

Opinnäytetyö (YAMK)

Kemiantekniikka ja bioteknologia

2022

Outi Lehtinen

**BIOLUMINESENSIN  
SOVELTUVUUS PUHDASTILAN  
PINTAHYGIENIAN  
VALVONTAAN**



RESTRICTED

Opinnäytetyö (YAMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Kemiantekniikka ja bioteknologia

2022 | 57 sivua, 5 liitesivua

Outi Lehtinen

## Bioluminesenssin soveltuvuus puhdastilan pintahygienian valvontaan

Standardi DIN EN ISO 17141 määrittelee menetelmät, joita käytetään puhdistilojen biokontaminaatioiden valvonnassa. Standardi sallii vaihtoehtoisten menetelmien käyttämisen vaadittujen menetelmien rinnalla. Nykyiset menetelmät ovat aikaa vieviä, ja bioluminesenssia hyödyntävällä luminometrillä olisi mahdollisuus saada tietoa pintahygieniasta lähes reaaliaikaisesti. Luminometrin avulla olisi mahdollista havaita pinnoilta kaikki orgaaninen materiaali, kuten biofilmi joka usein jää nykyisillä menetelmillä havaitsematta. Bioluminesenssia ei vielä käytetä puhdistilojen hygieniavalvonnassa, ja opinnäytetyössä tutkittiin sen soveltuvuutta C- ja D-puhtausluokan puhdistilojen pintahygienian sekä puhdistiloissa käytettävän puhdistetun veden hygienian valvontaan.

Vesi-ATP -menetelmän testaus suoritettiin ymppäämällä puhdistettuun veteen tunnettu määrä tunnettua mikrobia ja valmistamalla ympätystä näytteestä laimennossarja. Pinta-ATP -menetelmää testattiin ottamalla pinnanäytteitä rinnakkain sekä luminometrillä että kontaktimaljamenetelmällä 10 työpäivän ajan ennen ja jälkeen puhdistuksen. Tutkimuksen perusteella Vesi-ATP -menetelmä ei ole riittävän herkkä puhdistetussa vedessä mahdollisesti esiintyvien ongelmien havaitsemiseen. Pinta-ATP -menetelmän herkkyys havaittiin riittäväksi puhdastilan kontaminaatioiden havaitsemiseen, ja erityisesti rinnakkain kontaktimaljamenetelmän kanssa käytettynä sillä saatiin paljon uutta informaatiota puhdastilan pintojen hygieniatasosta.

Asiasanat:

bioluminesenssi, luminometri, adenosiniitriofosfaatti, biofilmi, puhdastila

Master's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Master's Degree Programme in Chemical engineering and biotechnology

2022 | 57 pages, 5 appendix pages

Outi Lehtinen

## Applicability of bioluminescence to cleanroom hygiene monitoring.

The standard DIN EN ISO 17141 defines the methods used in the control of biocontamination in cleanrooms. The standard allows alternative methods to be used alongside the required methods. The current methods are time-consuming, and a luminometer, which is utilizing bioluminescence, would have the opportunity to obtain information on surface hygiene almost in real time. With the help of a luminometer, it would be possible to detect all organic material on surfaces, such as biofilm, which often goes undetected with the current methods. Bioluminescence is not yet used in hygiene monitoring of cleanrooms and the present Master's thesis investigates its suitability for monitoring the surface hygiene of class C and D cleanrooms and the hygiene of purified water used in cleanrooms.

The testing of the water-ATP method was performed by inoculating purified water with a known amount of a known microbe and preparing a series of dilutions from the inoculated sample. The surface ATP method was tested by taking surface samples in parallel with both the luminometer and the contact plate method for 10 working days before and after the cleaning. Based on the research, the water-ATP method is not sensitive enough to detect problems that may occur in purified water. The sensitivity of the surface ATP method was found to be sufficient for detecting contamination in the cleanroom, and especially when used in parallel with the contact plate method, it provided a lot of new information about the hygiene level of the cleanroom surfaces.

Keywords:

Bioluminescence, luminometer, adenosinetriphosphate, biofilm, cleanroom

# Sisältö

<b>Käytetyt lyhenteet tai sanasto</b>	<b>6</b>
<b>1 Johdanto</b>	<b>7</b>
<b>2 Puhdastila</b>	<b>9</b>
2.1 Puhdastilan määritelmä	9
2.2 Kontaminaatioiden hallinta puhdastilassa	11
2.3 Puhdastilan normaalifloora	13
<b>3 Puhdastilan siivous</b>	<b>14</b>
3.1 Puhdastilan siivouksen periaatteet	15
3.2 Puhdistus ja sen osatekijät	16
3.3 Siivousmenetelmien ja välineiden valinta	17
3.3.1 Siivousliinat	18
3.3.2 Pesuaineet	18
3.3.3 Desinfektioaineet	20
3.3.4 Puhdistettu vesi	22
<b>4 Biofilmi</b>	<b>24</b>
4.1 Biofilmin kemiallinen rakenne	24
4.2 Biofilmin muodostuminen	25
4.3 Quorum sensing	27
4.4 Biofilmin kiinnittymiseen vaikuttavat tekijät	29
<b>5 Mittausmenetelmät ja välineet</b>	<b>31</b>
5.1 Kontaktimaljamenetelmä	31
5.2 Pintalevitysmenetelmä	32
5.3 Bioluminesenssi	33
5.3.1 Adenosiinitrifosfaatti	33
5.3.2 Pesu- ja desinfektioainejäämien vaikutus luminometrin mittaustuloksiin	34
5.4 Pinta-ATP -menetelmä	35

5.5 Vesi-ATP -menetelmä	35
<b>6 Työn suoritus</b>	<b>37</b>
6.1 Vesi ATP -menetelmän testaus	38
6.2 Pinta ATP -menetelmän testaus	41
<b>7 Tulosten analysointi ja johtopäätökset</b>	<b>43</b>
<b>8 Yhteenveto</b>	<b>50</b>
<b>9 Liitteet</b>	<b>51</b>
<b>Lähteet</b>	<b>52</b>

## **Liitteet**

Liite 1. Pinta-ATP -menetelmän testaus, mittaustulokset

## Käytetyt lyhenteet tai sanasto

Lyhenne	Lyhenteen selitys
ADP	Adenosiinidifosfaatti
AMP	Adenosiinimonofosfaatti
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
CFU	Pesäkkeen muodostava yksikkö
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
EPS	Eksopolysakkaridi
HEPA	Korkean tehokkuuden hiukkasilmansuodatin
PAL	Henkilösulku
PPJ	Puhdistuksen jälkeen
RLU	Suhteellinen valoyksikkö
RST	Ruostumaton teräs
ta	Työn aikana
TS-malja	Tryptoni-soija-agarmalja

# 1 Johdanto

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, soveltuuko bioluminesenssi menetelmänä käytettäväksi kohdeyrityksen puhdastilojen ja puhdasveden puhtaustason valvontaan. Testauksessa oli tarkoitus selvittää, voitaisiinko luminometrin adenosiinitrifosfaatti (ATP) -menetelmää käyttää rinnakkaisena, nopeampana menetelmänä pintojen puhtauden tarkkailussa kontaktimaljamenetelmän ja puhdasveden puhtauden tarkkailussa suodatusmenetelmän rinnalla. ATP-menetelmällä ei ole tarkoitus korvata nykyisiä käytössä olevia menetelmiä. ATP-menetelmä haluttaisiin käyttöön nykyisten menetelmien rinnalle, koska sillä voitaisiin saada lähes reaaliaikaisesti tietoa puhdasveden ja pintojen puhtaustasosta esim. ongelmatilanteiden yhteydessä, ja sitä voitaisiin hyödyntää koulutustarkoituksiin esim. siivoojien koulutuksen yhteydessä. Nykyisillä, standardin ISO 14644 määrittelemillä maljamenetelmillä tulosten saaminen vie useita päiviä inkubointiajoista johtuen.

ATP-menetelmää käytetään paljon sairaalamaailmassa ja elintarviketeollisuudessa. Käyttö ei ole vielä laajentunut puhdastiloihin, ja työn tarkoituksena oli selvittää, saadaanko ATP-menetelmällä riittävä vaste C- ja D-puhtausluokan puhdastiloissa sekä puhdistetusta vedestä, jotka ovat mikrobiologiselta laadultaan puhtaampia kuin olosuhteet, joissa luminometriä yleisesti käytetään. Taustatutkimuksessa löytyi yksi tieteellinen artikkeli, joka käsitteli luminometrin soveltuvuutta sairaalan D-puhtausluokan puhdastilaan. Artikkelin perusteella luminometri soveltui käytettäväksi puhdastilassa. Kohdeyrityksen puhdastilat ovat kuitenkin pääasiallisesti C-puhtausluokkaa, ja tästä syystä haluttiin tutkia luminometrin soveltuvuutta kohdeyrityksen käyttöön puhdastiloissa.

Biofilmi voi olla puhdastiloissa merkittävä ongelma, ja sen havaitseminen kontaktimaljamenetelmällä voi olla vaikeaa. On mahdollista, että kontaktimaljamenetelmä osoittaa pinnan olevan puhdas vaikka pinnalla on biofilmiä. Kohdeyrityksessä on havaittu erityisesti lattiapinnoilla aika ajoin mm.

tahmaisuutta, mutta siitä huolimatta kontaktimaljamenetelmällä saadut tulokset osoittavat pintojen puhtauden olevan riittävällä tasolla. Luminometrillä voitaisiin saada esiin myös mahdollinen biofilmi, sillä ATP-menetelmä havaitsee kaiken orgaanisen materiaalin. Tästä syystä opinnäytetyölle asetettiin tavoitteeksi paitsi tutkia, minkälainen vaste luminometrillä voitaisiin saada puhdistilan erilaisilta pinnoilta ja puhdistetusta vedestä, myös tutkia, voidaanko lattioilta otettujen näytteiden perusteella päätellä, onko pinnoilla pesuainejäämiä ja/tai biofilmiä.

Opinnäytetyöraportin teoriaosuus käsittelee tutkimukseen oleellisesti liittyviä aihealueita, kuten puhdistilan siivousta, siivousvälineitä ja -aineita sekä tutkimuksessa käytettyjä menetelmiä. Mahdollinen biofilmin esiintyminen puhdistilassa oli työn erityinen mielenkiinnon kohde, ja biofilmin rakennetta, kemiaa ja muodostumista käsitellään hieman syvällisemmin. Lopuksi esitellään tutkimuksen eteneminen, tulokset ja sen perusteella tehdyt johtopäätökset sekä esitellään jatkosuunnitelma luminometrin käyttöönottoa varten kohdeyrityksessä.



## 2 Puhdastila

### 2.1 Puhdastilan määritelmä

Puhdastilalla tarkoitetaan aluetta, joka on erityisesti suunniteltu ja rakennettu siten, että ilmassa olevien partikkelien määrä saadaan pidettyä vaaditulla tasolla. (Sandle & Saghee 2013, s. 7) ISO standardi 14644-1 määrittelee puhdastilan huoneeksi, jossa ilmassa olevien hiukkasten lukumäärää valvotaan ja luokitellaan, ja joka on suunniteltu, rakennettu ja jota käytetään siten, että voidaan valvoa partikkeleiden tilaan pääsyä, muodostumista ja tilassa pysymistä. (The International Organisation of Standardization 2015, s. 1)

Puhdastilat jaetaan vaaditun partikkelitason mukaisesti puhtausluokkiin A-D. Taulukossa 1 on EU GMP Annex 1 mukaiset vaatimukset partikkelimäärille. (European Commission 2022, s. 12-13)

Taulukko 1. EU GMP vaatimukset partikkelimäärille eri puhtausluokissa (European Commission 2022, s.12).

Grade	Maximum limits for total particle $\geq 0.5 \mu\text{m}/\text{m}^3$		Maximum limits for total particle $\geq 5 \mu\text{m}/\text{m}^3$	
	at rest	in operation	at rest	in operation
A	3 520	3 520	Not specified <sup>(a)</sup>	Not specified <sup>(a)</sup>
B	3 520	352 000	Not specified <sup>(a)</sup>	2 930
C	352 000	3 520 000	2 930	29 300
D	3 520 000	Not predetermined <sup>(b)</sup>	29 300	Not predetermined <sup>(b)</sup>

(a) A-puhtausluokalle ei ole erikseen määritetty vaatimusta  $\geq 5 \mu\text{m}$  hiukkasille toiminnan aikana tai lepotilassa. B-puhtausluokalle vaatimusta ei ole määritetty lepotilassa. Mikäli kontaminaatioiden valvonnan suunnitelma tai aikaisempi trendi niin osoittaa, voidaan harkita raja-arvon määrittämistä myös  $\geq 5 \mu\text{m}$  hiukkasille.

(b) D-puhtausluokalle ei ole ennalta määritetty vaatimusta toiminnan aikaisille hiukkasille. Niiden rajat tulee asettaa perustuen riskinarvioon ja rutiinimittauksista kertyneeseen dataan, mikäli mahdollista.

Puhdastilaluokille on partikkelimäärien lisäksi erillinen vaatimus myös mikrobien määrälle. Taulukossa 2 on esitetty vaatimustaso mikrobien määrälle eri puhtausluokissa. (European Commission 2022, s. 12-13)

Taulukko 2. EU GMP vaatimukset mikrobimäärille eri puhtausluokissa (European Commission 2022, s.13)

Grade	Air sample CFU/m <sup>3</sup>	Settle plates (diameter 90 mm) CFU/4 hours <sup>(a)</sup>	Contact plates (diameter 55 mm) CFU/plate
A	No growth		
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

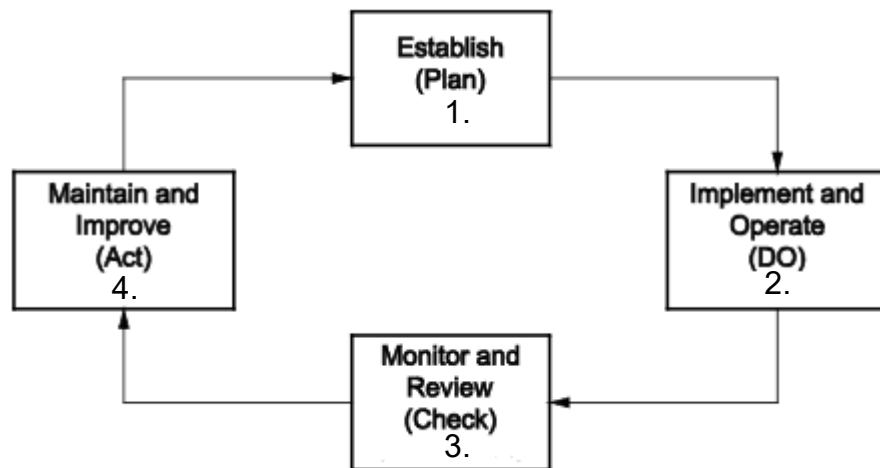
Tilaan päätyvien partikkelien määrää kontrolloidaan materiaalivalinnoilla, huoneiden välisillä paine-eroilla, ilman suodatuksella, tilassa liikkuvien henkilöiden pukeutumisella ja oikeanlaisella käyttäytymisellä. (Sandle & Saghee 2013, s. 7) Puhdastilaan tuleva ilma suodatetaan HEPA-suodattimilla.

Puhdistettua ilmaa johdetaan puhdastilaan suuria määriä, jolloin se laimentaa ilman partikkelipitoisuutta ja poistaa henkilöstön, koneiden ja muiden lähteiden ilmaan tuottamia partikkeleita, mikrobeja ja dispersoituneita kemikaaleja poistoilmaventtiilien kautta. Paine-eroilla taas hallitaan ilman virtaus-suuntia: korkeamman puhtausluokan puhdastilaan asetetaan korkeampi ilmanpaine kuin alemman puhtausluokan huoneisiin, jolloin ilma virtaa aina puhdastilasta pois päin. Puhdastilaa rakennettaessa valitaan materiaaleja, joista irtoaa mahdollisimman vähän partikkeleita ja jotka ovat helposti puhdistettavia. Lisäksi tilassa työskentelevältä henkilökunnalta edellytetään pukeutumista puhdastilapukuun, joka ikään kuin kapseloi henkilön ja minimoi ihmisestä ilmaan päätyvien partikkelien ja mikrobien määrän. (Whyte 2010, s. 1)

## 2.2 Kontaminaatioiden hallinta puhdastilassa

Mahdollisia kontaminaatiolähteitä on puhdastilassakin useita. Puhdastilojen tuotantoalueita ympäröivät vähemmän puhtaat alueet, kuten henkilösulut jossa tiloissa työskentelevä henkilöstö pukeutuu ja riisuutuu. Tiloihin tulevat materiaalit taas kulkevat materiaalisulkujen kautta. Kontaminaatio saattaa siirtyä näihin tiloihin henkilöstön ja materiaalien mukana, ja sitä kautta siirtyä puhdastiloihin. Mikäli pukeutumistekniikka ei ole hallussa tai hygieniasääntöjä ei noudateta, voi kontaminaatio siirtyä henkilökunnan vaatteiden tai käsineiden mukana lopulta tuotteeseen asti. Mikäli puhdastilaan tuotavia materiaaleja ei ole puhdistettu riittävästi tai materiaalit eivät ole puhdastilaan soveltuvia, voi kontaminaatio siirtyä puhdastilaan materiaalien mukana. Koneet ja erityisesti niiden liikkuvat osat sekä työkalut, joita käytetään koneiden kunnostukseen ja huoltamiseen, voivat myös olla kontaminaation lähteitä. Ilma johdetaan puhdastilaan HEPA-suodatinten läpi, mutta jos suodattimet eivät jostain syystä toimitukseen kunnolla, voisi kontaminaatio siirtyä puhdastilaan myös ilman välityksellä. Puhdastilan pinnat voivat myös kontaminoitua. Mikäli siivous ja desinfektio ei ole riittävällä tasolla, voi pintojen kontaminaatio johtaa lopulta tuotteen kontaminoitumiseen. (Whyte 2010, s. 205-206)

Mikrobiologisten kontaminaatioiden hallinnassa on tärkeää ottaa huomioon ne riskit, joita mikrobiologinen kontaminaatio voi aiheuttaa. Tätä varten pitää pohtia, mitkä ovat mahdollisia mikrobiologisen kontaminaation lähteitä, minkälaisia mikrobeja ja mikrobipitoisuuksia kontaminaatiolähteistä voi aiheutua ja kuinka todennäköistä on, että kontaminaatio vaikuttaa tuotteen laatuun, potilaaseen tai kuluttajaan. Mikrobiologisen kontaminaation hallinta pitää olla luonteeltaan jatkuvaa, ja siihen pitää sisältyä mikrobitalon monitorointia, seuranta ja mikrobien tunnistamista. Kyseessä on siis jatkuva prosessi, jonka tarkoitus on ennaltaehkäistä ja parantaa toimintaa. Prosessin vaiheet on esitetty kuviossa 1. (European Committee for Standardisation 2020, s.6-7)



Kuvio 1. Mikrobiologisen kontaminaation hallinnan prosessi. Prosessin vaiheet ovat: 1. Perusta, 2. Toteuta ja käytä, 3. Seuraa ja tarkista ja 4. Ylläpidä ja paranna. (European Committee for Standardisation 2020, s.6)

Mikrobiologisen kontaminaation hallintajärjestelmässä pitää ottaa huomioon seuraavat seikat:

- puhdastilan tai olosuhdevalvotun tilan kaikkien potentiaalisten kontaminaatiolähteiden ja reittien tunnistaminen
- Näistä kontaminaatiolähteistä ja reiteistä aiheutuvan riskin arvioiminen ja tarvittaessa valvontamenetelmien käyttöönotto tunnistettujen riskien pienentämiseksi
- monitorointisuunnitelman laatiminen kontaminaatiolähteiden tai niiden valvontamenetelmien tai molempien seuraamiseksi soveltuvien näytteenottomenetelmin
- hälytys- ja toimenpiderajojen sekä tarvittaessa tavoitetasojen määrittäminen, niiden toimenpiteiden määrittäminen jotka tulee tehdä rajojen ylittyessä
- jatkuva todentaminen sille, että kontaminaatioiden valvontajärjestelmä on riittävän tehokas ja täyttää sille asetetut suorituskykyparametrit. Jatkuva todentaminen tulee tehdä tarkastelemalla tuotteiden mikrobiologista puhtautta, olosuhdevalvonnan tuloksia, riskinarviointimenetelmiä,

valvontamenetelmiä, seurannalle asetettuja rajoja ja tarvittaessa muuttamalla niitä

- asianmukaisen dokumentaation luominen ja ylläpitäminen
- puhdastilassa tai valvotussa tilassa työskentelevän henkilökunnan kouluttaminen. (European Committee for Standardisation 2020, s.6-7).

### 2.3 Puhdastilan normaalifloora

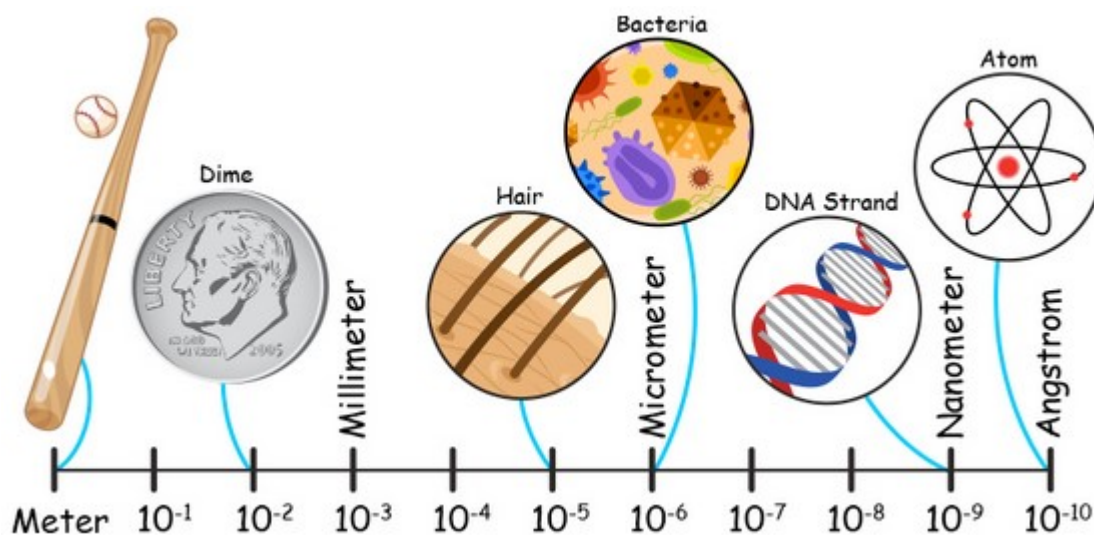
Mikrobit kulkeutuvat puhdastilaan joko henkilökunnan, pölyn tai tiloihin kuljetettujen materiaalien välityksellä. Puhdastilojen tyypillinen mikrobifloora muodostuu pääasiassa ihmisen normaaliflooraan kuuluvista mikrobeista, mutta niistä voi löytyä myös ympäristön mikrobeja. Tyypillisimmät puhdastiloista löydettävät mikrobit ovat Gram-positiivisia bakteereja. (Sandle 2011)

EU GMP Annex 1 mainitsee mm. desinfektioaineiden yhteydessä, että mikrobiston monitorointia tulee tehdä säännöllisesti desinfektion tehokkuuden arvioimiseksi sekä mikrobiston muutosten havaitsemiseksi. (European Commission 2022, s. 14) Normaaliflooran kartoitus on välttämätöntä tehdä säännöllisesti, jotta puhdastilan tyypillinen mikrobisto tunnetaan. Kun normaalifloora on tunnettu, on myös mahdollista reagoida herkemmin mahdollisiin systemaattisiin muutoksiin, jotka voivat kertoa muuttuneista työskentelytavoista, puutteista siivouksesta tai desinfektioon liittyvistä ongelmista. (Sandle 2011)

### 3 Puhdastilan siivous

Puhdastilan siivouksessa päämääränä on paitsi poistaa irtolika ja hiukkaset, saavuttaa riittävä mikrobiologinen puhtaustaso kohtuullisen ajan puitteissa, jotta puhdastilaluokan mikrobiologisen puhtauden vaatimustaso täyttyy. Siivous ja desinfektio ovat tärkeä osa puhdastilan kontaminaatioiden hallintaa, ja siksi on tärkeätä valita oikeat menetelmät sekä oikeat puhdistus- ja desinfektioaineet. (Sandle & Saghee 2013, s. 435)

Vaikka puhdastila on ympäristönä erittäin kontrolloitu, pitää puhdastilaakin siivota säännöllisesti jotta se ei kontaminoidu ja vaaranna tuotteen potilasturvallisuutta. Puhdastila voi näyttää visuaalisesti puhtaalta, koska ihmissilmällä pystyy havaitsemaan vasta n. 50 µm -kokoluokan hiukkasia. Pinnoilla voi kuitenkin olla paljon partikkeleita jotka ovat tätä pienempiä. (Whyte 2010, s. 327-328) Esimerkiksi yleisimpien bakteerien koko vaihtelee välillä 1-10 µm, ja bakteeri-itiöt ovat vielä tätäkin pienempiä. (Arizona State University 2014) Kuvassa 1 on esitetty erilaisia objekteja mittajanalla havainnollistamaan bakteerin kokoa.



Kuva 1. Bakteerin koko suhteutettuna mittajanalla. (Arizona State University 2014)

Puhdastilan siivous on tärkeätä suorittaa huolellisesti, jotta desinfektio onnistuu. Pinnoille jäävä kiinteä lika heikentää desinfektioaineen vaikutusta muodostamalla esteen desinfektioaineen ja mikrobien välille. Lika voi myös reagoida aineiden kanssa ja sitoa desinfektioaineen vaikuttavia aineita, jolloin desinfektioaineen vaikutus estyy. (Sandle & Saghee 2013, s. 435-436)

### 3.1 Puhdastilan siivouksen periaatteet

Puhdastilan siivouksessa on tiettyjä periaatteita, joita tulee aina noudattaa. Puhdastilaa siivoavien tulee ymmärtää, että puhdastilaa siivottaessa pääsääntöisesti poistetaan partikkeleita ja mikrobeja joita ei voi silmällä nähdä. Vaikka tila näyttää visuaalisesti puhtaalta, ei siivousta silti voi jättää tekemättä. Siivouksen aiheuttaman kontaminaatoriskin minimoimiseksi tulee varmistaa, että ilmanvaihto toimii normaalisti ja että siivoushenkilöstö pukeutuu puhdastilaan samalla tavoin kuin tuotantohenkilöstö. Siivotessa tulee liikkua rauhallisesti ja käydä läpi kaikki pinnat huolellisesti, jotta siivouksella ei levitetä mahdollista kontaminaatiota. Siivousaineet tulee laimentaa muovisissa tai ruostumattomasta teräksestä valmistetuissa ämpäreissä mieluiten tislattuun tai puhdistettuun veteen. Siivous- ja desinfektioaineet tulee valita sekä niiden puhdistus- ja desinfiointitehon että mahdollisimman pienen tuotehaitan perusteella. Pesu- ja desinfektioaineita tulee käyttää pienimmällä mahdollisella pitoisuudella jolla ne vielä toimivat tehokkaasti. Pesu- ja desinfektioainelaimennoksissakin voi esiintyä mikrobikontaminaatioita, ja tästä syystä laimennoksia ei tulisi säilyttää vaan jokaista käyttökertaa varten tulisi valmistaa uudet laimennokset. Sumutuspulloja ei tule käyttää pesu- ja desinfektioaineiden annostelussa, sillä ne vapauttavat miljoonia partikkeleita jokaisen suihkutuksen yhteydessä. (Whyte 2010, s. 343-345)

Pesuaine on kemikaali, jota käytetään poistamaan ei-toivottu aines pinnoilta. Yleisesti ottaen pesuaine toimii tunkeutumalla lian sisään ja heikentämällä pintajännitystä, jolloin lika liukenee pesuaineeseen ja se saadaan poistettua. Monet pesuaineet ovat pinta-aktiivisia aineita, jotka poistavat partikkelit pinnoilta

joko kapillaarivaikutuksella tai elektrostaattisten voimien ansiosta. (Sandle & Saghee 2013, s. 436)

Desinfektioaine on kemiallinen tai fysikaalinen aine, joka vähentää mikro-organismien määrää pinnoilla joko poistamalla tai tuhoamalla ne.

Desinfektioaineita on runsaasti erilaisia, ja niiden tehokkuus eri mikrobeihin sekä vaikutustapa vaihtelevat. (Sandle & Saghee 2013, s. 436)

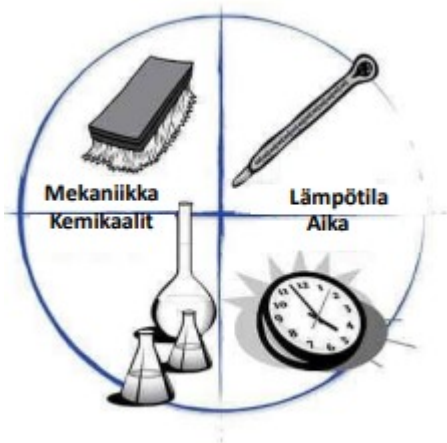
EU GMP Annex 1 Manufacture of sterile medicinal products määrittelee, miten desinfektioaineita tulisi puhdistiloissa käyttää. Desinfiointi tulee aina toteuttaa kirjatun ohjelman mukaisesti. Jotta desinfiointi on tehokasta, tulee pinnat puhdistaa ennen desinfiointia. Siivousohjelman tulisi tehokkaasti poistaa desinfektioaineiden jäämät pinnoilta. Ohjelmaan tulee aina sisältyä vähintään kaksi eri mekanismilla toimivaa desinfektioainetta, ja yhdessä niiden tulee tehot sekä bakteereihin että homeisiin. Säännöllisin väliajoin tulee käyttää myös itiöihin tehoavaa desinfektioainetta. Mikrobisto tulee säännöllisin väliajoin kartoittaa, jotta voidaan osoittaa desinfiointiohjelman tehokkuus ja havaita mahdolliset muutokset mikrobifloorassa. Desinfiointiprosessi tulee validoida, ja validoinnin tulee demonstroida sekä desinfektioaineiden sopivuus että tehokkuus niillä pintamateriaaleilla joilla niitä käytetään. Puhtausluokissa A ja B käytettävien desinfektioaineiden tulee olla steriilejä. Puhtausluokissa C ja D steriiliyttä ei vaadita, ellei se riskinarvioinnin perusteella ole tuotteen kannalta tarpeellista. Laimennettavia desinfektioaineita käytettäessä tulee laimentaminen tehdä siten, että vältytään kontaminaatioilta, ja laimennoksien mikrobiologista puhtautta tulee myös monitoroida säännöllisesti. (European Commission 2022, s.14-15)

### 3.2 Puhdistus ja sen osatekijät

Puhdistamisen tavoitteena on lian poistaminen. Puhdistumiseen vaikuttavat monet osatekijät. Koska lika on kiinnittynyt pintaan jollakin tavalla, on tavoitteena purkaa lian kiinnittymismekanismi. Puhdistusaine tulee valita sen mukaan, mitä tyyppiä lika on. Esimerkiksi happo tai emäs voivat tehostaa lian



liukenemista veteen. Usein myös lämpö tehostaa liukenemista, mutta sen lisäksi siihen tarvitaan aikaa. Sinnerin ympyrä (kuva 2) kuvaa puhdistumiseen vaikuttavia tekijöitä, jotka ovat kemiallinen energia, mekaaninen energia, lämpöenergia ja aika. (Aulanko 2010, s. 9-11)



Kuva 2. Sinnerin ympyrä (Kaiser 2016)

Sinnerin ympyrässä mainitut tekijät voivat korvata toisiaan jossain määrin, mutta eivät täysin. (Aulanko 2010, s.11)

Sinnerin ympyrä on nimetty sen kehittäjän Herbert Sinnerin mukaan. Ympyrä kuvaa siivouksen neljä perusosatekijää ja niiden vaikutusta toisiinsa ns. optimaalisessa pesuprosessissa. Ympyrän muoto ei milloinkaan muutu, mikä tarkoittaa, että jos jonkin osatekijän osuutta pienennetään, täytyy jonkin toisen osatekijän vastavuoroisesti kasvaa. (Kärcher LLC 2022)

### 3.3 Siivousmenetelmien ja välineiden valinta

Käytettävät siivousmenetelmät ja -välineet tulee valita niin, etteivät ne itsessään aiheuta kontaminaatoriskiä puhdastiloissa.

### 3.3.1 Siivousliinat

Puhdastilassa käytettävien siivousliinojen tulee joko olla kertakäyttöisiä tai vaihtoehtoisesti niiden puhtaus tulee osoittaa. Siivousliina tulee valita siten, että liinasta irtoavien partikkelien määrä on mahdollisimman alhainen, ja siivousteho paras mahdollinen. Siksi puhdastilassa käytettävät siivousliinat on valmistettu synteettisistä kuiduista ja ne on prosessoitu siten, että ne ovat mahdollisimman resistenttejä kemiallisesti. Hiukkasten irtoamiseen liinasta vaikuttavat toisaalta materiaalin rakenne ja toisaalta mekaaninen rasitus jolle liina altistuu. Kun liinalla pyyhitään pintaa, aiheutuu hankausta jonka seurauksena liinasta irtoaa partikkeleita. Mikäli käytetään steriilejä siivousliinoja, käytetään sterilointimenetelmänä yleensä gammasterilointia joka osaltaan rasittaa siivousliinan rakennetta. Liinan steriiliys ei kuitenkaan vaikuta siihen, miten paljon partikkeleita irtoaa pintojen pyyhkimisen aiheuttaman hankauksen seurauksena. (Cleanroom technology 2021a, s.46-47)

Käytettäessä liinaa oikeaoppisesti se tulee taitella, kastella siivous- tai desinfektioaineella ja lopulta tuoda kontaktiin siivottavan tai desinfioitavan pinnan kanssa. Siivoava vaikutus muodostuu, kun kuidut ja kudottu rakenne tai kuiturakenne on vuorovaikutuksessa puhdistettavan pinnan kanssa. Siivousteho kuvaa, kuinka paljon siivottavalla pinnalla ollutta likaa saadaan poistettua pyyhkimisprosessin aikana. Pinnan pyyhkimisessä myös muodostuu kitkaa, joka taas vaikuttaa siihen kuinka paljon liinasta irtoaa partikkeleita. (Cleanroom technology 2021a, s.46-47)

### 3.3.2 Pesuaineet

Puhdastilassa käytettävän pesuaineen valinnassa on kaksi tärkeää kriteeriä: pesuaineen kemiallinen koostumus ja sen yhteensopivuus käytettävän desinfektioaineen kanssa sekä soveltuvuus käytettäville pinnoille. Pesuaineet ovat tyypillisesti neutraaleja ionittomia liuoksia. Puhdastilassa suositaan pesuaineita, jotka eivät vaahtoa. Pesuaineen kemiallisen koostumuksen tulee olla yhteensopiva käytettävän desinfektioaineen kanssa. Joskus pesuaineesta

jää pinoille jäämiä, jotka voivat neutraloida desinfektioaineen vaikuttavan ainesosan. Tällöin desinfektioaineen mikrobisidinen teho jää huonoksi. (Sandle & Saghee 2013 s. 438)

Ideaali puhdistusaineliuos on ominaisuuksiltaan:

- myrkytön
- ei-syövyttävä
- ei-syttyvä
- riittävän nopeasti kuivuva
- ei vahingoita puhdasilan pintoja
- ei jätä jäämiä tai kontaminaatioita jotka ovat haitallisia tuotteelle
- tehokas kontaminaation poistamiseen
- kohtuullisen hintainen

Yleensä pesuaine ei täytä kaikkia yllä mainittuja kriteerejä. Pesuaineen valinnan tulee perustua sen käyttötarkoitukseen, ja valita sen perusteella pesuaineelta vaadittavat ominaisuudet. (Whyte 2010, s. 339)

Pesuaineita on runsaasti erilaisia, ja niiden vaikutusmekanismi vaihtelee.

Yleisesti käytetyt pesuaineet voidaan jaotella seuraavasti:

1. Saippuat
2. Anioniset pesuaineet
3. Kationiset pesuaineet
4. Ionittomat pesuaineet
5. Amfoteeriset pesuaineet
6. Emäksiset pesuaineet
7. Happamat pesuaineet

Pesuaineisiin on yleensä lisätty myös muita kemikaaleja, jotka tehostavat niiden vaikutusta. Näitä lisäaineita ovat esimerkiksi pinta-aktiiviset aineet, jotka liuottavat rasvaa ja saavat puhdistettavan pinnan kastumaan tasaisesti, sekä sekvestrantit, jotka vähentävät ionien määrää vedessä pienentäen näin veden kovuuden vaikutusta pesuaineen tehoon. (Sandle & Saghee 2013 s. 438-439)

### 3.3.3 Desinfektioaineet

Desinfektioainetta valitessa on useita kriteereitä, jotka tulisi ottaa huomioon valinnassa. (Sandle & Saghee 2013 s.439) EU GMP Annex 1 mukaan tulee aina käyttää vähintään kahta erilaista desinfektioainetta, jotta välttytään resistenttien kantojen muodostumiselta. (European commission 2022, s. 14) Yleisesti ottaen suositellaan, että toinen käytettävistä desinfektioaineista olisi sellainen, joka tehoaa myös itiöihin. (Cleanroom technology 2021b, s. 37)

Valittavalla desinfektioaineella tulisi olla mahdollisimman laaja mikrobispektri. Hyvä desinfektioaine on tehokas sekä gram-negatiivisiin että gram-positiivisiin bakteereihin. Desinfektioaineen vaikutusajan tulisi olla kohtuullisen lyhyt.

Desinfiointivan pinnan tulee pysyä kosteana koko desinfektioaineen vaikutusajan. Puhdastilassa ilmanvaihtokerroin on korkea, ja jos vaikutusaika on pitkä, voi pinnan kosteana pysyminen tuottaa haasteita. Ollakseen tehokas, desinfektioaine ei saa helposti neutraloitua orgaanisen aineksen, muovimateriaalien tai pesuainejäämien vaikutuksesta. Pesuaineista jää aina jonkin verran jäämiä puhdistetulle pinnalle, ja jos jäämät häiritsevät desinfektioaineen toimintaa, ei pinta välttämättä desinfioidu tehokkaasti. (Sandle & Saghee 2013 s. 439-440)

Jotkut desinfektioaineet vaativat tietyn lämpötilan tai pH:n toimiakseen kunnolla. Yleisesti ottaen, mitä alhaisempi lämpötila, sen pidemmän vaikutusajan desinfektioaine tarvitsee. pH taas saattaa vaikuttaa desinfektioaineen molekyyliarakenteeseen, kuten peretikkahappo joka on epästabiili voimakkaasti emäksisessä ympäristössä. Desinfektioaineella voi olla epäsuotuisia vaikutuksia kohdemateriaaliin. Siksi tulee ottaa huomioon pintamateriaalit, joilla desinfektioainetta tullaan käyttämään. Esimerkiksi kevytmetallit kuten alumiini ovat herkkiä joillekin desinfektioaineilla ja voivat ruostua niiden käytön seurauksena. (Sandle & Saghee 2013 s. 439-440)

Erilaisia, eri mekanismeilla vaikuttavia desinfektioaineita on runsaasti. Erilaiset desinfektioaineet tehoavat myös eri tavalla mikrobeihin ja niillä on erilaiset mikrobispektrit. Desinfektioaine voi vaikuttaa mikrobisolun soluseinään,

sytoplasmamembraaniin tai sytoplasmaan. Jotkut desinfektioaineet myös tunkeutuvat solun sisään diffuusion avulla, ja vaikuttavat sitten solun sisäisiin osiin. Desinfektioaineita voidaan jaotella niiden kemiallisten luonteen, vaikutustavan tai mikrobisidisen vaikutuksen perusteella. Kemiallisten ominaisuuksien perusteella desinfektioaineet voidaan luokitella seuraavasti:

#### Ei-hapettavat desinfektioaineet

1. Alkoholit
2. Aldehydit
3. Amfoteeriset desinfektioaineet
4. Happamat anioniset desinfektioaineet
5. Biguanidit
6. Fenoliset desinfektioaineet
7. Kvaternääriset ammoniumyhdisteet

#### Hapettavat desinfektioaineet

1. Halogeenit
2. Hapettavat aineet

(Sandle & Saghee 2013 s. 441-442)

Jotta desinfektioaine vaikuttaa tehokkaasti, on tärkeää noudattaa valmistajan antamia ohjeita mm. konsentraation ja vaikutusajan suhteen. Diversey Caren ja Purduen yliopiston yhteistyössä tekemässä tutkimuksessa tutkittiin desinfektioaineiden bakteereita tuhoavaa vaikutusta, kun valmistajan ohjeita ei noudatettu tarkasti. Tutkimukseen valittiin vetyperoksidi, natriumhypokloriitti ja kvattipohjainen desinfektioaine. Kaikkien desinfektioaineiden teho oli huomattavan heikko *Staphylococcus aureusta* vastaan, kun ohjeistettua vaikutusaikaa ja konsentraatiota ei noudatettu. (Cleanroom technology 2018a, s. 54)

EU GMP Annex 1:n mukaan desinfektioaineen teho tulee myös aina osoittaa. Osoitus tulee toteuttaa niillä tavoilla ja sellaisilla pintamateriaaleilla, joilla desinfektioainetta tullaan käyttämään. (European commission 2022, s.14) On

tärkeää, että desinfektioaineen tehon osoitus tehdään kaikilla sellaisilla pintamateriaaleilla, joilla desinfektioainetta on tarkoitus käyttää, sillä joidenkin desinfektioaineiden teho saattaa olla erilainen riippuen pinnan ominaisuuksista. (Cleanroom technology 2021b, s. 37) On myös seikkoja, joita on vaikea jäljitellä laboratorio-olosuhteissa, kuten tietyille tilalle tyypillinen mikrobifloora, erilaiset ja eri ikäiset pinnat, erilaiset fysikaalis-kemialliset voimat joilla mikrobit kiinnittyvät pintoihin, kullekin pinnalle käytettävät siivousmenetelmät, pinnoilla mahdollisesti esiintyvä lika tai pesu- ja desinfektioainejäämät sekä henkilökunnan tapa käyttää desinfektioainetta. (Cleanroom technology 2020, s. 43)

Desinfektioaineista jää desinfioitaville pinnoille erilaisia määriä jäämiä, jotka voivat ilmetä mm. pintojen tahmaisuutena, liukkautena tai sameutena. Contecin suorittamissa testeissä useimmat jäämät olivat poistettavissa helposti pyyhkimällä pinta desinfioinnin jälkeen vedellä tai alkoholilla. Jos pyyhintää ei tehdä, on mahdollista, että jäämät heikentävät desinfektioaineen tehoa muodostamalla esteen desinfektioaineen ja desinfioitavan pinnan välille. (Cleanroom technology 2019, s. 19-22)

#### 3.3.4 Puhdistettu vesi

Puhdistettu vesi on vettä, joka valmistetaan juomavedestä. Lääkkeiden, joiden valmistukseen ei vaadita steriiliä ja pyrogeenivapaata vettä, valmistukseen tulee käyttää puhdistettua vettä. (European Medicines Agency 2020, s. 5) European Pharmacopoeian monografia 0008 määrittelee raja-arvot puhdistetulle vedelle. Mikrobien osalta raja-arvo on 100 CFU/ml. (Council of Europe 2019, s. 4207-4208) Myös C-puhtausluokan puhdastilojen siivoukseen käytetään kohdeyrityksessä puhdistettua vettä.

Puhdistetun veden käsittely sisältää useita eri vaiheita. Vesijohtoveden laatu saattaa vaihdella paljonkin mm. eri vuoden aikoina, ja vaihtelun vaikutusta myöhempisiin vedenkäsittelyvaiheisiin pyritään minimoimaan veden esikäsittelyllä. Esikäsittelyyn voi kuulua hiekkasuodattimia isojen partikkelien

poistamiseksi, veden pehmentimiä, kloorausta ja aktiivihillisuodatusta. (Halls 2007, s.12-13)

Esikäsitteilyn jälkeen varsinainen puhdistettu vesi voidaan tuottaa usealla eri menetelmällä. Yleisimmin käytetty menetelmä on kationi-anionivaihto. Muita menetelmiä ovat sekakerrosioninvaihto, elektrodeionisaatio ja käänteisosmoosi. (Halls 2007, s.14-15)

Puhdistetun veden tuottojärjestelmä ja putkistot ovat alttiita biofilmin muodostumiselle. Biofilmin muodostumista pyritään ehkäisemään veden jatkuvalla ja riittävän kovalla virtauksella, putkistomateriaalien tasaisilla pinnoilla ja säännöllisellä sanitoinnilla. (Halls 2007, s.11-12)

Vesijärjestelmään pääsee raakaveden mukana pieniä määriä mikrobeja, jotka voivat alkaa lisääntymään mikäli olosuhteet ovat suotuisat. Tunnetuimpia patogeenisiä mikrobeja vesijärjestelmissä ovat *Legionella*-bakteerit. Kaikki vesijärjestelmät, joissa vesi on riittävän lämmintä (20-45 °C), ovat potentiaalisia kasvualustoja *Legionella*-bakteereille. *Legionella*-bakteerien kasvua voidaan ehkäistä varmistamalla, että vesi on joko riittävän kylmää (<20 °C) tai riittävän lämmintä (>55 °C) koko vesijärjestelmässä. (Terveystieteiden ja Hyvinvoinnin Laitos 2021) Kohdeyrityksen vesijärjestelmälle suoritetaan joka yö sanitointi, jolloin veden lämpötila nostetaan 5 tunnin ajaksi 80 °C:een, joten *Legionella*-riskiä ei ole.

## 4 Biofilmi

Mikrobit voivat kasvaa vapaina, mutta sen lisäksi niille on tyypillistä kasvaa pinnoille kiinnittyneinä eliöyhteisöinä. Tällaista eliöyhteisöä kutsutaan biofilmiksi. Biofilmi muodostuu paitsi elävistä mikrobisoluista, myös kuolleista mikrobisoluista, solujen kappaleista ja niiden aineenvaihduntatuotteista. (Arampatzi et al. 2011) Biofilmin muodostus on tärkeä mekanismi bakteereille, koska se tehostaa niiden taudin aiheuttamiskykyä, parantaa resistenssiä mikrobilääkkeille ja mikrobisideille sekä auttaa suojautumaan immuunijärjestelmää vastaan. (Preda & Sandulescu 2019)

### 4.1 Biofilmin kemiallinen rakenne

Biofilmit muodostuvat pääasiallisesti mikrobisoluista sekä niiden erittämistä polymeereistä, eksopolysakkarideista (EPS). (Arampatzi et al 2011) Biofilmi voi sisältää pelkästään tiettyä mikrobia, mutta pääsääntöisesti se muodostuu useasta eri mikrobilajista, jotka saattavat hyötyä toisistaan mutta myös haitata toistensa kasvua. (Tapiainen et al 2010) EPS:n osuus biofilmin orgaanisesta aineksesta voi vaihdella 50 %:sta 90 %:iin. EPS:n kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet voivat vaihdella, mutta se muodostuu pääasiallisesti polysakkarideista. EPS:n vesipitoisuus on yleensä suuri, sillä se pystyy sitomaan itseensä paljon vettä vetysidoksilla. Se voi olla luonteeltaan hydrofobista, mutta useimmat EPS-molekyylit ovat sekä hydrofiilisiä että -fobisia. Myös EPS:n liukoisuus voi vaihdella paljon. (Arampatzi et al 2011) Lisäksi EPS voi sisältää mm. proteiineja, lipidejä ja DNA:ta. (Preda & Sandulescu 2019)

Biofilmin koostumus ja muoto voivat vaihdella paljon. Joidenkin Gram-negatiivisten bakteerien muodostaman biofilmin polysakkaridit ovat neutraaleja tai polyanionisia. Anioninen ominaisuus johtuu uronihappojen tai ketaaliin sitoutuneiden pyruvaattien läsnäolosta. Tämä ominaisuus taas saa aikaan sen, että kaksiarvoiset kationit kuten kalsium tai magnesium voivat kiinnittyä



biofilmiin ja vahvistaa entisestään biofilmin kykyä kiinnittyä pintoihin. Joidenkin Gram-positiivisten bakteerien, kuten stafylokokkien, muodostamien biofilmien EPS:t taas ovat pääasiallisesti kationisia. (Arampatzi et al 2011)

EPS:llä on kaksi tärkeää ominaisuutta, joilla voi olla merkittävä vaikutus biofilmiin. Ensinnäkin polysakkaridien koostumus ja rakenne määräävät EPS:n ensisijaisen konformaation. Esimerkiksi monilla bakteerien EPS:llä on runkorakenteita, jotka sisältävät 1,3- tai 1,4-p-sidottuja heksoosijäämiä ja jotka ovat yleensä jäykempiä, vähemmän muotoutuvia ja joissakin tapauksissa huonosti liukenevia tai kokonaan liukenemattomia. Muut EPS:t taas saattavat olla valmiiksi liukoisia veteen. (Arampatzi et al 2011)

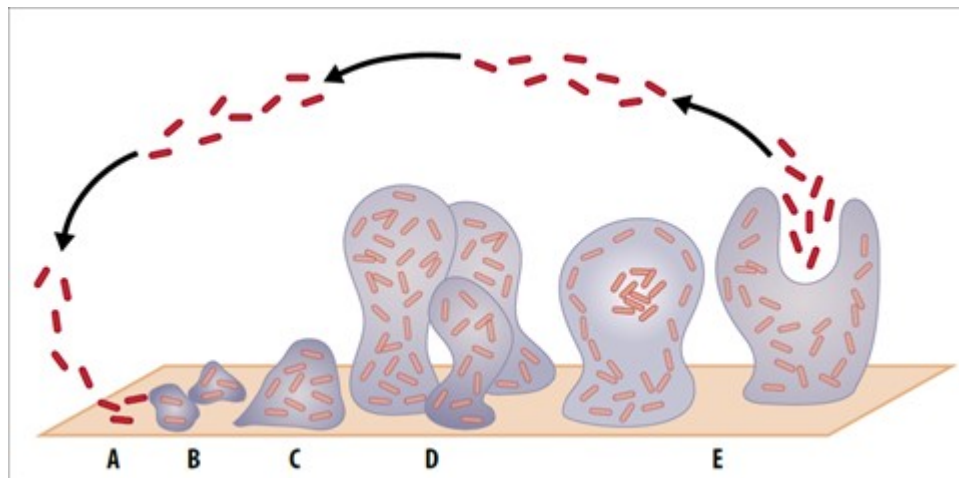
Toiseksi biofilmien EPS ei ole yleensä yhtenäinen, vaan sen muoto voi vaihdella ajan myötä. Eri organismit tuottavat erilaisia määriä EPS:ää, ja EPS:n määrä kasvaa biofilmin iän myötä. EPS voi liittyä metalli-ioneihin, kaksiarvoisiin kationeihin ja muihin makromolekyyleihin (kuten proteiineihin, DNA:han, lipideihin ja jopa humusaineisiin). Riippuen ympäristöstä, johon biofilmi on muodostunut, EPS:stä voi löytyä myös epäorgaanista materiaalia kuten mineraalikiteitä tai korroosiopartikkeleita. Jokainen biofilmi on koostumukseltaan yksilöllinen. (Arampatzi et al 2011)

#### 4.2 Biofilmin muodostuminen

Biofilmi muodostuu, kun bakteerit kiinnittyvät pysyvästi pinnan ja mikrobisolun sähkökemiallisesta vuorovaikutuksesta johtuen pintaan tai toisinaan myös kudoksen sisään. (Tapiainen et al. 2010) Tavallisesti bakteerit kiinnittyvät orgaanisista molekyyleistä, kuten ravinteista tai syljen proteiineista muodostuneeseen kerrokseen, joka voi osaltaan tehostaa bakteerien kiinnittymistä. Kiinnittymisen saa aikaan heikko palautuva van der Waalsin voima solun pinnan ja substraatin välillä (Dufour et al 2012).

Kiinnittymisen jälkeen solut kasvavat ja jakaantuvat, jonka seurauksena muodostuu mikropesäkkeitä. Mikropesäkkeet kasvavat asteittain ja vähitellen yhdistyvät muodostaen pinnan peittävän ensimmäisen solukerroksen. Kun

kasvu jatkuu ja useat solukerrokset peittävät pinnan, muodostumisen kolmas vaihe saavutetaan. Kolmannessa vaiheessa biofilmissä on makropesäkkeitä, joita ympäröivät vesikanavat. Ravinteet ja signaalimolekyylit pääsevät liikkumaan vesikanavia pitkin. Lopulta osa biofilmisoluista voi irrota joko yksittäin tai ryppäinä selviytyäkseen ravintoaineiden rajoittuessa, tai yksinkertaisesti levitäkseen uusiin paikkoihin. Yleensä biofilmin leviäminen tapahtuu vasteena ympäristön muutokseen ja on riippuvainen kasvuolosuhteista. (Dufour et al 2012) Biofilmin muodostuminen esitetään kuvassa 3.



Kuva 3. Biofilmin synnyn vaiheet. (Tapiainen & al. 2010).

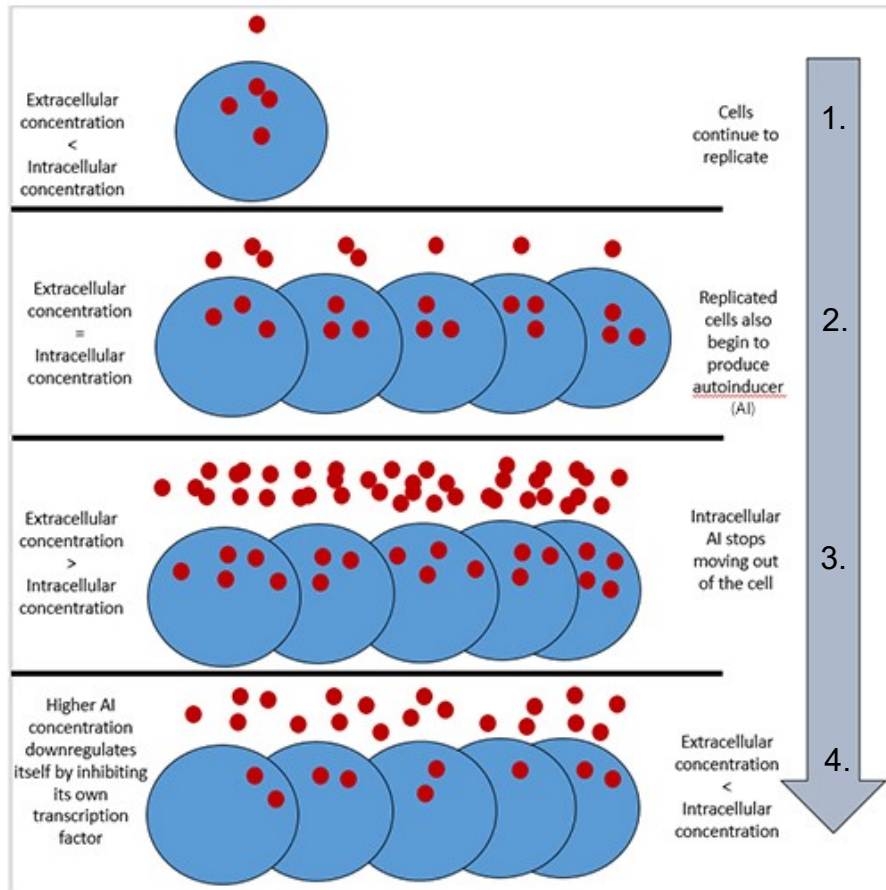
Tapiainen et al. (2010) kuvaavat biofilmin synnyn eri vaiheet seuraavasti: "A) Mikrobien kiinnittyminen elolliseen tai elottomaan pintaan, B) Irreversiibeli adhesio, C) Monisoluiainen kerroksittainen rakenne, D) Osa mikrobeista muodostaa biofilmissä sienimäisiä rakenteita ja vesikanavia, ja E) Biofilmistä voi irrota mikrobeja, jotka saattavat aiheuttaa uuden infektion."

Biofilmi on bakteerin kannalta edullinen muoto, sillä sen rakenne suojaa sitä ja biofilmin poistaminen on hankalaa sekä mekaanisesti että kemiallisesti. (Friman & Kivisalmi 2015) On osoitettu, että jos läsnä on orgaanista materiaalia, bakteeribiofilmi voi sietää erittäin korkeita konsentraatioita hapettavia desinfektioaineita, mikä voi johtaa desinfiointin epäonnistumiseen. (Jaglic et al 2012) Pitkälle kehittynyt bakteeribiofilmi saattaa myös alkaa tuottaa ns. signaalimolekyylejä. Bakteri voi tuottaa useampia proteiineja biofilmiin

kiinnittyneenä kuin irrallisena. Nämä proteiinit saattavat alkaa toimia bakteerien omien geenien säätelijöinä, joka voi aiheuttaa esimerkiksi bakteerien liman tuoton vähenemistä tai lisääntymistä kulloisenkin tarpeen mukaan. (Friman & Kivisalmi 2015) Tämä bakteerien välinen viestintä tunnetaan nimellä quorum sensing eli ryhmäviestintäilmiö. (Windsor 2020)

#### 4.3 Quorum sensing

Quorum sensing on bakteerien oma viestintäkeino, ja eri lajien väliset signaalit vaihtelevat. Jotkut bakteerilajit voivat tulkita monia erilaisia signaaleja, kun taas toiset lajit reagoivat vain muutamaan signaaliin. Quorum sensing mahdollistaa yksittäisten bakteerien koordinoinnin ja toisaalta esimerkiksi biofilmin muodostumisen tai itiöinnin. Quorum sensingin toimintaperiaate on esitetty kuvassa 4. (Windsor 2020)



Kuva 4. Miten Quorum sensing toimii bakteereilla. 1. Solun ulkoinen konsentraatio on korkeampi kuin solun sisäinen, ja solut jatkavat monistumista. 2. Solun sisäinen ja ulkoinen konsentraatio ovat yhtä suuret, ja monistuneet solut alkavat myös tuottaa autoindusoreja. 3. Solun ulkoinen konsentraatio on korkeampi kuin solun sisäinen, ja solun sisäiset autoindusorit lakkaavat siirtymästä solun ulkopuolelle. 4. Solun sisäinen konsentraatio on korkeampi kuin solun ulkoinen, ja korkeampi konsentraatio säätelee itseään inhiboimalla omaa transkriptiotekijäänsä. (Windsor 2020)

Yksittäiset bakteerit syntetisoivat lisääntymissyklin aikana autoindusoreja. (Windsor 2020) Autoindusoreja on ainakin kolmea erilaista: Gram-negatiivisilla bakteereilla asyylihomoseriinilaktoneja ja Gram-positiivisilla bakteereilla oligopeptidi. Autoindusori-2:a syntetisoivat sekä Gram-negatiiviset että Gram-positiiviset bakteerit. (Preda & Sandulescu 2019)

Gram-negatiivisilla bakteereilla nämä autoindusorit muodostuvat asyylihomoseriinilaktonista, joka voi passiivisesti diffusoitua niiden ohuen soluseinän läpi. Gram-positiivisilla bakteereilla taas autoindusorit muodostuvat peptideistä, ja ne täytyy aktiivisesti kuljettaa peptidoglykaaniseinän läpi käyttäen ATP-sidoskasetti -kuljetussysteemiä. Kummassakin tapauksessa autoindusorit siirtyvät pois yksittäisistä soluista, kun niitä tuotetaan. Bakteerien lisääntyessä autoindusoreja tuottavia soluja tulee yhä lisää, kunnes autoindusorien solun ulkoinen pitoisuus saavuttaa kriittisen tason. Tässä vaiheessa autoindusorien poistuminen solusta muuttuu energian kannalta epäedulliseksi, ja siitä seuraa solun sisäinen autoindusorien pitoisuuden kasvu. Kun solun sisäinen pitoisuus kasvaa, autoindusorit sitoutuvat reseptoreihinsa ja laukaisevat signaaliketjuja, jotka muuttavat transkriptiotekijän aktiivisuutta ja siten geenien ilmentymistä. (Windsor 2020)

Bakteerisolujen välinen kommunikointi on riippuvainen ionikanavavälitteisestä sähköisestä signaloinnista. On havaittu, että *Bacillus subtilis* -biofilmi voi lähettää solun ulkoisia kaliumsignaaleja energian avulla. Kaliumsignaalit aiheuttavat sähköaalloja, jotka leviävät läpi biofilmin. Sähköaallot saavat aikaan aineenvaihduntatiloja, jotka saavat bakteerisolut toimimaan yhteistyössä. (Manna et al 2020)

#### 4.4 Biofilmin kiinnittymiseen vaikuttavat tekijät

Bakteerien kiinnittymisessä pintaan on pinnan varauksella suuri merkitys. Pinnan varaus määrittää bakteerin ja pinnan välisen kiinnittymisvoiman. Useimmat bakteerisolut ovat negatiivisesti varautuneita, joten positiivisesti varautunut pintamateriaali on alttiimpi ja negatiivisesti varautunut pintamateriaali taas vastustuskykyisempi bakteerien tarttumiselle. Pinnoilla, joissa on tiettyjä kationisia ryhmiä kuten kvaternääristä ammoniumia tai polyetylenei-imiiniä, on antimikrobinen vaikutus ja ne voivat tappaa kiinnittyneet solut. Pinnan varaus voi vaikuttaa myös biofilmin pitkän aikavälin rakenteeseen. (Song et al 2015)

Pinnan ominaisuuksilla on merkittävä vaikutus bakteerien tarttumiseen. Yleisesti ottaen biofilmi voi kuitenkin kehittyä mihin materiaaliin tahansa. Kiinnittymiseen vaikuttavat pinnan tekstuuri, hydrofobisuus tai -fiilisyys, pH, lämpötila ja ravintoainekoostumus. Joitakin pintoja peittää niin sanottu hoitokalvo, joka sisältää makromolekyylejä kuten orgaanisia aineita. Tämä lisää bakteerisolujen kiinnittymistä pintaan. On myös osoitettu, että mikä tahansa pinnalla olemassa oleva EPS helpottaa bakteerien kiinnittymistä. (Srey et al 2013)

## 5 Mittausmenetelmät ja välineet

Standardi DIN EN ISO 17141 käsittelee biokontaminaatioiden valvontaa puhdastiloissa ja niihin liittyvissä valvotuissa ympäristöissä. Standardin mukaan osana mikrobiologisen kontaminaation valvontaprosessia mikro-organismien pitoisuutta pinnoilla ja ilmassa tulee mitata ja havaitut mikro-organismit tunnistaa, jotta valvontajärjestelmän tehokkuus voidaan osoittaa. Standardin liitteessä E kuvataan menetöt, jotka perustuvat mikrobien viljelyyn. Standardi mainitsee myös, että on sallittua käyttää näiden menetelmien lisäksi sellaisia vaihtoehtoisia menetelmiä, jotka voivat parantaa ymmärrystä puhtaan valvotun tilan mikrobiologisesta puhtaudesta. Vaihtoehtoiset menetelmät voivat kuitenkin vaatia teknistä lisäkehitystä ja validointia, jotta ne voidaan hyväksyä käyttöön. (European Committee for Standardisation 2020, s. 18)

### 5.1 Kontaktimaljamenetelmä

Standardin DIN EN ISO 17141 liitteessä E mainitaan puhdastilan pintojen mikrobiologisen puhtauden tarkkailuun menetelmiksi kontaktimaljat sekä -liuskat tasaisille pinnoille ja sivelynäytepuikot epätasaisille pinnoille.

Kontaktimenetelmässä maljan halkaisija on tyypillisesti 55 mm, ja maljan elatusainepinta on hieman kupera. Maljaa painetaan tutkittavaa pintaa vasten tasaisella voimalla muutamia sekunteja, jolloin elinkelpoiset partikkelit jäävät kiinni maljan elatusainepintaan. Tämän jälkeen maljan kansi suljetaan, näyte inkuboidaan ja kasvavien pesäkkeiden määrä lasketaan maljalta. Tulos ilmoitetaan pesäkelukuna maljan pinta-alaa kohti, joka on 55 mm halkaisijaltaan olevalle maljalle 25 cm<sup>2</sup>. (European committee for standardization, 2020)

Kun käytetään kontaktimaljamenetelmää olosuhdevalvonnassa, tulee maljan elatusaineen olla non-selektiivinen, jotta sillä voidaan havaita mahdollisimman monenlaisia mikrobeja. Koska pinnoilla käytetään paljon puhdistus- ja desinfektioaineita, on kaupallisten maljojen elatusaineeseen lisätty lisäaineita,

jotka neutraloivat pinnoilla olevien desinfektioainejäämien antimikrobista vaikutusta. (Cleanroom Technology 2018)

## 5.2 Pintalevitysmenetelmä

Pintalevitystä käytetään tyypillisesti silloin, kun halutaan erottaa mikrobit hyvin pienestä määrästä näytettä. Näyte siirrostetaan agarmaljalle ja levitetään agarpinnalle, jolloin saadaan näytteen sisältämät mikrobit leviämään ympäri agarpintaa. Pintalevitysmenetelmää käytetään mm. silloin, kun halutaan saada selville tutkittavan liuoksen mikrobikonsentraatio. (Sanders 2012)

Agar valitaan sen mukaan, mitä mikrobia sillä halutaan kasvavan. Mikäli agar valmistetaan itse, kannattaa se tehdä jo pintalevitystä edeltävänä päivänä, koska siirrostettu näyte absorboituu paremmin jo kuivuneeseen kuin tuoreeseen ja kosteaan agariin. Pintalevitysmenetelmässä käytetään 90 mm petrimaljoja, ja sopiva siirrostusmäärä maljalle on 0,1 ml. Maljalta on mahdollista laskea maksimissaan n. 250 pesäkettä. Tätä suuremmat pesäkemäärät kasvavat jo niin tiheästi, että ne voivat häiritä toistensa kasvua ja kasvaa päällekkäin, eikä tulos näin ollen ole luotettava. Tutkittava liuos laimennetaan niin, että oletettu pesäkeluku saadaan sopivaksi. Tyypillisesti näytteestä tehdään useampi laimennos eli laimennossarja. (Wise 2006)

Kun näyte on siirrostettu agarille, tulee se levittää mahdollisimman nopeasti, sillä jotkut mikrobit kiinnittyvät agariin hyvin nopeasti. Mikäli tehdään laimennossarja, on suositeltavaa pipetoida laimennokset agarmaljoille niin, että aloitetaan laimeimmasta pitoisuudesta ja lopetetaan väkevimpään pitoisuuteen. Tällöin pipetoinnin voi tehdä käyttäen samaa pipetin kärkeä. Levitys maljalle tehdään joko muovisella, lasisella tai metallisella kulmasauvalla. Levityksen jälkeen maljan annetaan olla n. 10-20 minuuttia, jotta mikrobit ehtivät kunnolla kiinnittyä agariin. Tämän jälkeen maljan voi kääntää ylösalaisin ja siirtää inkuboitumaan. (Wise 2006)



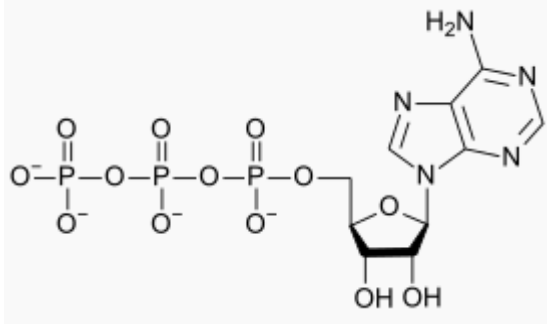
### 5.3 Bioluminesenssi

Luminometri on laite, joka mittaa ATP-pitoisuutta pinnoilta ja vesinäytteistä ja osoittaa siten pinnan puhtauden tasoa. Käytetty menetelmä on bioluminesenssi. ATP:a on läsnä kaikessa orgaanisessa materiaalissa. Luminometri käyttää lusiferiini/lusiferaasi-entsyymiä tuottamaan valoreaktion, jossa valon määrä on suoraan verrannollinen näytteessä olevaan ATP:n määrään. Se mittaa näytteen emittoiman valon intensiteettiä, ja antaa tuloksen suhteellisena valoyksikkönä, relative light unit (RLU). Tulos saadaan muutamissa sekunneissa. (3M 2016)

ATP-menetelmässä käytetään alun perin tulikärpäsistä eristettyä lusiferaasia. Valoreaktio syntyy ATP-molekyylistä riippuvaiseen hapettumisreaktion seurauksena, jossa pelkistetty D-lusiferiini (2-(4-hydroksibentsotiatsoli-2-yyli)-2-tiatsoliinihappo) tuottaa hiilidioksidia, adenosiinimonofosfaattia (AMP), epäorgaanista pyrofosfaattia ja oksilusiferiinia magnesiumin ja molekulaarisen hapen läsnäollessa. Muodostuva oksilusiferiini on virittyneessä tilassa, ja kun se palautuu perustilaan, vapautuu energiaa joka havaitaan valona. (Kirkpatrick et al. 2018) Valoreaktio havaitaan aallonpituudella 562 nm. Emittoituneen valon määrä on suoraan verrannollinen läsnäolevan ATP:n määrään. (Halls 2004, s.166)

#### 5.3.1 Adenosiinitrifosfaatti

ATP on solujen energian lähde. ATP on rakenteeltaan nukleosiditrifosfaatti, joka koostuu tyypipitoisesta emäksestä (adeniinista), riboosisokerista ja kolmesta fosfaattiryhmästä. (Dunn, J., Grider, M. H. 2022) ATP:n rakenne on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Adenosiinitrifosfaatin rakenne. (Wikipedia 2020)

ATP on erinomainen molekyyli energian lyhytaikaiseen varastointiin ja nopeaan vapauttamiseen siinä olevien fosfaattiryhmien ansiosta. Fosfaattiryhmät kytkeytyvät toisiinsa fosfodiesterisidoksilla. Nämä sidokset sisältävät suuren määrän energiaa, koska niihin liittyvät elektronegatiiviset varaukset kohdistavat fosfaattiryhmien välille hylkivän voiman. Metaboliaprosessien kautta ATP hydrolysoituu ADP:ksi ja edelleen AMP:ksi sekä vapaiksi epäorgaanisiksi fosfaattiryhmiksi. (Dunn & Grider 2022)

### 5.3.2 Pesu- ja desinfektioainejäämien vaikutus luminometrin mittaustuloksiin

Omidbakhsh, Ahmadpourin ja Kennyn tekemässä tutkimuksessa testattiin desinfektioainejäämien vaikutusta mittaustulokseen neljän eri valmistajan luminometrillä. Tutkimuksessa käytettiin neljäätoista eri desinfektioainetta, joista osassa oli sama vaikuttava aine mutta erilainen kemiallinen koostumus. Vaikuttavia ainesosia testattiin erikseen tislattuun veteen sekoitettuna. Monen desinfektioaineen kohdalla vaikuttava aine yksinään ei aiheuttanut vaikutusta mittaustulokseen, vaan sen sai aikaan desinfektioaineen kemiallinen koostumus. Tutkimuksessa havaittiin, että jäämät voivat vaikuttaa mittaustulokseen kumpaankin suuntaan tahansa: mitattu RLU-arvo voi olla suurempi tai pienempi kuin todellinen tulos. Jokaisen desinfektioaineen vaikutus mittaustulokseen oli erilainen. (Omidbakhsh et al 2014)

#### 5.4 Pinta-ATP -menetelmä

Pinta ATP -menetelmällä voidaan mitata ATP:n määrää erilaisilta pinoilta puhdistuksen tehokkuuden osoittamiseksi. Työssä käytetty 3M™ Clean-Trace™ Surface ATP UXL100 -testikitti sisältää näyteputken, jossa on entsyymiliuoksen lisäksi kationisella liuoksella esikostutettu sivelynäytepuikko. Liuos helpottaa kiinteän aineksen irtoamista tutkittavalta pinnalta ja samalla tehostaa ATP:n vapautumista. (3M 2013a) Testikitin käyttö ja mittaus on esitetty kuvassa 6.



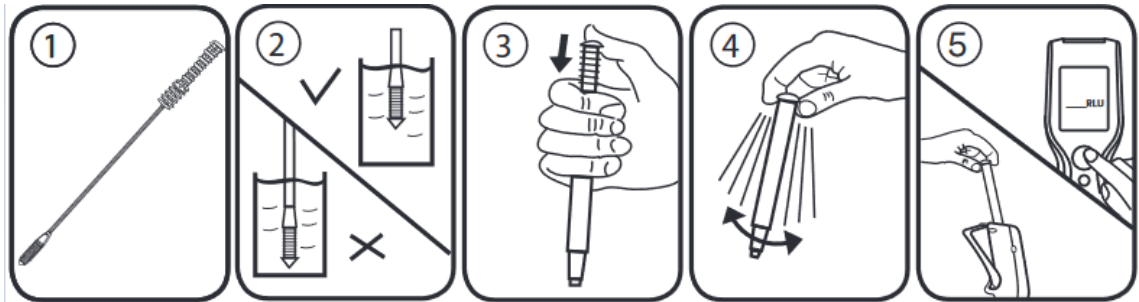
Kuva 6. Pinta ATP testin suorittaminen: 1. ja 2. Tutkittavaa pintaa sivellään esikostutetulla sivelynäytepuikolla n. 10x10 cm alalta pyörittäen samalla puikkoa. 3. Sivelynäytepuikko painetaan näyteputkeen, jossa on entsyymiliuos. 4. Näyteputkea sekoitetaan. 5. Näyteputki työnnetään luminometriin ja painetaan mittausnäppäintä, jolloin saadaan tulos RLU-yksikköinä. (3M 2013a)

Esikostutetulla puikolla sivellään tutkittavaa pintaa n. 10 x 10 cm eli 100 cm<sup>2</sup> alalta. Puikko painetaan testiliuokseen jolloin testi aktivoituu ja entsyymi reagoi kerätyn näytteen kanssa muodostaen valoreaktion. Mittaus luminometrillä suoritetaan heti testin aktivoimisen jälkeen. (3M 2013a)

#### 5.5 Vesi-ATP -menetelmä

Vesi ATP -menetelmällä voidaan mitata vapaan ATP:n määrä tutkittavasta vedestä. Työssä käytetty 3M™ Clean-Trace™ Water-Free ATP AQF100 -testikitti sisältää näyteputken, jossa on entsyymiliuos sekä testinäytepuikko. Testinäytepuikko sisältää näytteenkeräysrenkaita, jotka on päällystetty kostutusaineella. Kostutusaine helpottaa nestemäisen näytteen keräämistä niin,

että ATP ei vapaudu ehjistä mikrobisoluista. (3M 2013b) Testikitin käyttö ja mittaus on esitetty kuvassa 7.



Kuva 7. Vesi ATP -testin suorittaminen: 1. Vesinäytepuikko 2. Näytepuikko upotetaan tutkittavaan liuokseen kuvan osoittamalla tavalla niin, ettei puikko kosketa astian pohjaa. 3. Näytepuikko painetaan näyteputkeen, jossa on entsyymiliuos. 4. Näyteputkea sekoitetaan. 5. Näyteputki työnnetään luminometriin ja painetaan mittausnäppäintä, jolloin saadaan tulos RLU-yksikköinä. (3M 2013b)

Testinäytepuikko upotetaan kokonaan tutkittavaan vesinäytteeseen, jonka jälkeen puikko painetaan testiliuokseen. Testi aktivoituu ja entsyymi reagoi kerätyn näytteen kanssa muodostaen valoreaktion. Mittaus luminometrillä suoritetaan välittömästi testin aktivoimisen jälkeen. (3M 2013b)

## 6 Työn suoritus

Työn tarkoituksena oli selvittää, voitaisiinko ATP-menetelmää käyttää puhdasveden puhtauden tarkkailussa sekä puhdastilojen pintojen puhtauden tarkkailussa perinteisten menetelmien rinnalla. ISO 17141 määrittelee menetelmät pintapuhtauden tarkkailuun puhdastilassa. Kontaktimaljamenetelmä on yleisesti käytetty menetelmä, mutta sen heikkoutena on pitkä inkubointiaika (8-12 vrk). Kontaktimaljamenetelmällä ei myöskään saada näkyviin muuta kuin elävät, monistumiskykyiset ja kyseisellä elatusaineella kasvavat mikrobit. ISO 17141 mukaan on sallittua käyttää pintapuhtauden tarkkailussa muita menetelmiä kontaktimaljamenetelmän rinnalla. ATP-menetelmän käyttö kontaktimaljamenetelmän rinnalla mahdollistaisi elävien mikrobien lisäksi kaiken muun orgaanisen materiaalin havaitsemisen ja tuloksen saamisen välittömästi. Esimerkiksi biofilmi jää yleensä kontaktimaljamenetelmällä havaitsematta, mutta ATP-menetelmällä se voitaisiin saada näkyviin.

Työn lähtökohtana oli kohdeyrityksen puhdastiloissa jo pitkään jatkuneet ongelmat. Oli ennalta tiedossa, että tilojen lattioilla on jossakin määrin pesuainejäämiä, sillä lattioiden oltiin toisinaan havaittu olevan hieman tahmaisia. Tahmaisuudesta huolimatta lattioista otetuissa puhdistuksen jälkeisissä näytteissä ei läheskään aina havaittu kasvua kontaktimenetelmällä otetuissa näytteissä. Oletuksena oli, että pesuainejäämistä johtuen lattiapinnoilla esiintyy myös biofilmiä.

Luminometriä käytetään pintojen puhtauden tarkkailussa elintarviketeollisuudessa sekä sairaaloissa. Puhdastiloissa sitä ei vielä käytetä. Trsan, Vehovc, Seme ja Srcic kuvaavat 2020 julkaistussa artikkelissaan "Evaluation of ATP bioluminescence for monitoring surface hygiene in a hospital pharmacy cleanroom" tutkimuksen, jossa luminometriä kokeiltiin sairaalan apteekin D-puhtausluokan puhdastilassa. Tutkimuksen tavoitteena oli vertailevasti arvioida ATP-menetelmän toteutettavuutta, hyödyllisyyttä ja rajoituksia pintahygienian seurannassa puhdastilassa. Tutkimuksen mukaan luminometrillä saatiin riittävä vaste D-puhtausluokassa, jotta sitä voitaisiin

käyttää kyseisen tilaluokan pintojen puhtauden tarkkailuun. (Trsan & al. 2020)Tälle työlle asetettiin kaksi tavoitetta:

1. tutkia, minkälainen vaste luminometrillä saadaan puhdistilassa erilaisilta pintamateriaaleilta sekä puhdistetusta vedestä
2. tutkia, voidaanko lattioilta otettujen näytteiden perusteella päätellä, onko lattioilla pesuainejäämiä ja/tai biofilmiä

Saatujen tulosten perusteella voitaisiin tehdä päätös, kannattaako ATP-menetelmää lähteä kehittämään kohdeyrityksen käyttöön nopeammaksi menetelmäksi perinteisten menetelmien rinnalle. Työlle laadittiin työsuunnitelma, jonka mukaan työ toteutettiin. Kaikki työvaiheet tehtiin mikrobiologisen laboratorion tiloissa.

#### 6.1 Vesi ATP -menetelmän testaus

Vesi-ATP -menetelmän testaamiseen valittiin näytteiksi Turun kaupungin raakavesi sekä farmakopean mukainen puhdistettu vesi. Valittujen näytteiden lisäksi valmistettiin laimennossarja, jossa puhdistettuun veteen ympättiin *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 -bakteerikantaa. Bakteerikannasta valmistettiin työn suoritusta edeltävänä päivänä väkevä suspensio, jota inkuboitii 24 h +30-35 °C lämpötilassa. Väkevästä suspensiosta tehtiin kaksi alkulaimennosta, joista jälkimmäistä käyttäen valmistettiin ympätty laimennossarja. Kaikista näytteistä ja laimennossarjan laimennoksista suoritettiin kaksi rinnakkaista mittausta vesi-ATP -testitikuilla. Laimennossarjan laimennoksista tehtiin lisäksi kaksi rinnakkaista näytettä pintaviljelymenetelmällä laimennoksen todellisen pitoisuuden varmentamiseksi. Pintaviljely suoritettiin pipetoimalla 100 ul näytettä kaupalliselle Biomerieuxin valmistamalle 90 mm tryptoni-soija-agarmaljalle (TS-malja). Pintaviljeltyjä maljoja inkuboitii 2 vrk +30-35 °C lämpötilassa. Taulukossa 3 on esitetty laimennosten tavoitepitoisuudet sekä ATP-mittauksen ja pintaviljelynäytteiden tulokset.

Taulukko 3. Kokeilu 1, laimennosten tavoitepitoisuudet sekä ATP-mittausten ja pintaviljelynäytteiden tulokset.

Laim. nro	Tavoitepitoisuus CFU/ml	ATP-mittaus 1 / RLU	ATP-mittaus 2 / RLU	Pintaviljely 1 CFU/malja	Pintaviljely 2 CFU/malja
1	1200	16	19	29	31
2	600	12	16	14	18
3	300	15	11	8	6
4	150	-	-	3	5
5	75	-	-	1	1
6	50	-	-	1	0
7	25	-	-	1	0
8	10	-	-	0	0

ATP-mittausta tehdessä havaittiin, ettei laimennoksista saadut RLU-arvot juurikaan eroa toisistaan, vaikka pitoisuudet näytteiden välillä puolittuivat. Mittaukset keskeytettiin laimennoksen 3 jälkeen. Luminometrinn toiminnan varmistamiseksi mitattiin alkulaimennokset 1 ja 2. Alkulaimennos 2:n antama vaste oli edelleen hyvin pieni, mutta alkulaimennos 1 jonka tavoitepitoisuus oli n. 8000 CFU/ml, antoi hyvin korkean vasteen. Tämän perusteella todettiin, ettei ole syytä epäillä luminometrinn toimintakykyä.

Inkubointiajan jälkeen suoritettiin pesäkelaskenta pintaviljelyille maljoille. Tulosten perusteella havaittiin, että laimennoksen 1 todellinen pitoisuus oli vain n. 300 CFU/ml eli n. 4 kertaa oletettua pienempi. Testi päätettiin toistaa laimennossarjalla korkeammilla pitoisuuksilla. Muilta osin testi suoritettiin täysin samalla tavalla kuin ensimmäisellä kerralla. Laimennoksista 1 ja 2 pipetoitiin kuitenkin pintalevityksen yhteydessä vain 10 ul korkeasta pitoisuudesta johtuen. Taulukossa 4 on esitetty laimennosten tavoitepitoisuudet sekä ATP-mittauksen ja pintaviljelynäytteiden tulokset.

Taulukko 4. Kokeilu 2, laimennosten tavoitepitoisuudet sekä ATP-mittausten ja pintaviljelynäytteiden tulokset.

Laim. nro	Tavoitepitoisuus CFU/ml	ATP-mittaus 1 / RLU	ATP-mittaus 2 / RLU	Pintaviljely 1 CFU/malja	Pintaviljely 2 CFU/malja
1	6000	200	143	ei laskettavissa <sup>1</sup>	ei laskettavissa <sup>1</sup>
2	3000	73	78	51 <sup>1</sup>	68 <sup>1</sup>
3	1500	51	60	ei laskettavissa	ei laskettavissa
4	750	34	30	124	145
5	500	37	40	104	106
6	200	29	32	22	27
7	100	32	30	7	13
8	50	24	26	2	3

<sup>1</sup> Maljalle pipetoitu näytemäärä 10 µl.

Nollanäytteenä käytettiin puhdistettua vettä, jonka mikrobiologinen pitoisuus suodatusmenetelmällä oli 0 CFU/ml. Ympätyn näytteen korkeammilla pitoisuuksilla saatiin luminometrillä tuloksia, jotka erottuivat selkeästi nollanäytteestä. Turun kaupungin raakavedestä suoritetuilla mittauksilla saatiin tulokset 31 RLU ja 21 RLU. Puhdistetusta vedestä (=nollanäytteestä) saatiin tulokset 16 RLU ja 23 RLU. Nollanäytteen keskiarvoksi tulee tämän perusteella 20 RLU.

Laskettaessa pesäkkeet pintaviljelyiltä maljoilta, havaittiin, että todellinen pitoisuus laimennokselle 1 oli nyt n. 12000 CFU eli noin kaksi kertaa korkeampi kuin tavoiteltu pitoisuus. Testissä saatujen tulosten todettiin kuitenkin riittävän luminometrin käyttöön soveltuvuuden arvioimiseen, eikä testiä päätetty toistaa kolmatta kertaa.



## 6.2 Pinta ATP -menetelmän testaus

Testaus suoritettiin D- ja C-puhtausluokan puhdastiloissa 3M Clean-Trace LM1 luminometrillä. Testaukseen valittiin kahden D-puhtausluokan ja yhden C-puhtausluokan tilan lattiapinnat. Lisäksi testiin otettiin mukaan RST-tasopinta ja laminaattipinta, jotka sijaitsivat D-puhtausluokan puhdastilassa ja ovat tyypillisiä kalusteiden puhdastilamateriaaleja. D-puhtausluokan lattioiden materiaalina oli vanha muovimatto, ja C-puhtausluokan epoksimaali.

Mittaus luminometrillä suoritettiin 10 työpäivänä. Jokaisena työpäivänä otettiin näytteet työn aikana (ta) ja puhdistuksen jälkeen (PPJ). Jokaisesta tutkittavasta pinnasta tehtiin 2 rinnakkaista mittausta. Lisäksi rinnalla otettiin 2 rinnakkaista kontaktimaljanäytettä kustakin tutkittavasta pinnasta. 8 näytteenottokerran aikana puhdistuksen jälkeiset näytteet otettiin saman päivän aikana jolloin siivous suoritettiin, kuitenkin niin, että siivouksesta oli kulunut vähintään 15 minuuttia. Kahtena näytteenottokertana puhdistuksen jälkeiset näytteet otettiin siivousta seuraavan päivän aamuna ennen kuin tiloissa aloitettiin työskentely. ATP-näytteenotossa siveltävä pinta-ala oli n. 10x10 cm. Mittausten tulokset on esitetty liitteessä 1. Taulukossa 5 on esitetty mittausten minimi- ja maksimitulokset sekä keskiarvot.

Taulukko 5. ATP-pintamenetelmän testauksessa saatujen mittaustulosten minimi-, maksimi- ja keskiarvot ATP-menetelmällä ja kontaktimaljamenetelmällä.

	RST	Laminaatti	Lattia muovimatto D-tila	Lattia muovimatto D PAL <sup>3</sup>	Lattia epoksimaalattu C PAL
ATP ta <sup>1</sup> / RLU					
min	15	13	12	21	16
max	121	175	188	1414	43
ka	29	40	52	179	27
MB ta / CFU/25cm <sup>2</sup>					
min	0	0	0	0	0
max	39	17	61	155	14
ka	3	2	17	34	2
ATP PPJ <sup>2</sup> / RLU					
min	16	15	18	18	14
max	42	54	91	85	39
ka	24	24	42	42	23
MB PPJ / CFU/25cm <sup>2</sup>					
min	0	0	0	0	0
max	7	5	107	167	33
ka	2	1	32	29	3

<sup>1</sup> ta =Työn aikainen ennen puhdistusta otettu pintanäyte

<sup>2</sup> PPJ = pintanäyte puhdistuksen jälkeen

<sup>3</sup>PAL = henkilösulku

## 7 Tulosten analysointi ja johtopäätökset

Ympätyn vesinäytteen mittausten perusteella havaittiin, että ATP-mittauksella voidaan havaita n. 1000 CFU/ml -tason pitoisuuksia. Nollanäytteen keskiarvotulos luminometrillä oli 20 RLU. Ympätyistä vesinäytteistä, joiden todellinen pitoisuus oli alle 1000 CFU/ml, saatiin kaikista tulokseksi 25-30 RLU. Testauksen aikana ei määritetty luminometrin tarkkuutta, mutta kaikki alle 1000 CFU/ml pitoisuuksien näytteiden rinnakkaiset tulokset erosivat toisistaan 2-3 RLU. Tällä perusteella voidaan olettaa, että alle 1000 CFU/ml pitoisuuksilla luminometrillä saadut tulokset eivät eroa nollanäytteen tuloksesta niin paljoa, että voitaisiin luotettavasti sanoa milloin puhdistettu vesi ei täytä laatuvaatimuksia. Toimenpideraja puhdistetulle vedelle on  $\geq 100$  CFU/ml, ja hälytysraja  $\geq 5$  CFU/ml.

Pintapuhtauden tarkkailussa tehtiin useita havaintoja mittausten aikana. Yleisesti ottaen kaikkien näytteenottokohteiden osalta havaittiin, että tulostasoa laski jonkin verran mittausten edetessä sekä ATP-menetelmällä että kontaktimaljamenetelmällä otetuissa näytteissä. Jo aiemmin rutiiniseurannassa on saatu toistuvia ylittäviä tuloksia D-puhtausluokan henkilösulun lattiasta, ja se osoittautuikin sekä kontaktimaljanäytteiden että ATP-mittausten perusteella pinnoista likaisimmaksi. Myös toinen muovimatto (viljelyhuoneen lattia) antoi melko korkeita tuloksia sekä ATP-menetelmällä että kontaktimaljamenetelmällä. Alhaisimmat tulokset kautta linjan saatiin viljelyhuoneessa sijaitsevista RST- ja laminaattitasoista kummallakin menetelmällä. Erityisesti alkupään mittauksissa sekä muovimattolattian että epoksimaalatun lattian osalta mikrobiologiset tulokset olivat useasti huomattavasti korkeammat siivouksen jälkeen kuin ennen siivousta. Tästä syystä päädyttiin toteuttamaan kaksi näytteenottokertaa niin, että puhdistuksen jälkeiset näytteet otettiin vasta siivousta seuraavana päivänä. Siivousta seuraavana päivänä otettujen näytteiden osalta samaa ilmiötä ei havaittu. Vaikka mikrobiologiset tulokset olivat puhdistuksen jälkeen huomattavasti korkeammat kuin ennen puhdistusta, käyttäytyivät luminometrin mittaustulokset useimmiten päinvastoin: puhdistuksen jälkeen saatiin

alhaisemmat tulokset kuin ennen puhdistusta. Menetelmien välillä ei havaittu suoraa korrelaatiota.

D-puhtausluokan henkilösulun lattiasta otetuista kontaktimaljanäytteistä 2 työn aikaista ja 1 puhdistuksen jälkeinen näyte olivat niin täynnä mikrobikasvua, ettei tulos ollut luotettavasti laskettavissa. Näiden tulos muunnettiin kohdeyrityksen ohjeistuksen mukaan muotoon toimenpideraja + 1 CFU. EU GMP:n määrittelemä raja kontaktimaljanäytteelle D-puhtausluokassa on 50 CFU/25cm<sup>2</sup>, joten tällä perusteella kyseisten näytteiden tulokseksi merkittiin 51 CFU/25cm<sup>2</sup>.

Erityisesti lattioiden osalta huomioitiin myös siivouksen vaikutus tuloksiin. Lattiat pyyhitään voimassa olevan siivousohjeistuksen mukaan D- ja C-puhtausluokassa tietyin määräväleillä laajakirjoisella itiöihin tehoavalla desinfektioaineella. Ennen desinfektioainepyyhintää lattia pestään yleispuhdistusaineella. Tuloksia tarkasteltiin huomioiden, miten pitkä aika edellisestä laajakirjoisella desinfektioaineella tapahtuneesta lattioiden pyyhinnästä oli aikaa. Puhdistuksen jälkeiset näytteet oli otettu kahdella näytteenotokerralla heti laajakirjoisella desinfektioaineella pyyhinnän jälkeen, mutta tulostason ei havaittu eroavan kummallakaan menetelmällä niiden näytteiden tuloksista jotka oli otettu jonain muuna päivänä kuin määräajoin tehtävän desinfioinnin jälkeen.

Luminometrin vesimenetelmällä havaittavat ATP-pitoisuudet ovat luokkaa 1000 CFU/ml, ja puhdistetun veden toimenpideraja  $\geq 100$  CFU/ml. Vesimenetelmän havaitsema ATP-pitoisuus on niin korkea, ettei menetelmästä todennäköisesti ole hyötyä kohdeyrityksessä käytettävän veden tarkkailussa edes ongelmatilanteiden yhteydessä.

Luminometrin pintapuhtauden tarkkailussa voidaan päästä suunnilleen tasoon 20 RLU. Työn suorituksen aikana alhaisin mitattu tulos oli 12 RLU, ja eri pinnoilta mitatut minimitulokset ennen ja jälkeen puhdistuksen vaihtelivat välillä 12 - 21 RLU. Luminometrin määrittäjäraja on n. 10 RLU (Omidbakhsh et al. 2014). Kontaktimaljamenetelmällä GMP -raja-arvot ovat työn aikaisille

pintanäytteille C-puhtausluokassa 25 CFU/25cm<sup>2</sup> ja D-puhtausluokassa 50 CFU/25cm<sup>2</sup>. (European Commission 2022, s. 13) Puhdistuksen jälkeen otetuille näytteille ei ole erillistä viranomaisvaatimusta, mutta kohdeyrityksessä sille on asetettu raja-arvoksi 20 CFU/25cm<sup>2</sup>.

Jotta voitaisiin määrittää, mikä taso kullekin pintamateriaalille osoittaa hyvää puhtaustasoa, tarvittaisiin vielä lisää testejä. Tämän testin aikana ei käytetty järin standardoitua näytteenottomenetelmää, sillä 10x10 cm pinta-ala arvioitiin silmämääräisesti eikä pinnan sivelyiden määrää laskettu. Mittaustulosten perusteella saatiin kuitenkin paljon muuta arvokasta tietoa.

Mittausten tulostaso laski kaikkien pintojen osalta mittausten edetessä sekä ATP-menetelmällä että kontaktimaljamenetelmällä otetuissa näytteissä. Toisaalta, useiden näytteenottokertojen aikana havaittiin, että mikrobiologinen tulos puhdistuksen jälkeen oli huomattavasti korkeampi kuin ennen puhdistusta. Näin ei kuitenkaan ollut niillä näytteenottokerroilla, jolloin puhdistuksen jälkeiset näytteet otettiin vasta siivousta seuraavan päivän aamuna. Lattiapinnoilla, ja erityisesti muovimatolla havaittiin myös, että puhdistuksen jälkeen otetuissa näytteissä ATP-tulos oli pienempi kuin ennen puhdistusta, mutta mikrobiologinen tulos suurempi. Näiden seikkojen perusteella voidaan päätellä, että näytteenottoon valituilla pinnoilla on sekä pesuainejäämää että biofilmiä. Puhdistuksen aikana biofilmi hajoaa, mutta puhdistus ei riitä poistamaan sitä. Tätä oletusta puoltaa kasvaneet mikrobiologiset tulokset, sekä se että kun näytteet otettiin riittävän pitkän ajan kuluttua puhdistuksesta (seuraavana aamuna) olivat mikrobiologiset tulokset jälleen pienempiä kuin ennen puhdistusta otetuissa näytteissä. ATP-menetelmällä kuitenkin saatiin suurempia tuloksia myös niissä näytteissä, jotka otettiin vasta puhdistusta seuraavan päivän aamuna, kuin työn aikana otetuissa näytteissä.

Tiedetään, että pesu- ja desinfektioainejäämät voivat häiritä ATP-mittausta ja vaikuttaa tulokseen sekä suurentavasti että pienentävästi. Tämä selittäisi sen, miksi puhdistuksen jälkeen ATP-tulos pienenee mutta mikrobiologinen tulos kasvaa. Kontaktinäytteenoton jälkeen pinta pyyhitään aina kahdesti etanolilla, jotta saadaan poistettua agar-jäämät pinnalla. Tämä taas selittää sen, miksi

tulostaso molemmilla menetelmillä parani mittausten edetessä: toistuvalla etanolipyyhinnällä saatiin pinnoilta poistettua pesuainejäämää ja biofilmiä. Pinnoista puhtaimmiksi osoittautuivat RST- ja laminaattitaso, joista kumpikin ovat pöytäpintoja. Näiden pintojen osalta olikin odotettavaa, että pesuainejäämää tai biofilmiä ei esiintyisi, sillä kyseiset pinnat pyyhitään etanolilla päivittäin ennen työskentelyn aloittamista.

Siivouksen valvonnan monitorointiohjelman suunnitteluun ja implementointiin kannattaa 3M:n suosituksen mukaan sisällyttää seuraavat vaiheet:

1. Muotoile testisuunnitelma ja määritä testipisteet
2. Tunnista hyväksyty/hylätty -raja-arvot
3. Määritä testausfrekvenssi
4. Luo mittarit, jotka ovat testauksen kannalta merkityksellisiä
5. Seuraa testituloksista kertyvää dataa ja sen trendiä, ja arvioi mm. hyväksyty/hylätty -raja-arvoja säännöllisesti uudelleen. (3M 2017)

Testisuunnitelma muodostuu yksittäisistä näytepisteistä. Pisteiden määrittämisessä tulisi erityisesti ottaa huomioon riskit, ja keskittyä niihin pisteisiin joissa kontaminaatoriski tuotteen kannalta on suurin. Yksittäisen tilan näytepisteiden määrä tulisi perustua riskinarvioon: mitä korkeampi riski, sitä enemmän näytepisteitä tulisi olla. Jotta kerätty tieto olisi tilastollisesti pätevää, tulee sitä kerätä rutiininomaisesti riittävä määrä. Valittujen alueiden tulee edustaa kaikkia siivouksen osa-alueita: erilaisia siivousmenetelmiä ja eri siivoojien suorittamia siivoustöitä. (3M 2017)

Kohteen tavoitemittareiden tulee olla sellaisia, että ne heijastavat puhdistuksen seurantaohjelman tavoitteita. Mittarit voivat myös muuttua ja kehittyä ajan myötä. Tavoitemittareita voivat olla esimerkiksi:

1. hyväksyty/hylätty -tulosten prosenttiosuus yhdistetyistä tiedoista
2. hyväksyty/hylätty -tulosten määrä huonekohtaisesti

3. hyväksyty/hylätty -tulosten määrä eri testikategorioissa. Testikategoriat voisivat olla esimerkiksi työn aikaiset pintanäytteet, puhdistuksen jälkeiset pintanäytteet ja primääripintanäytteet (suorassa tuotekontaktissa olevat pinnat).

4. hyväksyty/hylätty -tulosten prosenttiosuus henkilöstön mukaan jaoteltuna.

Ensimmäinen mittari antaa kokonaiskuvan puhdistuksen tehokkuudesta.

Toinen tarjoaa keinon löytää ongelma-alueet ja pinnat ja kohdistaa toimenpiteet oikein. Kolmas mittari mahdollistaa mahdollisten kehittymässä olevien ongelmien tunnistamisen mahdollisimman varhaisessa vaiheessa.

Viimeinen mittari taas mahdollistaa koulutuksen onnistumisen ja mahdollisten koulutuksen puutteiden tai lisäkoulutustarpeen havaitsemisen.

(3M 2017)

Jotta mittaustuloksista saatava palaute olisi mahdollisimman käyttökelpoista, on kerättävä riittävä määrä tietoa jotta saadaan todellinen kuva siivouksen tehokkuudesta. Pintojen puhtautta tulee tarkkailla riittävällä tiheydellä, jotta voidaan mahdollisimman aikaisessa vaiheessa havaita haitalliset suuntaukset. 3M:n suositus rutiiniseurannassa on, että tilan testipisteistä vähintään 80 % antaa hyväksyty tuloksen. Jos 20 % tai enemmän tuloksista on hylättyjä, tulisi koko tila puhdistaa ja testata puhdistuksen jälkeen uudelleen. Korkean riskin alueilla tulisi olla vieläkin tiukemmat kriteerit: 3M:n suositus on, että jokainen hylätyn tuloksen antanut testipiste puhdistetaan ja uudelleentestataan, kunnes tulos on hyväksyty. (3M 2017)

Kun mittaustuloksia seurataan ajan mittaan, mahdollistetaan prosessin ja siivouskäytäntöjen parantaminen. Pitkän ajan tulostason seurannalla voidaan tunnistaa mm. vanhenevat ja vaurioituneet pinnat sekä vaikeasti puhdistettavat laitteet. Siivouksen ja puhdistuksen osalta voidaan havaita, mikäli puhdistusprosesseja ei suoriteta vakiintuneiden menettelytapojen mukaisesti. (3M 2017)

3M suosittelee luminometrin validoinnista ja raja-arvojen määrittämisestä seuraavaa: Jokaisesta testipisteestä tulisi kerätä vähintään 30 näytetulosta. Oletuksena tulosten analysoinnissa tulee olla, että puhdistusprosessit ovat tehokkaita suurimman osan ajasta, jolloin useimmin esiintyvät tulokset RLU-yksikössä indikoivat tehokkaasti puhdistettua pintaa. Vaadittu puhtaustaso eri testipinnoilla voi vaihdella, joten on tärkeää kategorisoida testituloksista saatu data ja analysoida jokaisen kategorian testipisteitä omassa datajoukossaan. Kategoriat voivat olla esim. työn aikainen pintanäyte, primääripintanäyte, puhdistuksen jälkeinen pintanäyte tms. Tällä ehkäistään analyysin tulosten väärintulkinta. (3M 2019)

Kun luodaan luminometriin näytepisteitä, ohjelmisto vaatii että näytepisteelle määritetään myös hyväksytyt- ja hylättyt raja-arvot. 3M suosittelee määrittämään aluksi 150 RLU rajaksi hyväksytylle tulokselle ja 300 RLU hylätylle tulokselle. Tällöin tulokset, jotka ovat pienempiä kuin 150 RLU, ovat hyväksytyjä. Tulokset, jotka ovat suurempia tai yhtä suuria kuin 300 RLU, ovat hylättyjä. Tulokset välillä 150 - 299 RLU ylittävät huomio- tai hälytysrajan, mutta eivät vielä aiheuta hylättyä tulosta. Kun validoinnin tulokset on analysoitu, hyväksytyt ja hylätyn tuloksen raja-arvot voidaan uudelleenarvioida saatujen tulosten perusteella. Sen lisäksi raja-arvot kannattaa uudelleenarvioida säännöllisin väliajoin, jotta varmistutaan, että raja-arvot pysyvät sopivalla tasolla. (3M 2019)

3M:n suosittamat vaiheet validointiprosessia varten ovat:

- valitse sopivat testipisteet riskinarvion perusteella
- tee näytteenottosuunnitelma testipisteistä 3M Clean Trace Hygiene Monitoring-ohjelmistoon
- noudata käytössä olevaa siivousohjeistusta ja puhdista testipisteet sen mukaisesti
- testaa jokainen testipiste 5-10 kertaa. Jos otat kaikki näytteet samalla kertaa, niin älä kuitenkaan ota näytettä tismalleen samalta alueelta enempää kuin



kerran. Käytä eri 10x10 cm alueita isoilla pinnoilla, kuten liukuhihnoilla. Jos tutkittava pinta on pieni, kerää näytteet eri päivinä siivouksen jälkeen.

- laske saaduista tuloksista keskiarvo ja keskihajonta

- määritä hylätyn raja-arvo lisäämällä keskiarvoon + 3 x keskihajonta. Keskiarvo on raja voi toimia hyväksytyn tuloksen raja-arvona. (3M 2019)

Soveltuvat raja-arvot riippuvat halutusta puhtaustasosta, ja mittaustulosten taso on myös jonkin verran riippuvainen siitä, minkä valmistajan luminometriä käytetään. Asiantuntijalausuntoon perustuen erään kohteen korkean hygienian vaatimustason tiloissa Clean-Trace LM1 -luminometrillä hyväksytyn näytteen raja-arvo oli 20 RLU ja hylätyn 60 RLU. Normaalin hygienian vaatimustason tiloissa taas hyväksytyn näytteen raja-arvo oli 30 RLU ja hylätyn 100 CFU. (Raunila 2021) Tehdyn testauksen ja siinä saatujen tulosten perusteella kyseiset raja-arvot voisivat soveltua myös puhdastilan raja-arvoiksi.

## 8 Yhteenveto

Saatujen tulosten perusteella vesi-ATP menetelmä ei osoittautunut kohdeyritykselle hyödylliseksi. Pinta-ATP -menetelmä sen sijaan voi antaa paljon lisätietoa mm. pintojen puhtaudesta ja olla apuna ongelmatilanteiden selvittelyssä. On ollut jo pitkään tiedossa, että tuotanto-osastojen lattioilla on pesuainejäämää, ja on myös mahdollista että niillä esiintyy biofilmiä. Yhdistämällä pinta-ATP -näytteenotto ja kontaktimaljanäytteenotto voidaan saada paljon enemmän hyödyllistä informaatiota kuin pelkällä kontaktimaljanäytteenotolla, ja se voi erityisesti ongelmatilanteissa auttaa juurisyyn selvittämisessä.

Mikäli pinta-ATP -menetelmä päädytään ottamaan käyttöön, tulisi vielä määrittää yksityiskohtaisemmin eri pinnoille (lattia, pöytä tms.) taso, joka on riittävä puhtauden kannalta. Tässä työssä näytteenottoa ei toteutettu sapluunan avulla vaan pinta-ala arvioitiin silmämääräisesti, eikä yksittäisen näytteen siveleyiden määrää laskettu. Menetelmän käyttöön ottamiseksi tulisi vielä toteuttaa toinen näytteenottokokeilu standardoidulla näytteenotolla. Lisäksi tulee vielä määrittää, mihin tarkoituksiin ATP-menetelmää halutaan käyttää ja laatia siihen tarvittava ohjeistus.

3M antaa ohjeistuksia ja suosituksia mm. luminometrin käyttöön otolle, testaussuunnitelmien luomiselle ja luminometrin menetelmien validoinnille. Nämä ohjeistukset ja suositukset kannattaa huomioida, kun luminometria otetaan käyttöön kohdeyrityksen tuotantolaitoksille. Tällöin tulee kuitenkin myös huomioida, että ohjeistukset on luotu elintarviketeollisuuteen ja sairaaloille. Puhdastiloille ei vielä ole saatavilla erillisiä ohjeistuksia. Kun ohjeistuksia ja suosituksia tarkastellaan, tulee jokaisen kohdan osalta harkita, soveltuuko kyseinen kohta sellaisenaan puhdastilaan vai pitääkö sitä kenties muokata jollakin tavalla paremmin kohdeyrityksen käyttöön soveltuvammaksi.

## 9 Liitteet

Liite 1. Pinta-ATP menetelmän testaus, mittaustulokset.

## Lähteet

3M. 2013a. 3M Clean-Trace Surface ATP (UXL100) Product Instruction.

Saatavilla www-muodossa:

<https://multimedia.3m.com/mws/media/807474O/3m-clean-trace-surface-atp-uxl100-product-instruction.pdf> viitattu 30.7.2022

3M. 2013b. 3M Clean-Trace Water - Free ATP (AQF100) Product Instruction.

Saatavilla www-muodossa:

<https://multimedia.3m.com/mws/media/807475O/3m-clean-trace-water-free-atp-aqf100-product-instruction.pdf> viitattu 30.7.2022

3M. 2016. 3M Clean-Trace Water - Free ATP (AQF100) Product Instruction and Trace Luminometer User Manual LM1. Saatavilla www-muodossa:

<https://multimedia.3m.com/mws/media/1216712O/3m-clean-trace-luminometer-user-manual-lm1.pdf> viitattu 30.7.2022

3M. 2017. Environmental Surfaces Implementation Guide for Routine Cleaning Monitoring. Saatavilla www-muodossa:

<https://multimedia.3m.com/mws/media/1414099O/3m-clean-trace-environmental-surfaces-implementation-guide.pdf> viitattu 15.10.2022

3M. 2019. Technical Bulletin. Setting pass/fail limits for the 3M™ Clean-Trace™ hygiene monitoring and management system. Saatavilla www-muodossa:

<https://multimedia.3m.com/mws/media/1763752O/clean-trace-setting-pass-fail-limits-pdf-lm1-implementation.pdf> viitattu 14.10.2022

Arampatzi, S., Giannoglou, G., Diza, E. 2011. Biofilm formation: A complicated microbiological process. Saatavilla www-muodossa:

<https://core.ac.uk/download/pdf/267932592.pdf> viitattu 13.7.2022

Arizona State University. 2014. Ask a biologist: Microbes, the good, the bad, the ugly. Saatavilla www-muodossa: <https://askabiologist.asu.edu/bacteria-overview> viitattu 12.11.2022

Aulanko, M. 2010. Pesu- ja puhdistusaineet, johdatus siivouskemiaan. Suomen siivousteknisen liiton julkaisuja III: 4. 3. uusittu painos. Helsinki. Kopio Niini Oy.

Cleanroom technology, The international journal of contamination control. 2018a. Sourcing effective and user-friendly cleaning solutions. Volume 26 number 1.

Cleanroom technology. 2018b. Validation of contact plates for environmental monitoring. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa.com):  
[https://www.cleanroomtechnology.com/news/article\\_page/Validation\\_of\\_contact\\_plates\\_for\\_environmental\\_monitoring/147446](https://www.cleanroomtechnology.com/news/article_page/Validation_of_contact_plates_for_environmental_monitoring/147446) viitattu 2.10.2022

Cleanroom technology, Industry insight for controlled environments. 2019. Disinfectant residues in cleanrooms per GMP Annex 1. Volume 27 number 12.

Cleanroom technology, Industry insight for controlled environments. 2020. Putting disinfectant to the test: designing a field trial. Volume 28 number 6.

Cleanroom technology, Industry insight for controlled environments. 2021a. How does a wipe become a cleanroom wipe? Volume 29 number 1.

Cleanroom technology, Industry insight for controlled environments. 2021b. Components of an effective disinfectant prequalification strategy. Volume 29 number 2.

Council of Europe. 2019. European Pharmacopoeia. 10. painos. Strasbourg. Druckerei C.H. Beck, Nördlingen.

Dufour, D., Leung, V., Lévesque, C. M. 2012. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa.com):  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x> viitattu 5.9.2022

Dunn, J., Grider, M. H. 2022. Physiology, adenosine triphosphate. National Library of Medicine. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa.com):  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553175/> viitattu 6.8.2022

European Commission. 2022. Guidelines: The rules governing medicinal products in the European Union, Volume 4 EU guidelines for good manufacturing practice for medicinal products for human and veterinary use. Annex 1: Manufacture of sterile medicinal products. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa.com):  
[https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/20220825\\_gmp-an1\\_en\\_0.pdf](https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/20220825_gmp-an1_en_0.pdf) viitattu 4.9.2022

European Committee for Standardisation. 2020. DIN EN 17141:2021-02 Cleanrooms and associated controlled environments - biocontamination control. Bryssel.

European Medicines Agency. 2020. Guideline on the quality of water for pharmaceutical use. Saatavilla [www-muodossa: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-water-pharmaceutical-use\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-water-pharmaceutical-use_en.pdf) viitattu 24.9.2022

Friman, T. Kivisalmi, V. 2015. Laboratorion välinehuolto. Saarijärvi. Saarijärven Offset Oy.

Halls, N. 2004. Microbiological contamination control in pharmaceutical clean rooms. United States of America. CRC Press LLC Sue Horwood Publishing Limited.

Halls, N. 2007. Pharmaceutical contamination control, practical strategies for compliance. United States of America. Davis Healthcare International Publishing, LLC.

Jaglic, Z., Cervinkova, D., Vlkova, H., Michu, E., Kunova, G., Babak, V. 2012. Bacterial biofilms resist oxidising agents due to the presence of organic matter. Saatavilla [www-muodossa: https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/214\\_2011-CJFS.pdf](https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/214_2011-CJFS.pdf) viitattu 1.10.2022

Kaiser, U. 2016. Välineiden puhdistus ja desinfektio. Infektioidentorjuntayhdistys ry. Saatavilla [www-muodossa: https://infektioidentorjunta.fi/wp-content/uploads/2020/03/V%C3%A4lineiden-puhdistus-ja-desinfektio-Dr.-Ulrich-Kaiser.pdf](https://infektioidentorjunta.fi/wp-content/uploads/2020/03/V%C3%A4lineiden-puhdistus-ja-desinfektio-Dr.-Ulrich-Kaiser.pdf) viitattu 20.8.2022

Kirkpatrick, A., Xu, T., Ripp, S., Saylor, G., Close, D. 2018. Biotechnological advances in luciferase enzymes. Saatavilla [www-muodossa: https://www.intechopen.com/chapters/66251](https://www.intechopen.com/chapters/66251) viitattu 8.7.2022

Kärcher LLC. 2022. The Sinner's circle in practise, Saatavilla [www-muodossa: https://www.kaercher.com/ge/home-garden/cleaning-and-care-agents/know-how/the-sinner-s-circle.html](https://www.kaercher.com/ge/home-garden/cleaning-and-care-agents/know-how/the-sinner-s-circle.html) viitattu 11.10.2022

Manna, S., Ghanty, C., Baidara, P., Barik, T.KR., Mandal, S.M. 2020. Electrochemical communication in biofilm of bacterial community. Saatavilla

www-muodossa <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jobm.202000340> viitattu 24.9.2022

Omidbakhsh, N., Ahmadpour, F., Kenny, N. 2014. How reliable are ATP bioluminescence meters in assessing decontamination of environmental surfaces in healthcare settings? Saatavilla www-muodossa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4062432/> viitattu 13.8.2022

Preda, V. G., Sandulescu, O. 2019. Communication is the key: quorum sensing, formation and prevention. Saatavilla www-muodossa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7086079/> viitattu 21.9.2022

Raunila, S. 2021. Asiantuntijalausunto. Keskustelu käyty sähköpostilla.

Sanders, E.R. 2012. Aseptic laboratory techniques: Plating methods. Saatavilla www-muodossa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846335/> viitattu 24.9.2022

Sandle, T., Saghee, M.R. 2013. Cleanroom management in pharmaceuticals and healthcare. Essex, England. Euromed communications Ltd.

Sandle, T. 2011. Review of Cleanroom Microflora: Types, Trends and Patterns. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. Volume 6. Number 4.

Song, F., Koo, H., Ren, D. 2015. Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. Saatavilla www-muodossa: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0022034515587690> viitattu 28.8.2022

Srey, S., Jahir, I. K., Ha, S. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Saatavilla www-muodossa: [https://www.sciencedirect-com.ezproxy.turkuamk.fi/science/article/pii/S0956713512006536?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com.ezproxy.turkuamk.fi/science/article/pii/S0956713512006536?via%3Dihub) viitattu 6.9.2022

Tapiainen, T., Salo, J., Uhari, M. 2010. Bakteeribiofilmit infektioitaudeissa. Saatavilla www-muodossa: <https://www.duodecimlehti.fi/duo98732#s4> viitattu 24.7.2022

Terveyden ja Hyvinvoinnin Laitos. 2021. Legionella bacteria in water systems. Saatavilla www-muodossa: <https://thl.fi/en/web/environmental-health/water/legionella-bacteria-in-water-systems> viitattu 13.11.2022

The International Organisation of Standardization. 2015. ISO 14644-1:2015(E). Cleanrooms and associated controlled environments - Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration. 2. painos. Sveitsi. ISO Copyright Office.

Trsan, M., Vehovc, M., Seme, K., Srcic, S. 2020. Evaluation of ATP bioluminescence for monitoring surface hygiene in a hospital pharmacy cleanroom. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa.com):  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701219308140> viitattu 25.9.2022

Whyte, W. 2010. Cleanroom Technology, fundamentals of design, testing and operation West Sussex, United Kingdom.. John Wiley & Sons Ltd.

Wikipedia 2020. Adenosiinitrifosfaatti. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa.com):  
<https://fi.wikipedia.org/wiki/Adenosiinitrifosfaatti> viitattu 6.8.2022

Windsor, W.J. 2020. How quorum sensing works. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa.com):  
<https://asm.org/Articles/2020/June/How-Quorum-Sensing-Works> viitattu 21.9.2022

Wise, K. 2006. Preparing spread plates protocols. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa.com):  
<https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Preparing-Spread-Plates-Protocols.pdf?ext=.pdf> viitattu 2.10.2022



## Pinta-ATP -menetelmän testaus, mittaustulokset

RST-taso

mittauspvm	ATP-menetelmä / RLU				Kontaktimaljamenetelmä / CFU/25cm <sup>2</sup>			
	ATP TA 1	ATP TA 2	ATP PPJ 1	ATP PPJ 2	MB TA 1	MB TA 2	MB PPJ 1	MB PPJ 2
10.5.	121	23	34	22	0	39	4	1
11.5.	22	22	42	23	0	0	1	7
16.5.	18	21	20	27	0	0	4	1
23.5.	27	22	24	26	5	4	0	0
30.5.	31	33	21	19	2	0	1	0
13.6.	34	25	20	20	0	0	3	0
16.6.	30	26	18	19	0	0	1	0
17.6.	15	18	25	23	2	0	1	2
22.6.	20	19	30	28	0	0	2	3
23.6.	16	37	27	16	0	0	0	0
ka	29		24		3		2	
min	15		16		0		0	
max	121		42		39		7	
	otettu seuraavana aamuna							

## Laminaatti-taso

mittauspvm	ATP-menetelmä / RLU				Kontaktimaljamenetelmä / CFU/25cm <sup>2</sup>			
	ATP TA 1	ATP TA 2	ATP PPJ 1	ATP PPJ 2	MB TA 1	MB TA 2	MB PPJ 1	MB PPJ 2
10.5.	30	175	26	25	17	0	1	0
11.5.	116	55	23	54	2	0	4	1
16.5.	15	32	26	16	1	0	0	2
23.5.	26	39	20	19	0	1	4	1
30.5.	21	35	27	18	1	0	2	2
13.6.	18	19	17	24	0	1	5	0
16.6.	31	42	19	15	2	6	1	0
17.6.	24	32	36	24	1	0	2	1
22.6.	37	20	19	33	1	0	0	2
23.6.	20	13	24	18	0	0	0	0
ka	40		24		2		1	
min	13		15		0		0	
max	175		54		17		5	
	otettu seuraavana aamuna							

## Muovimatto, D-puhtausluokka, työskentelytila

mittauspvm	ATP-menetelmä / RLU				Kontaktimaljamenetelmä / CFU/25cm <sup>2</sup>			
	ATP TA 1	ATP TA 2	ATP PPJ 1	ATP PPJ 2	MB TA 1	MB TA 2	MB PPJ 1	MB PPJ 2
10.5.	53	81	48	54	8	11	0	11
11.5.	47	28	49	18	40	23	7	13
16.5.	55	28	38	87	36	5	75	58
23.5.	60	88	39	65	61	56	107	27
30.5.	51	188	35	45	7	8	52	21
13.6.	24	60	29	23	11	8	10	23
16.6.	63	55	37	40	22	32	62	30
17.6.	26	60	91	64	6	5	96	38
22.6.	12	17	18	19	0	1	0	1
23.6.	29	20	22	18	4	2	0	0
ka	52		42		17		32	
min	12		18		0		0	
max	188		91		61		107	
	otettu seuraavana aamuna							

## Muovimatto, D-puhtausluokka, henkilösulku

mittauspvm	ATP-menetelmä / RLU				Kontaktimaljamenetelmä / CFU/25cm <sup>2</sup>			
	ATP TA 1	ATP TA 2	ATP PPJ 1	ATP PPJ 2	MB TA 1	MB TA 2	MB PPJ 1	MB PPJ 2
10.5.	72	122	25	25	0	11	59	67
11.5.	207	46	53	34	14	19	0	0
16.5.	151	210	75	45	155	51	167	51
23.5.	377	127	61	62	52	30	60	80
30.5.	86	103	56	52	51	42	32	38
13.6.	160	252	48	26	71	28	0	1
16.6.	1414	29	25	85	51	5	0	0
17.6.	63	29	27	22	62	27	18	3
22.6.	35	21	47	24	10	0	0	0
23.6.	60	24	20	18	5	1	0	0
ka	179		42		34		29	
min	21		18		0		0	
max	1414		85		155		167	

otettu seuraavana aamuna  
todellinen tulos: ei laskettavissa

## Epoksimaalattu lattia, C-puhtausluokka, henkilösulku

mittauspvm	ATP-menetelmä / RLU				Kontaktimaljamenetelmä / CFU/25cm <sup>2</sup>			
	ATP TA 1	ATP TA 2	ATP PPJ 1	ATP PPJ 2	MB TA 1	MB TA 2	MB PPJ 1	MB PPJ 2
10.5.	42	41	30	32	0	1	1	5
11.5.	26	27	19	21	0	1	33	16
16.5.	43	41	22	39	14	9	1	1
23.5.	37	30	26	27	2	3	1	1
30.5.	20	17	20	25	0	1	0	7
13.6.	24	24	14	31	2	3	1	0
16.6.	16	19	21	20	0	0	0	0
17.6.	19	19	25	15	0	0	0	0
22.6.	31	23	18	21	0	0	0	0
23.6.	21	25	21	18	0	0	0	0
ka	27		23		2		3	
min	16		14		0		0	
max	43		39		14		33	
	otettu seuraavana aamuna							