanidit

Biguanidit ovat kationisia pinta-aktiivisia aineita, jotka ovat tehokkaita sekä akantamebojen trofotsoiitteja että kystia vastaan. Biguanidit reagoivat mikrobien solukalvon happamien fosfolipidien kanssa aiheuttaen solukalvon hajoamisen ja lopulta mikrobin kuoleman. Ne myös liuottavat kystan kaksoisseinän glykosaminoglykaaneja ja vaikuttavat suoraan solunsisäisiin organelleihin.¹⁴

Polyaminopropylibiguanidi (PAPB) ja polyheksametyleenibiguanidi (PHMB) ovat useita biguanidiyksiköitä sisältäviä polymeerejä^{32,33}. PAPB:n (kaupalliselta nimeltään Dymed[®]) yleinen pitoisuus hoitonesteissä on 0,0001 % (1 ppm)³³. Dymed[®] on turvallinen eikä ärsytä sarveiskalvoa²⁵. PHMB (molekyyli­massa 1300 u) sisältää 6-8 aktiivista kohtaa. PHMB:n pitoisuus hoitonesteissä vaihtelee 0,5 ppm:n ja 50 ppm:n välillä.³²

Klooriheksidiini on yleisesti antiseptisissä tuotteissa käytetty biosidi. Se on monipuolinen, tehokas ja suhteellisen myrkytön biguanidi.³⁴ Kooltaan klooriheksidiini on PHMB:a pienempi (molekyyli­massa 359 u)³². Yleisimmin sitä käytetään ihon ja suun desinfiointiin tarkoitetuissa tuotteissa³⁴, mutta se soveltuu myös piilolinssien desinfiointiin³⁵. Klooriheksidiini tehoaa hyvin *gram*-positiivisiin- sekä useisiin *gram*-negatiivisiin bakteereihin, mutta ei viruksiin³⁰. Klooriheksidiinin desinfiointiteho riippuu paljon pH:sta ja sen teho heikkenee orgaanisen aineen vaikutuksesta³⁴. Alkoholit lisäävät klooriheksidiinin tehoa³⁰. Suurina pitoisuuksina klooriheksidiini on myrkyllinen sarveiskalvon soluille³⁶. Lisäksi osa sen suoloista absorboituu joihinkin pehmeissä piilolinssissä käytettyihin polymeereihin³⁷. Klooriheksidiini vaikuttaa solukalvojen eheyteen jo pieninä pitoisuuksina ja aiheuttaa sytoplasman hyytymistä suurempina pitoisuuksina³⁸.

Aleksidiini eroaa kemialliselta koostumukseltaan hieman klooriheksidiinistä ja on kooltaan tätä suurempi (molekyyli­massa 582 u). Aleksidiinillä on nopeampi biosidinen ja bakteerien solukalvoa heikentävä vaikutus. Se on tehokas *gram*-positiivisia ja *gram*-negatiivisia bakteereja vastaan. Sitä on käytetty ennen suuvesien ja haavanpuhdistusaineiden desinfioivana aineena, mutta nykyään se on piilolinssien hoitonesteidien ainesosa.³⁸

Kvaternääriset ammoniumyhdisteet

Kvaternääriset ammoniumyhdisteet ovat ammoniakkin johdannaisia ns. kationisia detergenttejä²⁵, jotka vaikuttavat mikrobien, etenkin bakteerien, solukalvon rakenteisiin³⁴. Yhdisteet aiheuttavat mikrobien solukalvon särkymisen, positiivisesti varautuneiden alkyyliryhmien reagoidessa

kalvolipidien kanssa. Bakteerien ja sienien itiöihin yhdisteet eivät vaikuta. Yhdisteiden teho heikkenee metalli-ionien ja orgaanisen aineksen läsnä ollessa. Alkoholi lisää yhdisteiden desinfiointitehoa. Kvaternäärysten ammoniumyhdisteiden etuina ovat ympäristöystävällisyys ja vaarattomuus.³⁹

Bentsalkoniumkloridi (BAK) on yleisesti käytetty säilöntäaine (mm. silmä lääkkeissä ja –tipoissa), joka tehoaa sekä bakteereihin että sieniin, mutta voi suurina pitoisuuksina olla sytotoksinen sarveiskalvon soluille. BAK:n pienen molekyylikoon (molekyyli­massa 340 u) vuoksi sitä ei voida käyttää hydrogeelilinssien hoitonesteissä.²⁵

Polyquaternium-1 eli PolyquadTM (PQ-1) on BAK:n johdannainen⁴⁰ ja suurin piilolinssien desinfioinnissa käytetty molekyyli (molekyyli­massa 5000 u)³². Suuri koko estää sitä kulkeutumasta linssimateriaalin sisään, eikä se näin ollen aiheuta yliherkkyyttä³².

Alkoholit, hapot ja niiden johdannaiset

Sorbiinihappo (molekyylikoko 112,13) on luonnossa esiintyvä bakteerien, hiivojen ja homeiden kasvua estävä yhdiste. Sorbiinihappo tehoaa pääsääntöisesti hiivoja ja homeita vastaan ja sen teho vaihtelee bakteereja vastaan.⁴¹ Kelatoivat aineet (esim. EDTA) parantavat sorbiinihapon antimikrobiologista vaikutusta.²⁵ Sorbiinihappo toimii hoitonesteissä käytettynä konsentraationa pääasiassa säilöntä tai desinfioinnin apuaineena²⁴.

Hapettavat aineet

Vetyperoksidi (H₂O₂) on yleinen, jo 1970-luvun alusta asti käytössä ollut desinfiointiaine⁴². Vetyperoksidi tarjoaa monia etuja muihin desinfiointiaineisiin verrattuna. Oikein käytettynä se on turvallinen, erittäin tehokas eikä sisällä herkistäviä aineisosa. Vetyperoksidi kulkeutuu hydrogeelilinssien huokosiin ja syväpuhdistaa linssit tehokkaasti, mutta ei kuitenkaan itse kerry tai sitoudu hydrogeelilinssiin. Vetyperoksidi tunkeutuu myös mikrobien biofilmin läpi toisin kuin muut desinfioivat aineet. Orgaaninen aines ja suolat eivät vaikuta vetyperoksidin desinfiointitehokkuuteen.⁴³

Vetyperoksidi tuottaa haitallisia vapaita happiradikaaleja, jotka vahingoittavat mikro-organismien kalvolipidejä, perintöainesta (DNA, deoksiribonukleiinihappo) ja muita elintärkeitä solukomponentteja aiheuttaen mikrobien kuoleman. Aerobisten ja fakultatiivisten anaerobien bakteerien tuottama katalaasi suojaa soluja niiden metaboliassa (aineenvaihdunnassa) syntyneitä vetyperoksiedeja vastaan, hajottamalla vetyperoksidin vedeksi ja hapeksi. Nämä bakteerit ovat myös kestävämpiä desinfiointiaineissa olevaa vetyperoksidia vastaan. Konsentraatiota nostamalla myös kestävämmät bakteerit tuhoutuvat.⁴⁴

Vetyperoksidi on erittäin laajakirjainen. Se on tehokas bakteereja, hiivoja, homeita, itiöitä sekä viruksia vastaan. Lisäksi se on tehokas akantamebojen trofotsoiitteja sekä kystia vastaan.⁴⁴ Vetyperoksidin on huomattu olevan tehokkaampi *gram*-positiivisia kuin *gram*-negatiivisia bakteereja vastaan³⁴. Lisäksi vetyperoksidin poistaa tehokkaasti myös proteiineja⁴⁵.

Vetyperoksidia käytetään piilolinssien hoitonesteissä 3-6 %:n (yleensä 3 %:n) konsentraationa. Vetyperoksidi on itsessään sytotoksinen sarveiskalvolle⁴⁴, joten se vaatii neutralisoinnin joko entsyymaattisesti tai katalyyttisesti ennen piilolinssien käyttöä. Sytotoksisuudesta johtuen vetyperoksidia käytetään yhdessä neutraloivien liuosten tai tablettien kanssa. Neutraloinnissa se hajoaa vedeksi ja hapeksi. Neutraloitu vetyperoksidiliuos on altis mikrobialliselle kontaminaatiolle, mikäli se ei sisällä muita desinfiioivia aineita.⁴³

Natriumkloriitti (NaClO_2) aktivoituu happamien solukomponenttien vaikutuksesta ja on yleisesti juomaveden puhdistuksessa käytetty desinfiointiaine. Vesiliuoksessa happaman aineksen sekä pelkistimen läsnä ollessa natriumkloriitti hapettuu erittäin reaktiiviseksi klooridioksidiksi (ClO_2). Klooridioksidi reagoi voimakkaasti happamien solukomponenttien kanssa ja siten tuhoaa tehokkaasti mikrobeja. Natriumkloriittia käytetään yhdessä vetyperoksidin kanssa, jolloin ne muodostavat yhdessä antimikrobiologisen kompleksin. Kompleksissa vetyperoksidi toimii pelkistimenä ja kompleksin antimikrobiologinen vaikutus perustuu molempien yhdisteiden yhteisvaikutukseen. Natriumkloriitin muodostama klooridioksidi on tehokas *gram*-positiivisia ja *gram*-negatiivisia bakteereja sekä hiivoja ja homeita

vastaan. Pullossa ja linssikotelossa kompleksi on itsessään stabiili, mutta silmään joutuessaan se hajoaa suolaksi, vedeksi ja hapeksi. Se on turvallinen eikä ärsytä silmän sarveiskalvoa, minkä vuoksi se soveltuu hyvin käytettäväksi desinfiointiaineena myös piilolinssien hoitonesteissä.³²

Aminoyhdisteet

Myristamidopropyli dimetyyliamiini (MAPD), kaupalliselta nimeltään Aldox[®] on kationinen amidoamiini-yhdiste. MAPD on tehokas ja hoitonesteissä sitä käytetään konsentraationa 5 mg/l (50 µg/ml). Pienen molekyylikoon (molekyyli massa 300 u), vaihtoehtoisen kemiallisen rakenteen ja laajakirjoisuutensa vuoksi MAPD:n soveltuvuutta mikrobialisten sarveiskalvotulehdusten (MK) hoitoon on tutkittu paljon. Pienen molekyylikokonsa ansiosta se läpäisisi paremmin sarveiskalvon pinnan ja siten olisi tehokkaampi MK:n hoidossa. R. Hughes ym.⁴⁶ huomasivat tutkimuksissaan MAPD:n olevan tehokas myös akantameboja vastaan. MAPD:n antimikrobiologinen vaikutustapa ei ole vielä tiedossa.⁴⁶

3.4 Muut aineet

Myös monet muut hoitonesteen sisältävistä aineista vaikuttavat nesteen desinfiointitehokkuuteen. Desinfioivien ja puhdistavien aineiden lisäksi piilolinssien hoitonesteet sisältävät puhdistettua vettä, puskureita, säilöntäaineita sekä kelatoivia ainesosia. Jokaisella ainesosalla on oma tarkoituksensa piilolinssien hoidon ja desinfioinnin kannalta.²⁵ Taulukossa 6 on esitetty yleisimpiä hoitonesteidien muita ainesosia.

Taulukko 6. Muita piilolinssien hoitonesteiden ainesosia.

Säilöntäaineet	Klooriheksidiini Sitruunahappo Kaliumsorbaatti Isopropyylialkoholi Sorbiinihappo Polyquaternium-1
Kelatoivat aineet	EDTA
Puskuroivat ainesosat	Boorihappo Kaliumbikarbonaatti Natriumfosfaatti Natriumtetraboraatti (Borax)
Kosteuttavat / viskositeettiin vaikuttavat ainesosat	Polyvinyylialkoholi Polyvinyylipyrrolidoni Pluronic F127 Tetronic 1304 Propyleeniglykoli Sorbitoli Hyaluronihappo Metyyliselluloosa Hydroksietyyliselluloosa Hydroksipropyylimetyyliselluloosa Karboksimetyyliselluloosa

Antimikrobiologisten säilöntäaineiden tarkoituksena on estää hoitonesteiden mikrobiologista pilaantumista pullon avauksen jälkeen. Pienempinä konsentraatioina desinfiointiaineet toimivat usein myös säilöntäaineina.²⁴

Kelatoivista ainesosista yleisin on EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo), joka parantaa nesteen bakterisidistä toimintaa ja estää kalsiumin kertymistä piilolinssin pinnalle. EDTA:n bakteereja tuhoava vaikutus perustuu sen kykyyn sitoa kahden arvoisia metalli-ioneja (esim. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}). Mikrobien aineenvaihdunta tarvitsee kahdenarvoisia metalli-ioneja kuten kalsiumia ja magnesiumia, mutta koska EDTA sitoo nämä ionit muodostamalla esimerkiksi EDTA-kalsiumkelaatin, mikrobit eivät pysty hyödyntämään näitä ioneja.^{24, 47}

Piilolinssien hoitonesteiden pH vaikuttaa piilolinssien käyttömukavuuden lisäksi hoitonesteiden desinfiointitehokkuuteen, stabiilisuuteen, steriiliyteen sekä

viskositeettiin⁴⁷. Terveen ihmisen kyynelneesten pH on välillä 7,3–7,7. Piilolinssien hoitonesteiden pH:n tulisi olla mahdollisimman lähellä normaalin kyynelneesten pH:ta jotta piilolinssijä olisi mahdollisimman miellyttävä käyttää ja ne ärsyttäisivät mahdollisimman vähän sarveiskalvoa.⁴⁸ Hoitonesteiden sisältämät puskurit pitävät hoitonesteen pH:n silmälle sopivalla tasolla.⁴⁹

Kosteuttavat ainesosat helpottavat hoitonesteen leviämistä koko piilolinssin pinnalle ja parantavat siten piilolinssien käyttömukavuutta⁴⁹. Lisäksi linssin pinnan kosteus on tärkeään myös optisten ominaisuuksien vuoksi. Huono linssin kosteus saattaa johtaa kyynelneesten ongelmiin, heikentää näkökykyä ja ärsyttää silmän sarveiskalvoa.²⁴ Kosteuttavien aineiden lisäksi voidaan käyttää myös viskositeettiin vaikuttavia ainesosia, jotka lyhentävät linssin kostumisaikaa sekä parantavat linssien käyttömukavuutta⁴⁹.

Osmolaliteetti tarkoittaa liuenneiden suolojen konsentraatiota liuoksessa. Silmän kyynelneesten osmolaliteetti on välillä 244–344 $\frac{\text{mOsm}}{\text{kg}}$. Hoitonesteen vääränlainen osmolaliteetti johtaa elektrolyyttien epätasapainoon ja aiheuttaa silmien kuivuutta.⁴⁸ Hoitonesteen osmolaliteetti saadaan samalle tasolle kyynelneesten kanssa esimerkiksi natriumkloridilla (NaCl)²⁴.

4 VIRANOMAISVAATIMUKSET

4.1 Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkevirasto (FDA)

Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkeviraston säädöksiin piiriin kuuluvat elintarvikkeet, tupakkatuotteet, lisäravinteet, resepti- ja reseptivapaat lääkkeet, rokotteet, biolääketuotteet, verisiirteet, lääkinnälliset laitteet, radioaktiivista säteilyä säteilevät laitteet, eläintuotteet sekä kosmetiikka⁵⁰.

Piilolinssit ja niiden hoitonestet kuuluvat FDA:n lääkinnällisistä ja säteilevistä laitteista vastaavan keskuksen (Center for Devices and Radiological Health, CDRH) alaisuuteen. Yritykset, jotka suunnittelevat, valmistavat, uudelleenpakkaavat, uudelleen etiketöivät ja/tai maahantuovat lääkinnällisiksi laitteiksi luokiteltavia laitteita Yhdysvaltojen markkinoille, kuuluvat FDA:n säädöksiin piiriin. Jokainen uusi Yhdysvaltojen markkinoille pyrkivä lääkinnällinen laite tulee hyväksyttäväksi FDA:lla ennen markkinoille vapauttamista.⁵⁰

FDA:n määrittämisen mukaan lääkinnälliseksi laitteeksi luokitellaan mikä tahansa kansainvälisesti tai Yhdysvalloissa tunnustettu väline, laite/laitteisto, työväline, kone, implantaatti tai *in vitro* reagenssi, joka on tarkoitettu ihmisen tai eläimen terveydentilan diagnosoimiseen, sairauden parantamiseen, lievittämiseen, hoitoon tai ennaltaehkäisyyn. Lääkinnällisen laitteen tarkoituksena on vaikuttaa ihmisen tai eläimen rakenteeseen tai elintoimintoon, mutta sen pääasiallista vaikutustapaa ei saavuteta kemiallisesti eikä tavoiteltu vaikutus ole riippuvainen metabolisesta hajoamisesta.⁵⁰

Lääkinnälliset laitteet luokitellaan 3 luokkaan (Luokka I-III) niiden käyttöön liittyvien riskien perusteella. Luokan I laitteet ovat ”matalan riskin” laitteita, joihin kuuluu esimerkiksi hammaslanka. Luokan II laitteet ovat ”keskisuuren riskin” laitteita ja ne vaativat suurempaa säätelyä ja valvontaa kuin luokan I laitteet. Piilolinssien hoitonestet kuuluvat luokkaan II. ”Suuren riskin” laitteet kuuluvat luokkaan III ja ne vaativat suurinta mahdollista säätelyä ja valvontaa. Piilolinssit kuuluvat joko luokkaan II tai III riippuen niiden materiaalista ja käyttöajasta.⁵⁰

Vuosien 2005–2007 aikana esiintyneen AK-epidemian johdosta FDA kiinnostui piilolinssien hoitonesteiden desinfiointitehokkuuksista akantameboja vastaan. Sekä vuonna 2008 että vuonna 2009 FDA kokoontui pohtimaan piilolinssien hoitonesteiden akantameba-aktiivisuusmääritysmenetelmän tarvetta. Lopulta vuonna 2009 FDA päätti sisällyttää myös akantamebojen kystat ja trofotsoiitit hoitonesteiden testausten piiriin.⁵⁰

4.2 Lääkintälaitedirektiivi (Medical Device Directive, MDD)

Piilolinssit ja niiden hoitonesteet luokitellaan lääkinnällisiksi laitteiksi joten Euroopassa niiden kehitystä ja valmistusta säätelee lääkintälaitedirektiivi 2007/47/EC (Medical Device Directive, MDD). Jokaisen Euroopan talousalueella myytävän lääkinnällisen laitteen on oltava lääkintälaitedirektiivin vaatimusten mukaisia. Direktiivi tulee ottaa huomioon kunkin jäsenvaltion lainsäädännössä jo ennen sen voimaantulusta.²³ Suomessa lääkintälaitedirektiivin noudattamista valvoo Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirasto eli Valvira⁵¹.

Lääkintälaitedirektiivin määrittämien mukaan lääkinnälliseksi laitteeksi luokitellaan mikä tahansa instrumentti, laitteisto, väline, ohjelmisto, materiaali tai muu tarvike, jota käytetään joko yksin, yhdistelminä tai lisälaitteiden kanssa sairauden tai vamman diagnosointiin, ehkäisyyn, tarkkailuun, hoitoon, lievitykseen tai kompensointiin. Lisäksi lääkinnällisen laitteen käyttötarkoituksena voi olla anatomian tai fysiologisen toiminnon tutkiminen, korvaaminen tai muuntelu tai hedelmöittymisen säätely. Lääkinnällisen laitteen tavoiteltua vaikutusta ihmiskehossa tai –kehoon ei saavuteta farmakologisin, immunologisin tai metabolisin keinoin.²³

Lääkinnälliset laitteet jaotellaan niiden ominaisuuksien perusteella tuoteluokkiin I, IIa, IIb ja III. Piilolinssien hoitotuotteet kuuluvat luokkaan IIb ja piilolinssit luokkaan IIa.²³

4.2.1 Laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista (629/2010)

Lain (629/2010) tarkoituksena on ylläpitää ja edistää terveydenhuollon laitteiden ja tarvikkeiden sekä niiden käytön turvallisuutta⁵¹. Lailla pannaan täytäntöön direktiivit 90/385/EEC (implantoitavia lääkinnällisiä laitteita koskeva direktiivi), 93/42/EEC (lääkintälaitedirektiivi) ja 98/79/EC (*in vitro* –diagnostiikkaan tarkoitettuja laitteita koskeva direktiivi) sekä niihin myöhemmin tehdyt muutokset (direktiivi 2007/47/EC). Lakia sovelletaan mm. lääkinnällisten laitteiden, tarvikkeiden ja niiden lisälaitteiden suunnittelussa, valmistuksessa ja markkinoille saattamisessa.⁵²

Lääkinnällisiä laitteita valmistavat yritykset (tai valtuutettu edustaja) voivat saattaa lääkinnällisen laitteen Suomen markkinoille vasta, kun laite täyttää lain (ja samalla direktiivien) mukaiset vaatimukset. Markkinoille saatetun lääkinnällisen laitteen saa ottaa käyttöön, kun se asianmukaisesti toimitettuna, asennettuna, huollettuna ja käyttötarkoituksensa mukaisesti käytettynä täyttää tämän lain mukaiset vaatimukset.⁵²

Terveydenhuollon laite täyttää olennaiset vaatimukset silloin, kun se on suunniteltu, valmistettu ja varustettu sitä koskevien kansallisten standardien mukaisesti. Laitteen tulee olla käyttötarkoitukseensa sopiva ja sen tulee oikein käytettynä saavuttaa sille suunniteltu toimivuus ja suorituskyky. Lisäksi laitteen asianmukainen käyttö ei saa tarpeettomasti vaarantaa potilaan, käyttäjän tai muun henkilön terveyttä tai turvallisuutta.⁵²

Valvonta

Valvira valvoo ilmoitetun laitoksen avulla terveydenhuollon laitteiden ja tarvikkeiden vaatimustenmukaisuutta sekä turvallisuutta ja ylläpitää vaaratilannerekisteriä. Tarkastukset, tutkimukset ja laitteiden testauttaminen ovat keinoja, joilla Valvira toteuttaa valvontaa. Valvira voi valvontaviranomaisena käyttää hallinnollisia pakkokeinoja puutteiden korjaamiseksi ja vaaran torjumiseksi.⁵¹

Ilmoitetut laitokset ovat EU:n jäsenvaltioiden nimeämiä tahoja, jolla on oikeus tehdä vaatimustenmukaisuuden arviointeja. Niiden toimintaa valvoo kunkin maan toimivaltainen viranomaisena.⁵¹ Ilmoitetun laitoksen on säännöllisesti suoritettava asianmukaisia tarkastuksia ja arviointeja varmistaakseen, että valmistaja noudattaa hyväksytyä laatujärjestelmää, sekä annettava valmistajalle arviointikertomus. Ilmoitetun laitoksen on otettava huomioon tuotannon aikana suoritetuista arviointi- ja tarkastustoimista saadut tulokset.⁵² Suomessa ilmoitettuna laitoksina toimivat VTT (Valtion teknillinen tutkimuskeskus) ja DNV (Det Norske Veritas).

4.3 Vaatimusten mukaisuuden osoittaminen

Valmistaja osoittaa tuotteen vaatimusten mukaisuuden testaamalla, kehittämällä ja valmistamalla tuotteet kansainvälisten ISO standardien mukaisesti.²³

Kun terveydenhuollon laite tai tarvike saatetaan Euroopan markkinoille, se on varustettava CE –merkinnällä (joitain erityistapauksia lukuun ottamatta). CE -merkinnällä valmistaja vahvistaa, että laite tai tarvike täyttää sitä koskevat vaatimukset. CE -merkinnän yhteyteen liitetään ilmoitetun laitoksen tunnusnumero, mikäli tuotteen arvioinnissa käytetään ilmoitettua laitosta.⁵¹

Piilolinssien hoitonesteidien kehityksessä olennaiset vaatimukset ja niiden määrittämiseen liittyvät standardit on esitetty kansainvälisessä standardissa SFS-EN ISO 14534 ("Ophthalmic optics. Contact lenses and contact lens care products. Fundamental requirements."). Tämä määrittelee piilolinssien, piilolinssien hoitonesteidien sekä muiden piilolinssivarusteiden perusvaatimukset. Standardissa määritellään mm. piilolinssien, niiden hoitonesteidien sekä muiden varusteiden kehitykseen, valmistukseen, pakkaukseen, säilyvyyteen sekä merkintään liittyvät vaatimukset.⁵³

Desinfiointitehokkuuden määrittämiseen ja vaatimukseen liittyvä kansainvälinen standardi SFS-EN ISO 14729 ("Ophthalmic optics. Contact lens care products. Microbiological requirements and test methods for products and regimens for

hygienic management of contact lenses.”) määrittelee mikrobiologiset kriteerit, jotka piilolinssien desinfiointien tuotteiden tulee täyttää. Se sisältää kaksi testimenetelmää hoitonesteidien antimikrobiologisten aktiivisuuksien arviointiin bakteereilla, hiivoilla ja homeilla. Hoitonesteidien antimikrobiologisten tehokkuuksien perusteella hoitonesteet luokitellaan joko piilolinssien desinfiointituotteiksi tai tuotteiksi, jotka ovat osa puhdistusmenetelmää (huuhtelu, hankaus, desinfiointi) tai –järjestelmää (useiden hoitotuotteiden menetelmä).²⁹

Mikrobiologisten kriteerien lisäksi standardi sisältää liitteissä C ja D perustelut sille miksi virukset ja akantamebat eivät kuulu hoitonesteidien testausten piiriin. Liitteessä D kerrotaan lyhyesti akantamebasta ja sen aiheuttamasta keratiitista. Liitteessä perustellaan akantameba-aktiivisuus testausten poisjättämistä AK:n harvinaisuudella ja sillä että kontaminaatio on estettävissä piilolinssien oikeanlaisella hoidolla ja käsittelyllä. Standardi SFS-EN 14729:2001 ei suosittele akantameba-aktiivisuus testausta.²⁹ Standardista on tullut uusi versio (2011), mutta tätä ei ole vielä Suomessa vahvistettu (Riikka Järvinen 13.5.2011, Piilokset by Finnsusp Oy, henkilökohtainen tiedonanto).

5 PIILOLINSSIEN HOITONESTEIDEN AKANTAMEBA-AKTIIVISUUSTUTKIMUKSET

Piilolinssien hoitonesteiden akantameba-aktiivisuuksia on tutkittu viime aikoina enenevässä määrin. Toistaiseksi virallista menetelmää hoitonesteiden akantameba-aktiivisuuksien arviointiin ja testaukseen ei kuitenkaan ole, joten eri tutkimusmenetelmät ja niistä saadut tulokset vaihtelevat suuresti. Kokeellisen työn menetelmän kehitysvaiheessa hyödynnettiin neljää lähiaikoina julkaistua tutkimusta^{5,54,55,56}. Kyseisten tutkimusten valintaan vaikuttivat niiden eroavaisuudet toisistaan sekä julkaisuajankohta. Erityisesti Shoff ym.⁵⁴ julkaisu oli mielenkiintoinen, sillä hoitonesteet testattiin agar-paloihin kiinnittyneillä akantameboilla.

5.1 Tutkimusten tarkoitus, tutkitut hoitonesteet ja tutkimuksissa käytetyt akantamebat

Tutkimusten tarkoitus ja tutkimuksissa tutkitut hoitonesteet

Tutkimusten tarkoituksena oli selvittää eri hoitonesteiden akantameba-aktiivisuudet. Kaikki testatut hoitonesteet olivat yleisesti Yhdysvaltojen markkina-alueella myytäviä hoitonesteitä.^{5,54,55,56} Kahdessa tutkimuksessa oli MPS (Multi Purpose Solution) eli ns. monikäyttönesteiden lisäksi myös vetyperoksidia sisältäviä nesteitä^{5,54}. Hoitonesteistä Complete MoisturePlus (AMO) vedettiin pois markkinoilta vuonna 2007, kun se yhdistettiin vuosien 2005–2007 AK-epidemiaan⁵⁰. ReNu MoistureLoc (Bausch & Lomb) puolestaan vedettiin markkinoilta vuonna 2006, kun se yhdistettiin fusariumkeratiitti-epidemiaan⁵. Lisäksi Shoff ym.⁵⁴ halusivat selvittää myös tauriinin vaikutuksen hoitonesteiden akantameba-tehokkuuksiin. Taulukossa 7 on lueteltuna eri tutkimuksissa tutkitut hoitonesteet sekä niiden desinfiioivat aineet.

Taulukko 7. Tutkitut hoitonesteet ja niiden desinfiioivat ainesosat.^{5,54,55,56}

Tutkittava hoitoneste	Desinfiioiva aine
Johnston ym.	
AMO UltraCare	Vetyperoksidi (3 %)
Ciba Vision Clear Care	Vetyperoksidi (3 %)
Alcon Opti-Clean II	Polyquad (0,001 %)
Alcon Opti-Free Express	Polyquad (0,001 %), Aldox (0,0005 %)
Alcon Opti-Free RepleniSH	Propyleeniglykoli, Polyquad (0,001 %), Aldox (0,0005 %)
AMO Complete MoisturePlus	Polyheksanidi (0,0001 %), Poloxamer 237
Bausch & Lomb Boston Simplus	Klooriheksidiiniglukonaatti (0,003 %), Polyaminopropyli (0,0005 %)
Bausch & Lomb ReNu MoistureLoc	Alexidiini (0,00045 %)
Bausch & Lomb ReNu MultiPlus	Polyaminopropyli (0,0001 %)
Ciba Vision Aquify	Polyheksanidi (0,0001 %)
Kirkland Signature Multipurpose Solution	Polyaminopropyli (0,0001 %)
Shoff ym.	
AMO UltraCare	Vetyperoksidi (3 %)
Ciba Vision Clear Care	Vetyperoksidi (3 %)
Bausch & Lomb ReNu MultiPlus	Polyaminopropyli (0,0001 %)
AMO Complete MoisturePlus	Polyheksanidi (0,0001 %), Poloxamer 237
Alcon Opti-Free Express	Polyquad (0,001 %), Aldox (0,0005 %)
AMO Trade name (generic)	Polyheksanidi (0,0001 %), Poloxamer 237
Borazjani ym.	
Bausch & Lomb ReNu MultiPlus	Polyaminopropyli (0,0001 %)
Buck ym.	
Bausch & Lomb ReNu MultiPlus	Polyaminopropyli (0,0001 %)
Alcon Opti-Free Express	Polyquad (0,001 %), Aldox (0,0005 %)

Akantamebat

Johnston ym.⁵ testasivat hoitonesteiden tehokkuudet vain akantamebojen kystia vastaan. Muissa tutkimuksissa hoitonesteiden tehokkuudet tutkittiin sekä trofotsoiitteja että kystia vastaan^{54,55,56}. Tutkimuksissa käytetyistä akantameboista suurin osa oli eristetty potilasnäytteistä. Osa oli eristetty ympäristöstä ja osa oli Amerikkalaisesta biologisen materiaalin kokoelmasta (ATCC; American Type Culture Collection) tilattuja kantoja.

Johnston ym.⁵ tutkimuksessa käytettiin vuonna 2007 potilasnäytteistä eristettyjä akantameboja. Kaikki käytetyt akantamebat kuuluivat morfologiseen luokkaan II ja olivat genotyypeiltään T4.⁵ Shoff ym.⁵⁴ tutkimuksessa käytettiin sekä potilasnäytteistä että ympäristöstä eristettyjä akantameboja. Kolme käytetyistä kannoista oli eristetty sairauden eri vaiheissa otetuista potilasnäytteistä (aikainen; 06-035 – keskivaihe; 06-061 – pitkälle edennyt; 06-004). Loput oli eristetty eri alueiden (Chicago, Columbus) vesijohtovesistä. Jokainen kanta oli genotyyppiä T4.⁵⁴ Borazjani ym.⁵⁵ käyttivät kahta eri kantaa, joista toinen oli ATCC-kanta ja toinen potilasnäytteestä eristetty kanta. Buck ym.⁵⁶ käyttivät kolmea potilasnäytteistä eristettyä kantaa, sekä yhtä ATCC-kantaa. Taulukossa 8 on lueteltuna eri tutkimuksissa käytetyt akantamebat.

Taulukko 8. Tutkimuksissa käytetyt akantameba-kannat.^{5,54,55,56}

Tutkimus	Laji	Kanta/alkuperä
Johnston ym.	<i>A. castellanii</i>	CDC:V568
	<i>A. polyphaga</i>	CDC:V572
	<i>A. hatchetti</i>	CDC:V573
Shoff ym.	06-004	UIC-AK
	06-061	UIC-AK
	06-035	UIC-AK
	06-039	Chicagon vesinäyte
	C06-038	Columbuksen vesinäyte
Borazjani ym.	<i>A. polyphaga</i>	ROS
	<i>A. castellanii</i>	ATCC 30868
Buck ym.	<i>A. polyphaga</i> (ROS)	3315
	<i>A. polyphaga</i> (WEB)	3339
	<i>A. castellanii</i>	ATCC 30234
	<i>A. castellanii</i> 044	44

5.2 Menetelmät

Johnston ym.⁵ tutkimuksessa akantameboja kasvatettiin vähäravinteisilla agar-maljoilla, kunnes kaikki trofotsoiitit olivat koteloituneet kystiksi. Kystat suspensoitiin ameba-saliiniin, niiden määrä laskettiin hemosytometrillä ja kystapitoisuus säädettiin 100 kystaa / 10 µl ameba-saliinia. Hoitonesteiden

testaukset suoritettiin siten, että 1 ml:aan monikäyttönestettä tai noin 5 ml:aan vetyperoksidia sisältävää nestettä lisättiin 10 µl kystasuspensiota. Monikäyttönesteiden testit tehtiin 15 ml putkissa, kun taas vetyperoksidia sisältävien nesteiden testit tehtiin nesteiden mukana tulleissa koteloidissa. Vetyperoksidia sisältävien nesteiden kotelot tuli ohjeiden mukaan täyttää viivaan asti (noin 5 ml), minkä vuoksi vetyperoksidia sisältävien nesteiden määrä tutkimuksessa oli suurempi kuin monikäyttönesteiden. Nesteiden annettiin vaikuttaa 4-6 tuntia sekä 24 tuntia +24 °C:ssa. Vetyperoksidia sisältäneet nesteet neutraloitiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Vaikutusaikojen jälkeen akantamebat huuhdeltiin ja kerättiin talteen sentrifugoimalla (1500 g, 10 min). Kystat siirrostettiin kolibakteereja (*Escherichia coli*) sisältäville vähäravinteisille agar-maljoille. Maljoja inkuboitettiin +24 °C:ssa kahden viikon ajan, minkä jälkeen tulokset ilmoitettiin kvalitatiivisesti (positiivinen/negatiivinen).⁵

Shoff ym.⁵⁴ tarkoituksena oli selvittää eri hoitonesteiden akantameba-aktiivisuuksien lisäksi myös tauriinin vaikutus akantamebojen desinfiointiainekestävyyteen. Tauriinin vaikutus akantameboihin kiinnosti, sillä eräissä tutkimuksissa oli havaittu tauriinin lisäävän akantamebojen koteloitumista kystiksi ja siten parantavan niiden kestävyksiä. Tutkimuksen alussa ameboja kasvatettiin eri pitoisuudet tauriinia (0,25 %, 0,05 % ja 0 %) ja bakteereja (*Enterobacter aerogenes*) sisältävillä vähäravinteisillä agar-maljoilla. Maljoilta leikattiin 2 mm² agar-paloja, joissa noin 50 amebaa / agar-pala. Palat siirrettiin tutkittaviin hoitonesteisiin (24-kuoppalevyn kuoppiin tai valmisteen mukana tulleisiin koteloihin) ja nesteiden annettiin vaikuttaa 6 tuntia ja 24 tuntia huoneenlämmössä (Room temperature; RT). Tutkimuksissa positiivisena kontrollina oli ameba saliini. Vetyperoksidia sisältävät nesteet neutraloitiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Vaikutusaikojen päätyttyä hoitonesteiden vaikuttavat aineet neutraloitiin Dey/Engley-liuoksella (Difco) viiden minuutin ajan, minkä jälkeen agar-palat huuhdeltiin kahdesti ameba-saliinilla (5 ja 10 min ajan). Huuhtelujen jälkeen palat siirrettiin bakteereja (*Enterobacter aerogenes*) sisältäville vähäravinteisille maljoille. Maljoja inkuboitettiin viikon ajan +21 °C:ssa,

minkä aikana maljoja tarkasteltiin mikroskoopilla päivittäin. Tulokset ilmoitettiin kvalitatiivisesti (positiivinen/negatiivinen). Koska tutkijat epäilivät agarin itsessään vaikuttavan hoitonesteidien desinfioiden aineiden desinfiointitehokkuuksiin (biosidistä aktiivisuutta heikentävästi), tutkittiin kolme hoitonestettä sekä agar-paloilla että ilman. Molemmilla menetelmillä tutkimustulokset olivat samankaltaisia.⁵⁴

Borazjani ym.⁵⁵ tutkivat hoitonesteen akantameba-aktiivisuuden modifioituilla stand-alone ja regimen testeillä²⁹. Molempia testejä varten akantameboja kasvatettiin eri mediumikasvatuksina, joista toisessa oli tarkoitus tuottaa trofotsoitteja ja toisessa kystia. Kasvatusten jälkeen kystat ja trofotsoiitit laskettiin hemosytometrillä ja määrät säädettiin 5×10^5 / 100 μ l. Modifioidut stand-alone testit suoritettiin sekä orgaanisen materiaalin (ns. orgaaninen lika) kanssa että ilman. Hoitonesteidien testaukset suoritettiin siten, että 10 ml:aan hoitonestettä lisättiin 100 μ l kysta- tai trofotsoiittisuspensiota. Hoitonesteidien annettiin vaikuttaa 24 tuntia, jona aikana nesteitä vorteksoitiin aikapisteissä: 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h ja 24 h. Jokaisesta aikapisteestä otettiin 20 μ l näyte 96-kuoppalevyille, missä vaikuttava aine neutraloitiin 0,1 % TWEEN 80:llä. Neutraloinnin jälkeen kuoppiin lisättiin 25 μ l Ringerin liuokseen suspensoituja kolibakteereja amebojen ravinnoksi. Kuoppalevy suljettiin ja inkuboitiin viikon ajan (+32 °C). Regimen-testien alussa 10 μ l kysta- tai trofotsoiittisuspensiota pipetoitiin piilolinssien molemmille puolille, minkä jälkeen linssien annettiin olla huoneenlämmössä viiden minuutin ajan. Vaikutusajan jälkeen linssit huuhdeltiin molemmilta puolilta kahdesti ja laitettiin 12-mikrotiiterilevyille. Kuoppiin lisättiin tutkittavaa hoitonestettä tai kontrollia 1,5 ml ja annettiin nesteen vaikuttaa 4 h, huoneenlämmössä. Vaikutusajan jälkeen hoitoneste neutraloitiin Ringerin liuoksella, linssit huuhdeltiin kuudesti ja siirrettiin kolibakteereja sisältävään nesteeseen. Maljoja inkuboitiin viikon ajan +32 °C:ssa. Tutkimuksissa käytetyt piilolinssit valittiin eri piilolinssiluokista.⁵⁵

Tutkimusten alussa Buck ym.⁵⁶ kasvattivat ameboja kahtena eri suspensiokasvatuksena tarkoituksenaan tuottaa toisessa trofotsoitteja ja

toisessa kystia. Alkuperäisestä eristyksestä tehtiin maksimissaan viisi jatkosiirrostusta, koska jatkosiirrostusten epäiltiin vaikuttavan amebojen herkkyyteen. Kasvatusten jälkeen trofotsoiitit ja kystat kerättiin talteen sentrifugoimalla (1500 rpm, 12 min) ja resuspensoitiin pagen saliiniin (5-6 ml). Amebat värjättiin trypan blue:lla ja laskettiin hemosytometrillä. Lopullinen amebapitoisuus säädettiin ($6,5 \times 10^6$ tai $1,0 \times 10^7$ TFU/ml). Trofotsoiitit testattiin heti samana päivänä kun taas kystat säilytettiin jääkaapissa seuraavaan päivään. Hoitonesteiden testaukset suoritettiin siten, että 9,9 ml:aan hoitonestettä lisättiin 100 µl kysta- tai trofotsoiittisuspensiota. Tutkimuksissa positiivisena kontrollina oli pagen saliini. Hoitonesteiden annettiin vaikuttaa 4-6 tuntia huoneenlämmössä. Vaikutusajan jälkeen 100 µl tutkittua hoitonestettä neutraloitiin Dey Engley liuoksella (900 µl). Neutraloinnin jälkeen 100 µl näytettä siirrostettiin kolibakteereja sisältäville vähäravinteisille maljoille. Maljoja inkuboitii +32 °C:ssa kahden viikon ajan. Maljoja tarkasteltiin mikroskoopilla kolmantena, seitsemäntenä ja 14. päivänä inkuboinnin aloittamisen jälkeen.⁵⁶

Taulukossa 9 on tiivistetysti esitetty hoitonesteiden akantameba-aktiivisuustutkimuksissa käytetyt tutkimusmenetelmät.

Taulukko 9. Tiivistelmä aiempien hoitonesteiden akantameba-aktiivisuustutkimusten menetelmistä.^{5,54,55,56}

	Johnston ym.	Shoff ym.	Borazjani ym.	Buck ym.
Alkuvalmistelut	Kystien tuotto vähäravinteisilla maljoilla (3 vko)	Amebojen kasvatusta eri määrän tauriinia sisältävillä maljoilla (3 pvä, RT)	Trofotsoiittien ja kystien tuotto suspensio-kasvatuksina (7 pvä) inkubaattoriravistelijassa (100 rpm).	Trofotsoiittien kasvatusta 3-4 pvä:n ja kystien kasvatusta 21-28 pvä:n ajan suspensio-kasvatuksina (+32 °C).
Testien suoritus	Kystien keräys, pesu (3x) ja laskenta hemosytometrillä. Kystämäärä: 100 kystaa/100µl.	Agareilta leikattiin paloja (2mm ²), joissa noin 50 amebaa/pala.	Kystien ja trofotsoiittien lasku hemosytometrillä. Trofotsoiitti tai kystämäärä: 5x10 ⁵ /100µl.	Kystien ja trofotsoiittien lasku hemosytometrillä ja. Trofotsoiitti tai kystämäärä: 6,5x10 ⁶ tai 1,0x10 ⁷ TFU/ml
	Kystien lisähoitonestisiin ja inkubointi 4-6 h ja 24 h (+24°C). Kystien huuhtelu ja sentrifugointi (1500 g, 10 min) ja siirrostus maljoille.	Palat siirrettiin tutkittaviin nesteisiin, inkubointi 6 h ja 24 h (RT). Palojen neutralointi Dey/Engley liuoksella ja huuhtelu ameba salinilla (2x). Palojen siirrostus maljoille.	Modifioidut stand-alone ja regimen testimenetelmät. Näytteiden neutralointi Ringerin liuoksella (jossa 0,1 % TWEEN 80:tä).	Trofotsoiitti- tai kystasuspension (100 µl) lisähoitonestisiin (990 µl), inkubointi 4 h tai 6 h, RT. Näytteiden neutralointi Dey/Engley liuoksella.
Tulosten tarkastelu	Maljojen inkubointi kahden viikon ajan (+24°C). Tarkastelu mikroskoopilla päivittäin. Tulokset: positiivinen / negatiivinen.	Maljojen inkubointi viikon ajan (+21°C). Tarkastelu mikroskoopilla päivittäin. Tulokset: positiivinen / negatiivinen.	Näytteiden inkubointi viikon ajan (+32°C). Regimen näytteitä tarkasteltiin 1, 5 ja 7 päivänä inkuboinnin aloittamisesta. Kvantitatiivinen tulosten tarkastelu.	Maljojen inkubointi kahden viikon ajan (+32°C) ja tarkastelu 3., 7. ja 14. päivänä inkuboinnin aloittamisesta. Kvantitatiivinen tulosten tarkastelu.

5.3 Tulokset

Tutkimuksissa^{5,54}, joissa tutkittavien hoitonesteiden joukossa oli myös vetyperoksidia sisältäviä nesteitä, selkeästi parhaat akantameba-aktiivisuudet oli juuri vetyperoksidia (3 %) sisältävillä hoitonesteillä (AMO UltraCare sekä Ciba Vision Clear Care). Molempien tutkimusten^{5,52} tulokset esitettiin kvalitatiivisesti.

Johnston ym.⁵ tutkimustulosten perusteella paras akantameba-aktiivisuus oli Clear Care-hoitonesteellä (Ciba Vision), joka tuhosi kaikki *A. castellanii*- ja *A. polyphaga*-lajien kystat jo minimivaikutusajalla (6 h). *A. hatchetti*-lajin kystat tuhoutuivat kokonaan vasta 24 tunnin vaikutusajalla. Yllättäen saman verran vetyperoksidia (3 %) sisältävä UltraCare (AMO) ei ollut yhtä tehokas kuin Clear Care (Ciba Vision). Yksikään monikäyttöneste ei tuhonnut akantameboja minimivaikutusajassa. Viisi yhdeksästä monikäyttönesteestä eivät tehonneet akantameboihin ollenkaan.⁵ Taulukossa 10 on esiteltynä Johnston ym.⁵ tutkimustulokset.

Myös Shoff ym.⁵⁴ tutkimuksissa vain vetyperoksidia (3 %) sisältävillä hoitonesteillä oli desinfioivaa vaikutusta akantameboihin minimivaikutusajassa. Jokaisen monikäyttönesteen akantameba-aktiivisuus oli heikko. Kolme neljästä (ReNu, Complete MoisturePlus sekä AMO generic) monikäyttönesteestä ei tehonnut akantameboihin ollenkaan. Toisin kuin Johnston ym.⁵ testeissä Opti-Free Express tehoi yhteen akantameba-kantaan 24 tunnin vaikutusajalla. AMO Complete Moisture Plus sen sijaan oli tehoton molemmissa sekä Johnston ym.⁵ että Shoff ym.⁵⁴ tutkimuksissa. Shoff ym.⁵⁴ tutkimustulosten perusteella voidaan päätellä, ettei tauriini vaikuta hoitonesteiden akantameba-aktiivisuuksiin. Taulukossa 11 on esiteltynä Shoff ym.⁵⁴ tutkimustulokset. Hoitonesteiden tulokset, joissa vähenemistä on tapahtunut, on havainnollisuuden vuoksi merkitty punaisella fontilla taulukoihin 10 ja 11.

Molempien tutkimusten^{5,54} perusteella voidaan todeta, että vetyperoksidia sisältävien puhdistusmenetelmien ja ns. monikäyttönesteiden akantameba-aktiivisuuksissa on merkittävä ero.

Taulukko 10. Johnston ym.⁵ akantameba-aktiivisuustulokset.

Tutkittava hoitoneste	Positiivisten maljojen määrä (%) tutkittavalla ameballa					
	<i>A. castellanii</i>		<i>A. polyphaga</i>		<i>A. hatchetti</i>	
	4-6 h	24 h	4-6 h	24 h	4-6 h	24 h
AMO UltraCare	66%	66%	33%	66%	66%	33%
Ciba Vision Clear Care	0%	0%	0%	0%	33%	0%
Alcon Opti-Clean II	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Alcon Opti-Free Express	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Alcon Opti-Free RepleniSH	100%	100%	100%	100%	100%	100%
AMO Complete MoisturePlus	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Bausch & Lomb Boston Simplus	100%	33%	100%	66%	100%	66%
Bausch & Lomb ReNu MoistureLoc	100%	100%	100%	66%	100%	66%
Bausch & Lomb ReNu MultiPlus	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Ciba Vision Aquify	100%	100%	100%	33%	100%	100%
Kirkland Signature Multipurpose Solution	100%	100%	100%	33%	100%	100%

Taulukko 11. Shoff ym.⁵⁴ akantameba-aktiivisuustulokset.

Tutkittava hoitoneste	Vaikutus-aika (h)	Tauriini-pitoisuus	Positiivisten maljojen määrä (%) tutkittavalla ameballa				
			06-039	C06-038	06-035	06-061	06-004
Bausch & Lomb ReNu MultiPlus	6	0 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,05 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,25 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	24	0 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,05 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,25 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
AMO Complete MoisturePlus	6	0 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,05 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,25 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	24	0 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,05 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,25 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Alcon Opti-Free Express	6	0 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,05 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,25 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	24	0 %	100 %	100 %	100 %	66 %	100 %
		0,05 %	100 %	100 %	100 %	0 %	100 %
		0,25 %	100 %	100 %	100 %	66 %	100 %
Ciba Vision Clear Care	6	0 %	100 %	66 %	100 %	100 %	33 %
		0,05 %	100 %	33 %	100 %	66 %	33 %
		0,25 %	100 %	66 %	100 %	66 %	0 %
	24	0 %	100 %	33 %	100 %	0 %	0 %
		0,05 %	100 %	0 %	100 %	0 %	0 %
		0,25 %	100 %	0 %	33 %	0 %	0 %
AMO Trade name (generic)	6	0 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,05 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,25 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	24	0 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,05 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
		0,25 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
AMO UltraCare	6	0 %	100 %	33 %	0 %	33 %	100 %
		0,05 %	100 %	0 %	100 %	0 %	0 %
		0,25 %	100 %	33 %	100 %	33 %	33 %
	24	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
		0,05 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
		0,25 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %

Borazjani ym.⁵⁵ stand-alone testeissä orgaanisen materiaalin puuttuessa molempien tutkittujen akantameba-trofotsoiittien määrät vähenivät keskimäärin yli 99,9 %:sesti jo minimivaikutusajassa. Vain pieni määrä ameboja jäi jäljelle vielä 24 tunnin vaikutusajan jälkeen. Säilyneistä trofotsoiiteista osa muuttui kestävämmiksi kystiksi ja osan oletettiin jo olleen kystinä tai prekystinä ennestään. Orgaanisen materiaalin kanssa molempien akantameba-trofotsoiittien määrät vähenivät keskimäärin 99,9 %:sesti. Kystien määrät vähenivät sekä orgaanisen materiaalin kanssa että ilman hieman alle 99,9 %:sesti. Erillisessä kokeessa selvitettiin orgaanisen materiaalin lisäyksen vaikutus akantamebojen kestävyteen. Tuloksista huomattiin orgaanisen materiaalin lisäävän akantamebojen kestävyttä desinfioivia aineita vastaan. Regimen-testeissä yhteenkään piilolinssiin ei jäänyt akantameboja hoitonestekäsittelyiden jäljiltä. Tutkimustuloksista huomattiin, että jo pelkällä suolaliuoksella huuhtelu vähensi amebojen (etenkin kystien) määrää piilolinseissä. Tuloksesta voidaan päätellä, että amebat kiinnittyvät linssien pintaan melko löyhästi. Tutkimuksessa käytettiin seuraavia eri piilolinssiryhmiin kuuluvia linsejä: Optima FW (Bausch & Lomb, ryhmä 1), SUREVUE (Johnston & Johnston, ryhmä 4), PureVision (Bausch & Lomb, ryhmä 3) sekä Focus NIGHT & DAY (CIBA Vision, ryhmä 1).⁵⁵ Taulukossa 12 on esitelty Borazjani ym.⁵⁵ tutkimuksissa saadut tulokset, joissa esitetty akantamebojen väheneminen (vrt. edellisissä tuloksissa esitetty akantamebojen selviytyminen).

Taulukko 12. Borazjani ym.⁵⁵ akantameba-aktiivisuustulokset.

Stand-alone testi				
Akantameba-laji	Akantamebojen logaritminen väheneminen			
	Trofotsoiitit		Kystat	
	<i>A. castellanii</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. polyphaga</i>
Ilman orgaanista materiaalia	4,3	4,0	2,4	2,4
Orgaanisen materiaalin kanssa	3,0	3,0	2,4	2,4
Regimen testi				
Akantameba-laji	Akantamebojen prosentuaalinen (%) väheneminen			
	Trofotsoiitit		Kystat	
	<i>A. castellanii</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. polyphaga</i>
Ilman orgaanista materiaalia	100%	100%	100%	100%
Orgaanisen materiaalin kanssa	100%	100%	100%	100%
Selite:	1,0 LOG = 90 %			
	3,0 LOG = 99,9 %			

Buck ym.⁵⁶ tutkimustulokset tulkittiin tilastollisesti. Tuloksista huomattiin, että eri hoitonesteidien akantameba-aktiivisuuksissa, eri akantameba-kantojen sekä kystien ja trofotsoiittien välillä oli merkittävä ero tehokkuuksissa. Rinnakkaisten testien-, eri vaikutusaikojen- sekä eri erien välillä ei ollut tilastollisesti suuriakaan eroja. Toinen hoitoneste (OPTI-FREE Express) oli tutkimusten mukaan joka suhteessa (yhtä akantameba-kantaa lukuun ottamatta) tehokkaampi kuin toinen. Hoitonestet tehosivat paremmin trofotsoiitteihin kuin kystiin ja eri kantojen herkkyudet erosivat toisistaan.⁵⁶ Taulukossa 13 on esitelty Buck ym.⁵⁶ tutkimustulokset, joissa esitetty akantamebojen väheneminen.

Taulukko 13. Buck ym.⁵⁶ akantameba-aktiivisuustulokset.

Keskimääräinen logaritminen väheneminen								
Akantameba			Vaikutus- aika	ReNu MultiPlus		OPTI-FREE Express		P-arvo
				LOG vähene- minen	Keski- hajonta	LOG vähene- minen	Keski- hajonta	
<i>A. polyphaga</i>	ROS 3315	Trofotsoiitti	4 h	0,796	0,709	2,248	0,465	<0,001
			6h	0,813	0,771	2,052	0,554	0,002
		Kysta	4 h	0,392	0,395	1,243	0,252	0,001
			6h	0,706	0,449	1,326	0,282	0,021
	WEB 3339	Trofotsoiitti	4 h	0,715	0,387	2,947	0,609	<0,001
			6h	0,788	0,319	2,882	0,626	<0,001
		Kysta	4 h	0,348	0,270	1,670	0,456	0,002
			6h	0,764	0,699	2,014	0,567	0,005
<i>A. castellanii</i>	ATCC 30234	Trofotsoiitti	4 h	0,844	0,457	3,305	0,779	0,001
			6h	0,864	0,370	3,511	0,466	<0,001
		Kysta	4 h	1,079	0,503	1,998	0,661	0,042
			6h	0,894	0,352	1,986	1,052	0,010
	044	Trofotsoiitti	4 h	2,496	0,657	2,648	0,698	0,736
			6h	2,413	1,236	2,676	0,740	0,114
		Kysta	4 h	1,345	0,943	1,284	0,957	0,887
			6h	1,075	0,498	1,010	0,305	0,703
Selite:			1,0 LOG = 90 % 3,0 LOG = 99,9 %					

5.4 Pohdinnat

Johnston ym.⁵ sekä Shoff ym.⁵⁴ tutkimustulosten perusteella lähes jokaisella Yhdysvaltojen markkinoilla myytävillä kovien ja pehmeiden piilolinssien hoitonesteillä on puutteellinen desinfiointiaktiivisuus akantameboja vastaan. Tutkimustulosten perusteella tehokkain desinfiointimenetelmä akantameboja vastaan on hapetukseen perustuva menetelmä eli desinfiointi vetyperoksidin avulla. Saman verran vetyperoksidia sisältävien nesteiden desinfiointitehokkuuksissa oli kuitenkin eroja. Monikäyttönesteiden tulokset olivat molemmissa tutkimuksissa yhdenmukaisia.^{5,54} Monikäyttönesteet ovat

huomattavasti suosituimpia piilolinssien hoitomenetelminä niiden helppokäyttöisyyden vuoksi⁵.

Shoff ym.⁵⁴ tutkimuksessa akantamebat olivat kiinnittyneinä agarin pinnalle, jossa niillä oli ravintona bakteereja. Tutkijoiden tarkoituksena oli matkia luonnollisia oloja, joissa amebat olisivat tarttuneina piilolinssin tai piilolinssikotelon pintaan. Solukiinnittyminen tai ameban kulkeutuminen huokosten sisälle saattaa suojata sitä desinfiointilaitteilta. Toisin kuin muissa tutkimuksissa Shoff ym.⁵ halusivat lisäksi välttää aiheuttamasta rakenteellista vahinkoa ameboille, minkä vuoksi niitä ei missään vaiheessa irrotettu agarin pinnalta tai sentrifugoitu. Koska stressaavia oloja pyrittiin välttämään, tulosten uskottiin kuvastavan paremmin hoitonesteidien akantameba-aktiivisuuksia. Monikäytönesteiden ollessa täysin tehottomia akantameboja vastaan, ei tauriin vaikutusta niiden tehokkuuksiin pystytty täysin arvioimaan. Kaikista akantameboista kestävin oli Chicagon alueen vesijohtovedestä eristetty kanta (06-039). Tuloksessa huolestuttavaa on, että patogeenisiä kantoja löytyy yleisesti vesijohtovesistä.⁵⁴

Borazjani ym.⁵⁵ modifioiduissa regimen-testissä huomattiin, että trofotsoiitit olivat kiinnittyneet piilolinssien pinnalle paljon tiukemmin kuin kystat. Kystien poistoon riitti jo pelkkä saliinilla huuhtelu. Trofotsoitteja poistaminen linssin pinnalta vaati hieman hankausta. Tuloksista huomattiin, että huuhtelu, hankaus ja desinfiointi yhdessä tehosivat akantamebojen kystiin ja trofotsoitteihin paremmin kuin pelkästään piilolinssien liotus hoitonesteessä.⁵⁵

Koska virallista standardimenetelmää akantameba-aktiivisuuden määrittämiseen ei vielä ole, akantameba-aktiivisuustutkimukset sekä niistä saadut tutkimustulokset vaihtelevat suuresti. Virallisen standardin kehittämisessä ongelmaksi tulee käytettävän akantameba-lajin ja -kannan valitseminen sillä tutkimustuloksista huomataan, että eri lajien ja kantojen herkkyydet vaihtelevat suuresti.^{5,54,55,56} Myös eri elinmuotojen (kystat vs. trofotsoiitit) kestävyyksissä oli eroja^{55,56}. Kystat olivat odotetusti trofotsoitteja kestävämpiä⁵⁶. Syitä eri lajien ja kantojen herkkyyseroille ei vielä täysin tiedetä. Luultavasti eroavaisuudet johtuvat luontaisista eroista eri alueilta eristetyillä ameboilla sillä eri alueilla ne

altistuvat eri kemikaaleille ja saattavat siten muuttua kestävämmiksi. Myös eri akantameba-lajien ja -kantojen virulensseissa saattaa olla eroja. Yksi syy herkkyseroille on varmasti myös se, että monet tutkijat ovat käyttäneet tutkimuksissaan jo vuosia sitten eristettyjä akantameboja. Luultavasti nämä kannat eivät enää edusta niitä lajeja jotka nykypäivänä aiheuttavat AK:a. Mikro-organismien geenit muuttuvat jatkuvasti ja niistä saattaa tulla kestävämpiä tai herkempiä vuosien kuluessa. Etenkin akantamebojen säilytys- ja kasvatusolosuhteet sekä useat uudelleensiirrostukset saattavat vaikuttaa niiden koteloitumiseen kystiksi ja samalla niiden herkkyysiin.^{5,54} Kannoista saattaa tulla herkempiä jos niiden koteloituminen kystiksi häiriintyy eivätkä ne koteloidu oikein. Kannat joista kystia tuotetaan aina ravinnon riiston ja Mg^{2+} avulla eivät välttämättä tuota 100 % kypsiä kystia.⁵ Shoff ym.⁵⁴ tutkimuksissa käytetyt akantamebat olivat paljon kestävämpiä (eritetty AK-näytteistä ja vesijohtovedestä) kuin samankaltaisella menetelmällä aiemmin tutkituissa tutkimuksissa, joissa käytettiin lähinnä ympäristöstä eristettyjä genotyyppiä T3, T4 ja T5 olevia akantameboja. Tulosten perusteella voidaan olettaa, että ainakin potilasnäytteistä ja vesijohtovedestä eristetyt kannat ovat kestävämpiä kuin ympäristöstä eristetyt kannat.⁵⁴

Jotta toimiva kvantitatiivinen menetelmä olisi mahdollista kehittää, täytyisi AK:n syntyyn ja kehitykseen liittyvät osatekijä tuntea paremmin. Etenkin se miksi jotkin lajit ja kannat ovat patogeenisiä ja toiset eivät. Lisäksi sairauden puhkeamisen aiheuttama akantamebojen lukumäärä ei ole tiedossa. Kvantitatiivisen menetelmän kehitys on turhaa, kunnes tiedetään AK:n syntyyn vaadittavien akantamebojen määrä.⁵⁴

6 KOKEELLINEN OSA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää sopiva menetelmä piilolinssien hoitonesteidien akantameba-desinfiointiaktiivisuuden määrittämiseen. Alustava menetelmä kehitettiin aiheesta aiemmin julkaistujen tutkimusten sekä ohjaajien ja asiantuntijan (Taru Meri, HUS) ohjeistuksien perusteella. Lisäksi tarkoituksena oli testata eri hoitonesteidien tehokkuuksia menetelmää hyödyntäen.

6.1 Kontrolliliuokset sekä tutkitut hoitonesteet

Kontrolliliuokset

Tutkimuksissa käytettiin kontrolliliuoksina fysiologista suolaliuosta (0,9 % NaCl-liuos), 2,5 % ja 5 % vetyperoksidia (H₂O₂) sekä 70 % etanolia (70 % EtOH). Positiivinen kontrolliksi valittiin fysiologinen suolaliuos, sillä akantameban tiedettiin elävän monenlaisissa ympäristöissä ja näin ollen fysiologisen suolaliuoksen arveltiin soveltuvan testeihin hyvin. Negatiivinen kontrolli valittiin aikaisempien julkaisujen perusteella^{5,54}. Varsinaisten testien aikana vetyperoksidia jouduttiin kuitenkin väkevöimään, sillä 2,5 % vetyperoksidi ei ollut yhtä tehokas AP:a (*A. polyphaga*) vastaan. Varsinaisissa testeissä negatiivisena kontrollina käytettiin myös 70 %:sta etanolia (EtOH), sillä sen desinfiointitehokkuus haluttiin tutkia jotta voitiin varmistua, että pintojen desinfioinnissa käytetty aine oli riittävän tehokas akantameboja vastaan. Taulukossa 14 on listattu testeissä käytetyt kontrolliliuokset. Liitteessä 1 on pagen salinin, vähäravinteisten maljojen sekä fysiologisen suolaliuoksen koostumukset. Vetyperoksidiliuokset saatiin toimeksiantajalta.

Taulukko 14. Testauksissa käytetyt kontrolliliuokset.

Kontrolliliuos	Merkintä			Koostumus
	Korkki	Pohja		
Positiivinen kontrolli	Pos	AC tai AP	4h, 8h tai 24h	0,9 % NaCl-liuos
Negatiivinen kontrolli	Neg	-	4h tai 24h	2,5 % Vetyperoksidi
Negatiivinen kontrolli (1)	Neg	AC tai AP	4h, 8h tai 24h	5 % Vetyperoksidi
Negatiivinen kontrolli (2)	EtOH	AC tai AP	4h, 8h tai 24h	70 % EtOH

Hoitonesteet

Toimivuuden testauksessa positiivisen ja negatiivisen kontrollin lisäksi testattiin yksi näyte (näyte 1). Varsinaisissa testeissä tutkittiin yhdeksän eri hoitonesteen desinfiointitehokkuudet. Osa nesteistä oli Piiliset by Finnsusp Oy:n kaupallisia tai tuotekehityksessä olevia nesteitä, osa muita kaupallisia nesteitä. Taulukossa 15 listattu tutkitut hoitonesteet ja niiden desinfiointiaineet.

Taulukko 15. Varsinaisissa testeissä tutkitut hoitonesteet.

Hoitoneste	Merkintä			Desinfiointiaine
	Korkki	Pohja		
A	A	AC tai AP	4h, 8h tai 24h	Biguanidi
B	B			
E	E			
G	G			
H	H			
I	I			
D	D	AC tai AP	4h, 8h tai 24h	Kloriitti-ioni ja hapetus
F	F			
C	C	AC tai AP	4h, 8h tai 24h	Kaksi eri yhdistettä
Selitteet: AC = <i>A. castellanii</i> AP = <i>A. polyphaga</i>				

6.2 Käytetyt mikrobit

Tutkimuksissa käytetyt akantamebat sekä kolibakteerit saatiin HusLabin parasitologian yksiköstä. Toinen akantameboista (*A. castellanii*) oli ATCC-kanta ja toinen (*A. polyphaga*) HusLabin oma potilaseristys. ATCC:ltä tilattu kanta on Intiassa vuonna 1984 akantamebakeratiittia sairastavan sarveiskalvosta eristetty kanta. HusLabin oma potilaseristys on Suomessa vuonna 2004 nuoren naispotilaan piilolinssistä eristetty kanta. Piilolinssiä potilas oli virheellisesti säilyttänyt vedessä Etelä-Euroopan matkallaan. Kanta on genotyypattu Lontoossa (London School of Hygiene and Tropical Medicine). (Taru Meri 8.4.2011, HUS, henkilökohtainen tiedonanto) Akantameban ravintona päätettiin käyttää HusLabin viljelyissä käyttämiä kolibakteereja (*Escherichia coli*). Taulukossa 16 on esitelty käytettyjen mikrobien tiedot.

Taulukko 16. Käytetyt mikrobit.

Laji	Tunniste	Alkuperä		
		Maa	Eristetty	Ajankohta
<i>A. castellanii</i>	ATCC 50492	Intia	Sarveiskalvo	1984
<i>A. polyphaga</i>	6025	Suomi	Piilolinssi	2004
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	Yhdysvallat	Kliininen näyte	1946

6.3 Liukset ja kasvatusalustat

Kolibakteerit kasvatettiin TSA-maljoilla (Tryptic Soy Agar). Pagen saliini sekä vähäravinteisten maljojen valmistus suoritettiin akantamebojen eristykseen sekä tunnistukseen tehdyn menetelmän ohjeiden mukaisesti (National Standard Methods)¹². Pagen saliini sekä siitä valmistetut vähäravinteiset maljat mainittiin myös muissa aiemmin julkaistuissa tutkimuksissa^{5,54,56} sekä kirjallisuudessa⁷ ja niitä käytetään myös HusLabin viljelyissä. Taulukossa 17 on esitelty käytetyt kasvatusalustat sekä liukset.

Taulukko 17. Käytetyt liuokset sekä kasvatusalustat.

Liuos / kasvatusalusta	Käyttötarkoitus	Tiedot
TSA, Difco	Kolibakteerien kasvatus	
Pagen saliini	Vähäravinteisten maljojen valmistus, kolibakteerien suspensointi sekä amebojen huuhtelu	Liite 1
Vähäravinteiset maljat	Akantamebojen kasvatus	Liite 1

6.4 Laitteistot

Taulukossa 18 on listattu testeissä käytetyt laitteet sekä niiden valmistajat ja valmistuspaikat.

Taulukko 18. Käytetyt laitteet.

Laite	Valmistaja
Autoklaavi	Oy Santasalo-Sohlberg AB, Suomi
Automaattipipetti (1-5 ml)	Biohit, Suomi
Automaattipipetti (50-200 µl)	
Laminaarikaappi	Kojair, Suomi
Lämpökaappi	Sanyo, Japani
Valomikroskooppi	Nikon, Japani
Valomikroskooppi	Euromex, Hollanti
Mikroskooppikamera	Nikon, Japani
Sentrifugi	Sigma, Saksa
pH-mittari	Orion research Ink., USA
Vaaka	Sartorius, Saksa
Vesihaude	MEMMERT GmbH+Co. KG, Saksa
Vortex	Merck, Saksa

6.5 Välineet

Tutkimuksissa käytettiin punnitusalustoja, erlenmeyereitä, pumpulia, foliota, säilöpulloja, petrimaljoja, parafilmiä, siirrostussilmukoita, mittalaseja, dekantterilaseja, eppendorf-putkia, falcon-putkia, pinsettejä, levityssauvoja, piilolinssikoteloita, pipetin kärkiä, veitsiä, bunsen-liekkiä ja preparaattilaseja.

7 MENETELMÄN KEHITYS JA TOIMIVUUDEN TESTAUS

Alustavaa menetelmää testattiin yhdellä hoitonesteellä (näyte 1) sekä positiivisella (0,9 % suolaliuos) ja negatiivisella (2,5 % H₂O₂) kontrollilla. Toimivuuden testauksessa käytettiin vain yhtä akantamebaa (*A. castellanii*). Hoitonesteet päätettiin testata vain akantameban kystia vastaan, sillä kystien tiedettiin kestävän paremmin ympäristön stressiä⁵. Ajateltiin, että jos hoitonesteet tehoavat kystiin niin ne tehoavat myös trofotsoitteihin. Lisäksi kystat oli helpommin havaittavissa valomikroskoopilla kuin trofotsoiitit. Testit suoritettiin jo menetelmän kehitysvaiheesta alkaen sokkoutettuina, mahdollisimman luotettavien tulosten aikaansaamiseksi. Menetelmän kehitysvaiheessa testit tehtiin viidellä rinnakkaisella näytteellä ja nesteiden vaikutusajoiksi valittiin minimivaikutusaika neljä tuntia sekä 24 tuntia. Testaukset tehtiin piilolinssikoteloissa luomaan mahdollisimman luonnolliset ja normaalia piilolinssien käyttöä mukailevat olosuhteet. Menetelmän toimivuuden testauksesta saatujen tulosten perusteella menetelmää muokattiin lopullisia tuotetestejä varten.

7.1 Menetelmän valinta

Menetelmän kehitysvaiheen kokeellisen osion alussa testattiin kahta erilaista menetelmää. Molemmissa akantameboja kasvatettiin vähäravinteisilla maljoilla, mutta toisessa hoitonesteet testattiin siten että akantamebat olivat kiinnittyneinä agarin pinnalle ja toisessa ne pyrittiin suspensioimaan agarin pinnalta pagen saliiniin, laskemaan hemosytometrillä ja pipetoimalla suspensio hoitonesteiden joukkoon. Akantamebojen suspensointi ei jostain syystä onnistunut ollenkaan, vaikka agarin pinnalle pipetoitiin pagen saliinia ja pintaa hangattiin levityssauvalla. Suspensoinnin epäonnistuttua päätettiin testata hoitonesteet agarin pinnalle kiinnittyneillä akantameboilla (kuten Shoff ym.⁵⁴). Agar-palojen valintaan vaikutti myös se, että haluttiin kehittää mahdollisimman luonnollisia piilolinssien käyttöolosuhteita mukaileva menetelmä, jossa akantamebat ovat

kiinnittyneinä agarin pinnalle kuten ne kiinnittyisivät piilolinssin pintaan. Tutkimuksissa päätettiin käyttää suurempia agar-paloja (1 cm²) kuin Shoff ym.⁵⁴ tutkimuksissa, sillä niin pieniä paloja (2 mm²) ei käytössä olleilla välineillä olisi pystynyt luotettavasti leikkaamaan. Lisäksi 1 cm² oli lähempänä todellista piilolinssin kokoa. Vaikka akantamebojen suspensointi ei onnistunut, haluttiin tietää siirtyvätkö ne helposti agarin pinnalta hoitonesteisiin hoitonesteiden vaikutusaikojen aikana.

7.2 Menetelmän toimivuuden testaus

7.2.1 Alkuvalmistelut

Amebojen kasvatusmaljojen valmistus

Akantamebojen ravintona käytettäviä kolibakteereja kasvatettiin TSA-maljoilla (+37 °C) ennen vähäravinteisille maljoille siirrostamista.

Bakteerit suspensoitiin 1 ml:n tilavuuteen 10 kertaisesti laimennettuun Pagen saliiniin (1x), minkä jälkeen 100 µl suspensiota pipetoitiin steriilisti vähäravinteisille maljoille. Bakteerit levitettiin maljoille tasaisesti levityssauvalla ja maljojen annettiin kuivua vähintään 15 minuuttia (+37 °C) ennen ameboiden siirrostamista. Mikäli maljoja ei käytetty heti samana päivänä, säilytettiin maljoja jääkaapissa (+4 °C:ssä) korkeintaan viikon ajan.

Amebojen siirrostus ja kasvatus maljoilla

Alkuperäinen HusLabista saatu *A. castellanii* -malja jaettiin tasaisesti noin 1 cm² paljoihin ja palat siirrettiin uusille, kolibakteereja sisältäville, vähäravinteisille maljoille. Maljoja inkuboitiin noin 3 viikon ajan (+30 °C) ennen testien aloittamista, jotta kaikki trofotsoiitit ehtivät muuttua kystiksi. Ennen hoitonesteisiin siirtämistä, jokainen maljalta leikattu pala tarkasteltiin mikroskoopin kanssa, jotta voitiin olla varmoja, että kaikkien palojen lähtötilanne oli sama. Maljoilta tarkastettiin, että kaikki trofotsoiitit olivat koteloituneet kystiksi ja että kystämäärä oli suurin piirtein sama.

7.2.2 Testien suoritus

Aluksi valmistettiin uudet vähäravinteiset maljat ja siirrostettiin niihin kolibakteereja amebojen ravinnoksi. Piilolinssikotelot merkittiin seuraavasti: N1, POS ja NEG (jokaisesta viisi rinnakkaista).

Kystia sisältävät amebamaljat jaettiin tasaisesti noin 1 cm² paloiksi ja siirrettiin palat omiin piilolinssikoteloihinsa. Jokaiseen koteloon lisättiin 3 ml tutkittavaa nestettä (N1, POS tai NEG) ja kotelot suljettiin. Liuosten annettiin vaikuttaa RT (Room temperature eli huoneen lämmössä) 4 ja 24 tuntia.

Sentrifugoidut näytteet

Vaikutusajan jälkeen tutkittavasta nesteestä pipetoitiin 1,3 ml eppendorf-putkiin ja sentrifugoitiin näytteet (10 min, +21 °C, 7000 g). Sentrifugoinnin jälkeen kaadettiin neste pois putkista ja tilalle pipetoitiin 1,3 ml Pagen salinia (1 x). Putkia vorteksoitiin hetki, minkä jälkeen näytteistä pipetoitiin 200 µl vähäravinteisille bakteerimaljoille.

Agar-palat

Agar-palat siirrettiin yksi kerrallaan falcon-putkiin ja huuhdeltiin kolmesti Pagen saliinilla (1 x). Huuhtelun jälkeen palat siirrettiin kukin omille vähäravinteisille bakteerimaljoilleen.

Maljojen annettiin kuivua noin 15 minuutin ajan, minkä jälkeen ne siirrettiin lämpökaappiin (+30 °C). Maljoja inkuboitiin (+30 °C) nurinpäin ja niitä tarkasteltiin päivittäin (viikonloppuja lukuun ottamatta) noin kahden viikon ajan (13–14 päivää).

7.3 Amebojen mikroskopointi

Tulosten arvioinnissa amebvoja tarkasteltiin valomikroskoopilla, 10 x okulaarilla sekä 10 x ja 40 x objektiiveilla. Petrimalja asetettiin preparaattipöydälle ilman kantta, minkä jälkeen trofotsoiitit ja kystat etsittiin ensin 10 x objektiivilla. Mikroskopoinnin alussa objektiivi säädettiin karkeasäädöllä (sivusta katsomalla) mahdollisimman lähelle agarin pintaa, minkä jälkeen amebat tarkennettiin

pikkuhiljaa hienosäädön avulla nostamalla objektiivia pois päin agarista. Parhaiten amebat, erityisesti kystat, erottuivat käänteisfaasikontrastia käytettäessä. Valon voimakkuutta säädettiin mikroskopoinnin aikana sopivaksi. Kuvattaessa käytettiin 40 x ja 10 x objektiiveja, joten suurennos oli yhteensä 100 x tai 400 x.

7.4 Menetelmän testauksesta saadut tulokset ja päätelmät

Menetelmän testauksella saaduista tuloksista voitiin päätellä, että menetelmä oli toimiva, sillä sekä positiivinen- että negatiivinen kontrolli toimivat halutulla tavalla. Positiivisessa kontrolliliuoksessa amebat selvisivät vaikutusaikojen ajan hyvin ja levittäytyivät uusille maljoille melko nopeasti. Negatiivisessa kontrolliliuoksessa (2,5 % H₂O₂) kaikki amebat kuolivat, eikä maljoilla näkynyt minkäänlaista levittäytymistä inkubointiajan jälkeen.

Sentrifugoitujen näytteiden tuloksista kävi ilmi, etteivät amebat siirry herkästi paloilta liuoksiin. Sentrifugoiduista näytteistä ainoastaan yhdessä positiivisessa kontrollissa oli inkubointiajan jälkeen ameboja. Yhden näytteen positiivinen tulos saattoi luultavimmin johtua siitä, että näyte kontaminoitui nesteiden käsittelyn aikana esimerkiksi työvälineiden kautta. Amebojen nihkeää siirtymistä hoitonestesiin puolsi myös se, etteivät ne helposti siirtyneet pagen saliiniin mekaanisesta hankaamisesta huolimatta. Koska akantamebat eivät siirtyneet pagen saliiniin edes mekaanisen hankaamisen avulla, voitiin olla melko varmoja siitä, etteivät ne siirry helposti hoitonestesiinkään. Tämän perusteella nesteiden sentrifugoinneista voitiin luopua.

Menetelmän testausvaiheessa huomattiin amebojen laskemisen olevan erittäin työlästä. Ajatuksena oli, että akantamebojen määrät laskettaisiin aina palan samasta kohdasta. Agar-palat pyrittiin kuvamaan ennen hoitonesteidien lisäystä ja hoitonesteidien vaikutusaikojen jälkeen samasta kohdasta, jolloin määrät olisi voinut laskea jälkeinpäin tietokoneen ruudulta. Kuvaamiseen tarvittavaa tekniikkaa ei saatu toimimaan halutulla tavalla, joten päätettiin arvioida tehokkuuksia jollain muulla tavalla kuin tarkoilla laskennallisilla määrillä. Menetelmän toimivuuden testauksesta saadut tulokset ovat kvalitatiivisia eli

tulos on joko positiivinen (1-5/5) tai negatiivinen (0/5). Positiiviset tulokset on merkitty taulukkoon (taulukko 19) punaisella fontilla.

Mielenkiinnon vuoksi lisättiin vielä yksi inkubointiaikapiste (8 h) tutkittavaksi ja tutkittavien näytteiden rinnakkaisten määrä vähennettiin kolmeen. Näytteiden rinnakkaiset testit päätettiin suorittaa eri päivinä, jotta saataisiin selville menetelmän toistettavuus eli miten tulokset eroavat eri päivinä tehdyissä testeissä. Taulukossa 19 on esitetty toimivuuden testauksesta saadut tulokset.

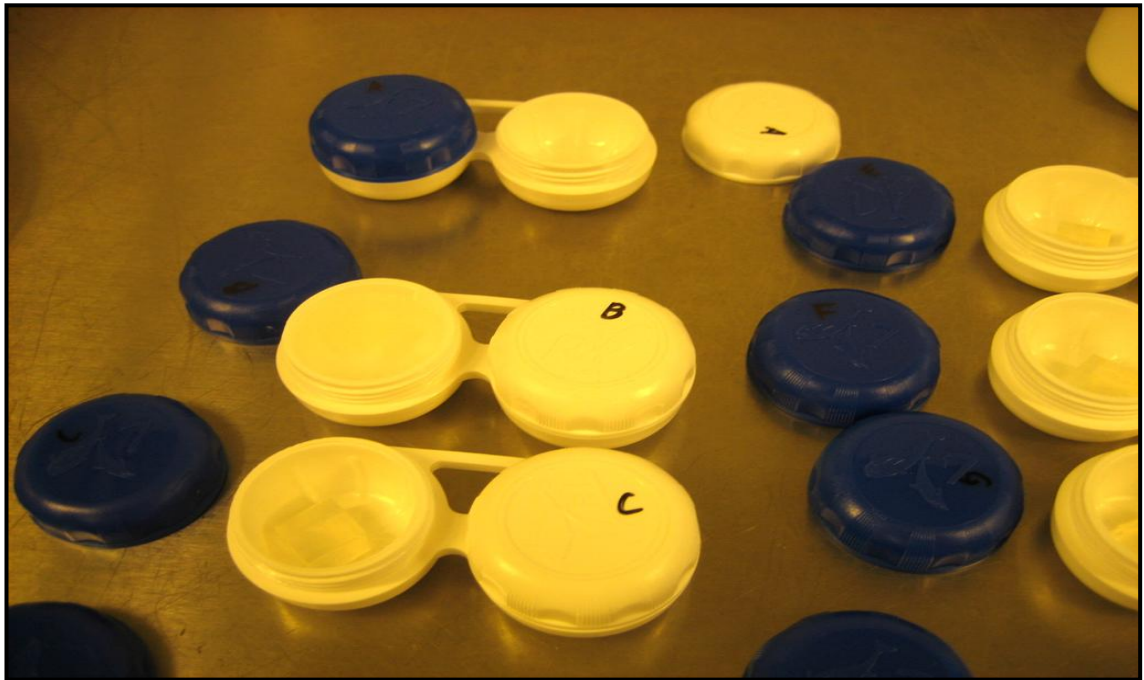
Taulukko 19. Toimivuuden testauksen tulokset.

Palat						
Havainnointi päivä	Negatiivinen kontrolli		Positiivinen kontrolli		Näyte 1	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
0	Siirrostus	Siirrostus	Siirrostus	Siirrostus	Siirrostus	Siirrostus
1	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	0/5
2	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	0/5
3	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
6	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
7	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
8	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
9	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
12	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
13	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
14	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Sentrifugoidut näytteet						
0	Siirrostus	Siirrostus	Siirrostus	Siirrostus	Siirrostus	Siirrostus
1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
6	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
7	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
8	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
9	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
12	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
13	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
14	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
Selite:	Negatiivinen (0/5) Positiivinen (1-5/5)					

8 VARSINAISET TESTIT

Näytteiden rinnakkaiset testit päätettiin suorittaa eri päivinä. Aluksi amebat siirrostettiin uusille maljoille ja maljoja inkuboitiin noin kolmen viikon ajan, kunnes amebat olivat muuttuneet kystiksi. Varsinaisissa testeissä käytetyt amebat siirrostettiin aina alkuperäiseltä HusLabista saaduilta maljoilta, jotta vältettiin turhat uudelleensiirrostukset. Varsinaisia testejä varten saatiin HusLabista uudet akantameba-maljat.

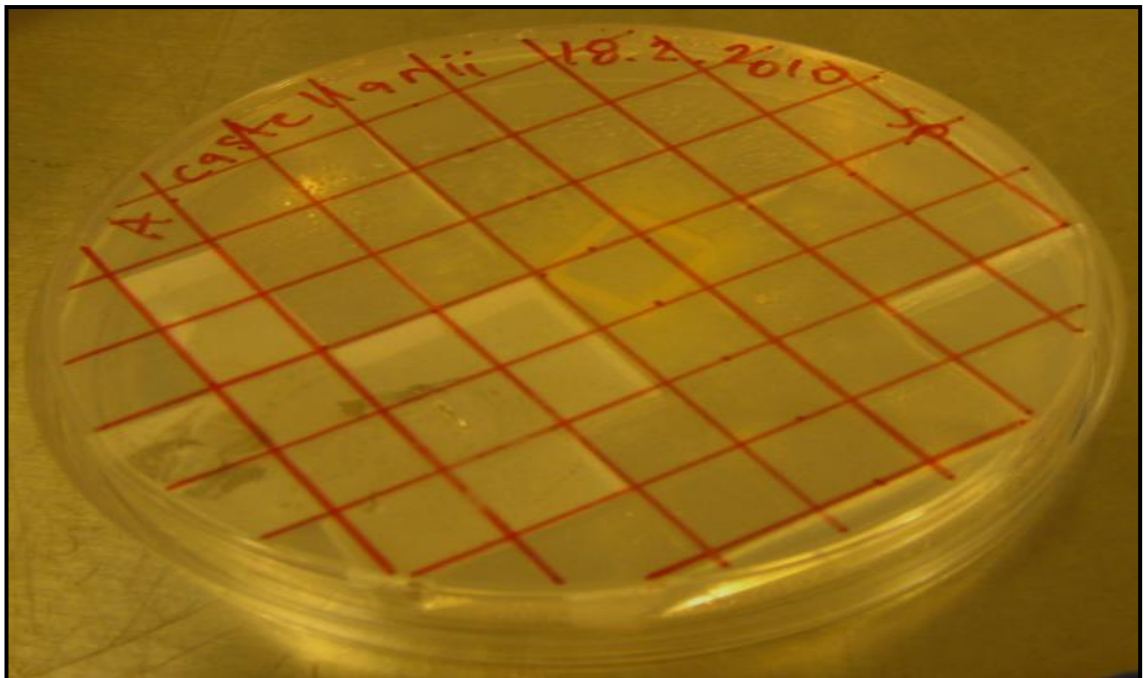
Piilolinssikoteloiden korkit merkittiin seuraavasti: POS, NEG, EtOH, A, B, C, D, E, F, G, H ja I. Koteloiden pohjiin merkittiin akantameba-laji, eli joko AC (*A. castellanii*) tai AP (*A. polyphaga*) sekä nesteen vaikutusaika (4h, 8h tai 24h). Kuvassa 3 havainnollistetaan varsinaisissa testeissä käytettyjen piilolinssikoteloiden merkitsemistä.



Kuva 3. Piilolinssikoteloiden merkintä varsinaisissa testauksissa.

Maljat, joilla amebat olivat muuttuneet kystiksi, jaettiin noin 1 cm² paloiksi. Paloja tarkasteltiin valomikroskoopilla, jotta kaikkien palojen alkutilanne oli

suunnilleen sama (kystat ryhmittyneet pääsääntöisesti yli 15:sta kystan ryppäisiin) ja laitettiin kukin pala omiin piilolinssikoteloihinsa. Palat eivät olleet kokonaan kystien peitossa (siton, että olisi ollut tasainen kystapinta), vaan kystaryppäitä oli tasaisesti maljan pinnalla. Yhdessä palassa yli 15:sta kystaryppäitä oli suunnilleen 20. Työvaiheiden nopeuttamiseksi laitettiin AP agar-palat aina koteloiden vasemmanpuolisiin koteloihin ja suljettiin ne sinisillä korkeilla. AC agar-palat laitettiin koteloiden oikeanpuolisiin koteloihin ja suljettiin valkoisilla korkeilla. Kuvassa 4 on havainnollistettu akantameba-maljojen paloihin jakoa.



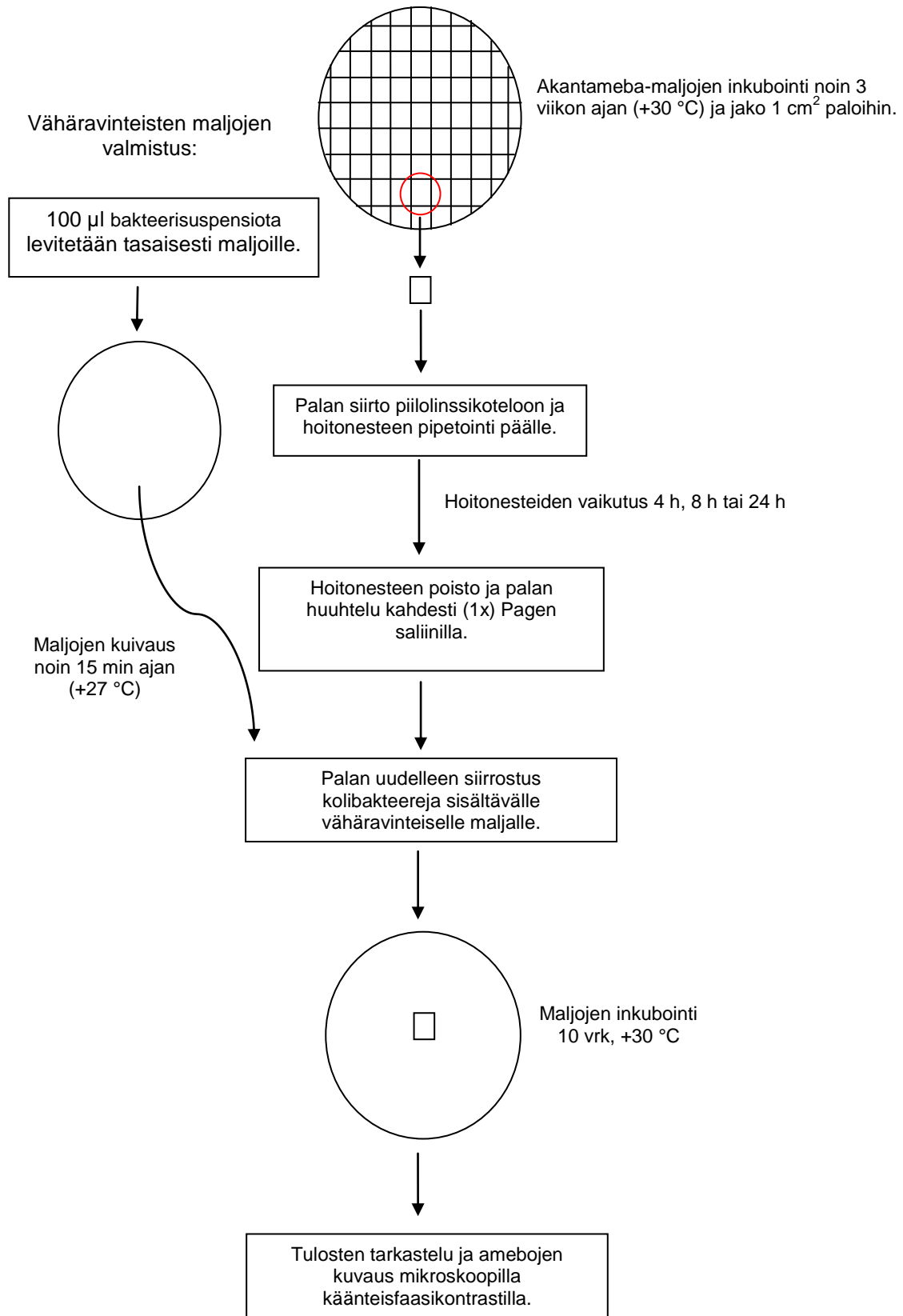
Kuva 4. AC-maljan jako paloihin.

Koteloihin pipetoitiin 3 ml tutkittavaa nestettä ja nesteiden annettiin vaikuttaa 4, 8 tai 24 tuntia. Suspensoituja kolibakteereja siirrostettiin vähäravinteisille maljoille ja maljojen annettiin kuivua lämpökaapissa (+37 °C) ennen ameboiden siirrostusta vähintään 15 minuutin ajan. Vaikutusaikojen jälkeen hoitonesteet poistettiin piilolinssikoteloista, agar-palat siirrettiin falcon-putkiin ja huuhdeltiin kahdesti Pagen saliinilla (1 x). Huuhtelun jälkeen palat siirrettiin aiemmin

valmistetuille vähäravinteisille bakteerimaljoille, minkä jälkeen niiden annettiin kuivua laminaarikaapissa noin 15 minuutin ajan. Maljoja inkuboitin (+30 °C) nurinpäin, parafilmiin käärittyinä kymmenen päivän ajan, minkä jälkeen niitä tarkasteltiin mikroskoopilla. Negatiivinen kontrolli jouduttiin vaihtamaan väkevämpään vetyperoksidi liuokseen (5 % H₂O₂), sillä aiempi (2,5 %) liuos ei tehonnut AP:an (*A. polyphaga*).

Kuviossa 1 on esitetty varsinaisten testien suoritus.

Työn kulku:

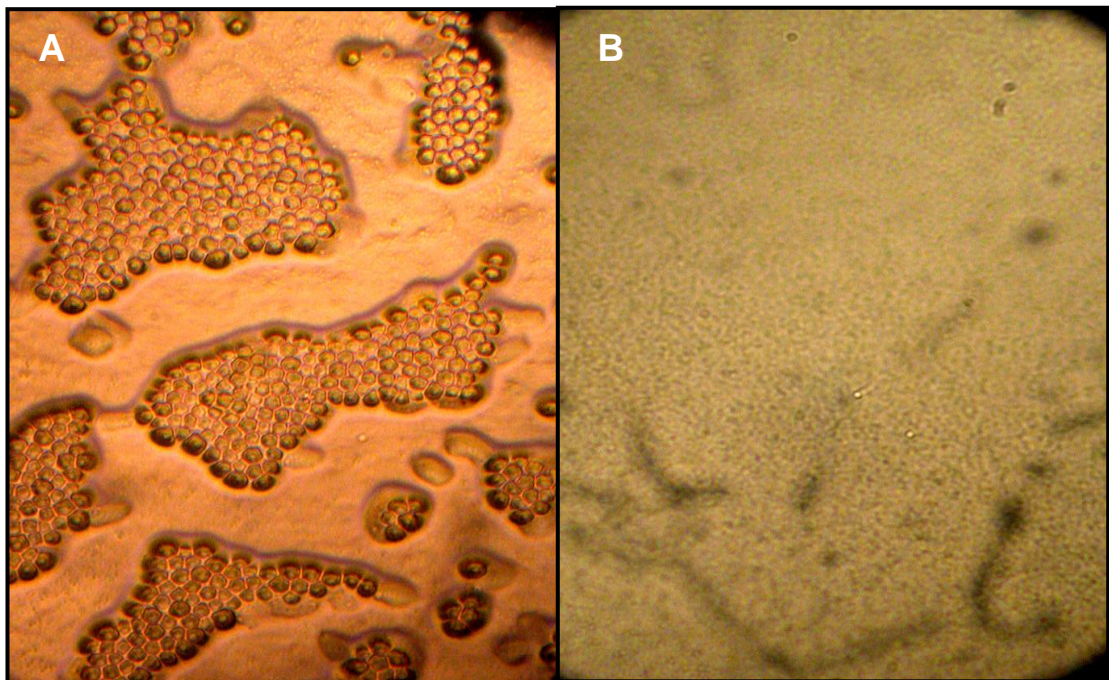


Kuvio 1. Varsinaisten testien suoritus.

9 TULOKSET

9.1 Tulosten tarkastelu

Akantamebojen laskeminen käytettävissä olleilla työvälineillä ja laitteilla osoittautui erittäin työlääksi, joten varsinaisista testeistä saatuja tuloksia päätettiin arvioida jollain muulla tavalla. Varsinaisten testien aikana huomattiin amebojen kystien muodostavan erikokoisia "ryppäitä" koteloituessaan. Joillain maljoilla ryppäissä oli enemmän kystiä kuin toisilla, joten päätettiin arvioida tehokkuuksia näiden ryppäiden sisältämien kystamäärien perusteella. Kuvassa 5 on kuvat positiivisen ja negatiivisen kontrollin maljoista. Lähtötilanteessa kaikki agar-palat näyttivät kuvan 4 A kanssa samalta. Yli 15 kystan ryppäitä oli palojen siirrostus-vaiheessa suunnilleen 20/pala.



Kuva 5. Kystaryppäitä positiivisen (A) ja negatiivisen (B) kontrollin maljoilla.

9.2 Hoitonesteiden tehokkuuksien arviointi

Hoitonesteiden tulokset esitettiin kystien muodostamien ryppäiden avulla taulukossa 20 esitettyjen arviointiperusteiden perusteella. Vaikka tulokset arvioidaankin kystien määrän perusteella, saattoi ryhmän 1 (+++) maljoilla näkyä vielä trofotsoiitteja 10 päivän inkuboinnin jälkeen. Trofotsoiitteja ei otettu huomioon tulosten arvioinnissa.

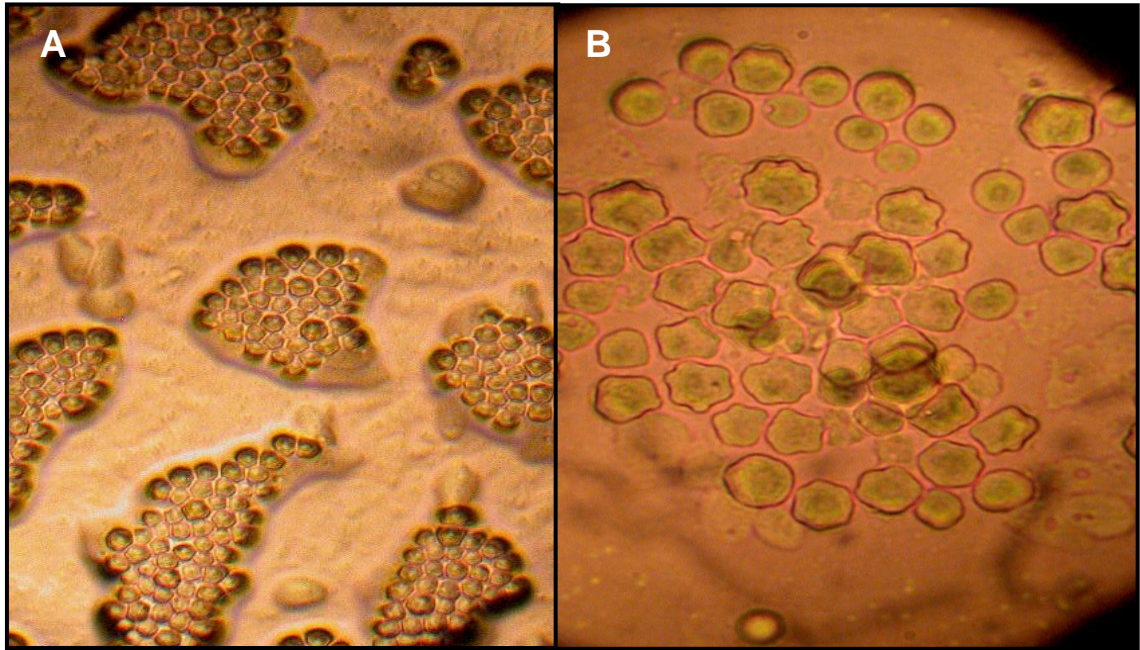
Taulukko 20. Hoitonesteiden tehokkuuksien arviointiperusteet.

Merkintä	Kystien määrä / ryppäs	Selite
+++	yli 15	Kaikkien tutkittavien agar-palojen lähtötilanne, positiivisten kontrollien maljat sekä maljat joilla vähenemistä lähtötilanteesta ei tapahtunut (kuva 5 A ja 6).
++	3-15	Selkeä väheneminen lähtötilanteesta, mutta kystia kuitenkin selvästi maljoilla (kuva 7 A ja B).
+	1-3	Selkeä väheneminen lähtötilanteesta, kystia havaittavissa siellä täällä maljoilla (kuva 8 A ja B).
+	Saattoi löytyä miltä tahansa maljalta	Havaittavien kystien soluseinät selkeästi normaalien kystien soluseiniä haaleampia. Näitä saattoi löytyä minkä tahansa ryhmän maljoilta pääsääntöisesti vain yksittäisinä tapauksina (kuva 9 A ja B).
-	-	Kystia ei havaittavissa maljoilla (kuva 10).

Maljojen tarkastelussa ensimmäisenä tarkasteltiin aina positiivisen kontrollin maljat. Tutkittavien nesteiden maljoja verrattiin aina positiivisen kontrollin- sekä rinnakkaisten testien maljoihin (maljat säilytettiin jääkaapissa tutkimusten loppuun asti).

Ryhmä 1 (+++)

Ryhmän 1 maljoilla (kuva 6 A ja B) kystat muodostivat pääsääntöisesti yli 15 kystan ryppäitä ja kystaryppäitä löytyi tasaisesti koko maljalta kymmenen päivän inkuboinnin jälkeen. Lähtötilanteessa (ennen hoitonesteilte altistamista) kaikki palat kuuluivat ryhmään 1.

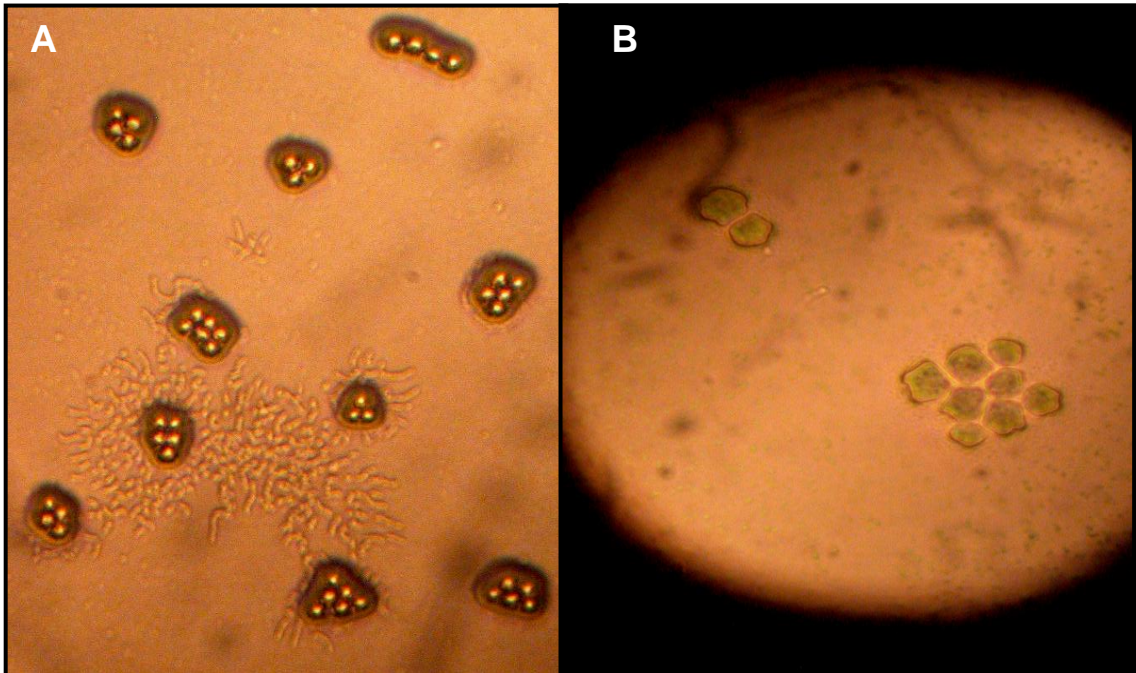


Kuva 6. Kystaryppäitä ryhmän 1 (+++) maljoilla.

Kuvassa 6 A on 100 x suurennos 4 tunnin vaikutusajan maljalta (AP), jossa tutkittavana hoitonesteenä oli hoitoneste C. Kuvassa 6 B on 400 x suurennos 4 tunnin vaikutusajan maljalta (AP), jossa tutkittavana hoitonesteenä oli hoitoneste A.

Ryhmä 2 (++)

Osassa maljoista kystien määrä oli selvästi pienempi verrattaessa lähtötilanteeseen sekä positiiviseen kontrolliin, vaikka niitä maljoilta löytyikin heti selvästi. Ryhmän 2 (kuva 7 A ja B) maljoilla kystat muodostivat pääsääntöisesti 3-15 kystan ryppäitä ja tarkastellessa kystamäärä oli selvästi vähentynyt positiivisiin kontroleihin verrattuna.

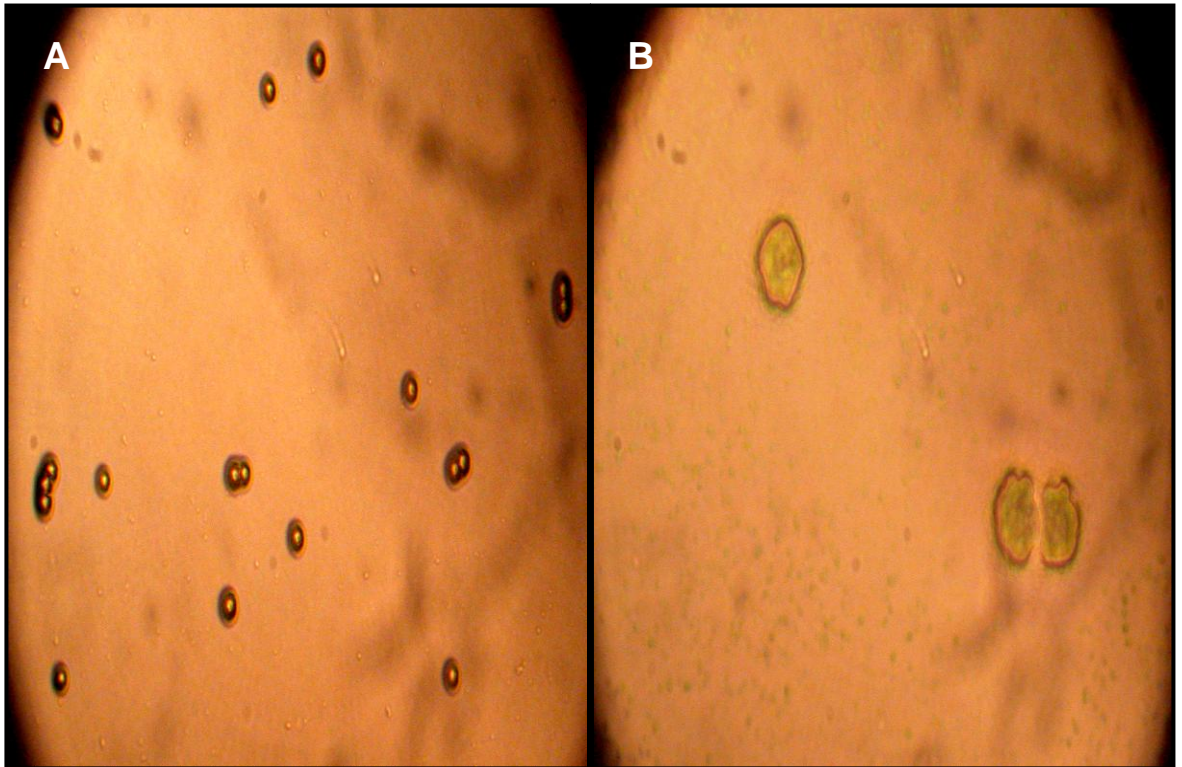


Kuva 7. Kystaryppäitä ryhmän 2 (++) maljoilla.

Kuvassa 7 A on 100x suurennos 8 tunnin vaikutusajan maljalta (AP), jossa tutkittavana hoitonesteenä oli hoitoneste A. Kuvassa 7 B on 400x suurennos 8 tunnin vaikutusajan maljalta (AP), jossa tutkittavana hoitonesteenä hoitoneste E.

Ryhmä 3 (+)

Ryhmän 3 (kuva 8 A ja B) maljoilla kystat olivat vähentyneet runsaasti verrattaessa ryhmiin 1 ja 2. Maljoja tarkasteltaessa kystia löytyi tasaisesti maljoilta pääsääntöisesti 1-3 kystan ryppäinä.

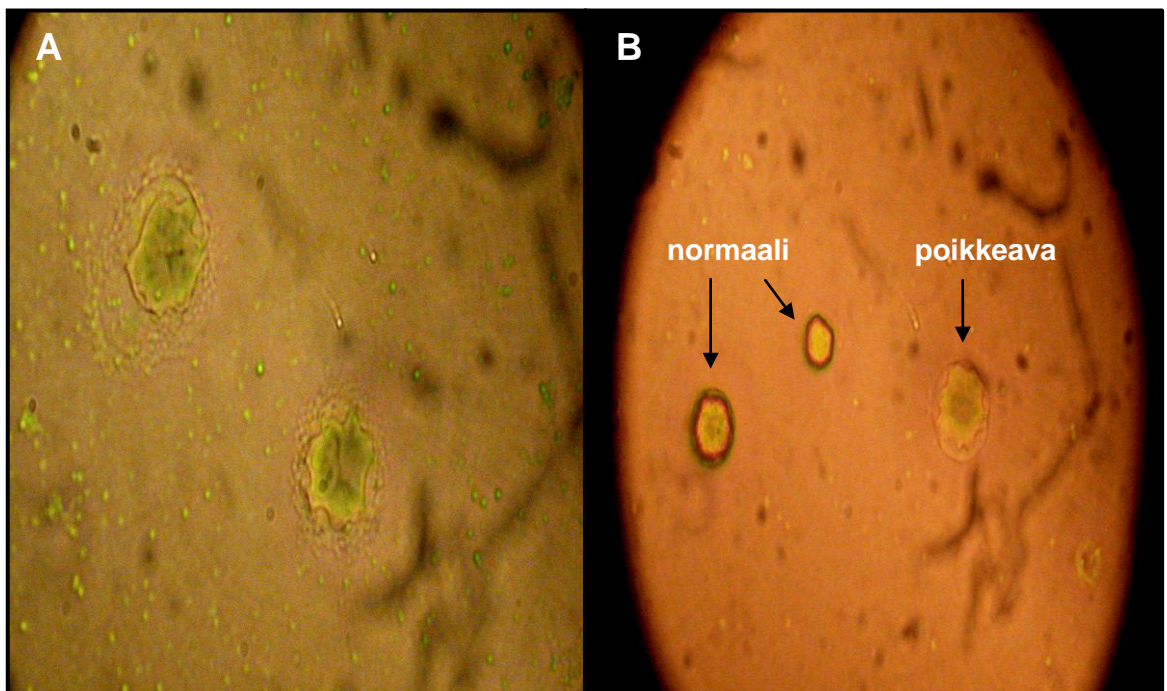


Kuva 8. Kystiä ryhmän 3 (+) maljoilla.

Kuvassa 8 A on 100x suurennos 8 tunnin vaikutusajan maljalta (AC), jossa tutkittavana nesteinä oli hoitoneste I. Kuvassa 8 B on 400x suurennos 8 tunnin vaikutusajan maljalta (AC), jossa tutkittavana hoitonesteinä on hoitoneste I.

Ryhmä 4 (+)

Ryhmän 4 (kuva 9 A ja B) kystiä saattoi löytyä miltä tahansa aiemmin kuvailtujen ryhmien (1-3) maljoilta, pääsääntöisesti yksittäin. Kystat erosivat ulkonäöltään selvästi normaaleista kystista, sillä niillä oli erittäin haalea soluseinä verrattaessa normaaleihin kystiin. Luultavasti hoitoneste vaikutti trofotsoitin koteloitumiseen siten että uudelleenkoteloituminen kystaksi heikentyi. Kuvassa 4 A on kaksi poikkeavaa kystaa ja kuvassa 4 B on kaksi normaalia sekä yksi poikkeava kysta.

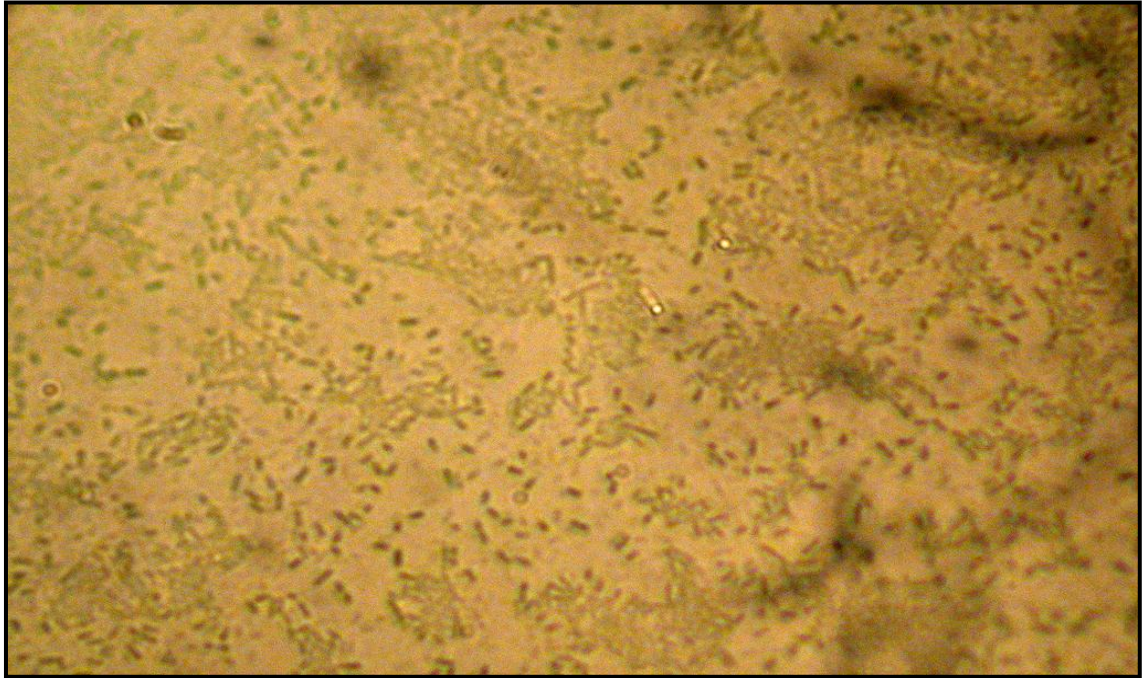


Kuva 9. Kystia ryhmän 4 (+) maljoilla.

Kuvassa 9 A on 400x suurennos 4 tunnin vaikutusajan maljalta (AC), jossa tutkittavana nesteenä oli hoitoneste A. Kuvassa 9 B on 400x suurennos 24 tunnin vaikutusajan maljalta (AP), jossa tutkittavana nesteenä oli hoitoneste A.

Ryhmä 5 (-)

Ryhmään 5 (kuva 10) kuuluvat ne hoitonesteet, joilla 10 päivän inkuboinnin jälkeen ei havaittu ollenkaan kystia.



Kuva 10. Kolibakteereja negatiivisen kontrollin maljalla.

Kuvassa 10 on 400x suurennos negatiivisen kontrollin (AC) maljasta, jonka pinnalla selvästi nähtävissä kolibakteereja (vihreitä sauvoja).

9.3 Varsinaisten testien tulokset

Testattujen hoitonesteidien tehokkuuksissa oli selkeitä eroja, vaikka tarkempi kvantitatiivinen tarkastelu jäikin sen hankaluuden vuoksi tekemättä.

Tuloksista huomataan, että lähes kaikilla hoitonesteillä oli jotain vaikutusta tutkittuihin akantameboihin jo minimivaikutusajassa. Vain hoitoneste E:llä ei ollut minkäänlaista vaikutusta AP:an minimivaikutusajalla. Tutkituista hoitonesteistä vain hoitoneste H ja I tuhosivat kaikki kystat yhdeltä AC:n rinnakkaiselta maljalta jo neljän tunnin vaikutusajalla. Tuloksista käy ilmi, että

pääsääntöisesti vaikutusaikoja pidentämällä hoitonesteiden tehokkuudet paranevat. Joissain tapauksissa hoitonesteillä kuitenkin saattoi olla parempi vaikutus lyhyemmällä kuin pidemmällä vaikutusajalla. Esimerkiksi hoitonesteellä B 4 tunnin vaikutusajan maljoilta löytyi vain poikkeavia pääsääntöisesti yksittäisiä kystiä (myös 2-3 poikkeavan kystan ryppäitä näkyvissä hyvin vähän), mutta 8 ja 24 tunnin vaikutusajan maljoilta (yksiltä rinnakkaisilta) löytyi normaaleja kystiä 3-15 kystan ryppäinä. Syytä tähän ei tiedetä.

Jo varsinaisten testien alussa huomattiin, että eri lajien herkkyyksissä on eroavaisuuksia. Käyttämistämme akantameboista AP oli selvästi kestävämpi kuin AC. Eri päivinä tehtyjen testien tuloksissa ja tehokkuuksissa oli eroavaisuuksia. Joidenkin tutkimusten mukaan useat uudelleensiirrostukset saattavat heikentää akantamebojen kestävyttä^{5,54}. Tutkimuksissa pyrittiin kuitenkin välttämään useita uudelleensiirrostuksia siten, että tehtiin siirrostukset aina alkuperäisestä maljasta. Myös pitkät säilytysajat saattavat heikentää akantameboja, joten syyt eri päivinä tehtyjen tulosten eroavaisuudet saattavat johtua käytettyjen akantamebojen eri säilytysajoista. Tehokkain AC:tä vastaan oli hoitoneste A ja AP:a vastaan hoitoneste F.

Biguanidia sisältäviä hoitonesteitä oli tutkittavien hoitonesteiden joukossa kuusi (A, B, E, G, H ja I), joista tehokkaimpia olivat hoitonesteet A ja B. Heikoimmin kaikista tutkituista hoitonesteistä (A-I), molempiin tutkittuihin akantameboihin, tehosi biguanidia sisältävä hoitoneste E.

Hoitonesteitä, joiden desinfiointi perustuu kloriitti-ioneihin ja hapetukseen oli tutkimuksissa kaksi (D ja F). Tehokkuudet olivat niiden kesken melko samankaltaiset.

Kahta eri desinfioivaa ainetta sisältävä hoitoneste C oli lähestulkoon yhtä tehokas AC:tä vastaan kuin hoitonesteet A ja B.

Taulukossa 21 on esitetty varsinaisista testeistä saadut tehokkuudet. Tulosten arviointiperusteet on esitelty aiemmin taulukossa 20.

Taulukko 21. Hoitonesteiden tehokkuudet.

Näyte	<i>A. castellanii</i>			<i>A. polyphaga</i>			Desinfioiva aine	
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h		
A	+++	++	+	+++	++	++	Biguanidi	
	+	-	-	++	++	++		
	+	-	-	++	++	+		
B	+	+	++	+++	++	++		
	+	++	-	++	+++	++		
	+	+	-	++	++	++		
C	+	+	++	+++	+++	+++		Kaksi yhdistettä
	++	++	-	+++	++	++		
	+	++	-	+++	+++	++		
D	++	+	+	++	+++	++	Kloriitti-ioni ja hapetus	
	++	+	+	++	+++	++		
	+	-	-	++	++	++		
E	+++	++	++	+++	+++	+++	Biguanidi	
	+++	++	++	+++	+++	+++		
	+	++	-	+++	++	++		
F	+	++	+	+++	+++	++	Kloriitti-ioni ja hapetus	
	+	++	+	++	+++	+		
	+	+	-	++	+	+		
G	++	++	++	+++	+++	+++	Biguanidi	
	+	++	+	++	++	+++		
	++	++	-	+++	++	+		
H	++	++	+	++	++	++		
	++	++	+	++	++	++		
	-	+	+	+++	+	++		
I	+	++	++	++	++	++		
	+	++	++	++	++	++		
	-	+	-	++	++	++		

Hoitonesteet jaoteltiin aktiivisuuden mukaan viiteen ryhmään (taulukko 20), joista ryhmän 1 (+++) hoitonesteet eivät osoittaneet minkäänlaista aktiivisuutta akantameboja kohtaan. Ryhmän 2 (++) ja 3 (+) hoitonesteet vaikuttivat jo selvästi akantameboihin, sillä silmämääräisesti akantamebojen määrät vähenivät huomattavasti lähtötilanteesta. Ryhmän 4 (+) kystat erosivat ulkonäöltään normaaleista kystistä selvästi (kuva 4 B) ja niitä oli maljoilla pääsääntöisesti yksittäin (satunnaisia 2-3 kystan ryppäitä lukuunottamatta). Näitä poikkeavia kystia saattoi löytyä minkä tahansa ryhmän (1-3) maljoilta. Ryhmän 4 (-) hoitonesteet tuhosivat kaikki kystat paloilta.

Hoitonesteiden kvalitatiiviset tulokset (taulukko 22) eivät kerro täysin vertailukelpoisesti eri hoitonesteiden tehoista, sillä positiivisten maljojen välillä oli suuria eroja. Kvalitatiiviset tulokset halutaan kuitenkin esittää tehokkuutta paremmin arvioivien tulosten rinnalla, jotta tutkimustuloksia voidaan paremmin vertailla aiemmissa tutkimuksissa saatuihin tutkimustuloksiin. Menetelmän kehitysvaiheessa hyödynnetyistä tutkimuksista^{5,54} kahden tutkimustulokset esitettiin vain kvalitatiivisesti. Hoitonesteiden tulokset, joissa vähenemistä on tapahtunut, on havainnollisuuden vuoksi merkitty punaisella.

Taulukko 22. Hoitonesteiden kvalitatiiviset tulokset.

Näyte	Positiivisten maljojen lukumäärä (%)					
	<i>A. castellanii</i>			<i>A. polyphaga</i>		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
A	3/3 (100 %)	1/3 (33 %)	1/3 (33 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
B	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	1/3 (33 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
C	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	1/3 (33 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
D	3/3 (100 %)	2/3 (66 %)	2/3 (66 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
E	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	2/3 (66 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
F	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	2/3 (66 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
G	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	2/3 (66 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
H	2/3 (66 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
I	2/3 (66 %)	3/3 (100 %)	2/3 (66 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)

Kystien elinkelpoisuus testattiin vielä siirrostamalla ne uudelleen uusille bakteerimaljoille. Kaikki kystat (myös poikkeavat) pystyivät muuttumaan takaisin trofotsoiiteiksi ja siirtymään uusille maljoille. Normaalien kystien siirtyminen paloilta maljoille kesti suunnilleen kaksi vuorokautta, kun taas poikkeavien

kystien siirtyminen kesti 4-5 vuorokautta. Poikkeavien kystien kohdalla toistettiin testimenetelmä 4 tunnin inkuboinnilla uudelleen (vain hoitonesteellä A), jotta saatiin selville kestävätkö poikkeavat kystat uudelleenkäsittelyä. Testistä kävi ilmi, että poikkeavat kystat eivät kestäneet toista hoitonestekäsittelyä edes 4 tunnin vaikutusajalla.

10 PÄÄTELMÄT

Hoitonesteiden tehokkuuksissa oli eroja, vaikka yksikään hoitoneste ei tuhonnut akantameboja 100 %:sti agar-paloilta (taulukko 22). Biguanideja sisältävistä hoitonesteistä A, B ja I olivat tehokkaampia AC:ta vastaan kuin hoitonesteet E, G ja H. Hoitonesteet A, I ja H olivat tehokkaampia AP:a vastaan kuin hoitonesteet B, E ja G. Jostain syystä biguanideja sisältäneet hoitonesteet eivät olleet yhtä tehokkaita molempia lajeja vastaan. Kaikista tutkituista hoitonesteistä biguanidia sisältäneet hoitonesteet E ja G tehosivat molempiin akantameboihin heikoiten. Kloriitti-ioneihin ja hapetukseen perustuvien hoitonesteiden tehokkuuksissa ei ollut suuria eroja. Yllättäen ne eivät kuitenkaan olleet hoitonesteistä tehokkaimpia, vaikka pärjäsivät vertailussa hyvin. Aiemmissä tutkimuksissa^{5,54} hapetukseen perustuvat menetelmät ovat olleet tutkituista hoitonesteistä selkeästi tehokkaimpia. Samaa aktiivista ainetta sisältävien nesteiden väliset erot saattavat johtua siitä, että nesteet joko sisälsivät eri määrän desinfioivaa ainetta tai muut hoitonesteiden sisältämistä aineista tehostivat tai heikensivät desinfioivan aineen tehoa. Muiden hoitonesteiden ainesosien kuten pinta-aktiivisten tai kelatoivien aineiden tiedetään lisäävän desinfioivien aineiden tehoa^{24,25}. Joidenkin aineiden tiedetään lisäävän akantamebojen koteloitumista kystiksi⁵⁴, joten eri aineiden vaikutukset akantamebaan olisi hyvä testata erikseen.

Tutkimustulosten perusteella eri akantameba-lajit erosivat herkkyysiltään suuresti. Tutkituista akantameboista AC oli selvästi herkempi hoitonesteille kuin AP. Virallisten testien alussa negatiivista kontrollia jouduttiin jopa väkevöimään, koska alkuperäinen (2,5 %) vetyperoksidiliuos ei tehonnut AP:an kuten se tehosi AC:hin. Myös aiemmissä tutkimuksissa^{5,54,55,56} on havaittu eri lajien herkkyserot. Syitä näihin herkkyseroihin ei vielä tarkkaan tiedetä. Eri lajien ja kantojen herkkyserot saattavat johtua eri alueilta eristettyjen akantamebojen luontaisista eroista. Eri alueilla akantamebat altistuvat erilaisille kemikaaleille, jotka saattavat vaikuttaa niiden herkkyysiin. Myös akantamebojen pitkien säilytysaikojen ja useiden uudelleensiirrostusten on todettu heikentävän niitä.^{5,54} Aiemmistä tutkimuksista^{5,54,55,56} käy ilmi, että etenkin potilasnäytteistä ja

vesijohtovesistä eristetyt kannat ovat kestävimpiä. Jatkossa hoitonesteet olisi hyvä testata sekä ympäristöstä että potilasnäytteistä eristetyille kannoille, jotta hoitonesteiden tehokkuuksista saataisiin mahdollisimman luotettava kokonaiskuva.

Tuloksista käy myös ilmi, että pidemmällä vaikutusajalla hoitonesteen tehokkuus pääsääntöisesti paranee. Vaikutusta olisi hyvä kuitenkin olla jo minimivaikutusajassa, sillä suurin osa piilolinssien käyttäjistä antaa hoitonesteiden vaikuttaa vain yön yli. Jatkossa olisi hyvä testata myös se, missä ajassa kaikki akantamebat kuolevat, näissä testeissä sitä ei huomattu testata.

Erikoista joidenkin hoitonesteiden tutkimustuloksissa oli, että osa tai kaikki kystista olivat hyvin haaleita ja erottuivat ulkonäöltään selkeästi muista kystista. Luultavasti hoitonesteet vaikuttivat akantameban koteloitumiseen, jolloin kystien soluseinät jäivät heikommiksi. Haaleat kystat eivät olleet kuitenkaan tuhoutuneet hoitonesteiden vaikutuksista kokonaan, sillä ne pystyivät muuttumaan takaisin trofotsoiiteiksi ja levittäytymään maljoille. Haaleiden kystien siirtyminen maljoille kesti kuitenkin kauemmin kuin normaaleilla kystilla, josta voidaan päätellä että niiden muuttuminen sekä trofotsoiiteiksi että kystiksi oli jotenkin häiriintynyt hoitonesteiden vaikutuksesta. Poikkeavien kystien uudelleentestauksesta kävi ilmi, että trofotsoiittien häiriintynyt koteloituminen kystiksi heikensi niitä selvästi. Yksikään poikkeava kysta ei kestänyt toista hoitonestekäsittelyä. Poikkeavien kystien lähtömäärä oli kuitenkin selvästi pienempi kuin virallisissa testeissä (yksittäisiä kystiä harvassa).

Tutkimustuloksissa erikoista oli myös se, että maljoilta, jotka sisälsivät eniten akantameboja lähtötilanteessa (ryhmä 1) saattoi trofotsoiitteja löytyä vielä 10 päivän inkuboinnin jälkeen. Muiden ryhmien maljoilla trofotsoiitit olivat jo kymmenen päivän kuluessa koteloituneet kystiksi. Voisi kuvitella asian olevan toisin. Eli mitä vähemmän akantameboja lähtötilanteessa olisi, sitä pidempään niillä riittäisi bakteeriravintoa ja sitä kauemmin ne pysyisivät trofotsoiitteina. Tutkimuksissa kuitenkin trofotsoiitteja löytyi nimenomaan niiltä maljoilta, joissa kystien lähtömäärä oli jo alussa suurempi.

Eri päivinä tehtyjen testien tuloksissa oli joitain eroja. Eroihin luultavasti vaikutti amebojen uudelleen siirrostus, sillä amebojen tiedetään heikentyvän pitkässä säilytyksessä. Myös aiempien julkaisujen^{5,54,55,56} tuloksissa oli hieman eroavaisuuksia.

Pelkkien kystien tutkiminen on perusteltua, sillä ne kestävät ympäristön stressiä paremmin kuin trofotsoiitit⁵. Kystien valinnassa ajateltiin, että jos hoitonesteet tehoavat kystiin ne tehoavat myös trofotsoiitteihin. Jatkossa testit on hyvä kuitenkin tehdä sekä kystiä että trofotsoiitteja vastaan, sillä luonnossa piilolinssien käyttäjät ja muut henkilöt altistuvat sekä kystille että trofotsoiiteille.

Borazjani ym.⁵⁵ tutkimustulosten perusteella huuhtelu, hankaus ja desinfiointi lisäävät hoitonesteiden tehokkuuksia. Yleensä piilolinssien puhdistukseen kuuluu mekaaninen hankaus, joten hoitonesteiden tehokkuudet olisivat varmasti olleet paremmat jos paloja olisi hangattu ja huuhdeltu ennen hoitonesteisiin upottamista.

Toimivan menetelmän kehittämiseksi AK:n syntyyn ja kehitykseen liittyvät osatekijät tulisi tuntea paremmin. Etenkin syyt miksi jotkin lajit ovat patogeenisiä ja toiset eivät. Lisäksi AK:n puhkeamiseen vaadittava akantamebojen lukumäärä täytyisi selvittää, jotta kvantitatiivisen menetelmän kehitys on järkevää. Kvantitatiivista menetelmää ei pysty kehittämään, ennen kuin tiedetään mikä määrä akantameboja aiheuttaa AK:n puhkeamisen. Saattaa olla, että jo yksi akantameba oikeissa olosuhteissa riittää AK:n puhkeamiseen.⁵⁴

Kehitetty menetelmä on toimiva, mutta erittäin työläs ja aikaa vievä, mikäli tutkittavia nesteitä on useampia. Tarkoituksena oli kehittää mahdollisimman luonnollisia käyttöolosuhteita mukaileva menetelmä tehokkuuksien arviointiin. Menetelmässä akantamebat olivat kiinnittyneenä agarin pinnalle aivan kuten ne kiinnittyisivät piilolinssin tai piilolinssikotelon pintaan niiden käytön tai säilytyksen aikana. Ajatuksena oli, että solukiinnittyminen tai kulkeutuminen agarin huokosiin saattaa suojata akantameboja desinfiioivilta aineilta. Lisäksi testausten aikana pyrittiin minimoimaan mahdolliset rakenteellista vahinkoa aiheuttavat työvaiheet. Tämän vuoksi päädyttiin menetelmään, jossa ei käytetty

sentrifugointia eikä akantameboja irrotettu alustoilta missään vaiheessa. Idea agar-palojen käyttöön tuli Shoff ym.⁵⁴ tutkimuksesta. Virallisen menetelmän kehityksessä tulee olemaan paljon haasteita. Koska monissa tutkimuksissa on havaittu suuria eroja eri akantameba-lajien ja jopa eri kantojen välillä, on suurimpana haasteena sopivan kannan tai lajin valinta. Myös säilytysolosuhteet ja -ajat sekä uudelleen siirrostuksien määrät tulee optimoida, jotta akantamebat pysyvät testien ajan mahdollisimman luonnollisina.

Toistaiseksi hoitonesteilä ei vaadita desinfiointitehokkuutta akantameboja vastaan, joten oikeanlainen piilolinssien käyttöön opastus on tärkeää. Piilolinssien käyttäjille on hyvä painottaa, että piilolinssien hoidon laiminlyöminen ja etenkin omatekoisten suolaliuosten tai vesijohtoveden käyttö piilolinssien huuhtelussa lisää akantamebakeratiitin riskiä.

LÄHTEET

1. Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S. & Portin, P. (2003) Biologian sanakirja. 2. Painos. Otava, Keuruu.
2. Turvallisuus- ja kemikaaliviraston (TUKES) kotisivut (2011). [online, viitattu 4.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.tukes.fi/>](http://www.tukes.fi/).
3. Terve.fi kotisivut (2011). [online, viitattu 4.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.tohtori.fi/?page=4069997&search=granulooma>](http://www.tohtori.fi/?page=4069997&search=granulooma).
4. Sarparanta, K., Lindbohm, N., Tervo, T., Tuisku, I. & Jokiranta, S. (2009). Akantamebakeratiitti. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. **125** (15): s. 1639–1646. [online, viitattu 12.12.2010] Saatavilla [www-muodossa: <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo98208.pdf>](http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo98208.pdf).
5. Johnston, S.P., Sriram, R., Qvarnstrom, Y., Roy, S., Verani, J., Yoder, J., Lorick, S., Roberts, J., Beach M.J. & Visvesvara, G. (2009) Resistance of *Acanthamoeba* Cysts to Disinfection in Multiple Contact Lens Solutions. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**: s. 2040-2045.
6. Piiloiset by Finnsusp Oy:n kotisivut. [online, viitattu 2.10.2010]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.piiloiset.fi/fin_piiloisetutuksi.php>](http://www.piiloiset.fi/fin_piiloisetutuksi.php).
7. Lynne Shore Garcia (2007) *Diagnostic Medical Parasitology*. 5. Painos. ASM Press, Washington.
8. Bowling, E., Russell, G.E., Shovlin, J.P. & Sindt, C.W. (2010). The Corneal Atlas. Review of Optometry: s. 6-7. [online, viitattu 2.10.2010]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.revoptom.com/cmsdocuments/2010/3/jan2010cornealatl.pdf>](http://www.revoptom.com/cmsdocuments/2010/3/jan2010cornealatl.pdf).
9. Booton, G.C., Visvesvara, G.S., Byers, T.J., Kelly, D.J. & Fuerst, P.A. (2005) Identification and Distribution of *Acanthamoeba* Species Genotypes Associated with Nonkeratitis Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: s.1689-1693.
10. Khan, N.A. (2003) Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial Pathogenesis*. **34**: s. 277-285.
11. Kalso, S., Jokipii, L., Warhurst, D., Vesaluoma, M., Pönkä, A. & Tervo, T. (1994) Vapaana elävien amebojen esiintyvyys pore- ja uima- allasvesissä – riski piilolasien käyttäjille. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. **110** (13); s. 1256–1261.[online, viitattu 29.8.2010]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/etusivu?p_p_id=dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku&p_p_action=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku__spage=%2Fportlet_action%2Fdlehtihakuartikkeli%2Fviewarticle%2Faction&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_tunnus=duo40268&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_frompage=uusinnumero>](http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/etusivu?p_p_id=dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku&p_p_action=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku__spage=%2Fportlet_action%2Fdlehtihakuartikkeli%2Fviewarticle%2Faction&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_tunnus=duo40268&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_frompage=uusinnumero).
12. National Standard Methods. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species. [online, viitattu 2.10.2010]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/water/pdf/w17.pdf>](http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/water/pdf/w17.pdf).
13. Niederkorn, J.Y., Alizadeh, H., Leher, H. & McCulley J.P. (1999) The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes and Infection*. **1**: s. 437–443.
14. Stapleton, F., Ozkan, J., Jalbert, I., Holden, B., Petsoglou, C. & McClellan, K. (2009) Contact Lens-Related *Acanthamoeba* Keratitis. *Optometry and Vision Science*. Vol 86: s. E1196-E1201.

15. Clarke, D.W. & Niederkorn, J.Y. (2006) The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes and Infection*. **8**: s.1400-1405.
16. Badenoch, P., Johnston, A., Christy, P. & Coster, D. (1990) Pathogenicity of *Acanthamoeba* and *Cornye-bacterium* in the rat cornea. *Archives of Ophthalmology*. **108**, s. 107-112.
17. Efron, N. & Ang J. (1990) Corneal Hypoxia and Hypercapnia during Contact Lens Wear. *Optometry and Vision Science*. **67**: s.512-521.
18. Holden B. (1989) The Glenn A. Fry Award Lecture 1988: The Ocular Response to Contact Lens Wear. *Optometry and Vision Science*. **66**: s.717-733.
19. Hamamo, H., Hori, M., Hirayama, K., Kawabe, H. & Mitsunaga, S. (1975) Influence of Soft and Hard Contact Lenses on the Cornea. *The Australian Journal of Optometry*. **58**: s.326–336.
20. Van Klink, F., Alizadeh, H., He, Y., Mellon, J., Silvany, R., McCulley, J. & Niederkorn, J. (1993) The role of contact lenses trauma and Langerhans cells in a Chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **34**: s.1937-1944.
21. DPDx – CDC Parasitology Diagnostic Web site. [online, viitattu 2.12.2010] Saatavilla [www-muodossa: <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/FreeLivingAmebic.htm>](http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/FreeLivingAmebic.htm).
22. Radford, C., Lehmann, O. & Dart, J. (1998) *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-1996. *British Journal of Ophthalmology*. **82**: s. 1387-1392.
23. Euroopan komissio. (2010) MEDICAL DEVICES: Guidance document – Classification of medical devices. MEDDEV 2. 4/1 Rev. 9. [online, viitattu 23.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://ec.europa.eu/consumers/sectors/medical-devices/files/meddev2_4_1_rev_9_classification_en.pdf>](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/medical-devices/files/meddev2_4_1_rev_9_classification_en.pdf).
24. Stapleton, F. & Stechler, J. (1994) Contact Lens Care Systems and Solutions used by Practitioner. Teoksessa: Ruben, M. & Guillon, M. (toim.). *Contact Lens Practice*. Chapman & Hall, Lontoo.
25. Bennett, E., Weissman, B. (2004) *Clinical Contact Lens Practice*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. [online, viitattu 10.11.2010]. Saatavilla [www-muodossa: <http://books.google.fi/books?id=yq5_QfbP8HQC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>](http://books.google.fi/books?id=yq5_QfbP8HQC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false).
26. Efron, N. (1991) Contact lens correction. Teoksessa: *Visual optics and instrumentation. Visual and vision dysfunction. Part 1*. Mac Millan Press LTD, Lontoo.
27. BASF kotisivut (2011). [online, viitattu 17.5.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.basf.com/group/corporate/en/>](http://www.basf.com/group/corporate/en/).
28. Gonzales-Lopez, J., Sandez-Macho, I., Concheiro, A. & Alvarez-Lorenzo, C. (2010) Poloxamines and Poloxamers Micellar Carriers for Simvastatin: Interactions at the Air – Water Interface and in Bulk Solution. *The Journal of Physical Chemistry A*. **114**: s. 1181-1189.
29. SFS-EN ISO 14729:2001. Ophthalmic optics – Contact lens care products - Microbiological requirements and test methods for products and regimens for hygienic management of contact lenses.

30. Raasmaja, A. & Männistö, P. Antiseptit ja desinfektioaineet. [online, viitattu 27.11.2010]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.muodossa.fi/fato/59.pdf>](http://www.muodossa.fi/fato/59.pdf).
31. Vaahtoranta-Lehtonen, H. (2000) Clinical and microbiological studies on EGD and BEN22 detergents in soft contact lens care solutions. Turun yliopiston julkaisuja, sarja D, Tom. 412. Digipaino, Turku.
32. Atkins, N. (2006) Developments in lens care solutions. OpticianOnline; helmikuu 2006. [online, viitattu 12.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.muodossa.fi/wp-content/uploads/2009/07/developments_opticain1.pdf>](http://www.muodossa.fi/wp-content/uploads/2009/07/developments_opticain1.pdf).
33. Bausch & Lomb Oy:n kotisivut. Eye Care Professional. [online, viitattu 24.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.muodossa.fi/www.bausch.com/en_US/default.aspx>](http://www.muodossa.fi/www.bausch.com/en_US/default.aspx).
34. McDonnell, G., Russell, A. (1999) Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. **12**, No. 1; s: 147–179.
35. Shih, K., Raad, M., Hu, J., Gresh, W., Jiries, S., Caldwell L. *et al.* (1991) Disinfecting activities of non-peroxide soft contact lens cold disinfection solutions. *Contact Lens Association of Ophthalmologists*. **17**: s. 165-168.
36. Green, K., Livingston, V., Bowman, K. & Hull, D. (1980) Chlorhexidine effects on corneal epithelium and endothelium. *Archives of Ophthalmology*. **98**: s. 1273-1278.
37. Plaut, B., Meakin B. & Davies, D. (1980) The influence of various counter ions on the interaction of chlorhexidine with the hydrophilic contact lens polymer, poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *The Journal of pharmacy and pharmacology*. **32**: s. 453-459.
38. Zorko, M. & Jerala, R. (2008) Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **62**: s. 730-737.
39. Hengitysliitto Heli Ry:n kotisivut. [online, viitattu 27.11.2010]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.muodossa.fi/HomeenDesinfointi/Biosidienkayttojavaikutus/>](http://www.muodossa.fi/HomeenDesinfointi/Biosidienkayttojavaikutus/).
40. Medscape Today. Preservatives in Topical Ophthalmic Medications: Historical & Practical Review of Benzalkonium Chloride. [online, viitattu 27.11.2010]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.muodossa.com/viewarticle/588636_5>](http://www.muodossa.com/viewarticle/588636_5).
41. Iowa State University kotisivut. Sorbic acid by Dr. Murli Dharmadhikari. [online, viitattu 8.4.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.muodossa.edu/NR/rdonlyres/173729E4-C734-486A-AD16-778678B3E1CF/73968/SorbicAcid1.pdf>](http://www.muodossa.edu/NR/rdonlyres/173729E4-C734-486A-AD16-778678B3E1CF/73968/SorbicAcid1.pdf).
42. Lowe, R., Vallas, V. & Brennan, N. (1992) Comparative efficacy of contact lens disinfection solutions. *Contact Lens Association of Ophthalmologists*. **18**: s. 34-40.
43. Ward, M. (2003) Soft Contact Lens Care Products. *Contact Lens Spectrum*; heinäkuu 2003. [online, viitattu 15.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.muodossa.com/article.aspx?article=12384>](http://www.muodossa.com/article.aspx?article=12384).
44. Rutala, W., Weber, D. & the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (2008) Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. [online, viitattu 15.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.muodossa.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/disinfection_nov_2008.pdf>](http://www.muodossa.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/disinfection_nov_2008.pdf).
45. Kiel, J.S. (1993) Protein removal from soft contact lens using disinfection/neutralization with hydrogen peroxide / catalytic disc. *Clinical therapeutics*. **15**: s.30-35.

46. Hughes, R., Dart, J. & Kilvington, S. (2003) Activity of the amidoamine myristamidopropyl dimethylamine against keratitis pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **51**: s. 1415-1418.
47. Stapleton, F., Phillips, A.J. & Hopkins, G.A. (1997) Drugs and solutions in contact lens practice and related microbiology. Teoksessa: Phillips, A.J & Speedwell, L. (toim.), *Contact lenses*. Butterworth – Heinemann, Oxford.
48. Venkatesh, S. (2010) Biotrue multipurpose solution: bringing inspiration to lens care. *Optician*. [online, viitattu 26.11.2010]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.opticianonline.net/Articles/2010/10/01/26380/Biotrue+multipurpose+solution+bringing+inspiration+to+lens.html?key=ACANTHAMOEBA>](http://www.muodossa.com/Articles/2010/10/01/26380/Biotrue+multipurpose+solution+bringing+inspiration+to+lens.html?key=ACANTHAMOEBA).
49. Hom, M. & Bruce, A. (2006) *Manual of Contact Lens Prescribing and Fitting*. Butterworth – Heinemann, St. Louis. 3. Painos. [online, viitattu 16.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://books.google.fi/books?id=jSvLJtyDNTEC&pg=PA381&lpg=PA381&dq=Gasson+%26+Morris.+The+Contact+lens+manual+%281998%29&source=bl&ots=uHxPI5IAK0&sig=jOJVyJFVVJO-kAOqnRBKRTV4sQg&hl=fi&ei=nDgzTdPXC8Txsgbkhrj5CQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CBoQ6AEwAQ#v=onepage&q=Gasson%20%26%20Morris.%20The%20Contact%20lens%20manual%20%281998%29&f=false>](http://books.google.fi/books?id=jSvLJtyDNTEC&pg=PA381&lpg=PA381&dq=Gasson+%26+Morris.+The+Contact+lens+manual+%281998%29&source=bl&ots=uHxPI5IAK0&sig=jOJVyJFVVJO-kAOqnRBKRTV4sQg&hl=fi&ei=nDgzTdPXC8Txsgbkhrj5CQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CBoQ6AEwAQ#v=onepage&q=Gasson%20%26%20Morris.%20The%20Contact%20lens%20manual%20%281998%29&f=false).
50. FDA:n kotisivut. [online, viitattu 24.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.fda.gov/default.htm>](http://www.fda.gov/default.htm).
51. Sosiaali- ja terveystieteiden lupa- ja valvontaviraston kotisivut. (2011) [online, viitattu 23.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa: < http://www.valvira.fi/>](http://www.valvira.fi/).
52. FINLEX® - Valtion säädöstietopankki. Laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista (24.6.2010/629). [online, viitattu 23.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2010/20100629>](http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2010/20100629).
53. SFS-EN ISO 14534:2002. Ophthalmic optics – Contact lenses and contact lens care products – Fundamental requirements.
54. Shoff, M., Joslin, C., Tu, E., Kubatko, L. & Fuerst, P. (2008) Efficacy of Contact Lens Systems Against Recent Clinical and Tap Water *Acanthamoeba* Isolates. *Cornea*. Vol. **27**, No. **6**; s. 713-719.
55. Borazjani, R. & Kilvington, S. (2005) Effect of a Multipurpose Contact Lens Solution on the Survival and Binding of *Acanthamoeba* Species on Contact Lenses Examined With a No-Rub Regimen. *Eye and Contact Lens*. Vol. **31**, No. 1, s. 39-45.
56. Buck, S., Rosenthal, R. & Schlecht, B. (2005) Amoebicidal Activity of Multipurpose Contact Lens Solutions. *Eye and Contact Lens*. Vol. **31**, No. 2, s. 62-66.

Pagen saliini (10x)⁷

Pagen saliini (10x)			
Määrä	Reagenssi	Laatu	Valmistaja
120 mg	NaCl	ACS, ISO, Reag.	J.T. Baker
4 mg	MgSO ₄ · 7H ₂ O	ACS, ISO, Reag.	J.T. Baker
4 mg	CaCl ₂ · 2H ₂ O	Reagent plus >-99,0 %	Sigma Aldrich
142 mg	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	ACS, ISO, Reag.	J.T. Baker
136 mg	KH ₂ PO ₄	ACS, ISO, Reag.	J.T. Baker
1000 ml	H ₂ O	Milli-Q	

Ohjeissa^{7,12} dinatriumvetyfosfaatti oli kidevedetön, mutta käytössäni oli Na₂HPO₄ · 2 H₂O, punnittiin kidevedellistä dinatriumvetyfosfaattia seuraavasti:

$$\frac{M(\text{Na}_2\text{HPO}_4) \times M(2\text{H}_2\text{O})}{M(\text{Na}_2\text{HPO}_4)} = 1,340 \rightarrow 1,34 \times 142 \text{ mg} = 190,28 \text{ mg}$$

Sekoitettiin reagenssit ja autoklavoitiin mediumi (20 min, +121,5 °C).

Pagen saliinin säilytys maksimissaan 6 kk jääkaapissa (+4 °C).

Vähäravinteiset maljat⁷

900 ml Milli-Q-vesi

100 ml Pagen saliini (10x)

15 g Agar Scharlau

Sekoitettiin reagenssit keskenään lämpösekoittajassa ja autoklavoitiin mediumi (20 min, +121,5 °C). Annettiin maljojen jäähtyä hetki, minkä jälkeen valettiin maljat. Maljojen säilytys, parafilmiin käärittyinä maksimissaan 3 kk jääkaapissa (+4 °C).

Fysiologinen suolaliuos

100 ml Milli-Q-vesi

0,9 g NaCl

Punnittiin ensin 0,9 g natriumkloridia, siirrettiin se 100 ml mittapulloon ja täytettiin pullo viivaan asti milli-Q-vedellä. Autoklavoitiin suolaliuos (20 min, +121,5 °C) ja säilytettiin se jääkaapissa käyttöjen välissä.