



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Henri Holmberg

Hopeaa sisältävien pintojen antimikro- bisuuden tutkiminen fluoresenssimikro- skopiolla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

28.05.2021

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Henri Holmberg Hopeaa sisältävien pintojen antimikrobisuuden tutkiminen fluoresenssimikroskopiolla 36 sivua + 4 liitettä 28.05.2021
Tutkinto	Laboratorioanalytiikka (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Jarmo Palm Kehityspäällikkö, FT Kari Soljamo
<p>Antimikrobisia pintoja käytetään torjumaan mikrobiperäisiä infektioita ja niiden leviämistä esimerkiksi sairaaloissa, hoitolaitoksissa ja muissa julkisissa tiloissa. Antimikrobisilla pinnoilla on iso merkitys antibioottiresistenttien bakteerikantojen leviämisen ehkäisyssä. Antibioottiresistentit bakteerikannat aiheuttavat huomattavia sairaanhoitokuluja yhteiskunnalle vuosittain.</p> <p>Opinnäytetyössä tutkittiin fluoresenssimikroskopiolla Isku Interior Oy:n ja Teknos Oy:n valmistamien antimikrobisten pinnoitteiden kykyä tappaa bakteerisoluja. <i>Staphylococcus aureus</i> -bakteerit värjättiin fluoresenssimikroskopiaan tarkoitetulla LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability -värjäyskitillä ja niiden annettiin olla vuorovaikutuksessa antimikrobisen pinnan kanssa. Vaikutusajan jälkeen eläviä ja kuolleita soluja tarkasteltiin fluoresenssimikroskopiolla. Eri antimikrobisten pintamateriaalien tuloksista tehtiin kuvasarjoja ajan funktiona, millä havainnollistettiin pinnoitteiden tehokkuutta <i>S. aureus</i> bakteeria vastaan.</p> <p>Lakka- ja jauhemaalipinnoitteiden antimikrobisuus perustuu hopeaionien käyttöön materiaalissa. Hopean on todettu olevan toksinen mikrobeille sen ionimuodossaan, jolloin hopealla on huomattavasti enemmän antimikrobisia ominaisuuksia, kuin esimerkiksi antibiooteilla. Hopea suurina pitoisuuksina on myrkyllistä ihmiselle, sekä ympäristölle, jonka vuoksi työssä tutkittiin myös hopean vapautumista antimikrobisista pinnoitteista. Tuloksia verrattiin vuonna 2020 tehtyyn IHMEC -hankkeen tuloksiin ja EU:n säätämään raja-arvoon 10 mg/dm² elintarvikkeiden kanssa kosketuksiin joutuville muovimateriaaleille ja tarvikkeille.</p> <p>Antimikrobisten pinnoitteiden tehokkuusmäärittämisen tulokset olivat linjassa aiemmin Bio-Cote Limited -yrityksen tekemän ”86 % reduction in bacteria in just 15 minutes” -tutkimuksen kanssa. Opinnäytetyössä tutkitut pinnoitteet tappoivat 80 % bakteereista 15 minuuttia kestäväällä vaikutusajalla ja 90 % bakteereista oli eliminoitu tunnissa. Bakteerikuolemaa pystyttiin havaita jo heti kontaktin jälkeen antimikrobisten pintojen kanssa. Hopean migraatiotutkimuksen tulokset vastasivat aiemmin tehdyn IHMEC -hankkeessa olevan tutkimuksen tuloksia kyseisille antimikrobisille pintamateriaaleille. Liennut hopeakonsentraatio jäi myös huomattavasti alle EU:n säätämän raja-arvon.</p>	
Avainsanat	Fluoresenssimikroskopia, hopea, antimikrobinen, pintamateriaali

Author Title	Henri Holmberg Antimicrobial Efficacy of Silver Containing Surfaces
Number of Pages Date	36 pages + 4 appendices 28 May 2021
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jarmo Palm, Senior Lecturer FT Kari Soljamo, Development Manager
<p>Antimicrobial surfaces are used to prevent microbial infections and their spreading, for example, in hospitals, health care facilities and other public places. Antimicrobial surfaces play an important role in preventing the spread of antibiotic-resistant bacterial strains. Antibiotic-resistant bacterial strains cause significant medical costs to society every year.</p> <p>In this study, the ability of antimicrobial coatings manufactured by Isku Interior Oy and Teknos Oy to kill bacterial cells was investigated by fluorescence microscopy. <i>Staphylococcus aureus</i> bacteria were stained with a LIVE / DEAD BacLight Bacterial Viability staining kit for fluorescence microscopy and it was allowed to interact with the antimicrobial surface. After the exposure time, living and dead cells were examined with fluorescence microscope. The results of different antimicrobial surface materials were plotted as a function of time to illustrate the efficacy of the coatings against <i>S. aureus</i>.</p> <p>The antimicrobial ability of varnish and powderpainted coatings is based on the use of silver ions in the material. Silver has been found to be toxic to microbes in its ionic form, giving silver significantly more antimicrobial properties than for example antibiotics. Silver in high concentrations is toxic to humans and the environment, which is why the release of silver from antimicrobial coatings was also studied. The results were compared with the earlier made project by IHMEC in 2020 and to the EU limit value of 10 mg/dm² on plastic materials and articles intended to come into contact with food.</p> <p>The results of the efficacy assay for antimicrobial coatings were consistent with the “86% reduction in Bacteria in just 15 minutes” study previously conducted by BioCote Limited. The coatings studied in the thesis work killed 80% of the bacteria within 15 minutes from contact and 90% of the bacteria had been eliminated within an hour. Bacterial death can be observed immediately after contact with antimicrobial surfaces. The results of the silver migration study were in line with the results of the previous study in the IHMEC project for the same antimicrobial surface materials. The dissolved silver concentration was also well below the EU regulation limit.</p>	
Keywords	Fluorescence microscopy, silver, antimicrobial, coated surfaces

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Pinnat infektioiden välittäjinä	2
2.2	Antimikrobiset pinnat	4
2.3	Hopea	6
2.3.1	Hopean vaikutus bakteereihin	6
2.3.2	Hopean ympäristövaikutukset	8
2.3.3	Hopean turvallisuus	9
2.4	Fluoresenssimikroskopia	11
2.5	LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability -värjäys	12
2.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
3	Kokeellinen osio	13
3.1	Antimikrobisen pintamateriaalin tehokkuus	13
3.1.1	Tutkittavat pintamateriaalit	14
3.1.2	Bakteerien kasvatus	14
3.1.3	Elävien ja kuolleiden solujen värjäys	15
3.2	Hopeaionien migraatiotutkimus	16
4	Analysointi	17
4.1	Kvantamisen protokolla	17
4.2	Hopean migraatio	19
5	Tulokset	19
5.1	Antimikrobiset pintamateriaalit	19
5.2	Hopean migraation tulokset	25
6	Tulosten tarkastelu	26
6.1	Pintamateriaalit	26

6.1.1	Aikaväli 0–10 minuuttia	26
6.1.2	Aikaväli 15–60 minuuttia	29
6.2	Hopean migraatio	32
7	Yhteenveto	33
	Lähteet	35
	Liitteet	
	Liite 1. Cultiloop-ohje	
	Liite 2. Hopean liuotus	
	Liite 3. Happopesuohje	
	Liite 4. BioCote:n tutkimus	

Lyhenteet

IHMEC	Indoor Hygiene Middle East Construction. EU:n osarahoittama yhteistyöprojekti, joka keskittyy ennaltaehkäisevään terveydenhuoltoon ja edistää sairaalahygieniaa.
MRSA	Metisilliinille resistentti <i>Staphylococcus aureus</i> . Vastustuskyvyn useita hoidoissa käytettäviä antibiootteja vastaan kehittänyt stafylokokkibakteerikanta.
NaCl	Natriumkloridi. Suolayhdiste.
TSB	Tryptone soy broth. Tryptonisoija-liemi bakteerien kasvatukseen.

1 Johdanto

Opinnäytetyönprojektin aiheena oli tutkia Iskun (Isku Interior Oy) ja Teknos Oy:n valmistamien antimikrobisten jauhemaali- ja lakkapinnoitteiden tehokkuutta. Iskun valmistamia antimikrobisia lakkapinnoitteita käytetään monissa niiden valmistamissa julkisten tilojen huonekaluissa, kuten sairaaloissa, toimistorakennuksissa ja kouluissa. Teknos Oy on taas tunnettu antimikrobisista jauhemaaleistaan. Pintamateriaalien antimikrobisen ominaisuuden merkitys on hyvin tärkeä osa nykypäivänä esimerkiksi antibioottiresistenttien sairaalabakteerikantojen leviämisen ja kehittymisen estämisessä.

Pintamateriaalien tehokkuuden määrittämisessä saatuja tuloksia verrataan BioCote Limited -yrityksen tekemään julkaisemattomaan tutkimukseen. Aikaisemmin tehdyn tutkimuksen mukaan antimikrobinen pintamateriaali onnistui 15 minuutissa vähentämään 86 % pinnan bakteereista ja kahdessa tunnissa määrä oli vähentynyt jopa 97 %. Tehokkuuden määrittämisessä tässä työssä käytetään apuna fluoresenssimikroskopiaa, jonka avulla saadaan visuaalisesti esitettyä bakteerien käyttäytymistä antimikrobisella pinnalla ajan funktiona. Tutkittavat bakteerit värjätään fluoresenssimikroskopiatutkimuksiin tarkoitetulla LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit -väriainekitillä (Thermo Fisher), jolla saadaan erotettua elävät ja kuolleet bakteerit toisistaan. Pintamateriaalin vaikutusta bakteereihin kuvataan mikroskoopilla ennalta määritetyillä aikapisteillä 0, 5, 10, 15, 30 ja 60 minuuttia.

Jauhelakkojen ja vesiohenteisten lakkojen antimikrobiset ominaisuudet perustuvat hopeaionien käyttöön. Hopea toimii toksisena bakteerisoluille vaikuttaen moneen eri solurakenteen osaan samanaikaisesti ja toimii näin ollen hyvin bakteerien ja niiden aiheuttamien infektioiden torjumisessa. Runsaina määrinä hopea on kuitenkin myrkyllistä ihmiselle ja sen käytön turvallisuutta pintamateriaaleissa on tutkittu paljon viime aikoina. Altistuminen pitkäaikaisesti suurille määrille hopeaa voi aiheuttaa vakavia sairauksia ihmiselle, kuten esimerkiksi argyriaa, ja ionimuodossaan se on ympäristömyrky. Opinnäytetyössä tutkitaan myös hopeaionien vapautumista tutkittavista antimikrobisista pintamateriaaleista ympäristöön. Mitatessa hopeaionien mahdollista välittymistä pintamateriaa-

lista ihmiseen saatuja arvoja verrataan IHMEC-hankkeessa saatuihin tuloksiin. Hankkeessa Iskun ja Teknoksen antimikrobisten pintojen vapauttamaa hopeamäärää tutkittiin laboratorio-olosuhteissa.

Tutkittavana kohdebakteerina projektissa oli *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*). *S. aureus* on paljon tutkittu ja mielenkiintoinen bakteeri sen monien antibioottiresistenttien kantojen vuoksi. Se elää noin puolella väestöstä iholla ja limakalvoilla, ja sen leviäminen eteenpäin tapahtuu hyvin helposti kosketuksen välityksellä esimerkiksi julkisissa tiloissa.

2 Teoria

2.1 Pinnat infektioiden välittäjinä

Julkisten tilojen, kuten sairaaloiden, erilaiset kosketuspinnat voivat toimia suurina bakteerien ja virusten aiheuttamien infektioiden levittäjiä. Bakteerien kyky selvitä erilaisilla pinnoilla on hyvin suuri. Gram-positiiviset bakteerit kykenevät selviämään kuivilla pinnoilla jopa kuukausia, kun taas gram-negatiiviset bakteerit kuukausia ja osa vain päiviä (Kuva 1).

Type of bacterium	Duration of persistence (range)
<i>Acinetobacter</i> spp.	3 days to 5 months
<i>Bordetella pertussis</i>	3 – 5 days
<i>Campylobacter jejuni</i>	up to 6 days
<i>Clostridium difficile</i> (spores)	5 months
<i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>C. trachomatis</i>	≤ 30 hours
<i>Chlamydia psittaci</i>	15 days
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	7 days – 6 months
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1–8 days
<i>Escherichia coli</i>	1.5 hours – 16 months
<i>Enterococcus</i> spp. including VRE and VSE	5 days – 4 months
<i>Haemophilus influenzae</i>	12 days
<i>Helicobacter pylori</i>	≤ 90 minutes
<i>Klebsiella</i> spp.	2 hours to > 30 months
<i>Listeria</i> spp.	1 day – months
<i>Mycobacterium bovis</i>	> 2 months
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1 day – 4 months
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 – 3 days
<i>Proteus vulgaris</i>	1 – 2 days
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 hours – 16 months; on dry floor: 5 weeks
<i>Salmonella typhi</i>	6 hours – 4 weeks
<i>Salmonella typhimurium</i>	10 days – 4.2 years
<i>Salmonella</i> spp.	1 day
<i>Serratia marcescens</i>	3 days – 2 months; on dry floor: 5 weeks
<i>Shigella</i> spp.	2 days – 5 months
<i>Staphylococcus aureus</i> , including MRSA	7 days – 7 months
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 – 20 days
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3 days – 6.5 months
<i>Vibrio cholerae</i>	1 – 7 days

Kuva 1. Bakterien selviytymisaajat kuivilla pinnoilla. [1]

Virukset selviävät kuivilla pinnoilla huomattavasti vähemmän aikaa, kuin suurin osa bakteereista. Esimerkiksi norovirukset kestävät vähimmillään vain tunteja, mutta kauimmillaan 7 päivää (Kuva 2). Koronaviruksen kyky säilyä kuivilla pinnoilla on vain kolme tuntia. Bakteereilla ja viruksilla molemmilla ilmankosteus ja lämpötila vaikuttavat niiden selviämiseen. Matala lämpötila (4 °C tai 6 °C) ja korkea ilmankosteus (70 %) edistävät suurimman osan selviytymistä kuivilla pinnoilla. [1.]

Type of virus	Duration of persistence (range)	Source
Adenovirus	7 days – 3 months	[32, 34, 38–41, 111]
Astrovirus	7 – 90 days	[38]
Coronavirus	3 hours	[112, 113]
SARS associated virus	72 – 96 hours	[114]
Coxsackie virus	> 2 weeks	[34, 111]
Cytomegalovirus	8 hours	[115]
Echovirus	7 days	[39]
HAV	2 hours – 60 days	[35, 38, 41]
HBV	> 1 week	[116]
HIV	> 7 days	[117–119]
Herpes simplex virus, type 1 and 2	4.5 hours – 8 weeks	[34, 111, 118, 120]
Influenza virus	1 – 2 days	[39, 43, 121, 122]
Norovirus and feline calici virus (FCV)	8 hours – 7 days	[42, 45]
Papillomavirus 16	> 7 days	[123]
Papovavirus	8 days	[118]
Parvovirus	> 1 year	[118]
Poliovirus type 1	4 hours – < 8 days	[35, 118]
Poliovirus type 2	1 day – 8 weeks	[34, 38, 111]
Pseudorabies virus	≥ 7 days	[124]
Respiratory syncytial virus	up to 6 hours	[44]
Rhinovirus	2 hours – 7 days	[33, 125]
Rotavirus	6 – 60 days	[36 – 38, 41]
Vacciniavirus	3 weeks – > 20 weeks	[34, 126]

Kuva 2. Virusten selviytymisajat kuivilla pinoilla [1].

Kuvassa 1 näkyy, että tutkittavana kohteena oleva *Staphylococcus aureus* voi selvitä jopa seitsemän kuukautta kuivalla pinnalla, ja tämän aikana se voi aiheuttaa monta uutta kontaminaatiota tai infektiota kosketuksen välityksellä. On arvioitu, että 20–40 % sairaalainfektioista johtuu terveydenhuollon työntekijöiden kontaminoituneista käsistä [2]. Tutkimusten mukaan kontaminoituneet kädet voivat levittää viruksia ja bakteereja jopa viiteen uuteen pintaan kosketuksen välityksellä [1].

2.2 Antimikrobiset pinnat

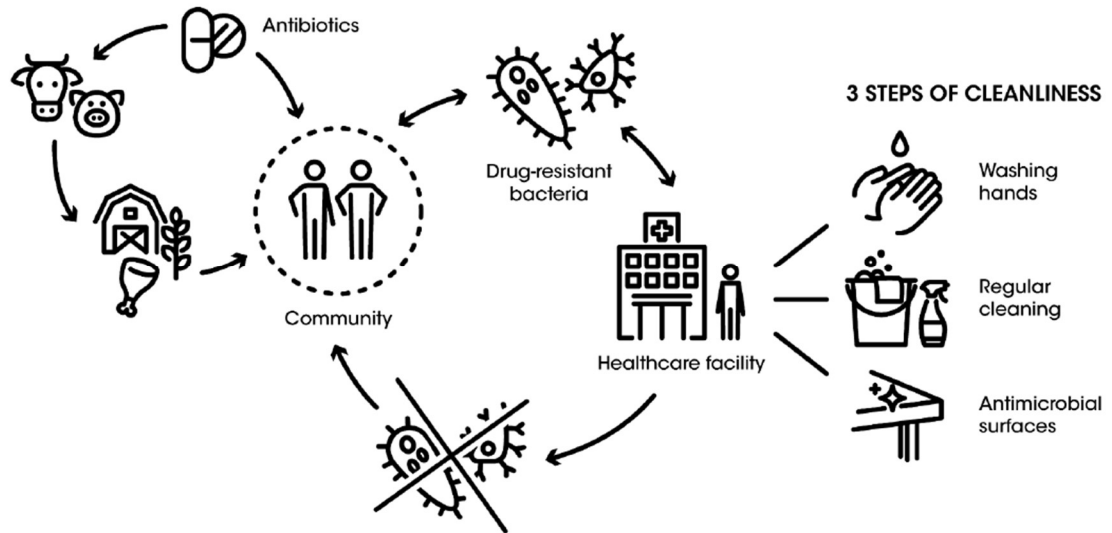
Hopeaa on käytetty jo kauan ehkäisemään erilaisia bakteerien aiheuttamia infektiota. Persian kuningas esimerkiksi säilöi keitetyt vedet joukoilleen hopeapäälysteisissä leileissä lähdetessä sotaan. Ensimmäinen moderni havainto aiheesta on vuodelta 1869, jolloin havaittiin, että *Aspergillus niger* -homesieni ei kyennyt kasvamaan hopeisissa astioissa. [3, s. 1.]

Viime vuosikymmenenä erilaiset resistentit bakteerikannat ovat lisääntyneet. Resistentit bakteerikannat ovat vastustuskykyisiä esimerkiksi erilaisille antibiooteille, kuten tunnettu sairaalabakteeri MRSA (metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus*). *S. aureus* elää noin puolella väestöstä iholla ja limakalvoilla. Täten se leviää helposti esimerkiksi kosketuksen välityksellä. *S. aureus* -bakteerin osalta tunnetaan monta erilaista antibiootti-resistenttiä kantaa. Antibiooteille vastustuskykyiset bakteerikannat aiheuttavat vuosittain Euroopassa noin 33 000 kuolemaa ja ylimääräisiä hoidosta johtuvia yhteiskunnallisia kuluja 1,5 miljardia euroa. [4.]

Resistenttien bakteerikantojen syntymisessä ja leviämisen estämisessä antimikrobiset pinnat tulevat merkittävänä tekijänä esiin. Sairaaloissa ja hoitolaitoksissa on paljon erilaisia kosketuspintoja, joiden kautta bakteerien on helppo levitä ihmisestä toiseen. Lisäksi bakteerien selviäminen sairaalan sisällä, lisää eri antibiooteille resistenttien kantojen syntymistä. Antibiooteille resistentit kannat ovat uhka yhteiskunnalle, mikäli ne pääsevät leviämään hallitsemattomasti yhteisöön sen ulkopuolella. Kuvassa 3 on esitetty antibioottiresistenttien bakteerien synty ja keinoja bakteerien leviämisen estämiseksi. [4; 5.]

Iskun Apila-terveysasemalla Lahdessa otettiin käyttöön vuonna 2016 hopeafosfaattilasia sisältäviä ja myös kuparista valmistettuja kosketuspintoja. Pintoja käytettiin eri huonekaluissa, kuten tuoleissa, tuolien käsinojissa ja pöydissä. Näiden avulla onnistuttiin vähentämään keskimäärin 57 % pinnoilla olevista bakteereista. [6, s. 9.]

Antimikrobiset pinnat voivat myös olla tärkeitä, kun halutaan minimoida sairastumisien aiheuttamia poissaoloja kouluilla ja työpaikoilla. BioCoten vuonna 2017 tekemä tutkimus Englannissa, jossa toimistotilan pöydät sekä asiakastuolit olivat pinnoitettu antimikrobisilla materiaaleilla Iskun toimesta, osoitti bakteerimäärien pienenevän antimikrobisilla pinnoilla. Iskun antimikrobiset pinnoitteet onnistuivat vähentämään 95 % bakteereista työpöydillä ja 80 % tuoleilla verrattuna referenssipintoihin, jotka eivät olleet antimikrobisia. Tutkimuksessa painotettiin myös, ettei antimikrobisten pintojen tarkoitus ole vähentää hyvää käsihygieniaa, vaan edistää hyvinvointia vähentämällä sairastumista ja infektioiden leviämistä yhteisössä ja julkisissa tiloissa (Kuva 3). [7.]



Kuva 3. Bakteerien kierto ja niiden torjuminen [6].

2.3 Hopea

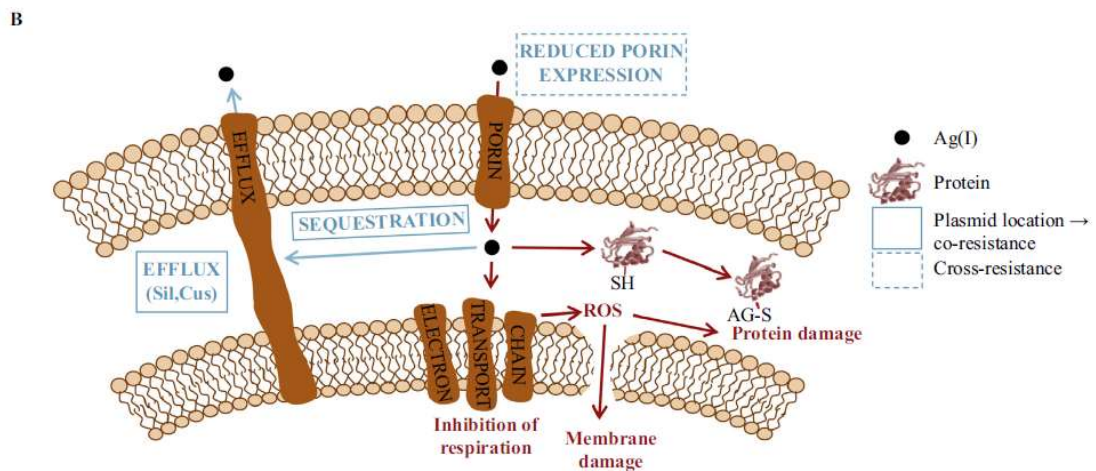
2.3.1 Hopean vaikutus bakteereihin

Verrattuna antibiootteihin, joiden vaikutusmekanismi kohdentuu tiettyyn mikrobin solurakenteeseen inhiboiden sitä, hopeaionit vaikuttavat moneen eri solun toimintaa ylläpitävään rakenteeseen samanaikaisesti. Tämän takia hopeaionit ovat hyvin tehokkaita mikrobien torjumisessa. Hopeaionin monivaikutteisuus mikrobisoluun on myös yksi tärkeimmistä syistä, miksi mikrobien on hyvin vaikea kehittää resistenssiä sitä vastaan. Resistenssin kehittyminen mikrobeille antibiootteja vastaan on helpompaa, kun niiden toimintamekanismin keskittyy vain yhteen solurakenteeseen tai sen toimintaan. [3; 8.]

Hopeaionien, (Ag^+), yksi vaikutuskohteista on solussa olevat entsyymiproteiinit. Entsyymiproteiinien rakenteessa on tioliryhmiä (-SH), joissa rikkiatomi on sitoutunut vetyatomiin. Hopean on todettu sitoutuvan proteiinin tioliryhmän kanssa (Kuva 4), mikä estää disulfidi-sidosten muodostumista, aiheuttaen proteiinin kolmiulotteisen rakenteen vää-

ränlaisen laskostumisen [8]. Entsyymiproteiinien toiminnalle on hyvin tärkeää niiden kolmiulotteisen rakenteen muoto. Pienikin muotoa vaurioittava tai muuttava tekijä vaikuttaa entsyymin toimintaan inhiboiden sitä.

Esimerkiksi hopeaionien muodostamat sidokset solukalvolla olevien proteiinien tioliryhmien kanssa, häiritsevät kyseisen solun energiatuotantoa, hengitysketjua ja solulle tärkeiden ionien kuljetusta solusta sisään ja ulos [8]. Tästä aiheutuu hopeaionien muodostamien vapaiden happiradikaalien, eli reaktiivisten happilajien (ROS), muodostuminen mikrobin sytoplasmassa. Nämä vapaat radikaalit vahingoittavat suoraan soluseinämää tehden sen rakenteesta huokoisen (Kuva 4). Huokoinen rakenne aiheuttaa solussa olevien solutoimintaa ylläpitävien ainesosien karkaamisen ulos solusta, mikä johtaa solukuolemaan. [8; 4.]



Kuva 4. Hopean vaikutus solukalvoon ja sitoutuminen proteiinimolekyylien tioliryhmiin. Bakteerisolu voi myös vähentää poriinikuljetuskanavien määrää solukalvolla ja pyrkiä aktiivisesti pumppaamaan hopeaa pois periplasmisesta tilasta puolustautuakseen hopealta. [4.]

Hopeaionien toinen tapa inhiboida mikrobien solutoimintaa on sen vaikutus DNA:han. DNA:ssa olevat vastakkaisten juosteiden emäsparit ovat sitoutuneet toisiinsa vetysidoksilla, aiheuttaen DNA:n kaksoiskierrerakenteen. Hopeaionien läsnä ollessa muodostuu interkalaatio nukleotidien ja niitä yhdessä pitävien vetysidosten välille, joka johtaa DNA-molekyylin denaturoitumiseen ja toimintahäiriöihin DNA:n transkriptiossa ja replikaatiossa. [8.]

Yllä olevat mekanismit ovat kaksi tutkituimpia ja tehokkaimpia hopeaionien mekanismeja mikrobeja vastaan. Lisäksi on muita vähemmän tutkittuja ja ymmärrettyjä antimikrobisia mekanismeja:

- Hopeaioneilla on häiritsevä vaikutus solukalvon kalvopotentiaaliin, mikä aiheuttaa kaliumionien (K^+) vapautumista.
- Hopea on heikko happo, joten se reagoi heikkojen emästen kanssa. Mikrobisoluissa on hyvin paljon heikkoja emäksiä, jotka reagoivat hopeaionien kanssa aiheuttaen lopulta solukuoleman.
- Hopeaionit voivat vaikuttaa mikrobisolujen signalointiin.
- Niin kutsuttu ”zombi-efekti”, jossa hopeaionien tappamat bakteerisolut jäävät vaikuttamaan elossa olevaan samaan bakteeripopulaatioon antimikrobisesti. Tämä johtuu siitä, että hopeaionit eivät deaktivoitu antimikrobisessa prosessissa, vaan jatkavat antimikrobista toimintaansa, kun kuolleet bakteerisolut vapauttavat ne elävien bakteerien populaatioon ympärillään.

Suurin osa hopean antimikrobisista ominaisuuksista vaatii Ag^+ -ionien kulkeutumista solun sytoplasmaan. Hopeaionien, kuten muidenkin ionien, kulku sisälle mikrobisoluun on mahdollista solukalvoproteiinien kautta. Hopeaioneille ei ole tiettyä omaa solukalvoproteiinkanavaansa soluun sisään, mutta tutkimukset ovat osoittaneet, että esimerkiksi *Enterococcus hirae*-bakteerin solukalvoproteiini, CopB-ATPaasi, kuljettaa hopeaioneita soluun sisään, vaikka sen tehtävä onkin kuljettaa kupari-ioneja. [8.]

2.3.2 Hopean ympäristövaikutukset

Hopeaa käytetään moniin eri tarkoituksiin ympäri maailmaa. On arvioitu, että vuosittain käytetään noin 7 500 tonnia hopeaa tietokoneiden, puhelimien ja älytablettien valmistuksessa. Suuren hopeamäärän käytöstä huolimatta lähes mitätön määrä hopeasta päätyy luontoon erilaisten kierrätys- ja suodatusmenetelmien kautta. [9.]

Hopean on todettu olevan myrkyllistä vain sen ionimuodossa, (Ag^+), joka yleisesti muodostuu vain vesifaasissa. Ionimuodossa hopea toimii myös toksisena bakteereille. Ympäristön suojelemisen kannalta on tärkeää estää hopeaa muodostamasta vapaita ioneja tai koettaa sitoa niitä talteen. Vedenpuhdistuslaitoksilla hopea sitoutuu sedimentissä oleviin vapaisiin tioliryhmiin muodostaen hopeatiosulfaatti-yhdisteitä, jotka ovat suurinakin pitoisuuksina hyvin matalatoksisia yhdisteitä ympäristölle. Tästä hopeatiosulfaatti-yhdisteet matkaavat kohti sekundääristä vedenpuhdistamoja, jossa suurin osa hopeatiosulfaatti yhdisteistä kompleksoituu hopeasulfidiksi. Hopeasulfidi on tutkitusti vähiten toksinen hopeayhdiste sen huonon liukenemiskyvyn ja biosaatavuuden takia. Vedenpuhdistusprossien jälkeen lähes kaikki jätevesiin päässeet hopeaionit on saatu muutettua turvalliseksi yhdisteiksi, joilla ei ole biologista vaikutusta ympäristöön. [9.]

Puhdistamoilta lähtiessään hopea laimenee eri vesireittejä pitkin hyvin pieniin pitoisuuksiin. Makeanveden pohjaliejututkimuksissa ilmentyneet hopeapitoisuudet eivät olleet toksisia ympäristöille. [9.]

2.3.3 Hopean turvallisuus

Hopeaioneja sisältävien pintamateriaalien käyttö tulee olla turvallista ihmisille ja ympäristölle. Antimikrobisten pinnoitteiden valmistajien tulee tutkimusten avulla määrittellä hopeaionien pitoisuus materiaaleissa niin, että materiaalien tehokkuus pysyy hyvänä eikä sillä ei ole haittavaikutuksia ympäristöön. Antimikrobisissa materiaaleissa yleensä hopeaionikonsentraatiot ovat hyvin pieniä (5×10^{-6} ng/l). Suurin osa bakteereista kuolee jo hyvin pieneen määrään hopeaioneja, 5-10 ng/l. [9.]

Hopeaionien vapautuminen materiaalista riippuu monesta eri tekijästä. Ilmankosteus, lämpötila, pinnoitetun materiaalin olomuoto ja sen käyttötarkoitus määrittelevät laajalti, kuinka paljon hopeaioneja irtoaa ympäristöön. Vain osa pinnoitteissa olevista hopeaioneista on käytössä antimikrobiseen vuorovaikutukseen tai voi vapautua ympäristöön [9]. Vapautumisesta ja antimikrobisen tehokkuuden säilymisestä on tutkimustuloksia laboratorio-olosuhteissa, esimerkiksi aiemmin mainitussa IHMEC-hankkeessa, jossa olosuhteet olivat kontrolloituja.

IHMEC-hankkeessa tutkittiin hopeaionien käytön turvallisuutta Iskun antimikrobisessa lakkapinnoitteessa ja Teknoksen jauhelakka-pinnoitteissa yksin- ja kaksikertaisilla hopeamäärillä. Tutkimuksessa mitattiin pinnoitteista irtoavaa hopeaionien määrää käyttäen apuna grafiittiuuniatomiabsorptiospektrometriaa. Näytteiden liuotus suoritettiin laboratoriossa, jossa simuloitiin sisätiloissa tapahtuvaa ihokontaktia näytepinnan kanssa. Osassa liuotuksia käytettiin analyysihikeä, joka oli valmistettu EN1811. standardin (Reference test method for release of nickel from all post assemblies which are inserted into pierced parts of the human body and articles intended to come into direct and prolonged contact with the skin) mukaisesti. Tutkimuksessa näytepaloja liuotettiin 0, 1, 7, 14 ja 28 päivää.

Vain harva IHMEC-hankkeessa tutkituista näytteistä vapautti hopeaa menetelmän määritysrajan ylittäen. Näytteitä analysoitiin 81 kappaletta, ja Iskun näytteissä neljässä määrityksen alaraja ylittyi ja Teknoksen jauhelakkanäytteissä yhdeksässä. Teknoksen antimikrobisessa jauhelakassa, jossa hopeapitoisuus oli kaksinkertainen, ilmeni lähes kaikkien pintojen osalta mitattavia arvoja hopeaioneja. Tutkimuksessa pinnoitteista irronneiden hopeaionien pitoisuudet jäivät kuitenkin paljon alle EU:n säätämän raja-arvon (COMMISSION REGULATION (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food) 10 mg/dm^2 [10]. Useimpien näytteiden pitoisuudet jäivät luokkaan $<0,0004 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$.

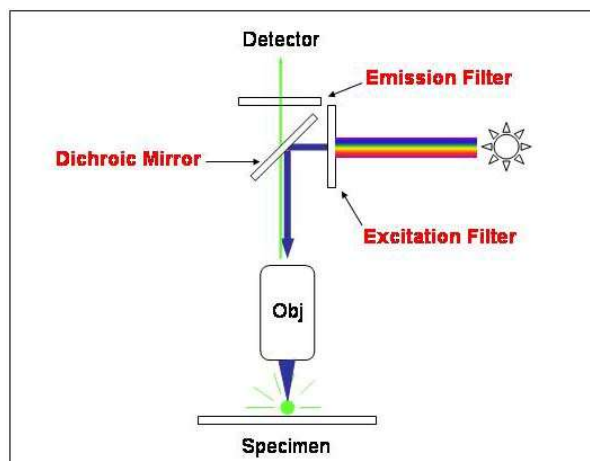
Hopeaionien irtoaminen pinnoitteista ei kuitenkaan laske niiden tehokkuutta. Hopeaionien irrotessa pinnoitteen pinnalta materiaalin vapailla ioneilla on kyky korvata pinnalta irtoava hopeaioni, ja täten materiaali säilyttää tehokkuuden käyttötarkoituksessaan [9]. BioCote-limited yrityksen tekemässä antimikrobisten pintojen tutkimuksessa vuonna 2017 laboratorio-olosuhteissa simuloitiin 25 vuoden elinkaarta pintamateriaaleilla sääolosuhteita ja materiaalin räsitystä säätelemällä. Pinnoitteiden tehokkuus mitattiin tämän jälkeen uudelleen kahdella bakteerilla: *S. aureus* ja *Escherichia coli*. Bakteerit altistettiin antimikrobiselle pinnoitteelle ja 24 tuntia altistumisesta noin 99,9 % bakteereista oli kuolleet. [11.]

2.4 Fluoresenssimikroskopia

Fluoresenssimikroskopiassa käytetään hyväksi fluorokromeja, eli väriaineita, jotka absorboivat valolähteen lähettämää ultraviolettisäteilyä. Fluorokromit vapauttavat osan ultraviolettivalon sidotusta energiasta fluoresenssina eli pidempinä aallonpituuksina, jotka voidaan havaita mikroskopoidessa.

Fluoresenssimikroskoopissa valonlähteinä käytetään elohopeahöyrylamppua, ksenonlamppua tai LED-lamppua. Elohopeahöyrylamppun toiminta perustuu siihen, että sitä lämmitetään sähkövirralla, jolloin elohopea lämpenee ja alkaa höyrystyä. Tästä aiheutuva paineesta alkaa muodostumaan sähkömagneettista säteilyä, joka pääosin on UV-säteilyä.

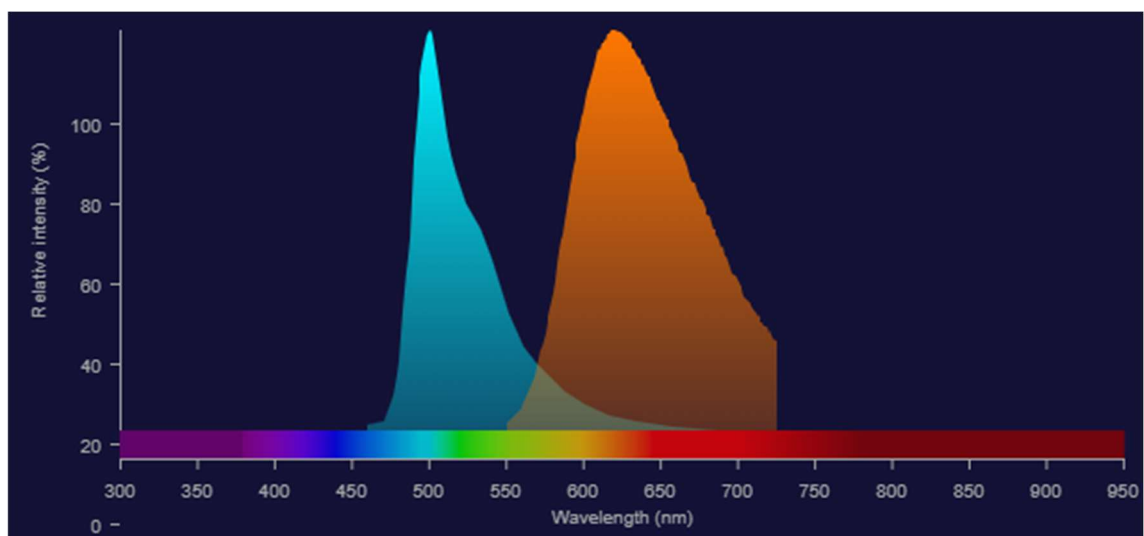
Valonsäteet kulkevat eksitaatiosuodattimen läpi, jonka tehtävänä on ohjata vain tutkitun fluorokromin eksitaatioaallonpituudella olevaa valoa näytteeseen. Säteilyn kohdatessa fluorokromit, niiden fluorokromien elektronit virittyvät. Kun virittyneiden elektronien energiatila laskee ne emittoivat valoa. Jotta fluorokromien emittoima valo voitaisiin havaita, sen täytyy kulkea vielä emissiosuodattimen läpi. Emissiosuodatin päästää lävitseen fluorokromien vapauttamista aallonpituuksista vain pisimmät ja halutut. [12; 13; 14.]



Kuva 5. Havainnollistava kuva fluoresenssimikroskoopin toiminnasta [12].

2.5 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability -värjäys

Tutkittaessa eläviä ja kuolleita bakteereja tutkimuksessa käytettiin Thermofisherin valmistamaa värjäyskittiä (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit Protocol Cat. L7007). Kitin avulla elävät ja kuolleet bakteerit erottuvat toisistaan tutkittaessa fluoresenssimikroskoopilla. Kitti sisältää kaksi väriainetta. SYTO 9-väriaine värjää kaikki solut ja eksitaatioaallonpituudella 480 nm emittoi kirkkaan vihreää valoa aallonpituudella 500 nm (Kuva 6). Propiumjodidi-väriaine värjää vain kuolleet solut ja eksitaatioaallonpituudella 490 nm emittoi kirkkaan punaista valoa aallonpituudella 635 nm (**Virhe. Viitteen lähdeä ei löytynyt.**) [15; 16; 17].



Kuva 6. SYTO 9- (sininen) ja propiumjodidi-väriaineiden (oranssi) emissiospektrit [17].

Molemmat väriaineet värjäävät solujen nukleiinihappoja ja niiden toiminta perustuu siihen, että propiumjodidi pääsee solun sytoplasmaan vain vaurioituneesta solukalvosta. Propiumjodidin tunkeutuessa solukalvon sisälle, se aiheuttaa SYTO 9-väriaineen fluoresoivan vaikutuksen syrjäytymisen, jolloin solu havaitaan punaisena mikroskoopilla [18]. Syrjäytymishetkellä otetuissa yhdistetyissä kuvissa voidaan havaita keltaiseksi värjäytyneitä soluja. Keltainen väri johtuu siitä, että propiumjodidi-väriaine ei ole kokonaan syrjäyttänyt solun sisällä olevaa SYTO 9-väriainetta. Solut voidaan luokitella silti kuolleiksi,

koska niiden solukalvo on tuhoutunut mahdollistaen propiumjodidin kulkeutumisen sytoplasmaan. [19].

2.6 *Staphylococcus aureus*

Tutkimuksessa käytettiin *S. aureus* -bakteeria. *S. aureus* on yleinen ihmisen iholla ja limakalvoilla elävä gram-positiivinen kokkibakteeri ja noin joka toinen ihminen kantaa sitä. Sen erittämä enterotoksiini on myrkyllistä ihmiselle ja voi päästä elimistöön esimerkiksi ruuan kautta. Lisäksi *S. aureus* on opportunistipatogeeni ja voi aiheuttaa vakavia haavainfektioita. Kasvaessaan se muodostaa liikkumattomia ryppäitä, jotka voi helposti havaita mikroskoopilla. [20; 21].

S. aureus -bakteerilla on hyvin monta antibioottiresistenttiä kantaa, ja se voi kehittää myös resistenssiä hopeaa vastaan. Tunnetuin antibiooteille resistentti kanta on MRSA. Kyseiselle kannalle on kehittynyt vastustuskyky yleisiä hoidossa käytettäviä antibiootteja vastaan. MSRA-tartunnan saaneille haavojen yleisin hoitotapa on hopeaionien ja jodin käyttö antiseptisinä aineina, kun muut antibiootit eivät tehoa. Antimikrobisten pintojen merkitys on siis suuri torjuttaessa antibioottiresistenttejä bakteereita. [5].

3 Kokeellinen osio

3.1 Antimikrobisen pintamateriaalin tehokkuus

Kaikki laboratoriossa tehdyt työvaiheet tuli suorittaa aseptisesti ja steriileillä työvälineillä. Valmistetut reagenssit ja liuokset tuli autoklavoida, jotta välttyttäisiin kontaminaatiolta bakteerien kasvatusvaiheessa. Pintamateriaalien tehokkuuden määrittämiseen sekä hopean migraatioon liittyvät laboratoriotyöt, työvälineet ja reagenssit on esitelty seuraavissa (ala)lukuissa

3.1.1 Tutkittavat pintamateriaalit

Tutkimuksessa tarkasteltiin hopeakonsentraation vaikutusta antimikrobisuuden tehokkuuteen pintamateriaaleissa. Teknos Oy toimitti ja valmisti tutkittavat jauhelakkapinnoitetut peitinlasit. Peitinlasit on valmistettu kvartsilasista, joka kestää pinnoitusprosessissa käytettävän korkean lämpötilan (190 °C). Jauhelakkapinnoitteisissa peitinlaseissa käytettiin hopeafosfaattilasia antimikrobisena aineena 1- ja 2-kertaisilla konsentraatioilla. Referenssipintamateriaalina käytettiin jauhelakkalakkapäällysteistä pinnoitetta (DA40110), johon ei ollut lisätty hopeaa, sekä pelkkää borosilikaatista valmistettua objektilasia.

Jauhelakkamaalatut peitinlasit oli nimetty tutkimuksessa seuraavalla tavalla:

DA40110 Referenssilakka ilman hopeaa (Nimetty: D10)

DA40022/2 AMI-lakka hopealla (Nimetty: D22)

DA40022/3 AMI-lakka 2-kertaisella hopealla (Nimetty: D23)

Lisäksi tutkimuksen kohteena oli Iskun valmistama antimikrobinen hopeakloridia sisältävä lakkapinnoite.

3.1.2 Bakteerien kasvatus

Bakteerien kasvatus aloitettiin aina tuoreesta jääkapissa säilytetystä bakteerikannasta (*S.aureus* ATCC 6538™). Tutkimuksessa havaittiin *S. aureuksen* kiinnittyvän tutkittavaan peitinlasiin huomattavasti paremmin kuin *E. coli* -bakteerin, joten sitä käytetään tässä työssä. Kanta elvytettiin siirrostussilmukalta (CultiLoops) aluksi veriagarmaljalle. Elvyttäminen tapahtui siirrostusilmukoiden mukana tulleen ohjeen mukaisesti (Liite 1).

Seuraavana päivänä bakteerikantaa siirrostettiin kasvamaan steriiliin tryptonisoija-licmeen (TSB), joka valmistettiin kahden viikon välein uudelleen. Veriagarmaljalta otettiin

steriilillä 1 µl:n siirrostussilmukalla silmukallinen bakteerikasvustoa ja se siirrettiin steriiliin erlenmeyeriin, jossa oli 50 ml TSB-lientä. Siirrostuksen jälkeen Erlenmeyeria inkuboitiin ravistelussa 24 tuntia 37 °C:ssa.

Seuraavana päivänä suoritettiin bakteerien kasvatus peitinlaseille steriileissä 6-kuoppalevyissä (Sarstedt AG & Co. Cat. 83.3920). Levyjen kuoppien pohjalle asetettiin steriloitu 18 x18 mm peitinlasi, johon tutkittavan bakteerin haluttiin kiinnittyvän. Sterilointi tapahtui kastamalla peitinlasit 96-% (V/V) etanolilla ja tämän jälkeen liekittämällä peitinlasi kuivaksi käyttäen apuna bunsen-liekkiä.

Peitinlasien päälle siirrostettiin steriilillä mittapipetillä 500 µl kasvatettua bakteerisuspensiota. Tämän jälkeen lisättiin kuoppaan 3 ml steriiliä TSB-lientä. Kontaminaation ehkäisemiseksi kaikki työvaiheet on hyvä suorittaa laminaarikaapissa.

Valmiit 6-kuoppalevyt siirrettiin takaisin niiden mukana tulleisiin paketteihin ja pakettien suuaukko suljetaan teipillä, jotta kuopissa oleva bakteerisuspensio ei pääse kuivumaan inkuboinnin aikana. Valmiita 6-kuoppalevyjä inkuboidaan 24 tuntia 37 °C:ssa.

3.1.3 Elävien ja kuolleiden solujen värjäys

Väriaine valmistettiin joka kerta ennen mikroskopointia. Valmistus tehtiin väriainekitin (LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit Cat. L7007) mukana tulleesta ohjeesta hieman poiketen [12]. Värjätessä molemmilla väriaineilla samanaikaisesti bakteerisolut havaittiin propiumjodidi-signaalin vuoto käytössä olleella emissiosuodattimella SYTO 9 -signaalin puolella. Tämän seurauksena kaikki kuolleet bakteerisolut näkyivät vihreinä SYTO 9 -signaalia tarkasteltaessa. Tästä syystä duaalivärjäyksen sijasta elävät ja kuolleet solut värjättiin erikseen.

Propiumjodidi luokitellaan mahdolliseksi mutageeniksi, eikä SYTO 9:n toksisuudesta tai mutageenisyydestä ei ole vielä tutkittua tietoa. Tämän takia käsitellessä kantaliuoksia suositellaan käytettävän kaksia nitrilikäsineitä.

Väriainekittiä säilytetään pimeässä ja pakkasessa noin -20 °C:ssa. Ennen pipetointia väriainekitti otetaan sulamaan ja kun se on sulanut, on väriaineet hyvä sentrifugoida. Kumpaakin väriainetta pipetoidaan 1,5 µl eppendorf-putkiin ja niihin lisätään steriloitua 0,85-prosenttista NaCl-liuosta. Valmista väriaineseosta tulee säilyttää pimeässä ja tähän voi käyttää apuna foliota. Sen avulla eppendorf-putket on helppo suojata valolta, kun niitä ei käytetä.

3.2 Hopeaionien migraatiotutkimus

Hopeaioneiden liuotusta varten tarvittava keinotekoinen hiki valmistetaan standardin (EN1811 ASW, Bioaccessibility of nickel and cobalt in powders and massive forms of stainless steel, nickel- or cobalt-based alloys, and nickel and cobalt metals in artificial sweat) mukaan. Lisäksi kaikkien astioiden happopesua varten noudatetaan (EPA 200.8 Determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma - mass spectrometry) -ohjetta pesun suhteen. Tarkka laboratoriotyömenetelmä on esitelty liitteessä 2.

Liuotus suoritetaan kolmelle aikapisteelle, (1 pv, 1 vk ja 2 vk), ja kolmelle eri antimikrobiselle pinnoitteelle (DA40022/2, DA40022/3 ja Iskun antimikrobinen lakka). Jokaiselle aikapisteelle valmistetaan myös oma nollanäytteensä ja näytesarjan mukana valmistetaan kaksi positiivista kontrollinäytettä, jotka sisältävät tunnetun määrän hopeaa.

Työssä tarvittavat reagenssit:

- NaCl (MERCK pro analysi Sodium chloride, Lot: K34243404 504)
- urea (Riedel-de Haën Urea analytical reagent, Lot: 10940, Assay: 99,5%)
- maitohappo (J.T.Baker Lactic Acid, Lot: 9726210002)

- Etalon multi element ICP (VWR Chemicals, Ag 1000 mg/l, Lot: 87629180).

4 Analysointi

Fluoresenssimikroskoopin (Zeiss Axio Imager A1) emissiosuodattimina toimivat kuvauksissa FITC (424931) ja TRITC (424931). SYTO 9-väriaineelle käytettiin emissioaallonpituutta 525 nm käyttäen FITC-emissiofilteriä ja propiumjodidille 615 nm käyttäen TRITC-emissiofilteriä. Valotusajaksi asetettiin SYTO 9:lle 200 ms ja propiumjodidille hieman enemmän 300 ms, sillä punainen väri havaitaan himmeämmin mikroskoopilla kuin vihreä. Mikroskoopista säädettiin valon intensiteetti minimille, sillä lampun voimakas UV-viritysvalo olisi muuten polttanut väriaineen loppuun välittömästi. Näytteistä otettiin kuvia ProgRes CapturePro-ohjelmalla (Jenoptik) ja mikroskooppiin liitetyllä kameralla ProgRes SpeedXT^{core5} (Jenoptik).

4.1 Kuvantamisen protokolla

Ensimmäisenä tarvittavat objektilasit asetettiin vierekkäin laminaarikaapissa. Lasit merkittiin huolellisesti aikapisteiden (0, 5, 10, 15, 30 ja 60 minuuttia) ja niiden päälle laitetun antimikrobisen pinnan (D10, D22, D23 ja antimikrobinen lakka) mukaan. Objektilasin päälle tiputettiin tippa vettä ja tämän päälle asetettiin tutkittava antimikrobinen pinnoitettu peitinlasi. Veden oli tarkoitus kiinnittää tutkittava ohut peitinlasi objektilasin päälle, sillä immersioöljyä käytettäessä objektiivilinssin liikuttaminen aiheuttaa ohuen peitinlasin irtaamisen objektilasista, jolloin sen päällä oleva peitinlasi tarrautuu kiinni objektiivilinssiin. Pinnoitetun peitinlasin päälle tulee myöhemmin 6-kuoppalevyissä bakteerisuspensiossa inkuboitu peitinlasi.

Inkuboiduista 6-kuoppalevyn kaivoista tyhjennettiin bakteerisuspensio yksi kaivo kerrallaan ja siellä ollut peitinlasi nostettiin pinseteillä kaivosta. Peitinlasi huuhdeltiin 0,85-prosenttisella NaCl-liuoksella käyttäen steriiliä pasteur-pipettiä. 3 x 2 ml:n huuhtelu riittää poistamaan kiinnittymättömät bakteerit peitinlasin pinnalta. Huuhtelu on tärkeä muistaa,

sillä muuten mikroskopoidessa irtonaiset bakteerit virtaavat väriaineen seassa hankaloit-
taen kuvantamista. Peitinlasin pinnalta kuivattiin ylimäärä NaCl-liuosta asettamalla lasi
pystyyn suodatinpaperin päälle pinseteillä, jolloin liuos imeytyi paperiin. Peitinlasi jätettiin
tämän jälkeen suodatinpaperin päälle, bakteeripuoli ylöspäin.

Seuraavaksi peitinlasi, johon bakteerit ovat kiinnittyneet, käsiteltiin toisella valmistetuista
väriainelaimennoksista. 2–3 pisaraa väriainelaimennosta lisättiin niin, että se levisi mah-
dollisimman laajalti peitinlasin päälle. Väriaineen inkubointiaika bakteerien kanssa tulee
olla 15 minuuttia ja värjäys suoritetaan valolta suojassa tämän aikana. Halutulla väriai-
neella värjättiin vain yksi peitinlasi kerrallaan yhdelle tutkittavalle vaikutusajalle. Esimer-
kiksi kun kuvataan antimikrobisen pinnan vaikutusta eläviin bakteerisoluihin 10 minuutin
mittaisen vuorovaikutuksen jälkeen, väriaineella käsitelty peitinlasi käännetään viisi mi-
nuuttia väriainekäsittelyn jälkeen vastakkain antimikrobisen pinnan kanssa. 10 minuutin
kuluttua valmisteltu preparaatti on valmis kuvattavaksi. Valmisteltaessa 30 ja 60 minuutin
näytteitä, lisättiin pasteur-pipetillä kolme pisaraa 0,85 % NaCl -liuosta antimikrobiselle
pinnalle ja bakteereja sisältävä peitinlasi käännettiin tämän päälle. 15 minuuttia ennen
vaikutusajan loppua nostettiin peitinlasia varovasti sen reunasta pinseteillä ja sen väliin
lisättiin väriainelaimennosta 2–3 pisaraa. Tutkittavan pintamateriaalin ja peitinlasin väliin
tulee jäädä liuosympäristö koko vaikutusajan ajaksi, johtuen hopean antimikrobisesta
ominaisuudesta sen ionimuodossaan.

Toisena referenssipintana käytettävän pinnoittamattoman objektilasin valmistelu tehtiin
kuten edellä on mainittu. Tässä peitinlasi, johon bakteerit ovat kiinnittyneet, asetetaan
pelkästään objektilasin päälle.

Fluoresenssimikroskoopin näytepöydällä peitinlasin päälle asetettiin varovasti suodatin-
paperi, jonka avulla ylimäärä pintojen välissä olevaa väriainelaimennosta imeytyi pape-
riin. Näin vältettiin bakteerien liikkuminen mikroskopoidessa. Mikroskoopin emissiofilteri
valittiin riippuen siitä, kuvataanko kuolleita vai eläviä bakteerisoluja. Käyttäen 40-ker-
taista objektiivilinssiä etsittiin peitinlasilta kohta, jossa ei olisi taustalla fluoresoivia partik-
keleita. Etsimisessä tulee olla mahdollisimman nopea, sillä mikroskoopin UV-säteily on
bakteereille toksinen. Kohdan löydyttyä, lisättiin peitinlasin päälle fluoresenssimikrosko-
piaan soveltuvaa immersioöljyä (Merck Cat. 103699) ja vaihdettiin 63-kertainen objek-
tiivisuurenos. Mikroskoopin kuva tarkennettiin ja preparaattista otettiin kuva käyttäen

ProgRes CapturePro -ohjelmistoa, jonka taustakohinaa peittävän ominaisuuden avulla voitiin häivyttää tutkittavien pintamateriaalien fluoresoiva tausta.

4.2 Hopean migraatio

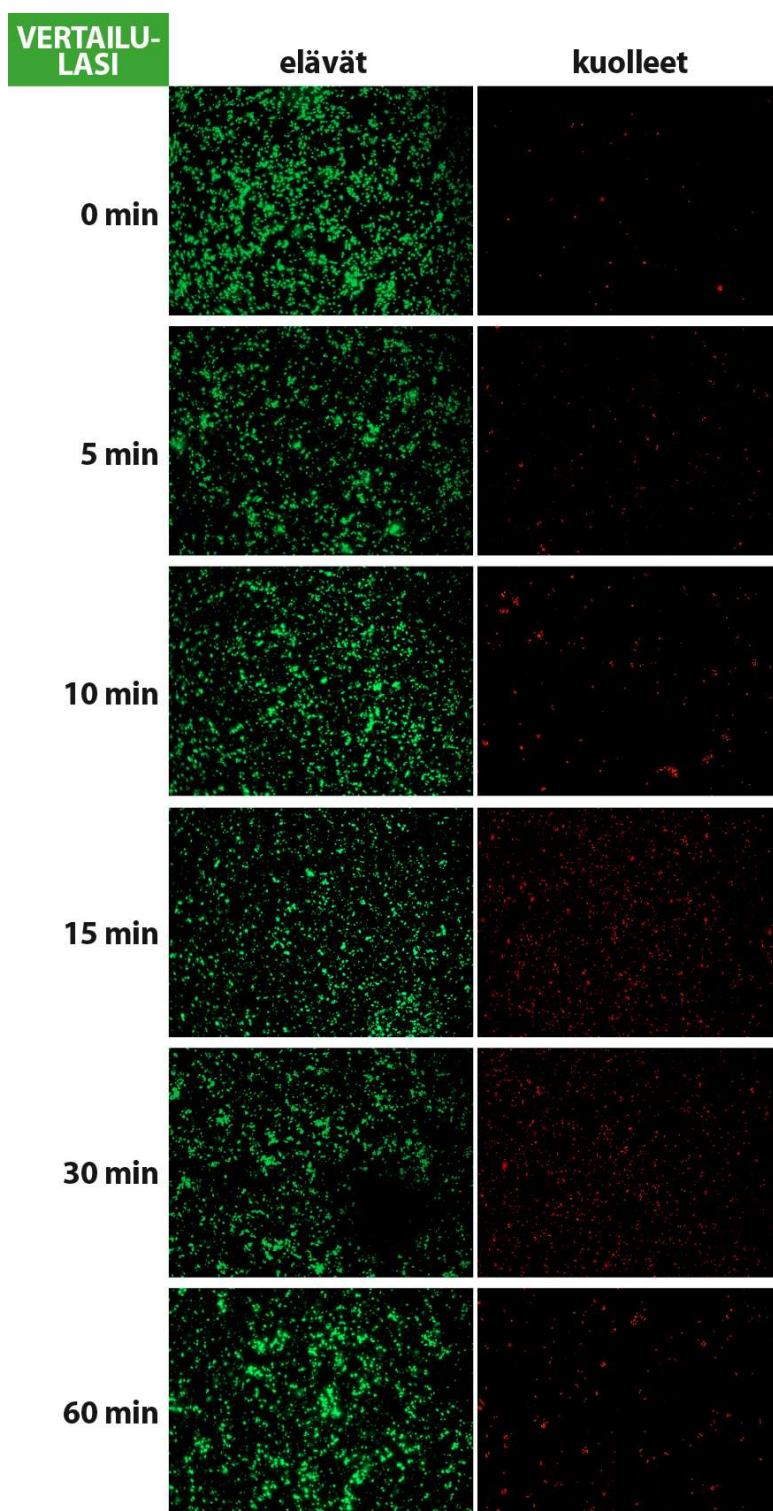
Hopean migraatiotutkimus aloitettiin happopesemällä kaikki työssä tarvittavat välineet (Liite 2). Välineet peseytyivät typpihapossa 24 tuntia, jonka jälkeen ne huuhdeltiin ultra-puhtaalla laboratoriovedellä. Pestyihin erlenmeyereihin asetettiin kolme peitinlasia pohjalle, pinnoitettu puoli ylöspäin, jokaisesta tutkittavasta päällysteestä. Asettelyn jälkeen lisättiin 50 ml valmistettua keinotekoista hikeä varmistaen, että peitinlasit pysyvät astian pohjalla eivätkä tarraudu toistensa päälle. Valmiit astiat suljettiin tämän jälkeen käyttäen parafilmiä ja ne siirrettiin suojaan valolta huoneenlämpötilassa. Nollanäytteitä valmistettiin yksi, jokaista liuotusaikapistettä kohti. Kaksi kontrollinäytettä, joihin lisättiin tunnettu määrä, hopeaa valmistettiin viimeisenä päivänä, jotta kaikki näytteet lähtisivät tuoreena migraatiotutkimuksen suorittavaan laboratorioon.

Näytteiden analysoinnin hoiti Eurofins Ahma Oy, Oulu. Laboratorio suoritti näytteiden analysoinnin käyttäen ICP-MS-tekniikkaa, jolla on hyvin alhainen havaintoraja.

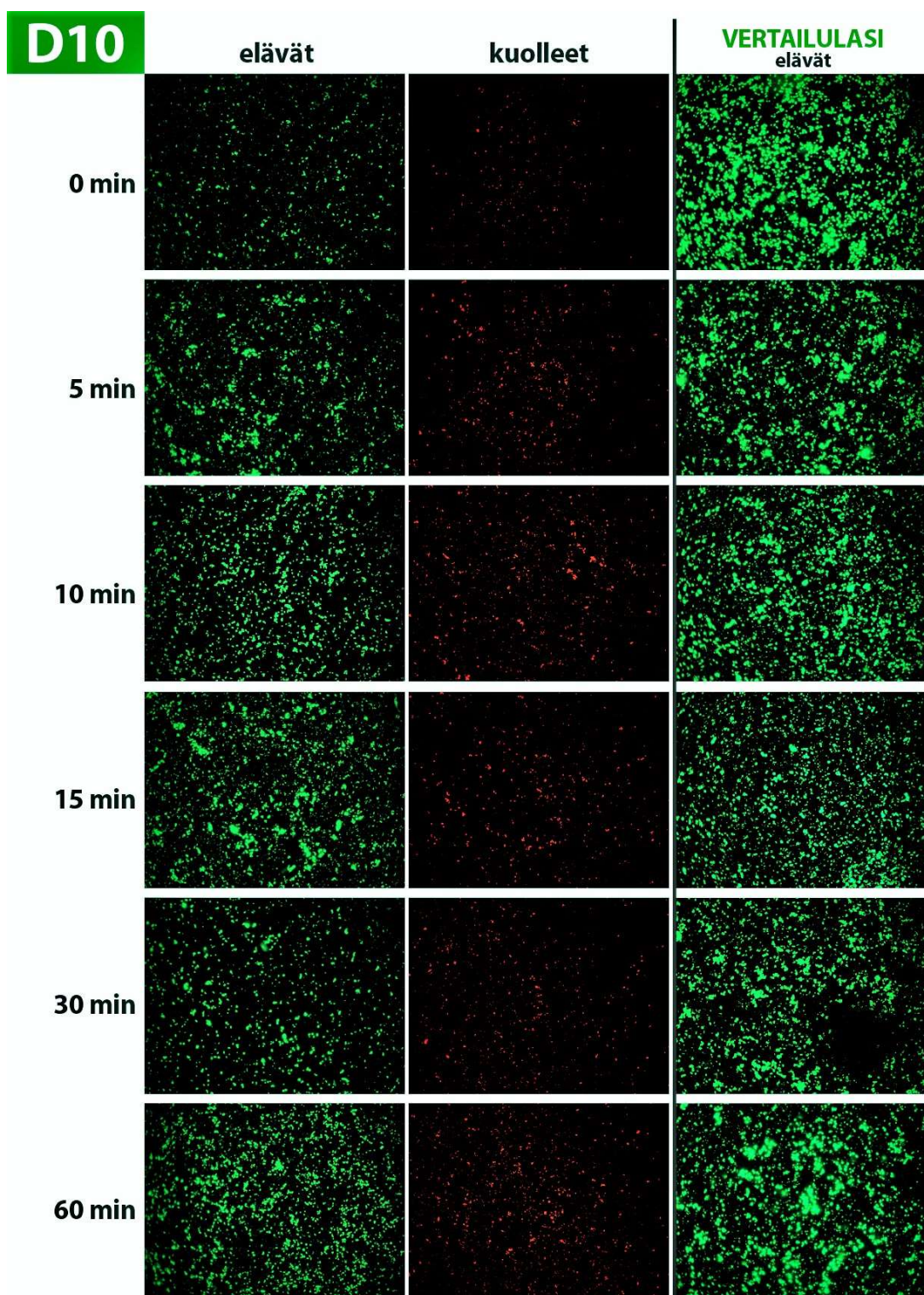
5 Tulokset

5.1 Antimikrobiset pintamateriaalit

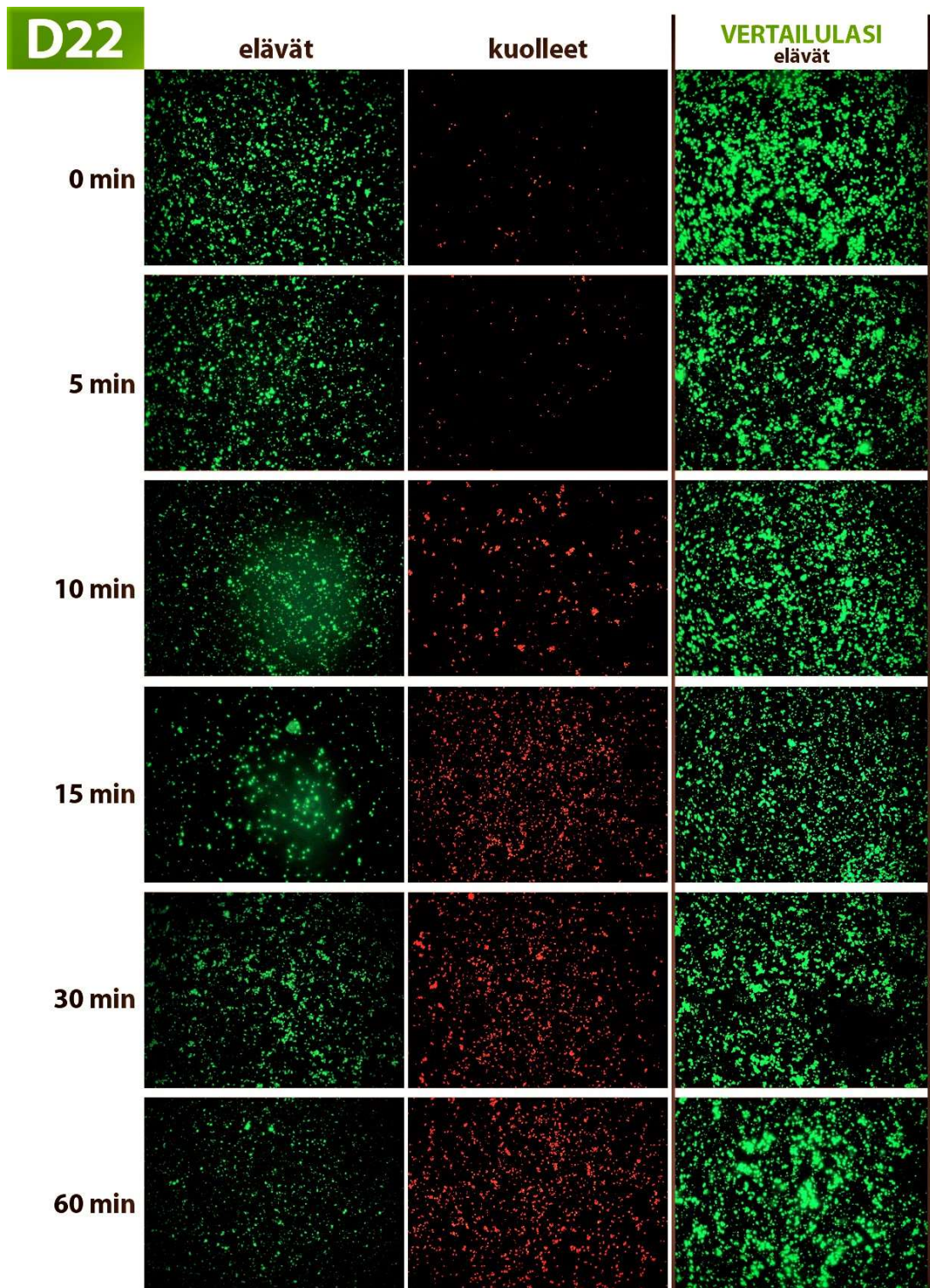
Mikroskoopilla otetut kuolleiden ja elävien bakteereiden kuvat eri aikapisteistä laitettiin järjestykseen kullekin tutkittavalla pintamateriaalille. Kuvasarjoissa vasemmalla puolella on esitetty SYTO 9 -värjätyt elävät solut vihreinä ja oikealla puolella kuolleet bakteerisolut, jotka havaitaan propiumjodidi-värjäyksessä punaisina (Kuva 7).



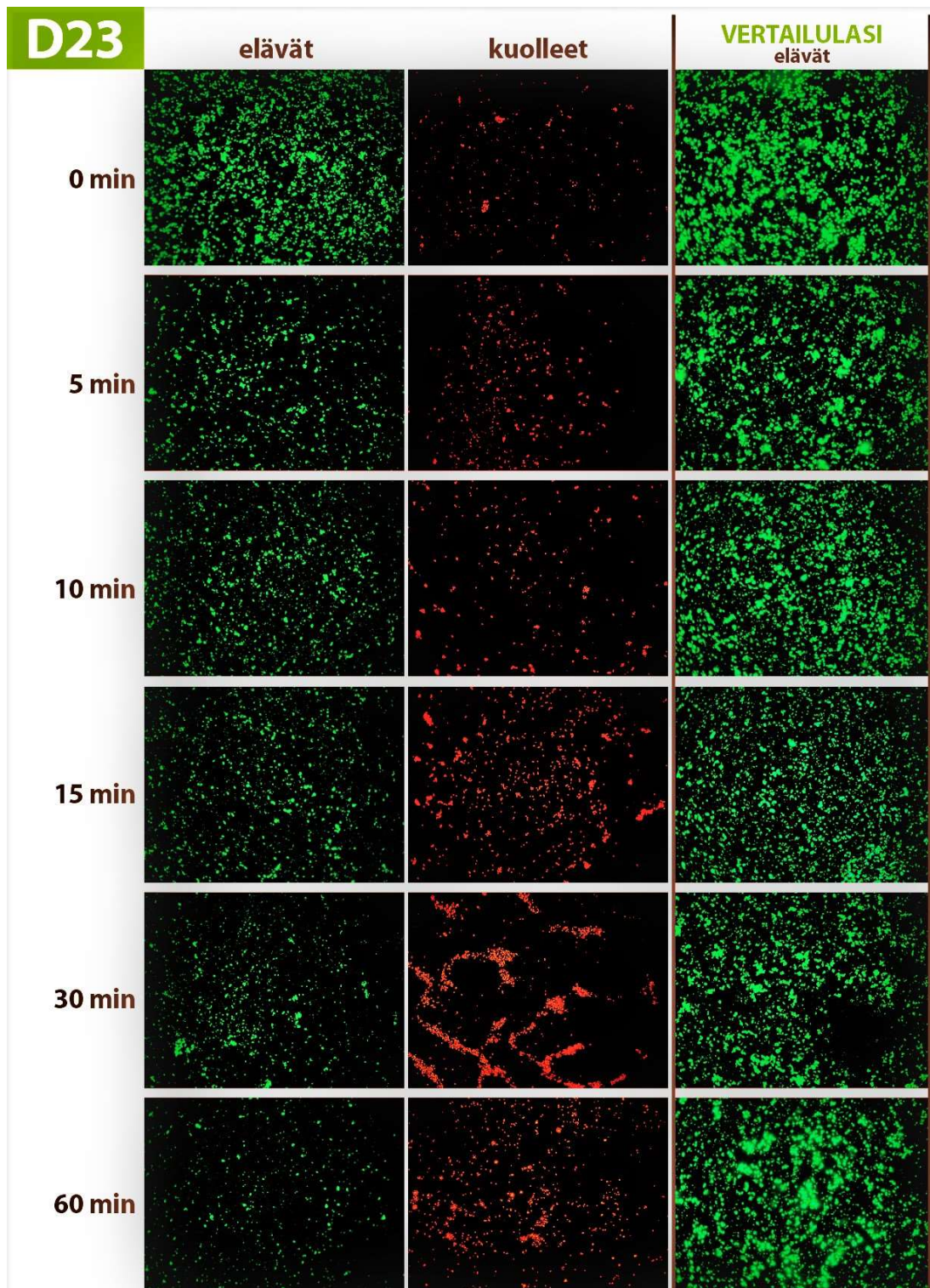
Kuva 7. Referenssipintana toimivan borosilikaatista valmistetun objektilasin värjäystulokset (630-kertainen suurennos).



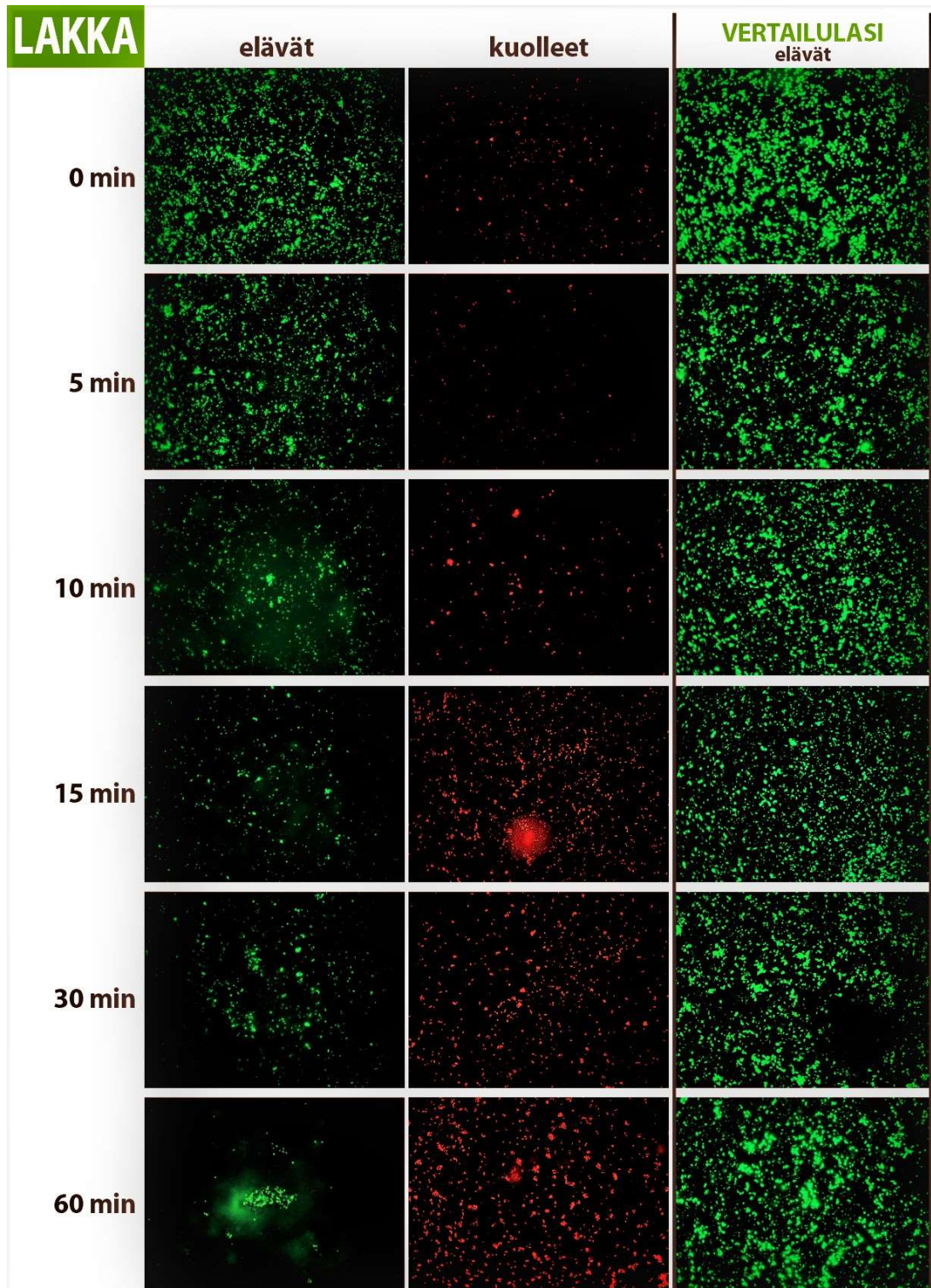
Kuva 8. Toisena referenssipintana toimivan DA40110-pinnoitteen värjäystulokset (630-kertainen suurennos).



Kuva 9. Teknoksen jauhelakan DA40022/2 värjäystulokset (630-kertainen suurennos).



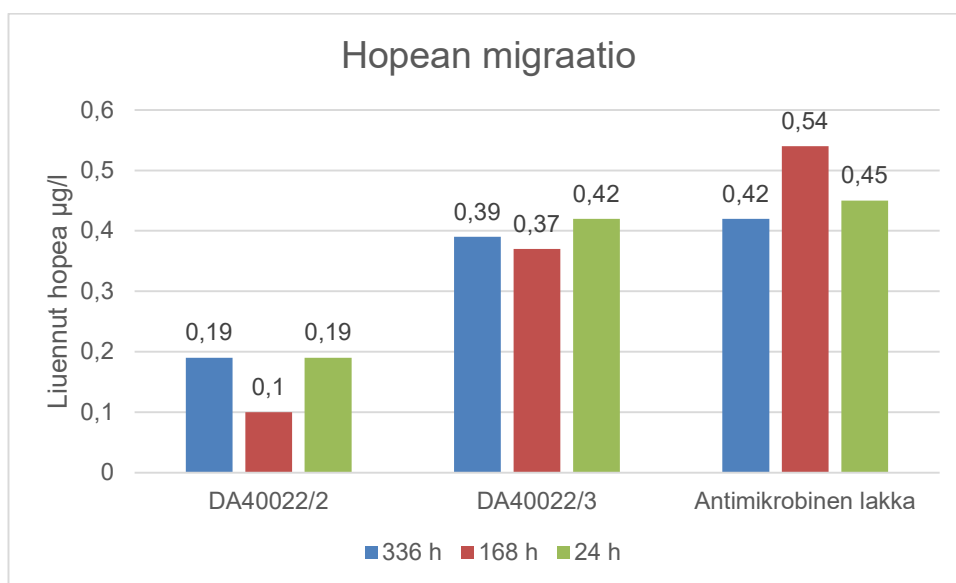
Kuva 10. Teknoksen jauhelakan DA40022/3 värjäystulokset (630-kertainen suurennos).



Kuva 11. Iskun antimikrobisen lakkapinnoitteen värjäystulokset (630-kertainen suurennos).

5.2 Hopean migraation tulokset

Eurofins Ahma Oy:n toimittamista hopean migraatiotuloksista laskettiin, kuinka paljon hopeaa vapautuu yhtä neliödesimetriä kohti. Laskusta saatuja tuloksia verrataan EU-direktiivin (10/2011) asettamiin raja-arvoihin (10 mg/dm²) [10]. Nollanäytteiden tulokset todistivat, että astioiden pesu on onnistunut, eikä niistä irronnut hopeaa. Valmistettujen kontrollien tuloksien arvot erosivat laskennallisista laimennoksista. Kontrolli 1:n pitoisuus oli 0,48 µg/l ja kontrolli 2:n pitoisuus oli 0,22 µg/l.



Kuva 12. Teknoksen jauhelakka pinnoitettujen peitinlasien migraatiotulokset yksinkertaisella hopealla (DA40022/2) ja kaksinkertaisella hopealla (DA40022/3). Lisäksi Iskun antimikrobinen lakkapinnoitteen migraatiotulokset.

Tulosten pylväsdiagrammista (Kuva 12) nähdään, että eniten hopeaa liukeni Iskun antimikrobisesti pinnoitetuista peitinlaseista. Toiseksi eniten hopeaa vapautti Teknoksen kaksinkertaisella hopeakonsentraatiolla jauhemaalattut peitinlasit.

6 Tulosten tarkastelu

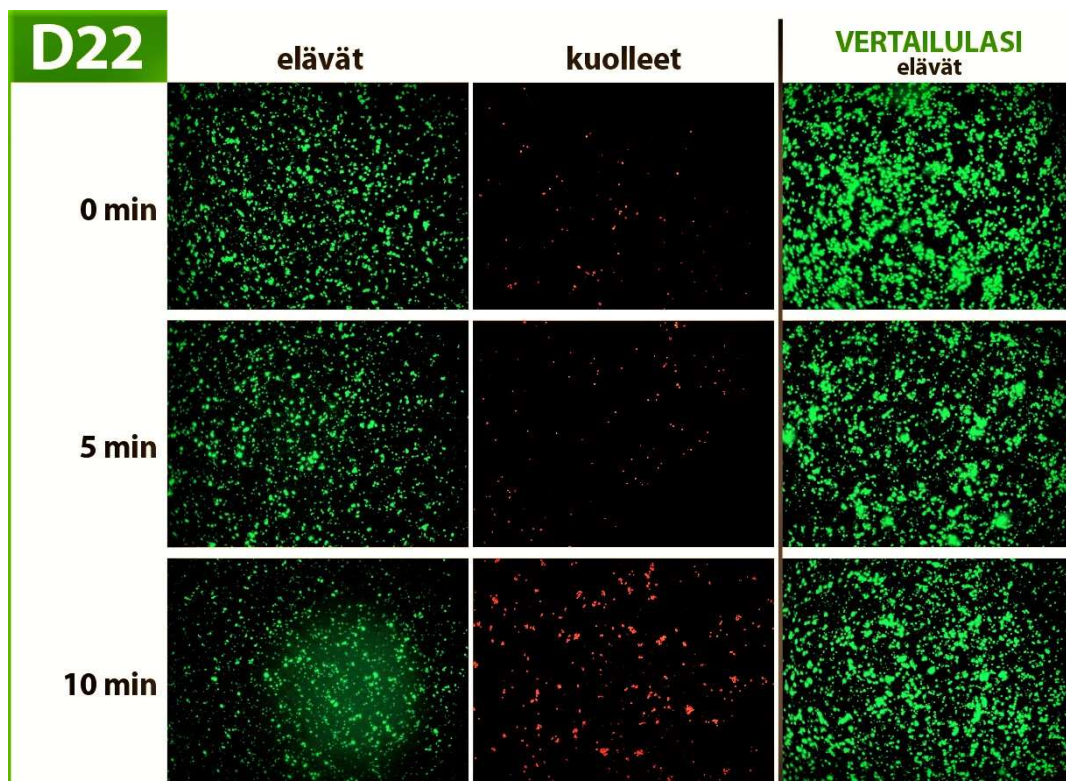
6.1 Pintamateriaalit

Ensin tulee tarkastaa, että referenssimateriaalien tulokset vastaavat oletettua. Vertailulasilla näkyy elävien bakteerien signaali hyvin voimakkaasti koko tunnin mittaisella vaikutusajalla, eikä kuolleiden signaali kasva normaalia bakteerikuolemaa huomattavammin (Kuva 7). Referenssilakan (DA40110), johon ei ollut lisätty hopeaa, tuloksissa myös huomataan, kuinka elävien signaali pysyy vahvana vielä tunnin mittaisen kontaktin aikana (Kuva 8). Signaali ei ole kuitenkaan näytä yhtä vahvalta kuin objektilasilla, mikä voi johtua jauhelakkapinnoitteen fluoresoivasta ominaisuudesta taustan häivytysvaiheessa mikroskoopin kameran ohjelmistolla. Referenssilakkapinnoitteessa kuolleiden solujen määrä ei myöskään kasva normaalia solukuolemaa huomattavammin.

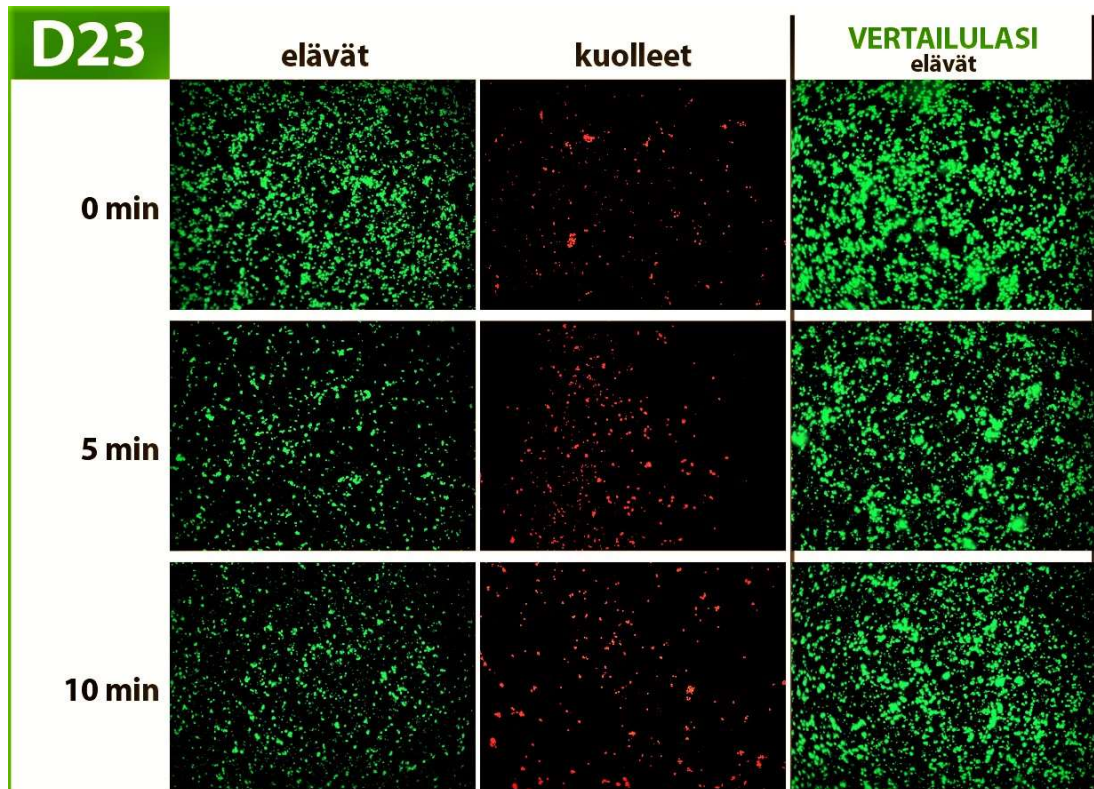
Antimikrobisia pintoja tarkasteltaessa huomataan, miten elävien bakteerisolujen signaali heikkenee pidemmän kontaktin kanssa antimikrobista pintaa vasten (Kuva 9, Kuva 10 ja Kuva 11).

6.1.1 Aikaväli 0–10 minuuttia

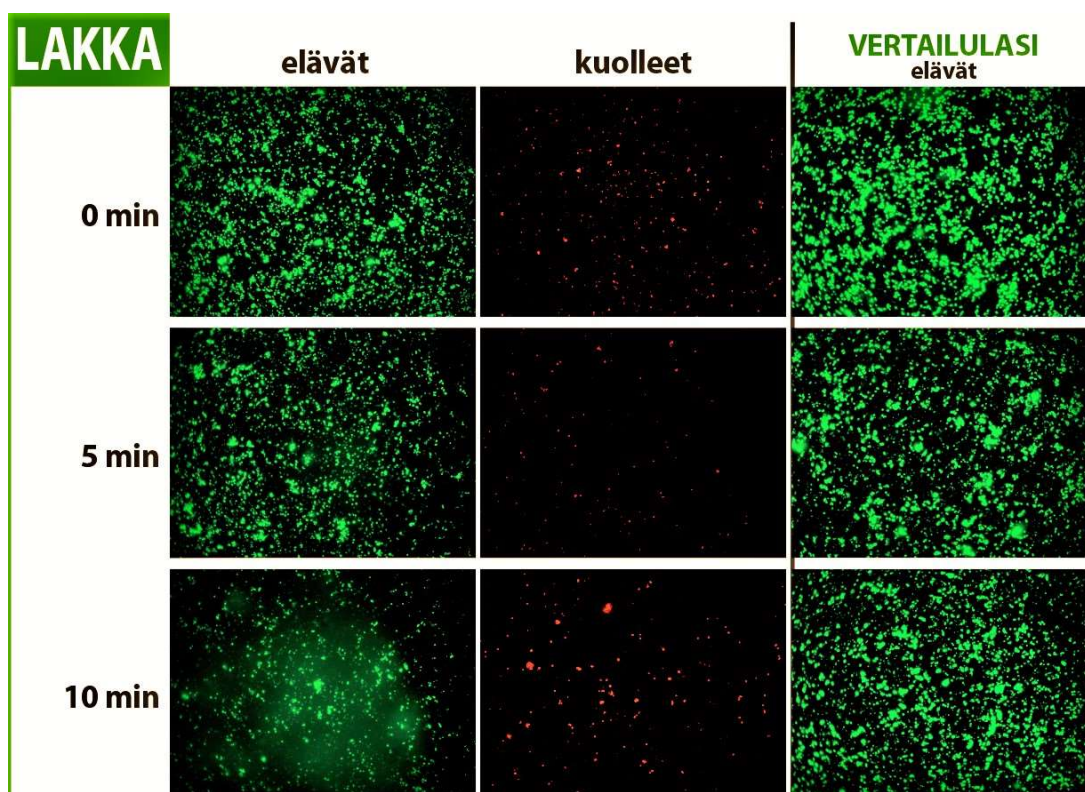
Kun verrataan 0–10 minuutin kontaktia antimikrobisilla pinnoilla referenssipintana olevaan objektilasiin, huomataan selkeästi antimikrobisen pinnoitteen vaikutus. Referenssi-pinnalla, elävien signaali pysyy hyvin voimakkaana. Antimikrobisilla pinnoitteilla (Kuva 13, Kuva 14 ja Kuva 15) elävien bakteerien lukumäärä laskee huomattavasti ja lisäksi niiden emittoiman vihreän valon signaali heikkenee. Samanaikaisesti kuolleiden bakteerien signaali ja lukumäärä kasvaa. Teknoksen yksin- ja kaksinkertaisella hopeakonsentraatiolla valmistettujen pinnoitteiden (Kuva 13 ja Kuva 14) tuloksissa huomataan, että kaksinkertaisella hopeakonsentraatiolla (Kuva 14) bakteerikuolemaa havaitaan enemmän heti kontaktin jälkeen antimikrobisen peitinlasin kanssa. Viiden minuutin kontaktiajalla bakteerikuolema on myös suurempaa kuin yksinkertaisella hopeakonsentraatiolla. Iskun antimikrobisen lakkapinnoitteen (Kuva 15) tulokset ovat lähes vastaavanlaiset, kuin yksinkertaisella hopeakonsentraatiolla päällystetyn Teknoksen jauhelakkapäälysteen (Kuva 13).



Kuva 13. Teknoksen yksinkertaisella hopealla päällystetty jauhelakkapeitinlasi (DA40022/2) aikavälillä 0-10 minuuttia, oikeassa reunassa vertailulasi (630-kertainen suurennos).



Kuva 14. Teknoksen kaksinkertaisella hopealla päällystetty jauhelakkapeitinlasi (DA40022/3) aikavälillä 0-10minuuttia, oikeassa reunassa vertailulasi (630-kertainen suurennos).



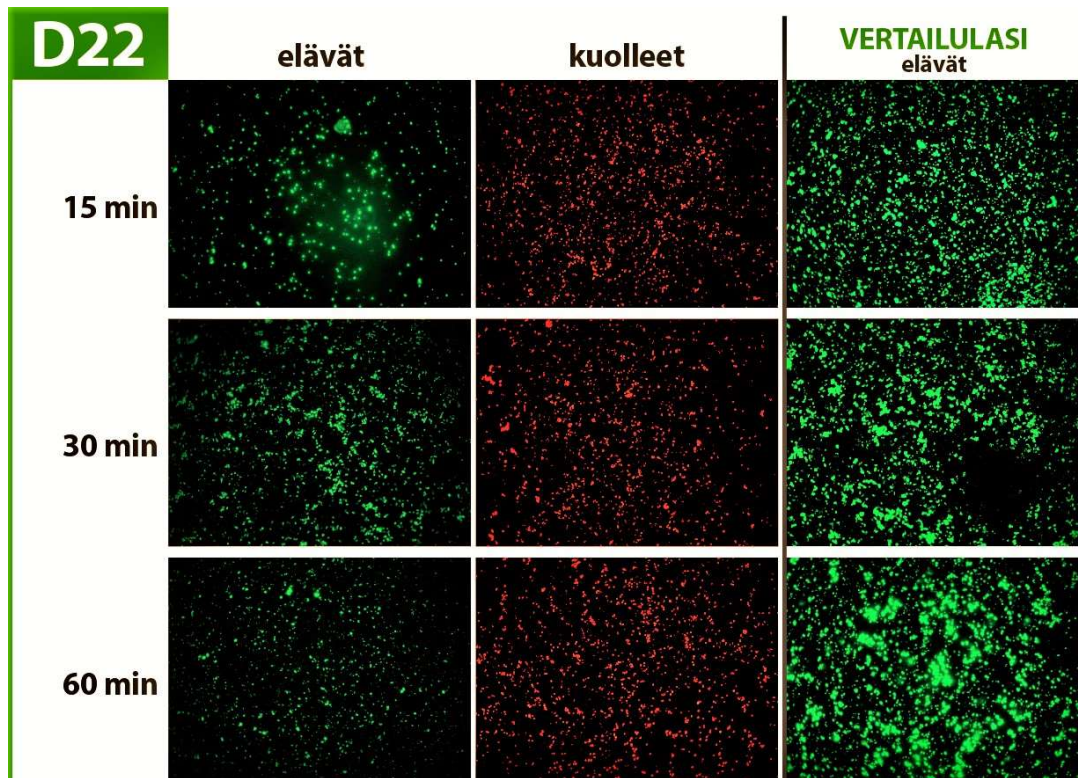
Kuva 15. Iskun antimikrobinen lakkapinnoite aikavälillä 5-10 minuuttia, oikeassa reunassa vertailulasi (630-kertainen suurennos).

6.1.2 Aikaväli 15–60 minuuttia

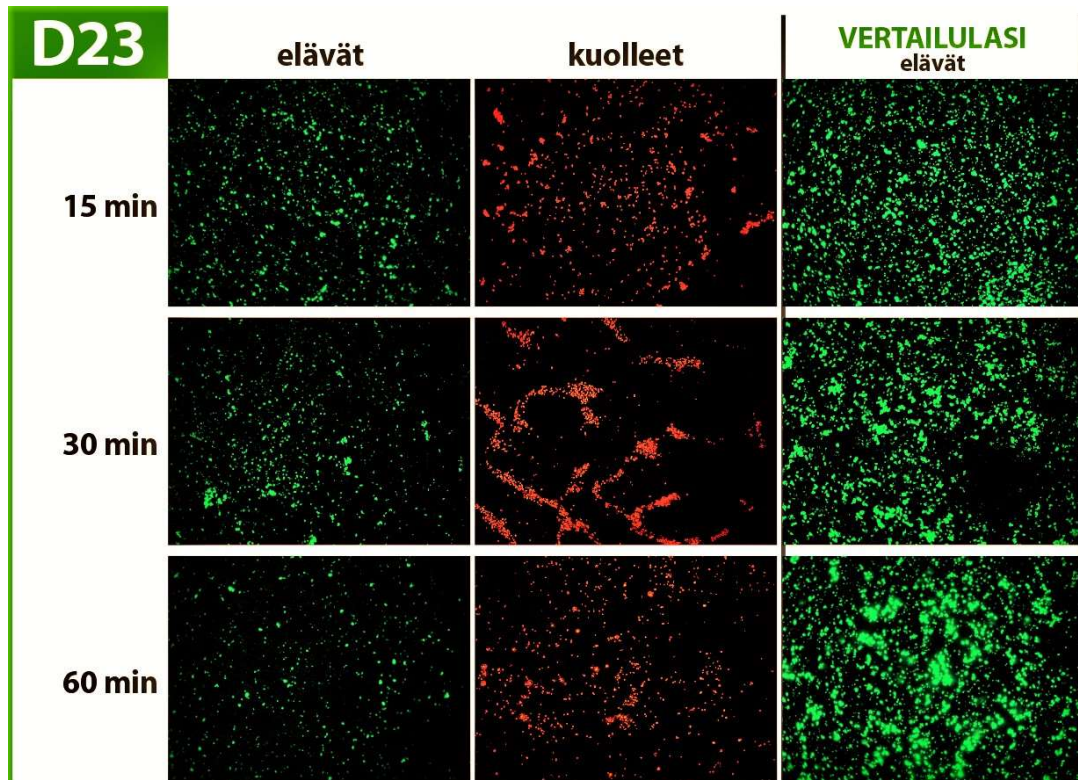
15 minuutin kohdalla kuolleiden bakteerien määrä kasvaa huomattavasti (Kuva 16, Kuva 17 ja Kuva 18). Kuolleiden bakteerien määrä voidaan arvioida olevan 80 % bakteerien kokonaismäärästä. Samassa aikapisteessä ei eri antimikrobisten pinnoitteiden välillä ole huomattavia eroja, paitsi iskun antimikrobisessa lakkapinnoitteessa (Kuva 18), jossa elävien signaali on pienempi kuin Teknoksen pinnoitteilla (Kuva 16 ja Kuva 17).

60 minuutin kontaktin aikana elävien bakteerien signaali on vähentynyt noin 90 % alkutilanteesta. Iskun antimikrobisen lakkapinnoitteen elävien bakteerien kontaktiajankohdassa 60 minuuttia (Kuva 18), nähdään pintamateriaalin fluoresoiva vaikutus sumumaisena verhona jäljellä olevien bakteerien ympärillä. Tämä johtuu siitä, että fluoresenssimikroskoopin lampun valon intensiteettiä joudutaan nostamaan, jotta jäljellä olevat elävät bakteerit havaittaisiin. Valon intensiteetin nosto aiheuttaa pintamateriaalin fluoresoivien ominaisuuksien ilmenemisen.

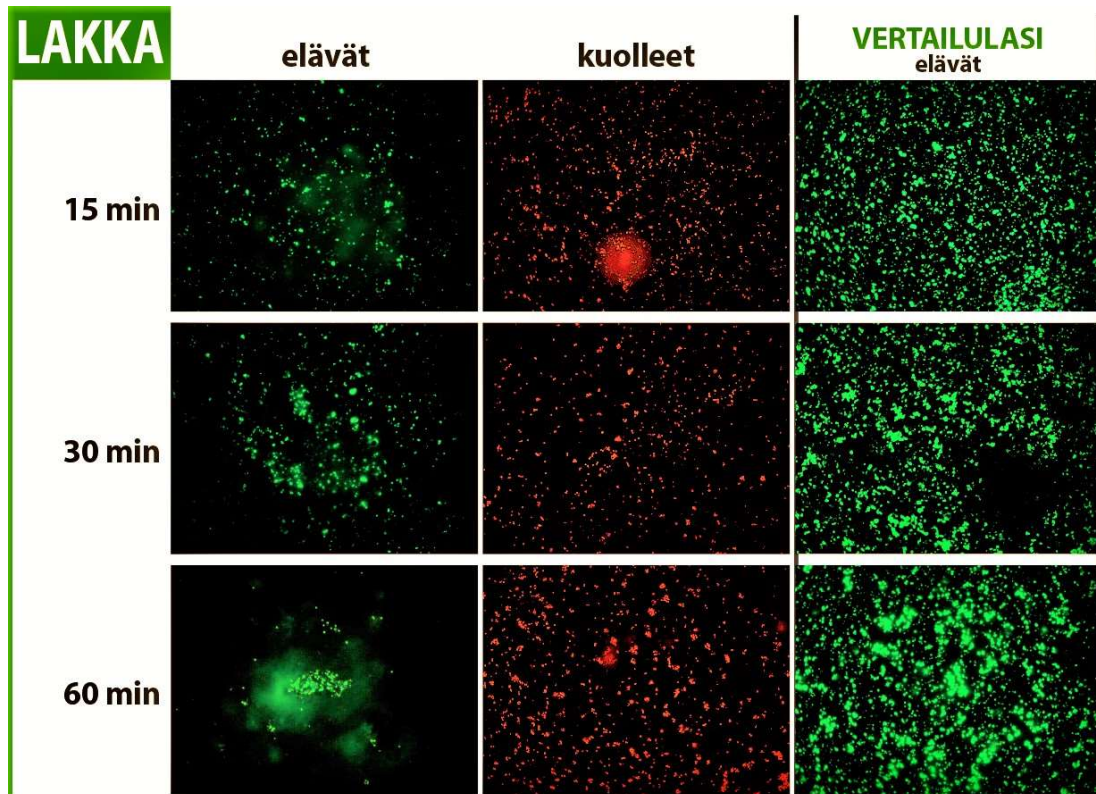
Kuolleiden bakteerien määrä antimikrobisesti pinnoitetuilla peitinlaseilla on lähes vastaava elävien bakteerien määrän kanssa vertailulasina käytettävällä objektilasilla. Verratessa bakteerikuolemaa 15–60 minuutin kontaktiajankohdilla objektilasin (Kuva 7) ja antimikrobisten pinnoitteiden välillä (Kuva 16, Kuva 17 ja Kuva 18) huomataan, miten bakteerikuolema on suurempi antimikrobisilla pinnoilla.



Kuva 16. Teknoksen yksinkertaisella hopealla päällystetty jauhelakkapeitinlasi (DA40022/2) aikavälillä 15-60 minuuttia, oikeassa reunassa vertailulasi (630-kertainen suurennos).



Kuva 17. Teknoksen kaksinkertaisella hopealla päällystetty jauhelakkapeitinlasi (DA40022/3) aikavälillä 15-60 minuuttia, oikeassa reunassa vertailulasi (630-kertainen suurennos).



Kuva 18. Iskun antimikrobinen lakkapinnoite aikavälillä 15-60 minuuttia, oikeassa reunassa vertailulasi (630-kertainen suurennos).

6.2 Hopean migraatio

Kun tarkastellaan liotusaikojen migraatiotuloksien eroja, huomataan, että hopeaa ei vapaudu 2 viikon näytteissä enempää kuin päivän liotetuissa näytteissä. Laskuihin valitaan jokaisesta pintamateriaalista näyte, josta on liennut eniten hopeaa. Päälystettyjen peitinlasien koko oli 24 x 40 mm, josta saadaan kaikkien kolmen liotetun näytepalan pinta-alaaksi 0,288 dm². Lienneet maksimi arvot hopealle neliödesimetriä kohti taulukoitettiin (Taulukko 1). Laskuissa on huomioitava, että lähetetty näytemäärä oli 50 ml.

Taulukko 1. Taulukoituna liuennut hopea neliödesimetriä kohti.

Näyte	Migraatio µg/l	Migraatio mg/dm ²
D22	0,19	3,3x10 ⁻⁵
D23	0,42	7,3x10 ⁻⁵
Lakka	0,54	9,4x10 ⁻⁵

Taulukosta nähdään, että eniten hopeaioneja vapauttaneet pinnoitetut peitinlasit alittavat huomattavasti alle EU-direktiivin säätämän yläraja-arvon. Tulokset ovat linjassa aiemmin mainittuun IHMEC hankkeen tutkimukseen, jossa suurimmasta osasta näytteitä liukeni 0,0004 µg/cm² hopeaa eli 4x10⁻⁵ mg/dm².

7 Yhteenveto

Antimikrobisten pintojen tehokkuuden tulokset olivat linjassa BioCototen aikaisemmin tehtyyn tutkimukseen (liite 4), jossa antimikrobiset pinnat tappoivat 86 % bakteereista 15 minuutissa ja 96 % kahdessa tunnissa. Opinnäytetyössä 15 minuutin kohdalla kaikki antimikrobiset pinnat olivat eliminoineet yli 80 % *S. aureus*-bakteerista. Tunnin kontaktissa olleet bakteerit olivat eliminoitu jo yli 90 %. Antimikrobisten pinnoitteiden välillä ei ollut opinnäytetyössä huomattavia eroja. Iskun antimikrobisen lakkapinnoitteen elävien signaali heikkeni nopeimmin verrattuna muihin pinnoitteisiin. Kuolleiden signaalit lisääntyivät kaikilla antimikrobisilla pinnoilla yhtenevästi.

Hopeaionien vapautumiseen liittyvät opinnäytetyön kokeet kulkivat linjassa IHMEC-hankkeen tutkimustulosten kanssa. Tehdyt kokeet myös todistivat, että liukeneminen alittaa EU-raja-arvon (10 mg/dm²) elintarvikkeiden kanssa kosketukselle joutuville muovimateriaaleille ja tarvikkeille. Teknos Oyn:n jauhemaalatu peitinlasit sisälsivät hopeafosfaattilasia ja Iskun lakkapinnoitteiset peitinlasit hopeakloridia. Hopeayhdisteen olomuodolla opinnäytetyön tutkimuksen perusteella on vaikutusta hopean migraatioon keinotekoiseen hikeen. Tämän tuloksen varmistamiseksi tulisi tehdä rinnakkaisia näyt-

teitä, jotta voitaisiin varmuudella todeta näin. Migraatiokokeen suurimmat hopeaioni-liukoisuuden tulokset jäivät kuitenkin kaikilla pinnoitteilla huomattavasti alle EU-direktiivin säätämän raja-arvon.

Lähteet

- 1 Kramer Axel; Schwebke Ingeborg, Kampf Günter. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infectious Diseases. <<https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>>. Luettu 6.5.2021
- 2 Mirzajani Fateme; Ghassempour Alireza; Aliahmadi Atousa, Esmaeili Mohammed Ali. 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. Verkkoaineisto <<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.009>>. Luettu 18.4.2021.
- 3 Clement Julia L., Jarrett Penelope S.. 1994. Antibacterial Silver.<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2364932/>>. Luettu 2.4.2021.
- 4 Pietsch F.; O`Neill A.J.; Ivask A.; Karhu A.; Ahonen M., Schreiber F.. 2020. Selection of resistance by antimicrobial coatings in the healthcare setting. The Journal of Hospital Infection. <<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.06.006>>. Luettu 2.5.2021.
- 5 Loh Jia V; Percival Steven L; Woods Emma J; Williams Nicola J, Cochrane Christine A. 2009. Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals. Verkkoaineisto. <<https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2008.00563.x>>. Luettu 2.5.2021
- 6 New ways for reducing bacterial & viral presence on touch surfaces. 2018. ISKU. Verkkoaineisto. <<https://d3bsr111nhttx2.cloudfront.net/app/uploads/12154006/whitepaperlsku.pdf>>. Verkkoaineisto. Luettu 15.4.2021
- 7 93 % reduction in bacteria in an office environment. 2017. BioCote case study. Verkkoaineisto. < <https://www.biocote.com/wp-content/uploads/2017/12/case-study-office-2017.pdf>>. Luettu 5.4.2021.
- 8 Hastings Richard. 2017. BioCote Ltd. The modes of action of antimicrobial silver – a review article.
- 9 Hastings Richard. 2017. BioCote Ltd. The environment fate of ionic silver – a review version.
- 10 Commission regulation (EU) No 10/2011. <<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:012:0001:0089:EN:PDF>> Luettu 26.5.2021.
- 11 Life Cycle Analysis of BioCote® Treated Products. 2018. BioCote. Verkkoaineisto. <https://compoundingsolutions.net/WP_Live/wp-content/uploads/2018/12/Durability-_Report_2017.pdf>. Luettu 27.4.2021

- 12 Rice George. Fluorescent Microscopy. Verkkoaineisto. <https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fluomic.html>. Luettu 11.4.2021.
- 13 Spring Kenneth R., Davidson Michael W.. Introduction to fluorescence microscopy. Verkkoaineisto. <<https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>>. Luettu 14.4.2021.
- 14 Mercury-vapor lamp. Verkoaineisto. <https://www.chemurope.com/en/encyclopedia/Mercury-vapor_lamp.html>. Luettu 16.4.2021.
- 15 Robertson Julia; McGoverin Cushla; Vanholsbeeck Frederique, Swift Simon. 2019. Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for Rapid Determination of Bacterial Load. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00801>>. Luettu 3.5.2021.
- 16 LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit (Cat. No. L7012). Thermo Fisher Scientific.
- 17 LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit, Product Information. 2004. Molecular Probes.
- 18 Berney Michael; Hammes Frederik; Bosshard Franziska; Weilenmann Hans-Ulrich, Egli Thomas. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAT *BacLight* kit in combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. <<https://doi.org/10.1128/AEM.02750-06>>. Luettu 8.5.2021.
- 19 Stiefel Philipp; Schmidt-Emrich Sabrina; Maniura-Weber Katharina, Ren Qun. 2015. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology*. <<https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>>. Luettu 27.4.2021
- 20 Anttila Veli-Jukka. MRSA. Lääkärikirja Duodecim. Terveyskirjasto. Verkkoaineisto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00586>>. Luettu 27.4.2021
- 21 Antibioottiresistenssin seuranta. Verkkoaineisto. Ruokavirasto <<https://www.ruokavirasto.fi/viljelijat/elaintenpito/elainten-laakitseminen/antibioottiresistenssin-seuranta/>>. Luettu 2.5.2021.
- 22 Silver antimicrobial properties. IHMEC Breaking the Infection Chain. Verkkoaineisto. <<https://www.indoorhygiene.fi/technology/technologies/antimicrobial-materials/silver-ag/>>. Luettu 17.4.2021

Cultiloop-ohje

DIRECT STREAK METHOD

This procedure is recommended for all non-fastidious microorganisms.

1. Warm the appropriate plate medium to 35–37°C.
2. Remove the sheath from the loop.
3. Stab the loop into the medium or lay it flat on the warm, moist surface. Hold it in this manner for 10–15 seconds to allow for absorption of moisture.
4. Streak the plate in the usual manner. As many as five plates may be streaked with the same loop.
5. Incubate the plates in an appropriate atmosphere and temperature for the optimal growth of the organism.

Hopean liuotus

Hopean liuotus

Tarvittavat välineet ja reagenssit:

- 14 kpl 250 ml:n erlenmeyereita
- 1 l:n laboratoriopullo
- 2 kpl 100 ml:n mittapulloa
- 14 kpl 50 ml:n falconputkia
- 50 ml:n mittalasi
- näytepalat (DA40022/2, DA40022/3 ja Iskun antimikrobinen lakka)
- analyysihien valmistamiseen:
 - o NaCl (MERCK pro analyysi Sodium chloride, Lot: K34243404 504)
 - o Urea (Riedel-de Haën Urea analytical reagent, Lot: 10940, Assay: 99,5%)
 - o Maitohappo (J.T.Baker Lactic Acid, Lot: 9726210002)
- kontrollinäytteitä varten ICP tutkimuksiin käytettävää "Etalon multi element ICP" reagenssia, jossa on hopeaa 1000 mg/l (VWR Chemicals, Lot: 87629180)

Kaikki välineet tulee haponpestä, jotta vältettäisiin mahdollinen kontaminaatoriski analyysin pienen määrittämissä vuoksi. Työskennellessä vahvan typpihapon kanssa tulee käyttää suojavarusteita ja olla huolellinen.

Analyysi suoritetaan Iskun ja Teknoksen pinnoittamille peitinlaseille (DA40022/2, DA40022/3 ja Iskun antimikrobinen lakka). Liuotus suoritetaan huoneen lämpötilassa, pimeässä ja kolmelle aikapisteelle: 24 h, 1 vk ja 2 vk. Koepalojen liuotusten ohella valmistetaan kaksi kontrollinäytettä, joihin lisätään tunnettu määrä hopeaa. Kontrollinäytteiden hopeapitoisuuden tulee ylittää ICP-MS-laitteen määrittämissä (0,1 µg/l). Lisäksi tulee valmistaa nollanäyte jokaiselle aikapisteelle.

Valmiit näytteet toimitetaan suljetuissa typpipestyissä falconputkissa analyysilaboratorioon (Eurofins Ahma Oy, Oulu). Liuotukset ajoitetaan niin, että kaikki näytteet saadaan lähetettyä samanaikaisesti tutkimuksiin. Analysointi suoritetaan käyttäen ICP-MS-tekniikkaa, jota varten tarvitaan 50 ml näytettä.

Työn eteneminen:

1. Valmistetaan happopesua varten 20-prosenttinen typpihappoliuos. Tarvittavan typpihapon tilavuus määräytyy kaikkien pestävien astioiden tilavuuksista. 60-prosenttinen typpihappoliuosta mitataan 1,67 litraa ja se lisätään 5 litraan ultrapuhdasta vettä. Veden ja typpihapon sekoittaminen täytyy suorittaa hitaasti, sillä typpihappo reagoi voimakkaasti veden kanssa aiheuttaen lämpöä.

Happoa käsitellessä tulee käyttää asianmukaista varustusta: Happopesuun tarvittavat suojakäsineet, essu ja visiiri tai suojalasit.

2. Happestään tarvittavat välineet. Valmistettua 20-prosenttista typpihappoa lisätään jokaiseen pestävään astiaan niin, että astiat täyttyvät pintaan asti. Falconputkissa suljetaan myös korkit. Typpihappo jätetään astioihin 24 tunniksi, jonka jälkeen se kerätään talteen ja neutraloidaan. Lisäksi kaikki välineet huuhdellaan runsaalla määrällä ultrapuhdasta vettä. Pestyjä astioita säilötään korkit kiinni tai sulkemalla suuaukot parafilmillä.

3. Analyysihieissä olevien reagenssien pitoisuudet:

- 0,5 m-% NaCl
- 0,1 % Urea
- 0,1 m-% maitohappo

Analyysihiki valmistetaan litran laboratoriapulloon, johon reagenssit tulee lisätä seuraavassa järjestyksessä: (1,00 ± 0,01) g ureaa, (5,00 ± 0,01) g NaCl:a ja (940 ± 20) µl maitohappoa. Tämän jälkeen lisätään ultrapuhdasta vettä 900 ml ja liuosta sekoitetaan niin, että kaikki lisätyt reagenssit liukenevat. Valmis liuos tulee vielä neutraloida käyttäen ammoniakkia, jotta liuoksen pH-arvoksi saataisiin 6,50 ± 0,1. Valmis liuos säilötään jääkaapissa.

4. Kolme näytepalaa kustakin tutkittavasta pinnoitteesta asetetaan erlenmeyerin pohjalle, pinnoitettu puoli ylöspäin. Erlenmeyriin lisätään valmistettua analyysihikeä 50 ml käyttäen väliastian typpipestyä 50 ml:n mittalasia. Erlenmeyerit merkataan liuotettavan pintamateriaalin ja liuotettavan aikamäärän mukaan. Liuotus tapahtuu pimeässä tilassa huoneenlämmössä ja astioiden suuaukot suljettuina parafilmillä. Astioita ei sekoiteta liuotuksen aikana.

Nollanäytteet tehdään jokaiselle aikapisteelle (24 h, 1 vk ja 2 vk). Erlenmeyeriin lisätään 50 ml analyysihikeä, suuaukko suljetaan ja se viedään pimeään.

5. Kahta kontrollinäytettä varten täytyy ”Etalon multi element ICP” reagenssia laimentaa, jotta saataisiin hopeapitoisuus hieman määritysrajan yläpuolelle.

Suoritetaan kaksi 100-kertainen laimennosta. Mitataan 100 µl reagenssia 100 ml:n tyypiepestyyn mittapulloon ja täytetään ultrapuhtaalla vedellä merkkiin. Tällöin saadaan pitoisuudeksi

1 µg/ml.

Seuraavaksi tehdään sama laimennos uudestaan, jolloin liuoksen lopullinen pitoisuus on

0,01 µg/ml.

Lopullista laimennosta lisätään 1,5 ml ja 0,75 ml erillisiin erlenmeyereihin, joissa on 50 ml analyysihikeä. Tällöin saadaan kaksi kontrollinäytettä, joissa hopeapitoisuuksiksi saadaan 0,3 µg/l ja 0,15 µg/l.

6. Kun näytteiden liuotus ajanjakso on tullut täyteen, siirretään erlenmeyreissä olevat liuokset 50 ml:n falconputkiin ja korkit suljetaan. Tämän jälkeen näyte- ja kontrolliputket lähetetään laboratorioon.

Happopesuohje

- 6.10 Labware - For determination of trace levels of elements, contamination and loss are of prime consideration. Potential contamination sources include improperly cleaned laboratory apparatus and general contamination within the laboratory environment from dust, etc. A clean laboratory work area designated for trace element sample handling must be used. Sample containers can introduce positive and negative errors in the determination of trace elements by (1) contributing contaminants through surface desorption or leaching, (2) depleting element concentrations through adsorption processes. All reusable labware (glass, quartz, polyethylene, PTFE, FEP, etc.) should be sufficiently clean for the task objectives. Several procedures found to provide clean labware include soaking overnight and thoroughly washing with laboratory-grade detergent and water, rinsing with tap water, and soaking for four hours or more in 20% (V/V) nitric acid or a mixture of dilute nitric and hydrochloric acid (1+2+9), followed by rinsing with reagent grade water and storing clean.

Kuva 19. EPA 200.8 ohje välineiden ja astioiden happopesuun.

Biocote:n tutkimus



BACKGROUND

BioCote® was required to demonstrate the speed at which our antimicrobial technology has a significant impact on bacterial numbers present on surfaces. In order to show this, a representative surface was chosen containing a BioCote® antimicrobial additive at a commercially relevant concentration. The protocol used was based on a modification of the internationally accepted ISO22196-11 to allow for the shorter times of exposure (15 minutes and 2 hours).

PROTOCOL

Briefly, surfaces containing BioCote® antimicrobial technology were cut to specific sizes conforming to ISO22196-11, and were subsequently exposed to a specified number of bacteria (e.g., 1.96×10^6 cfu; Initial). Following bacterial exposure according to ISO22196-11, surfaces were incubated standing at 37°C for either 15 minutes, or 2 hours. At the end of the incubation period, the surfaces were removed from the incubator and the remaining bacteria were enumerated using standard approved microbiological methods.

FIGURE 1 Represents raw numbers of bacteria recovered from a BioCote® protected surface at different time intervals.

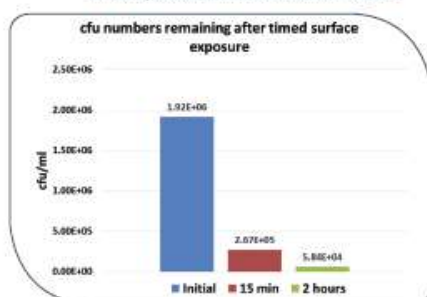
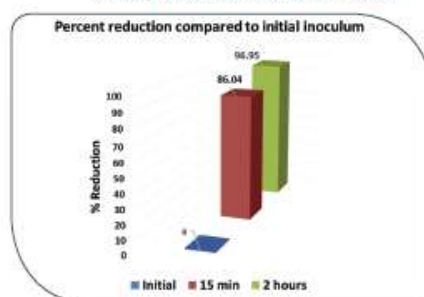


FIGURE 2 Depicts percent reduction of bacteria exposed to a BioCote® protected surface at different time intervals.



CONCLUSIONS

Figure 1 represents raw numbers of bacteria recovered from a BioCote® protected surface at different time intervals.

Figure 2 depicts percent reduction of bacteria exposed to a BioCote® protected surface when compared to the unprotected surface.

Results show that there is a significant reduction in bacterial numbers upon exposure to a BioCote® protected surface for 15 minutes, and an even greater

reduction in bacterial numbers upon exposure to the BioCote® protected surface for 2 hours. (Fig. 1)

After 15 minutes exposure to the BioCote® protected surface, there is 86.04% reduction in bacterial numbers. Exposure to a BioCote® protected surface for 2 hours results in an even more pronounced reduction (96.95%). (Fig. 2)

Reduction levels are expressed as a percentage of the initial inoculum (1.96×10^6 cfu).

BioCote House Oak Court Pilgrim's Walk Prologis Park Coventry CV6 4QH United Kingdom
 +44 (0) 2477 712489 +44 (0) 2476 336081 biocote@biocote.com www.biocote.com