

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja kemiantekniikan koulutus

2023

Linda Ertman

UVC- ja H₂O₂- desinfiointimenetelmien testaus



Opinnäytetyö (AMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja kemiantekniikan koulutus | Biotekniikka

2023 | 52 sivua, 5 liitesivua

Linda Ertman

UVC- ja H₂O₂- desinfiointimenetelmien testaus

Opinnäytetyö koostuu puhdastilojen, mikrobiologian ja desinfiointimenetelmien teoriaosuudesta ja siihen perustuvasta kokeellisesta osuudesta sekä tulosten analysoinnista.

Puhdastilojen mikrobiologisen laadun saavuttamiseksi ja ylläpitämiseksi tarvitaan vaatimusten mukainen desinfiointimenetelmä. Työn tarkoituksena oli arvioida kahden eri desinfiointimenetelmän tehoa ja soveltuvuutta kohdeyrityksen käyttöön. Aiemmin käytetty vetyperoksidi-peretikkahappopohjainen desinfiointiaine tulee korvata EU:n biosidilainsäädännön hyväksymällä valmisteella. Työssä käytetty Nocospray-desinfiointiaine on säädöksen mukainen, ja uudella menetelmällä säästettäisiin myös aikaa desinfiointiprosessissa. Lisäksi arvioitiin ultravioletti-C-desinfiointiyksikön soveltuvuutta käytettäväksi kemiallisen menetelmän rinnalla pintojen desinfiointiin.

Testaus tehtiin vakiintuneita mikrobiologisia viljelytekniikoita käyttäen. Tehoa arvioitiin niin sanotussa worst-case skenaariossa eli yleisissä työtiloissa ilman ennakkosiivousta keräämällä pinta- ja ilmanäytteitä ennen ja jälkeen käsittelyn. Tulosten arvioinnissa tarkasteltiin menetelmien vaikutusta pesäkemääriin ja laskettiin logaritminen alenema desinfiointitehon osoittamiseksi. Saatujen tulosten perusteella kyseisellä vetyperoksidimenetelmällä ei saavutettu riittävää desinfiointitehoa, eikä se tämän perusteella sovellu haluttuun käyttötarkoitukseen. Testauksen aikana ilmanvaihtoa ei hiljennetty, mikä on kuitenkin saattanut vaikuttaa tulokseen. UVC-desinfektioimenetelmällä saavutettiin huomattavasti parempi tulos, eli se todennäköisesti soveltuu kohdeyrityksen käyttöön pintojen desinfiointiin. Ennen käyttöönottoa laite on kvalifioitava käyttäen standardoitua menetelmää.

Asiasanat:

desinfiointi, puhdastila, lääketeollisuus, UVC, vetyperoksidi, mikrobiologia

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Biotechnology and Chemical Engineering

2023 | 52 pages, 5 appendix pages

Linda Ertman

UVC and H₂O₂ disinfection method testing

This thesis is comprised of cleanroom, microbiology and disinfection theory and an experimental part commissioned by the client company.

To ensure the microbiological quality of cleanrooms, a method of disinfection in compliance with the regulations is required. The aim of this thesis was to evaluate the efficacy and applicability of two separate disinfection methods for the needs of the target company. The previously used hydrogen peroxide-peracetic acid based chemical disinfectant needed to be replaced with a product that is compliant with the EU legislation on biocidal products. The disinfectant studied here is compliant with the regulation and the new method would save time in the disinfection process. The applicability of an ultraviolet-C disinfection unit to be used alongside chemical surface disinfection was studied as well.

The testing was conducted using established culture-based methods. The efficacy was evaluated in a worst-case scenario in general working spaces without precleaning by collecting air and surface samples before and after disinfection. Data interpretation comprised observing the effect the disinfection procedure had on the plate count and calculating the log reduction that was achieved to demonstrate the disinfection performance. A sufficient reduction was not achieved with the hydrogen peroxide disinfection method which based on this is not suitable for the intended use. The air conditioning in the room was not slowed down, which might have affected the disinfection result. With the UVC treatment, considerably better colony reduction rates were achieved, and therefore it seems to be suitable for surface disinfection in the target company. Before implementing the device, it must be qualified using a standardized protocol.

Keywords:

disinfection, cleanroom, pharmaceuticals, UVC, hydrogen peroxide, microbiology

Sisältö

| | |
|---|-----------|
| Käytetyt lyhenteet tai sanasto | 7 |
| 1 Johdanto | 9 |
| 2 Puhdastilat | 10 |
| 3 Mikrobit puhdastiloissa | 16 |
| 3.1.1 Prokaryootit | 17 |
| 3.1.2 Eukaryootit | 19 |
| 3.1.3 Virukset | 20 |
| 4 Mikrobiologiset tutkimusmenetelmät | 22 |
| 5 Desinfointimenetelmät | 27 |
| 5.1.1 Kemialliset menetelmät | 28 |
| 5.1.2 Fysikaaliset menetelmät | 30 |
| 6 Kokeellinen osuus | 33 |
| 6.1 Nocospray 2 | 33 |
| 6.1.1 Noco testaus | 34 |
| 6.2 MoonBeam™3 | 36 |
| 6.2.1 MoonBeam testaus | 36 |
| 7 Tulokset | 37 |
| 7.1 Bioindikaattoritestaus | 41 |
| 8 Loppupäätelmät | 46 |
| Lähteet | 49 |

Liitteet

Liite 1. Noco testauksen yksittäiset tulokset

Liite 2. MoonBeam testauksen yksittäiset tulokset

Kaavat

| | |
|---|----|
| Kaava 1. Vetyperoksidin hajoamisreaktio. | 29 |
| Kaava 2. Molekulaarisen hapen hajoaminen happiatomeiksi UV-säteilyn vaikutuksesta | 32 |
| Kaava 3. Otsonin muodostuminen happiradikaaleista ja happimolekyyleistä | 32 |
| Kaava 4. Log alenema | 40 |
| Kaava 5. Prosentuaalinen log alenema | 40 |
| Kaava 6. Itiötasonmäärityksen tuloksen laskenta | 41 |

Kuvat

| | |
|---|----|
| Kuva 1. PDCA-periaate | 14 |
| Kuva 2. Eliöiden evoluutiopuu eli fylogeneettinen puu | 16 |
| Kuva 3. Bakteerisolujen eri muotoja | 18 |
| Kuva 4. Bakteeripesäkkeiden morfologiaa | 24 |
| Kuva 5. Sähkömagneettisen säteilyn spektri | 31 |
| Kuva 6. Säteilyspektrien vertailua | 32 |

Kuviot

| | |
|---|----|
| Kuvio 1. Noco tulosten jakauma | 38 |
| Kuvio 2. Noco desinfioinnin prosentuaalinen log alenema | 40 |
| Kuvio 3. MoonBeam tulosten jakauma | 44 |
| Kuvio 4. MoonBeam desinfioinnin prosentuaalinen log alenema | 45 |

Taulukot

| | |
|--|----|
| Taulukko 1. EU GMP:n puhdastilaluokkien raja-arvot sallitulle partikkelikonsentraatiolle | 10 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Taulukko 2. EU GMP:n puhdastilaluokituksen mikrobikontaminaation raja-arvot | 11 |
| Taulukko 3. Log alenema verrattuna muihin asteikkoihin | 27 |
| Taulukko 4. Noco käsittelyn vaikutus pesäkemäärään | 37 |
| Taulukko 5. Noco käsittelyn log alenema | 39 |
| Taulukko 6. Noco bioindikaattoritestauksen tulokset | 41 |
| Taulukko 7. MoonBeam käsittelyn vaikutus pesäkemäärään | 43 |
| Taulukko 8. MoonBeam käsittelyn log alenema | 44 |

Käytetyt lyhenteet tai sanasto

| | |
|---------------|--|
| CFU | Colony forming unit, pesäkkeen muodostava yksikkö |
| DNA | Deoksiribonukleiinihappo, kaksijuosteinen polynukleotidi, sisältää geeniperimän |
| Endotoksiini | Gramnegatiivisen bakteerin tuottama, isäntäelimistössä tulehdusreaktion aiheuttava myrkkyaaine |
| GMP | Good Manufacturing Practices, EU:n Hyvät Tuotantotavat |
| HEPA | High Efficiency Particulate Air-ilmansuodatin |
| Kontaminaatio | Ei toivotun yhdisteen tai pieneliön pääsy tuotteeseen, pinnalle tai tilavuuteen, saastuminen |
| MALDI-TOF | matrix-assisted-desorption ionization time-of-flight-massaspektrometria |
| OOL/OOS | Out-of-limits/out-of-specification-tulos |
| PDCA | Jatkuvan kehittämisen periaate, (plan, do, check, act) |
| ppm | Parts per million, 1 ppm = 1 mg/kg |
| Pyrogeeni | Kuumetta aiheuttava yhdiste |
| RNA | Ribonukleiinihappo |
| RODAC | Replicate Organism Detection and Counting |
| SDA | Sabourad dekstroosi agar, erityisesti hiivoille ja homeille soveltuva elatusaine |
| TSA | Tryptoni soija agar, yleiskäyttöinen ei-selektiivinen elatusaine |
| UVC | Ultraviolettisäteily C, aallonpituus 100–280 nm |

Validointi

Tieteelliseen näyttöön perustuva prosessi, jolla varmistetaan kohteen täyttävän käyttötarkoituksen mukaiset vaatimukset

1 Johdanto

Lääketeollisuuden riskialttiiden tuotteiden ja niiden käyttötarkoitusten myötä vaatimukset tuotantoympäristölle ovat tarkoin säädeltyjä. Yleisesti ottaen tuotantotiloina käytettävien puhdastilojen tulee olla mikrobiologisesti puhtaita, joka vaatii rakennusteknisten ratkaisujen lisäksi tehokkaan, käytännöllisen ja vaatimusten mukaisen desinfiointimenetelmän. Tässä opinnäytetyössä perehdytään biokontaminaation hallintaan ja tutkitaan kahden eri desinfiointimenetelmän tehoa. Nocotech konsepti on vetyperoksidikuivasumutusmenetelmä ja MoonBeam™ on ultraviolettisäteilyyn perustuva desinfiointimenetelmä.

EU:n biosidilainsäädännön (European Parliament & European Council 2012) ja saatavuusongelmien myötä uuden desinfiointiaineen löytäminen tuotantotilojen kemialliseen desinfiointiin on ajankohtaista. Kokonaisuudessaan testataan Nocolyse desinfektioaineen lisäksi Nocospray suurtehosumuttimen ja MoonBeam UVC-desinfiointiyksikön toimintaa.

Työn tarkoituksena on tuoda näyttöä menetelmien soveltuvuudesta lääketieteellisuuden tuotantotilojen desinfiointiin. Ensisijaisena menetelmänä kemiallinen desinfiointi vähentää mikrobeja sekä tilan ilmasta että pinnoilta. UVC säteilyä voidaan tämän rinnalla käyttää tehostamaan pintojen desinfektioita. Menetelmien tärkeimpiä ominaisuuksia ovat ajansäästö, helppokäyttöisyys sekä jäämätön lopputulos. Vetyperoksidi hajoaa vedeksi ja hapeksi, jolloin desinfiointiaineiden jäämistä ei koidu haittaa tai lisätyötä (KiiltoClean Oy 2019).

Opinnäytetyö suoritettiin kohdeyrityksen Turun tuotantolaitoksen ohessa sijaitsevassa mikrobiologian laboratoriossa.

2 Puhdastilat

Puhdastila voidaan määritellä tilana tai alueena, jossa ilman hiukkaspitoisuus on tarkoin määritelty ja ympäristöparametrit kontrolloituja kontaminaatoriskin minimoimiseksi (SFS-EN ISO 14644-1 2015). Tilan rakentamiseen ja ylläpitoon tarvitaan huolellista suunnittelua ja tarkkoja toimintatapoja. Tähän kuuluu pohjapiirustuksen, ilmanvaihdon, ympäröivien tilojen ja olosuhteiden mallintaminen, kulunvalvonnan, käytettävien suojaimien ja olosuhdevalvonnan implementointi. Vaatimukset tilalle tulee määrittää käyttötarkoituksen mukaan ja tilat validoida kokonaisuudessaan asetettujen vaatimuksien mukaisesti. Osana validointiprosessia on puhdastilaluokan määrittäminen. (European Commission 2022, 12) Taulukossa 1 on esitelty EU GMP Annex 1 mukainen puhdastilojen luokitus ja niitä ohjaavat raja-arvot kokoluokan $\geq 0,5 \mu\text{m}$ ja $\geq 5 \mu\text{m}$ hiukkasten sallitulle määrälle kuutiota kohden. Sallittu kokonaismäärä riippuu puhtausluokan ja hiukkaskoon lisäksi olotilasta eli siitä onko tilassa toimintaa vai ei. (Sandle & Saghee 2017)

Taulukko 1. EU GMP:n puhdastilaluokkien raja-arvot sallitulle partikkelikonsentraatiolle (European Commission 2022, 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 ^(a) | Not specified ^(a) |
| B | 3 520 | 352 000 | Not specified ^(a) | 2 930 |
| C | 352 000 | 3 520 000 | 2 930 | 29 300 |
| D | 3 520 000 | Not predetermined ^(b) | 29 300 | Not predetermined ^(b) |

^(a) Classification including $5\mu\text{m}$ particles may be considered where indicated by the CCS or historical trends.

^(b) For grade D, in operation limits are not predetermined. The manufacturer should establish in operation limits based on a risk assessment and routine data where applicable.

Erityisesti lääketeollisuudessa yksi oleellisimmista kontaminaatoriskeistä on biokontaminaatio. Lääkeaineiden tai lääkinnällisten laitteiden valmistajien tulee noudattaa GMP:n käytäntöjä eli hyviä tuotantotapoja, jonka päämääränä on varmistaa tuotteen laatu ja turvallisuus. Mikrobikontaminaation lisäksi muita kontaminantteja ovat hiukkaset kuten pöly sekä endotoksiinit ja pyrogeenit. EU GMP:n Annex 1:ssä on määriteltynä ilmassa olevien hiukkasten lisäksi suurin sallittu mikrobimäärä luokkakohtaisesti aktiivisille ja passiivisille ilmanäytteille sekä pintanäytteille. Annex 1:ssä viitataan ISO 14644 sarjan standardeihin ja tarkoituksena on dokumentin rinnalla hyödyntää muita standardeja, joista löytyvät muun muassa näytemenelmät, joita EU GMP ei erikseen määrittele (Sandle & Saghee 2017, 39). Ensisijaisesti EU GMP on tarkoitettu ohjeistukseksi steriilien tuotteiden valmistukseen, mutta sitä voidaan soveltaa myös muuhun tuotantoon, jossa kontaminaation hallinta ja tuotantotilojen valvonta on oleellista. Kohdeyrityksen Turun tehtaalla ei ole aseptista valmistusta, vaan tuotteelle on mahdollista tehdä loppusterilointi. (European Commission 2022, 2–3)

Taulukko 2. EU GMP:n puhdastilaluokituksen mikrobikontaminaation raja-arvot (European Commission 2022, 13)

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

(a) Settle plates should be exposed for the duration of operations and changed as required after a maximum of 4 hours. Exposure time should be based on recovery studies and should not allow desiccation of the media used.

Puhdastilojen rakentamisessa käytettävät ja muut tilassa sallittavat materiaalit ovat ennalta määriteltynä. Materiaalien tulee olla mahdollisimman vähän hiukkasia vapauttava, jonka vuoksi esimerkiksi sisällä tarvittavista materiaaleista poistetaan pahvilaatikat ennen tilaan viemistä ja tavanomaisten paperipyyhkeiden sijaan tiloissa käytetään nukkaamattomia liinoja. Muu sisälle

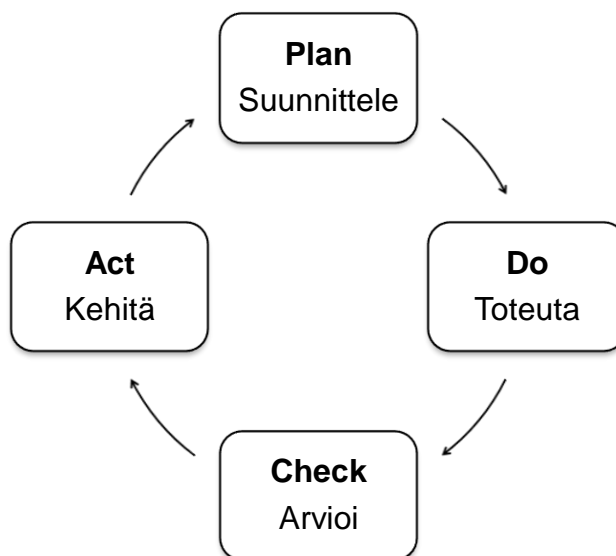
tuotava materiaali pyyhitään alkoholiliuoksella ja nukkaamattomalla liinalla estämään ylimääräisten hiukkasten ja mikrobin pääsyä puhdistilaan. Suurimpana kontaminaatiolähteenä puhdistiloissa on ihminen. Tilassa työskentelevä henkilö vapauttaa suuria määriä partikkeleja ympäristöönsä. Kuolleiden ihosolujen mukana ihmisestä irtoaa ihmisen normaaliflooraan kuuluvia mikrobeja. Suuren kontaminaatoriskin vuoksi puhdistilatyöskentelyssä tarvitaan erityisiä toimintatapoja, asianmukainen pukeutuminen, henkilösuojaimia ja koulutusta. (Whyte, W. 2010)

Puhdistiloissa toimivien työntekijöiden tulee olla päteviä ja perehdytettyjä kyseiseen työhön (European Commission 2022, 3). Valmistettavasta tuotteesta ja puhdistilaluokasta riippuen valmistajalla on oma ohjeistuksensa puhdistilassa työskentelyyn ja pukeutumiseen. Yleisesti ottaen puhdistiloissa tulee työskennellä rauhallisesti, välttämällä suuria ja nopeita liikkeitä, nojailua, lattialla istumista sekä muuta hiukkasia levittävää käyttäytymistä. Ylimääräiset tavarat kuten kellot ja korut sekä kosmetiikan käyttö puhdistilassa työskennellessä on kielletty. Hyvän henkilökohtaisen hygienian ylläpitämiseen kannustetaan. Vaatimusten mukaan käytettäviä suojaimia voivat olla esimerkiksi erilliset puhdistilajalkineet, hiusmyssy, partasuoja, suusuoja, suojakäsineet ja erityisesti materiaalista puhdistilatyöskentelyyn tarkoitettu takki tai haalari.

Materiaalivalintojen ja toimintatapojen lisäksi puhdistilaympäristöjä luodaan sekä ylläpidetään infrastruktuurin ja ilmanvaihdon avulla. Rakennusteknillisesti puhdistiloja ympäröi yksi tai useampi tavallista puhtaampi tila. Kyseessä on usein sulkutila materiaalin tai henkilöiden siirtämiseen tilaan tai tilasta ulos. Puhdistilaa voi myös ympäröidä astetta likaisempi toimitila, joka erottaa sen luokittelemattomista tiloista. HEPA-suodattimien lävitse puhdistilaan saapuva ilma laimentaa puhdistilaan päässeiden hiukkasten pitoisuutta ja ohjaa ne poistoilman mukana pois tilasta. Ilmanvirtaus voi olla joko turbulenttista tai laminaarista. Laminaarivirtauksessa katosta tuleva ilma kulkee yksisuuntaisesti alas lattiatason poistoaukoille ja tarkoituksena on likaisen ilman siirto suoraan pois puhdistilasta. Turbulenttisen virtauksen periaatteena on, että likainen ilma laimenee. Laminaarivirtausta on sekä vaikeampaa että kalliimpaa ylläpitää ja

siksi käytetään yleisesti korkeammissa puhtausluokissa. (Friman, T. & Kivisalmi, V. 2015, 66) Ilmavirtojen hallintaan käytetään myös paine-eroja. Puhdastiloissa vallitsee ympäristöön nähden pääsääntöisesti ylipaine. Tilojen välisiä ovia avatessa ilma pyrkii korkeammasta paineesta matalampaan paineeseen, jolloin hiukkaset ja mahdolliset kontaminantit eivät pääse puhdastilaan. Tietyissä tilanteissa halutaan estää tuotettavan valmisteen pääsy pois puhdastilasta, jolloin paine-erot ovat päinvastaisia.

Puhdastilaympäristöjen ylläpitämiseksi tarvitaan valvontajärjestelmiä. Järjestelmien tulee olla vaatimuksen mukaisia, ennalta määriteltäviä, validoituja ja säännöllisesti arvioituja (European Commission 2022, 3). Tämän työn kannalta keskeistä biokontaminaation hallintaa puhdastiloissa ohjaa standardi SFS-EN 17141:2020, joka korvaa aiemmin käytetyt biokontaminaation valvontaa käsittelevät ISO standardit 14698–1 ja 14698–2. Valvontajärjestelmien tarkoituksena on todentaa puhdastilan vaatimusten mukaisuus. Järjestelmä valitaan tai luodaan käyttötarkoituksen mukaan ja perustuu pitkälti riskinarviointiprosessiin. Riskinarviossa tunnistetaan mahdolliset mikrobikontaminaation lähteet ja arvioidaan tuotteen käyttötarkoitukseen, koostumukseen, loppukäyttäjään ja/tai kohderyhmään kohdistuvan haitan riski. Määritellään valvonnan aikataulu, näytepisteet, mittaustavat, raja-arvot sekä toimenpiteet, joita noudatetaan arvojen ylittyessä. Järjestelmissä sovelletaan jatkuvan kehittämisen periaatetta eli PDCA-sykliä, joka esitetty kuvassa 1. (SFS-EN 17141 2020). PDCA tulee englanninkielen sanoista plan, do, check ja act. Lähtökohtana on huolellinen suunnittelu, jonka toimintaa toteutettua arvioidaan ja tarpeen mukaan kehitetään. Kehitystoiminta puolestaan taas vaatii suunnittelua, jolloin sykli jatkuu.



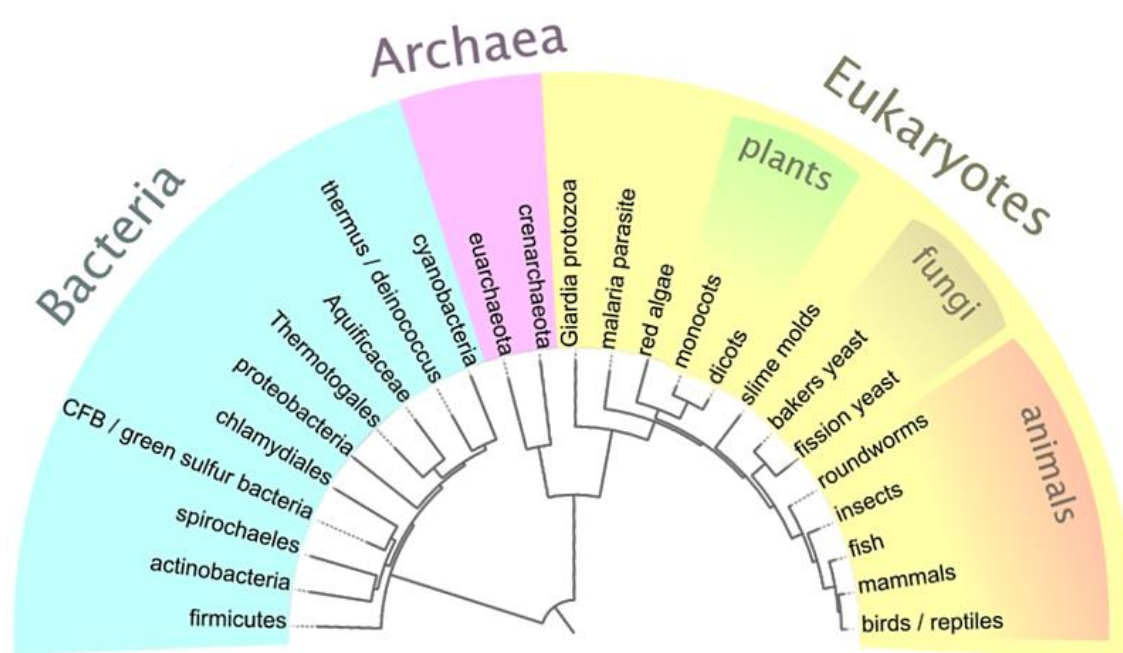
Kuva 1. PDCA-periaate

Käytännössä valvonta koostuu suunnitelman mukaisesti otettavista ilma- ja pintanäytteistä. Ilmanäytteenotto voidaan toteuttaa joko aktiivisella tai passiivisella menetelmällä. Passiivisessa menetelmässä halkaisijaltaan 90 mm laskeumamalja asetetaan tilaan elatusaineen paljas pinta ylöspäin 3 h 45 min–4 h. Aika ei saa ylittää neljää tuntia (European Commission 2022, 13). Aktiivisessa menetelmässä käytetään ilmanäytekeräintä, joka kerää huoneilmaa tietyn tilavuuden verran kasvatusmaljoille esimerkiksi ohuen raon tai siivilän lävitse. Pintanäytteet voidaan ottaa suoraan kontaktiliuskoille, hieman kuperille halkaisijaltaan 55 mm kontaktimaljoille tai sivelymenetelmällä 90 mm elatusainemaljoille steriileillä kostutetuilla pyyhkäisytykuilla. Maljoja inkuboidaan sopivassa lämpötilassa määrätyn ajan ja tulokset lasketaan kasvavien pesäkkeiden lukumääränä eli CFU per malja, pinta-ala tai tilavuutta kohden. (SFS-EN 17141 2020) Muita mikrobiologiseen valvontaan sisältyviä näytetyyppejä ilma- ja pintanäytteiden lisäksi ovat puhdastiloissa työskentelevien henkilöiden suojaamista otettavat näytteet, kuten suojakäsineelliset sormi- ja puhdastilahaalarinäytteet. Nämä ovat vaatimuksena erityisesti A ja B puhtausluokissa. (Sandle & Sanghee 2017, 414–417) Fysikaalisia olosuhteita kuten paine-eroja, lämpötilaa ja kosteutta valvotaan jatkuvasti kiinteistöautomaatiojärjestelmien avulla.

Mikrobiologisessa olosuhdevalvonnassa erityisen oleellista on trendien seuranta. Yksittäisten tuloksien sijaan muutokset pidemmän aikavälin tuloksiin verrattuna voi kertoa ongelmista puhdastilassa. Puhdastilojen normaalin mikrobiflooran määrittäminen säännöllisesti on oleellinen osa valvontaa, joka kertoo muutoksista ympäristössä. Raja-arvojen ylittyessä tai havaitessa haitallisia trendejä puhutaan poikkeavista eli OOL- tai OOS-tuloksista, jotka vaativat toimenpiteitä kuten mikrobien tunnistamista. Tunnistamisen avulla voidaan selvittää kontaminaation mahdollinen aiheuttaja ja eliminoida poikkeavien tuloksien juurisyy. Valvonta tulisi toteuttaa ”in operation” tilassa eli prosessin ollessa käynnissä ja tilassa on henkilöstöä. (Sandle & Sanghee 2017, 412–413)

3 Mikrobit puhdastiloissa

Mikrobeilla tai mikro-organismeilla tarkoitetaan pienikokoisia, paljaalle silmälle näkymättömiä, usein yksisoluisia eliöitä tai viruksia. Mikrobeja löytyy eliöiden jokaisesta pääryhmästä eli domeenista, jotka jakautuvat bakteereihin, arkeoneihin ja aitotumaisiin. Kyseessä on hyvin monimuotoinen ryhmä, joka esiintyy runsaslukuisena, lähestulkoon kaikkialla ympäristössä, erilaisina toimijoina.



Kuva 2. Eliöiden evoluutiopuu eli fylogeneettinen puu (Wikipedia Commons 2007)

Puhdastilojen mikrobiologisessa valvonnassa määritetään tyypillisesti vain aerobisia mikrobeja eli hapellisissa olosuhteissa kasvavien bakteerien, hiivojen ja homeiden määrää. Esimerkiksi viruksia ja monia muitakaan mikrobityyppejä ei perinteisin viljelymenetelmin pystytä määrittämään. Aerobisia mikrobeja määrittämällä saadaan kuitenkin riittävä käsitys mikrobiologisesta riskistä ja mahdollisista haitallisista trendeistä. Puhdastilojen normaalifloora koostuu pääasiassa Gram-positiivisista kokkibakteereista, jota tavataan ihmisen ihon normaalifloorassa (Sandle, T. 2011).

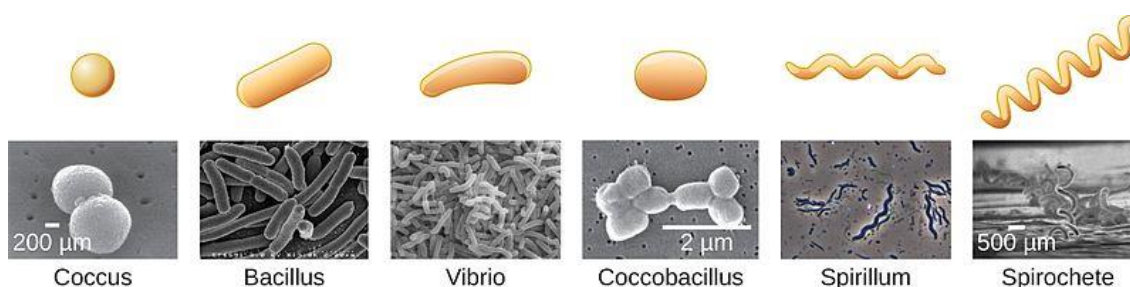
3.1.1 Prokaryootit

Prokaryootteihin eli esitumallisiin eliöihin kuuluvat bakteerit ja arkeonit. Näiden eliöiden geneettinen koodi ei ole pakattuna tumaan eivätkä ne omaa erikoistuneita soluelimiä. Sen sijaan geeniperimä on solulimassa nukleoidiksi kutsutulla alueella yhtenäisenä kiertäisenä kromosomina. Lisäksi erillisiä pieniä deoksiribonukleiinihappo- eli DNA-molekyylejä eli plasmideja voi löytyä sekä bakteereista että arkeoneista.

Arkeonit ovat todennäköisesti maapallon vanhimpia eliöitä, joita löytyy nykypäivänäkkin ääriolosuhteista kuten kuumista lähteistä, hyvin suolaisista, happamista tai emäksisistä ympäristöistä. Vaativia olosuhteita kestävä ja erilaisiin toimintoihin kykenevät arkeonit ovat luultavasti osaltaan edesauttaneet nykyisen elinympäristön muodostumista. Solurakenteellisesti arkeonit muistuttavat bakteereja, mutta esimerkiksi yhtäläisyydet ribosomaalisessa RNA:ssa ja proteiinisynteesiin osallistuvissa yksiköissä viittaavat lähempään sukulaissuhteeseen eukaryoottien kanssa (Talaro, K. P. & Chess, B. 2015, 116). Arkeonit eivät tunnetusti aiheuta infektioita eikä niitä tunneta yhtä laajalti kuin bakteereja, jonka vuoksi viljely on hankalaa ja niiden mikrobiologinen merkitys ihmiselle ei ole kovin suuri (Friman, T. & Kivisalmi, V. 2015, 195).

Bakteerit eli aitobakteerit tai eubakteerit ovat kliinisesti merkittävä ja ihmisten eri sovelluksissa paljon hyödynnetty mikrobiryhmä. Osa bakteereista ovat taudinaiheuttajia ja osa voi tuottaa haitallisia endo- tai eksotoksiineja eli myrkkyaaineita. Valtaosa bakteereista ovat kuitenkin hyödyllisiä ja jopa välttämättömiä ihmiselle. Bakteerien koko vaihtelee välillä 0,5–1000 µm ja ne voidaan jakaa muodon mukaan kokeiksi, sauvoiksi, vibrioiksi, spirokeetoiksi sekä spirilleiksi. Muita variaatioita saattaa myös esiintyä eikä muoto eli morfologia ole luotettava tapa tunnistaa bakteereja. Yleinen tapa tarkastella bakteereja on mikroskoopilla, jolloin gram-värijäyksellä on mahdollista erottaa bakteerit gram-negatiivisiin ja gram-positiivisiin. Gram-positiivisten bakteerien solua ympäröi solukalvo ja paksu peptidoglykaanista koostuva soluseinä. Gram-negatiivisilla on ohuempi soluseinä ja lisäksi vielä ulkokalvo

peptidoglykaani soluseinän ympärillä. Nopeassa värjäysmenetelmässä solut käsitellään kristallivioletilla ja Lugolin liuksella, jolloin solut värjäytyvät violeteiksi. Tämän jälkeen suoritetaan alkoholikäsitely, jolloin kristallinvioletti pääsee huuhtoutumaan ohuemman soluseinän omaavista gram-negatiivisista bakteerisolusta pois, mutta gram-positiivisista ei. Viimeisenä vaiheena safraniinikäsitely värjää värin menettäneet solut eli gram-negatiiviset solut vaaleanpunaisiksi. Gram-positiiviset solut säilyttävät violetin värin.



Kuva 3. Bakteerisolujen eri muotoja (Wikipedia Commons 2016)

Bakteerit lisääntyvät jakautumalla, jolloin yhdestä solusta syntyy kaksi tytärsolua, näistä jälleen kaksi solua ja niin edelleen. Suotuisissa olosuhteissa bakteerien kasvu on eksponentiaalista eli pienestäkin määrästä soluja voi syntyä suuri määrä bakteereja. Bakteerisolujen perimä on peräisin emosolusta, joka ennen jakautumistaan on luonut kopion kromosomistaan, mutta bakteerit voivat myös ottaa muuta perimäainesta ympäristöstään, muista bakteereista tai viruksista. Vastaanotettu DNA on yleisesti plasmidin eli erillisen pyöreän DNA-molekyylin muodossa tai se voi integroitua kromosomiin ja voi antaa kohdesolulle uuden ominaisuuden kuten antibioottiresistenssin (Talaro, K. P. & Chess, B. 2015, 102).

Jotkin bakteerit pystyvät muodostamaan itsestään kestromuodon eli bakteeritiön tai endosporin. Bakteerien sisäitiöt eivät ole lisääntyviä soluja ja ne kestävät hyvin epäsuotuisia olosuhteita. Käytännössä esimerkiksi ravinteiden riittämättömyyden uhatessa bakteeri muodostaa paksukuorisen ja alhaisen vesipitoisuuden omaavan lepomuodon solun välttämättömistä rakenteista, joka on vaikeampi tuhota ja joka kykenee suotuisissa oloissa muuttua jälleen

vegetatiiviseksi soluksi. Vain tietyt bakteerilajit kykenevät sporulaatioon eli muodostamaan itiöitä. (Friman, T. & Kivisalmi, V. 2015, 192).

Bakteerikontaminaation ainoa vaara ei ole mahdollinen patogeenisuus eli kyky aiheuttaa infektiota, vaan steriloidussa tuotteessa voi olla bakteerien tuottamia endotoksiineja. Pääsääntöisesti endotoksiineilla tarkoitetaan gramnegatiivisten bakteerien uloimman solukalvon lipopolysakkarideja, mutta myös muut bakteerit voivat tuottaa yhdisteitä, jotka vapautuessaan aiheuttavat haitallisia reaktioita ihmiskehossa (Talaro, K. P. & Chess, B. 2015, 100).

3.1.2 Eukaryootit

Prokaryooteista poiketen eukaryoottien eli aitotumallisten geeniperimä on tuman sisällä, niillä on myös laaja kirjo soluelimiä eli organelleja ja ovat tyypillisesti huomattavasti suurempia kooltaan. Perinteisesti eukaryootit luokitellaan neljään kuntaan, eläimet, sienet, kasvit ja alkueliöt eli protistit. Fylogeneettisesti eukaryootit jakautuvat kuntiin Unikonta, Chromalveolata, Archaeplastida ja Excavata (Friman, T. & Kivisalmi, V. 2015, 195). Eläimet ja sienet kuuluvat kuntaan Unikonta, kasvit Archaeplastidaan. Eukaryooteista mikrobeiksi luetaan levät, homeet ja hiivat sekä osa alkueliöistä (Solunetti n.d.).

Mikrobiologian kannalta oleelliset sienet jaetaan hiivoihin ja homeisiin. Sienien taksonominen luokittelu perustuu pitkälti vielä morfologiaan esimerkiksi genotyyppisen luokittelun sijaan. Ne lisääntyvät tuottamalla itiöitä, joka voi tapahtua suvuttomasti tai suvullisesti, tai ilman itiöitä suvuttomasti kuroutumalla. Sieni-itiöitä ei tule sekoittaa bakteeri-itiöihin, jotka ovat kestromuotoja bakteerisolusta. Monet sienet voivat elinkaarensa aikana lisääntyä sekä suvuttomasti, jolloin mitoosi tuottaa identtiset kromosomit, että suvullisesti, jolloin meioosi aiheuttaa muuntelua perimässä (Heikkinen ym. 2020, artikkelin tunnus: mbg00224). Homeet ovat tyypillisesti yhtenäisinä rihmastoina tai itiömassoina kasvavia rihmasieniä. Rihmoina (hyphae) kasvavat solut ovat muodoltaan pitkiä ja ohutsäikeisiä. Homeet lisääntyvät pääsääntöisesti konidioiden eli kuroumaitiöiden avulla suvuttomasti, jotka muodostuvat ja

kuroutuvat irti rihmastojen päistä. Hiivasolut taas ovat yksisoluisia sekä pyöreitä tai pitkulaisia. Ne lisääntyvät silmukoitumalla eli emosolusta kuroutuu tytärsolu, joka voi jäädä siihen kiinni tai irrottautua. (Talaro, K. P. & Chess, B. 2015, 135–139)

Mikrobeiksi luetut yksisoluiset levät ovat eukaryoottisia fotosynteesiin kykeneviä eliöitä, jotka eivät kuulu kasvikuntaan. Yksinkertaisuuden vuoksi ne voidaan perinteisesti luokitella protisteihin. Levien kloroplastit voivat vihreän klorofyllin lisäksi tuottaa keltaisen, punaisen tai ruskean värityksen. Tunnetusti levät asuvat vesistöissä, mutta myös muut ympäristöt kuten maaperä, kivet ja kasvit ovat mahdollisia kasvualustoja. Levien aiheuttamia terveyshaittoja ovat pääasiassa ruokamyrkytykset. Sinilevämyrkytys ei tosiasiasa ole levän, vaan sinileväksi kutsutun prokaryoottisen syanobakteerin aiheuttama reaktio. (Talaro, K. P. & Chess, B. 2015, 143)

Loput aitotumalliset mikrobit voidaan pitkälti luokitella alkueläimiin kuuluviksi. Alkueläimet (Protozoa) ovat monimuotoinen ryhmä yksisoluisia ja toisenvaraisia mikroskooppisia eliöitä. Ominaista näille on yksisoluisuus, ei soluseinää, kyky liikkua ja saada ravintonsa syömällä. Alkueläimet voidaan jakaa siimaeliöihin, ameeboihin, ripsi- ja itiöeläimiin (Solunetti n.d.). Elinympäristössä vaihtelevat vedestä ja maaperästä eläimiin. Ne tarvitsevat kosteutta, mutta muuten voivat kestää haastaviakin olosuhteita, kuten lämpötilojen ja pH:n molempia ääripäitä. Alkueläimien elinkaareen kuuluu aktiivisen vaiheen lisäksi lepovaihe, jossa solut voivat muuttua kestäväksi kystaksi. Kystamuoto kestää epäsuotuisia olosuhteita kuten kuivuutta samaan tyyliin kuin bakteeri-itiöt. Solut lisääntyvät suvuttomasti ja jotkin lajit tunnetusti aiheuttavat infektioita kuten malariaa ja toksoplasmoosia. (Talaro, K. P. & Chess, B. 2015, 145–146)

3.1.3 Virukset

Virukset ovat bakteereja pienempiä mikrobeja, jotka eivät ole varsinaisia eliöitä. Viruspartikkelit koostuvat genomista, joka on joko DNA:ta tai RNA:ta ja kapsidista eli proteiinikuoresta. Joillain viruksilla voi olla myös kapsidia

ympäröivä vaippa tai infektioprosessia edesauttavia entsyymejä. Virukset tarvitsevat isäntäsolun infektoitavakseen, jotta pystyvät lisääntymään. Infektoimalla solun omalla geneettisellä koodillaan virus pystyy hyödyntämään solun metaboliaa, proteiinisynteesikoneistoa ja rakenneyksiköitä replikoituaan. Mikä tahansa solu on viruksen infektoitavissa, mutta tiettyjen virustyyppien mahdolliset isäntäeliöt ovat rajoitettuja. Kaikilla eliölajeilla, bakteereilla, sienillä, levillä, kasveilla, eläimillä, protisteilla on niitä infektoivia viruksia. Infektioprosessissa virukset kiinnittyvät solun pinnalla tiettyihin rakenteisiin. Jotkin virukset kykenevät infektoimaan vain tietyn lajin, tietyn tyyppisiä soluja esimerkiksi HIV eli ihmisen immunokatovirus kiinnittyy ihmisen valkosolujen CD4⁺ tyyppin proteiineihin tai vesikauhua aiheuttava rabiesvirus nisäkkäiden hermosoluihin. Viruksien luokittelu on hankalampaa kuin eliöiksi laskettavat mikrobit. Erilaisia tapoja luokitella viruksia on niiden löytämisen myötä ollut, nykypäivänä samanlaisuuksien kuten genotyypin, isäntäeliöiden ja patogeenisyyden perusteella ryhmittely on yleisin keino (Talaro, K. P. & Chess, B. 2015, 158–166).

Solun ulkopuolella virukset ovat siis inaktiivisia partikkeleja, jotka eivät kykene yksinään lisääntymään ja joilla ei ole energia-aineenvaihduntaa tai muita solullisia toimintoja. Virukset säilyvät pinnoilla tartuntakykyisenä vaihtelevasti ja niitä ei ole mahdollista viljellä samalla tavalla kuin bakteereja tai homeita. Erilaisia tapoja määrittää, kasvattaa ja tutkia viruksia ovat muun muassa *in vitro* soluviljely tai *in vivo* koe-eläimissä (Talaro, K. P. & Chess, B. 2015, 175).

Monet virukset ovat patogeenisiä eri orgasmeissa, mutta ne voivat olla myös vaarattomia tai jopa hyödyllisiä. Bioteknologiassa ja lääketieteessä viruksia on hyödynnetty muun muassa rokotteissa sekä geeniterapiassa vektoreina. Bakteriofagit ovat yksinomaan bakteerisoluja infektoivia viruksia, joita voisi mahdollisesti käyttää bakteeri-infektioiden hoitoon (Talaro, K. P. & Chess, B. 2015, 161).

4 Mikrobiologiset tutkimusmenetelmät

Työssä käytettäviä mikrobiologisia tutkimusmenetelmiä ja näytetyyppejä olivat pintanäytteet, aktiivinen ilmanäyte sekä bioindikaattoreilla tehtävä steriiliystesti ja itiömääritys. Testauksessa käytettävät menetelmät, materiaalit ja laitteet tulevat olla validoituja. Viljelyyn perustuvat menetelmät kuvataan standardissa 17141:2020 ja bioindikaattorien testausmenetelmät ISO standardissa 11737-1.

Suoraan elatusainemaljoille otettavissa näytteissä kyse on elinkykyisiä mikrobeja määrittävästä menetelmästä, josta tulokseksi saadaan CFU eli pesäkettä muodostavaa yksikköä. Tämä kuvaa näytepinnalla olevia eläviä ja lisääntymiskykyisiä bakteereja ja sieniä. Pääsääntöisesti yksi silmin nähtävä pesäke on lähtöisin yhdestä ainoasta mikrobisolusta. Visuaalisessa tulosten laskennassa on kuitenkin rajoituksensa ja tilaa virheille esimerkiksi päällekkäisten ja epäselvien pesäkkeiden vuoksi. Menetelmä on siis suuntaa antava arvio pinnoilla tai ilmassa olevien lisääntymiskykyisten bakteerien ja homeiden määrästä. Mikrobiologisessa olosuhdevalvonnassa menetelmä on kuitenkin toimiva. Epäselvissä tilanteissa noudatetaan pahimman tapauksen ajatustapaa. Valvonnan toteutuessa ohjeistuksen ja suunnitelman mukaisesti muuttuvat trendit sekä poikkeavat tulokset on mahdollista huomata ja niihin voidaan reagoida asianmukaisesti. (Sandle & Sanghee 2017, 414)

Pintanäytteenotossa on kaksi pääasiallista menetelmää, kontakti- ja sivelymenetelmä. Näistä ensisijainen ja suositeltava vaihtoehto on kontaktimaljamenetelmä, joka esiintyy myös nimellä RODAC eli Replicate Organism Detection and Counting. Kontaktimaljan agarpinta painetaan tasaisella paineella näytepintaa vasten tietyn ajan, jolloin pinnalla olevia elinkykyisiä mikrobeja siirtyy elatusaineelle. Tyypillisesti elatusaineena on yleiskäyttöinen TSA eli tryptoni-soija-agar, johon on lisätty desinfiointiaineita neutraloivia yhdisteitä. Kasvualustan tulee tukea mahdollisimman hyvin erilaisten mikrobien kasvua ja minimoida kasvua häiritseviä tekijöitä, kuten pinnoilla olevien desinfiointiainejäämien vaikutusta. Kontaktimenetelmässä pinnan tulee olla tasainen ja riittävän suuri, jotta kontakti koko maljan ja pinnan

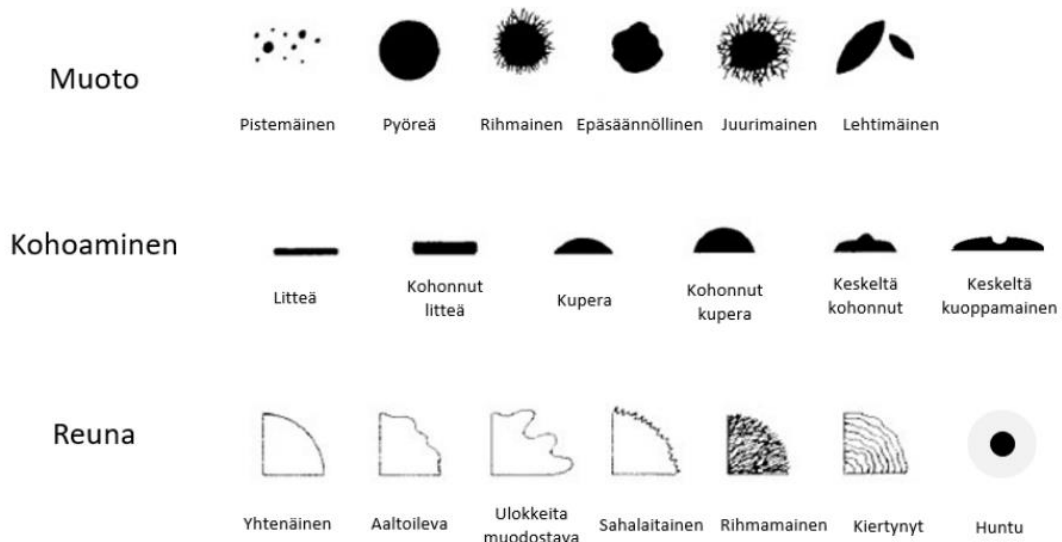
välillä saavutetaan. Epätasaisissa tai vaikeasti saavutettavissa näytepisteissä voidaan käyttää sivelymenetelmää, jossa steriiliin liuokseen kostutetulla steriilillä näytepuikolla sivellään näytepinta ja sivelletyllä näytepuikolla elatusaineen pintaan tarpeeksi voimakkaalla otteella pyörittäen tikkoa. Tyypillisesti siveltävänä on tietty pinta-ala esimerkiksi 25 cm² vastaava alue. Vaihtoehtoisesti voidaan upottaa näytepuikko nestemäiseen elatusaineeseen tai liuottaa ja kalvosuodattaa näyte. Näytteenottoon itse sisältyy aina kontaminaatoriski ja erityisesti sivelymenetelmässä tekniikalla ja näytteenottajan kokemuksella voi olla suurikin vaikutus saatuihin tuloksiin. (Sandle & Sanghee 2017, 416)

Ilmanäytteenotossa käytetään aktiivista menetelmää, jossa hyödynnetään ilmanäytekeräintä. Keräimiä löytyy erilaisia, mutta peruseriaatteena tietty tilavuus huoneilmaa imetään siivilän tai aukon lävitse elatusainemaljalle, jolloin elinkykyiset ja mahdollista mikrobiologista riskiä aiheuttavat mikrobit ilmassa voidaan määrittää. Työssä käytetty Sieve to agar -ilmanäytekeräintä, joka kerää huoneilmaa tietyllä virtausnopeudella 90 mm:n elatusainemaljalle reiällisen sihdin lävitse. (SFS-EN 17141:2020, 32)

Elatusaineen valinnassa ja inkuboinnin suunnittelussa on pääsääntöisesti kaksi vaihtoehtoa. Määrityksessä halutaan näkyviin sekä bakteerit että hiivat ja homeet, joiden optimaaliset kasvuolosuhteet eriyvät. Voidaan käyttää joko kahta eri elatusainetta ja inkubointilämpötilaa, bakteereille yleiskäyttöinen kasvualusta sekä inkubointi korkeammassa lämpötilassa, homeille ja hiivoille selektiivinen elatusaine kuten SDA eli Sabourad agar ja inkubointi alhaisemmassa lämpötilassa. Tämä merkitsee useamman eri näytteen ottoa, jolloin riski virheelle ja tuloksien vääristymiselle kasvaa. Toinen tapa on noudattaa kaksivaiheista inkubointikäytäntöä, jossa elatusaineena on tyypillisesti yleiskäyttöinen TSA. Inkubointi aloitetaan alhaisemmassa lämpötilassa 20–25 °C, jonka tarkoituksena on edistää hiivojen ja homeiden kasvua, jonka jälkeen maljojen inkubointia jatketaan korkeammassa lämpötilassa 30–35 °C. Inkubointi voidaan suorittaa myös päinvastaisessa järjestyksessä aloittaen korkeammasta lämpötilasta. Inkubointiaikoina 20–25 °C

asteessa vähintään 3–5 vuorokautta ja 30–35 °C:ssa vähintään kaksi vuorokautta. Inkubointikäytännöt myös vaihtelevat paikasta riippuen. Kokonaisajan tulisi kuitenkin olla vähintään 7 vuorokautta. (Sandle & Sanghee 2017, 417)

Inkuboinnin jälkeen tulosten analysointi tapahtuu silmämääräisellä tarkastelulla, jossa jokainen yksittäinen erotettava pesäke lasketaan yhdeksi CFU:ksi. Apuna voidaan muun muassa käyttää valopöytää, jossa saatavilla suurennuslasi sekä kosketusherkkä pesäkelaskuri. Asianmukainen ja oikea-aikainen dokumentointi on koko prosessin aikana tärkeää. Tarpeen vaatiessa pesäkkeistä voidaan tehdä mikrobien tunnistus. Alustavassa tunnistuksessa kuvaillaan pesäkkeen morfologiaa eli muotoa, väritystä ja muita ulkonäöllisiä ominaisuuksia. Mikroobeille voidaan suorittaa myös gram-värjäys ja mikroskopointi, jolla mikrobisolujen muotoa ja rakennetta voidaan tarkastella tarkemmin. Itiövärjäyksellä voidaan tunnistaa tai poissulkea itiöitä muodostavat bakteerit identifioinnissa. Tarkka määrittäminen tehdään biokemiallisella tunnistuksella esimerkiksi geenisekvensoinnilla tai nopeammalla matrix-assisted-desorption ionization time-of-flight- eli MALDI-TOF-massaspektrometrialla.



Kuva 4. Bakteeripesäkkeiden morfologiaa (Breakwell, D. ym. 2007)

Kaupallisia bioindikaattoreita hyödynnetään sterilointiprosessien tehokkuuden arviointiin. Tässä työssä käytettiin bioindikaattoriliuskoja, jotka sisältävät bakteeri-itiöitä suojakuoreen pakattuna. Tuhoamisen kannalta itiöt ovat hankalammasta päästä, joten sterilointiprosessilla käsiteltyä liuskaa analysoimalla voidaan varmistua sen tehokkuudesta. Käytetty indikaattoriorganismi *Geobacillus Stearothermophilus* on termofiili eli se viihtyy korkeammissa lämpötiloissa ja on sen vuoksi yleisesti käytetty indikaattori höyrysteriloinnissa. Analysointi koostuu itiötasonmäärityksestä ja steriiliystestistä.

Itiötasonmäärityksessä tarkistetaan liuskojen keskimääräinen itiötaso ja voidaan laskea itiöiden logaritminen vähenemä. Jokainen liuska tutkitaan erikseen aseptisesti työskennellen. Avataan suojakuori, siirretään liuska steriiliä vettä sisältävään steriiliin korkilliseen koeputkeen ja homogenoidaan liuska veteen. Hajotus voidaan tehdä monella tapaa kuten sonikaatiolla, homogenisaattorilla, manuaalisesti sekoittamalla tai vorteksoimalla. Tämän työn määrityksessä koeputkeen lisättiin steriilejä lasihelmiä ja vorteksoitiin kunnes liuska vaikutti hajonneen kokonaan. Homogenaatti lämpökäsitellään 95–100 °C:n vesihauteessa 15 minuutin ajan ja lopuksi jäähdytetään kylmähauteessa nopeasti. Lämpökäsitelystä homogenaatista valmistetaan laimennossarja, jonka tarkoituksena on antaa laskettavia tuloksia, mikäli itiömäärä on hyvin korkea eikä sen vuoksi laskettavissa. Sopivista laimennoksista tehdään viljelmät pipetoimalla pieni määrä maljoille, lisäämällä lämmitettyä nestemäistä TS agarია päälle ja sekoittamalla maljoja työtasolla kahdeksikon muodossa. Inkubointi 55–60 °C vähintään kaksi vuorokautta. (SFS-EN ISO 11737 2018) Tulosten laskenta tehdään laskettavista maljoista pesäkelaskinta hyödyntäen. Mikäli pesäkkeitä on paljon, malja voidaan jakaa esimerkiksi neljään osaan, laskea yhden osion pesäkemäärä ja kertomalla osuuksien määrällä saadaan arvio koko maljan pesäkemäärästä.

Steriiliystestissä käsitelty liuska siirretään aseptisesti elatusaineliemeen ja yksinkertaisesti inkuboidaan sopivassa lämpötilassa vähintään 7–14 vuorokautta tai kunnes kasvua esiintyy. Ohessa tutkitaan yksi käsittelemätön

bioindikaattoriliuska, joka toimii positiivikontrollina. Kontrolliputken elatusaineen tulee samentua ja steriloitujen liuskojen pysyä kirkkaina. Mikäli testiputkissa näkyy kasvua, eli elatusaine samenee, desinfiointiprosessi ei ole onnistunut. Mutta koska kyseessä ei ole sterilointi, täydellinen tuhoutuminen ei ole oletusarvona. *Geobacillus stearothermophiluksen* tapauksessa inkubointi suoritetaan korkeammassa lämpötilassa, joten samentuminen mitä todennäköisimmin tarkoittaa indikaattorimikrobin kasvua.

5 Desinfiointimenetelmät

Puhdastilaympäristöjen luomisessa ja ylläpitämisessä rakennusteknisten ratkaisujen lisäksi tilan siivous ja desinfiointi on oleellista, joille säännökset kuten EU GMP asettavat tiettyjä vaatimuksia. Desinfiointilla tarkoitetaan kasvullisten mikrobin poistamista tai vähentämistä elottomilta pinnoilta tai tiloista. (Sandle & Sanghee 2013, 436–437) Desinfiointimenetelmät voidaan pääsääntöisesti jakaa kolmeen luokkaan, fysikaalisiin, mekaanisiin sekä kemiallisiin menetelmiin. Fysikaalisia desinfiointia tekijöitä ovat lämpö ja ei-ionisoiva säteily, mekaanisia suodatusmenetelmät ja kemiallisissa erilaiset desinfiointiaineet. (Talaro & Chess 2015)

Desinfiointimenetelmien tehoa tarkastellessa oleellinen arvo tulosten analysoinnissa on log alenema, joka kuvaa mikrobin suhteellista määrää ennen ja jälkeen käsittelyn logaritmisessa muodossa. Voidaan puhua myös desimaalisesta eli kymmenkantisesta logaritmisesta. Logaritminen asteikko on muun muassa mikrobiologiassa hyödyllinen, koska mikrobisolun määrät ovat yleisesti ottaen hyvin suuria. Mitä suurempi log alenema on, sitä enemmän mikrobisoluja on menetelmällä saatu tuhottua.

Taulukko 3. Log alenema verrattuna muihin asteikkoihin (Trzepiński, P. 2023)

| Log alenema | Prosentuaalinen alenema | Pesäkemäärä (CFU) |
|-------------|-------------------------|-------------------|
| 0 | 0 % | $1 \cdot 10^6$ |
| 1 | 90 % | $1 \cdot 10^5$ |
| 2 | 99 % | $1 \cdot 10^4$ |
| 3 | 99,9 % | $1 \cdot 10^3$ |
| 4 | 99,99 % | $1 \cdot 10^2$ |
| 5 | 99,999 % | 10 |

5.1.1 Kemialliset menetelmät

Puhdastilojen desinfioinnista puhuttaessa tarkoitetaan ensisijaisesti kemiallisia aineita ja menetelmiä, jotka desinfioivat pintojen lisäksi huoneilmaa. Ilmassa olevat hiukkaset saattavat sisältää elinkykyisiä mikrobeja, jotka aiheuttavat kontaminaatoriskin valmistettavalle tuotteelle. Määritelmänä desinfiointiaineet eivät tuhoa bakteerien kestromuotoja eli itiöitä, mutta jotkin aineet voivat myös olla itiövaikutteisia (Sandle & Sanghee 2013, 435). Desinfiointiaineet muodostavat yhden biosidivalmisteiden neljästä pääryhmästä ja niiden käyttöä sekä myyntiä Suomessa säätelee EU:n biosidiasetus. EU:n jäsenvaltioissa käytettävillä biosidivalmisteilla on oltava asetuksen mukainen biosidivalmistelupa. Tarkoituksena on estää valmisteiden mahdollisia haitallisia vaikutuksia ympäristölle ja eliöille varmistamalla käytettävien tehoaineiden turvallisuus. Suomessa tuotteiden valvonnasta ja rekisteröinnistä vastaa Turvallisuus- ja kemikaalivirasto eli Tukes (European Parliament & European Council 2012; Friman, T. & Kivisalmi, V. 2015, 268).

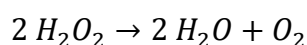
Yleisesti ottaen vaatimuksia desinfektioaineille ovat muun muassa laaja-alainen teho eri mikrobeihin, suhteellisen nopea vaikutusaika, yhteensopivuus käsiteltävien materiaalien kanssa, muiden yhdisteiden ja ympäristön olosuhteiden vaikutus tehoon sekä tehoaineiden stabiilisuus. Vaatimukset vaihtelevat tilannekohtaisesti ja käyttötarkoituksen mukaan. EU GMP:n asettamia vaatimuksia lääketeollisuudelle ovat kirjalliset ohjeet desinfiointimenettelytavoille, henkilökunta on koulutettu ja koulutus on dokumentoitu sekä säännöllisessä desinfioinnissa tulee käyttää vaihtelevasti vähintään kahta eri tehoainetta resistenttiyden ehkäisemiseksi, joista ainakin toinen on sporisidinen eli itiövaikutteinen. Desinfioinnin tehoa ja tilan mikrobiflooraa tulee säännöllisesti arvioida. Erityisesti muutokset, kuten resistenssi käytetylle desinfiointimenetelmälle, mikrobistossa on tärkeää havaita. EU GMP edellyttää desinfiointiaineiden mikrobiologisen laadun tarkkailua säännöllisesti sekä luokan A ja B tiloissa käytettävien steriilejä puhdistus- ja desinfiointiaineita. Kaikkien puhdastilojen käyttö tulee dokumentoida oikea-aikaisesti, desinfiointiaineiden toimittajan tulee olla

luotettava ja itse aineiden jäljitettävissä esimerkiksi eränumerolla. Kemiallisia desinfiointiaineita valitessa otetaan huomioon turvallisuuskäytäntö, tarvittava teho, mahdolliset jäämät ja niiden aiheuttamat haitat sekä hinta. Käytettävästä aineesta riippuen mahdolliset desinfiointiainejäämät tulee poistaa tai neutraloida pinnoilta käsittelyn jälkeen. (Sandle & Sanghee 2017, 437–440; European Commission 2022, 14)

Desinfiointiaineet voidaan jakaa alkoholeihin, halogeeneihin, fenoliyhdisteisiin, peroksygeeneihin eli hapettaviin yhdisteisiin, aldehydeihin, tensideihin ja polymeerisiin biguanideihin. Tietyillä metalleilla on myös antimikrobiaalisia vaikutuksia. Desinfektio mekanismi vaihtelee eri yhdisteillä, mutta kaikki aiheuttavat pysyvää vauriota johonkin solun rakenteista esimerkiksi rikkomalla solukalvoa tai denaturoimalla solunsisäisiä proteiineja (Friman, T. & Kivisalmi, V. 2015, 268–280).

Vetyperoksidikuivahöyrytys

Vetyperoksidi, kemialliselta kaavaltaan H_2O_2 , on yleisesti käytetty peroksygeeni eli hapettava desinfiointiaine. Vetyperoksidi on toinen vedyn oksideista, joka hajoaa vedeksi ja hapeksi lämmön, valon, metallien tai muiden katalyyttien kuten epäpuhtauksien vaikutuksesta (Työterveyslaitos 2022).



Kaava 1. Vetyperoksidin hajoamisreaktio.

Ominaisuuksiltaan vetyperoksidi on teholtaan laaja-alainen ja jopa sporisidinen, orgaanisten yhdisteiden jäämät eivät häiritse desinfiointin tehoa eikä itse jätä desinfiointiainejäämiä. Eri stabiloimisaineiden avulla koostumus on saatu stabiilua ja säilyy varastoitunakin vaikutuskykyisenä useamman kuukauden. (Talaro & Chess 2015, 342)

Vetyperoksidi tuottaa hydroksyyli radikaaleja, jotka ovat voimakkaasti reagoivia molekyylejä. Tämä voimakkaasti hapettava vapaa radikaali kykenee viemään

solurakenteilta elektroneja aiheuttaen soluvaurioita. Reagoimalla solun kloridi-ionien kanssa vetyperoksidi muodostaa hypokloriitti-ioneja, jotka itsessään toimivat desinfiointina tehoaineena (Friman, T. & Kivisalmi, V. 2015, 359). Solut tuottavat itse pienissä määrin vetyperoksidia, jonka vuoksi soluissa on vetyperoksidia hajottavaa katalaasientsyymiä. Desinfiointiin käytettyä määrää ja solun ulkopuolelta tulevaa vetyperoksidia solujen katalaasi ei juurikaan kykene neutraloimaan. Erityisesti kaasumaisessa muodossa vetyperoksidi on hyvin tehokas desinfiointiaine. (Talaro & Chess 2015, 200, 342)

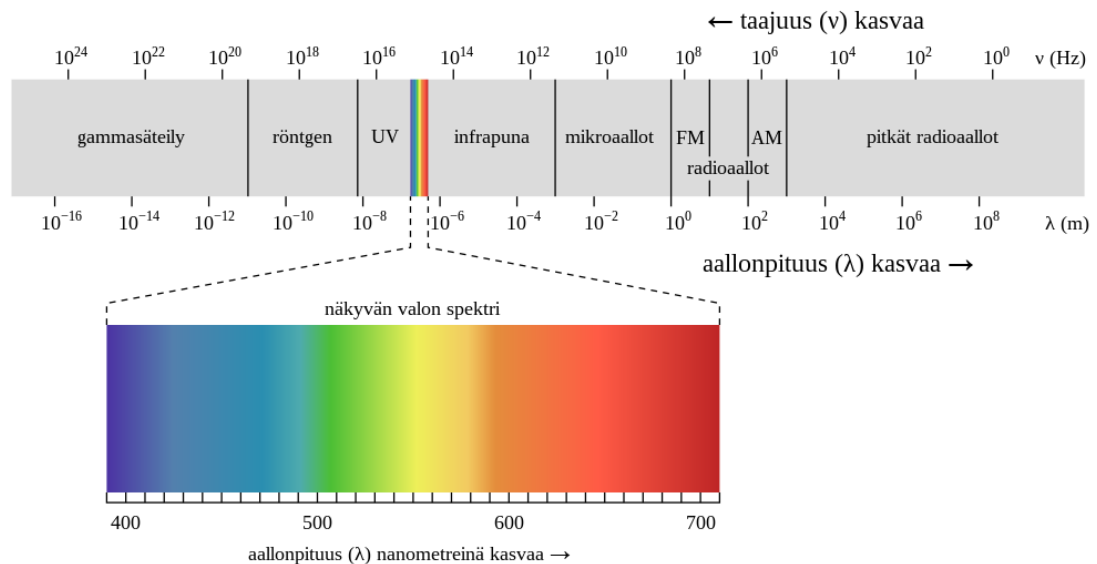
5.1.2 Fysikaaliset menetelmät

Fysikaaliset desinfiointimenetelmät voidaan jakaa lämpödesinfektioon, säteilytykseen ja suodatukseen. Suodatus voidaan jakaa myöskin erilleen mekaanisena menetelmänä (Talaro & Chess 2015, 322). Lämpödesinfektio on yleisin menetelmä, joka voidaan vielä jakaa kuivaan ja kosteaan. Kosteassa ympäristössä tehtävä desinfiointi, esimerkiksi vesihöyryn avulla, on tehokkaampi mikrobeja vastaan. Säteilyn avulla tehtävä desinfiointi voidaan jakaa käytettävän säteilyn perusteella ionisoivaan ja ionisoimattomaan. Ionisoivaa säteilyä kuten röntgen- tai gammasäteilyä käytetään sterilointiin, kun taas ionisoimatonta UV-säteilyä desinfiointiin.

UVC-säteily

UV- eli ultraviolettisäteily jaetaan aallonpituuksien perusteella kolmeen alueeseen, UVA (315–380 nm), UVB (280–315 nm) ja UVC (100–280 nm). Korkeaenerginen ja lyhyen aallonpituuden omaava UVC-säteily ei ole ionisoivaa, mutta kykenee aiheuttamaan muutoksia molekyyli-rakenteissa virittämällä atomeja korkeampaan energiatilaan. Ionisoiva säteily nimensä mukaisesti kykenee irrottamaan elektroneja molekyyleistä muuttaen sen sähkövaraukselliseksi eli ioniksi. Tämä voi aiheuttaa esimerkiksi katkoksia DNA-juosteessa, kun taas ionisoimaton säteily aiheuttaa poikkeavia sidoksia, joka puolestaan aiheuttaa mutaatioita perimässä. Muutokset DNA:ssa

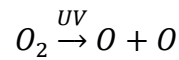
kohdistuvat pyrimidiiniemäksiin eli tyymiiniin ja sytosiiniin, jotka muodostavat keskenään pyrimidiinidimeerejä sen sijaan, että normaaliin tapaan muodostaisivat sidoksia puriiniemästen kanssa. Mutaatiot johtavat säteilyn ja epänormaalien sidoksien määrästä riippuen rajoittuneeseen solukasvuun tai solukuolemaan. Lisäksi UV-säteily muodostaa vapaita radikaaleja, jotka puolestaan häiritsevät solun normaalia toimintaa. UV-säteily ei myöskään ionisoivan säteilyn lailla läpäise kiinteitä esteitä, joten valon kohdennus desinfioitavaan kohteeseen on oleellista. Ultraviolettisäteilyn antimikrobinen teho on korkeimmillaan aallonpituudella 260 nm ja valonsäteen ollessa kohtisuoraan käsiteltävään pintaan. (Talaro & Chess 2015, 326–335)



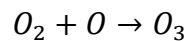
Kuva 5. Sähkömagneettisen säteilyn spektri (Wikipedia Commons 2011)

Jokaisen tunnetun organismin geneettisenä koodina toimii DNA, joten yhtä lailla UV-säteily on haitallista myös ihmisen eri kudoksille. Tämän vuoksi työturvallisuusaspekti on otettava huomioon, mahdolliset riskit tunnistettava ja ehkäisevät toimenpiteet laadittava, kun UVC-desinfiointia suunnitellaan käytettävän. Laitteen tulisi olla operoitavissa ajastimella tai kaukosäädettävä, jolloin operaattori voi poistua tilasta ennen käsittelyn aloitusta ja suojella itseään säteilyn aiheuttamilta haitoilta. Itse säteilyn lisäksi UVC-säteily muodostaa haitallista otsonia hajottamalla happimolekyylejä happiatomeiksi. Nämä herkästi

reagoivat happiatomit muodostavat ilmassa olevien happomolekyylien kanssa otsonia.

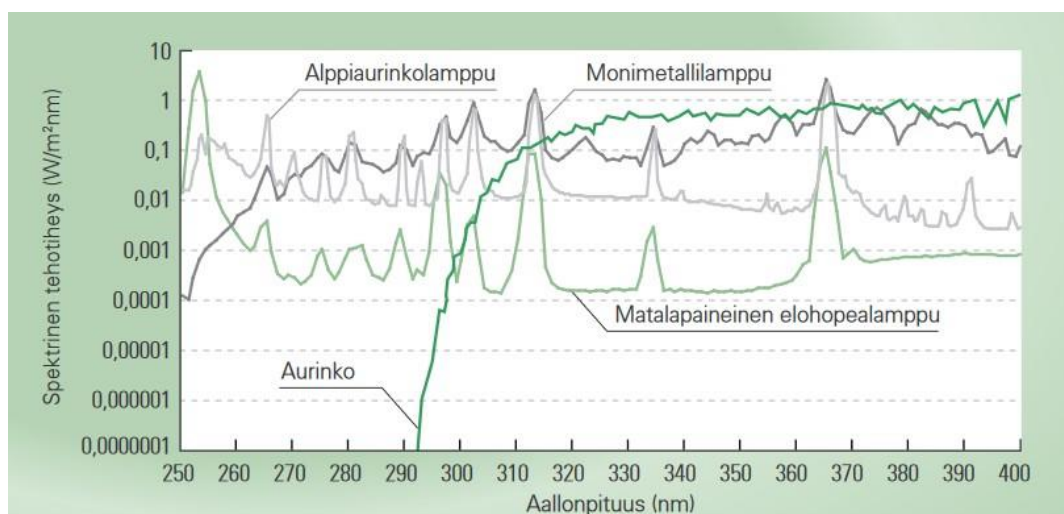


Kaava 2. Molekulaarisen hapen hajoaminen happiatomeiksi UV-säteilyn vaikutuksesta



Kaava 3. Otsonin muodostuminen happiradikaaleista ja happimolekyyleistä

Man ym. 2023 julkaistussa tutkimusartikkelissa arvioitiin UVC-laitteiden tuottaman säteilyn heijastumisen ja otsonin muodostumisen aiheuttamaa turvallisuusriskiä. Säteilylle altistuminen on todellinen riski, oli sitten kyse heijastumisesta tai suorasta altistuksesta, joten käsittelyn ajaksi tilasta tulee poistua. Otsonin muodostuminen puolestaan, erityisesti perinteisillä matalapaineisilla elohopealampuilla, ei aiheuta turvallisuusriskiä sisätiloissa käytettynä. Opinnäytetyössä käytettävä MoonBeam UVC-desinfiointiyksikön valmistajan mukaan laite ei tuota lainkaan otsonia. Laitteessa käytettävät lamput sisältävät myrkyllistä elohopeaa, joten erityisesti lampuja on käsiteltävä huolellisesti ja hävitettävä asianmukaisesti ongelmajätteenä.



Kuva 6. Säteilyspektrien vertailua (Pastila, R. 2009, 231)

6 Kokeellinen osuus

Opinnäytetyössä Noco ja MoonBeam desinfiointimenetelmien tehoa tutkittiin ilmasta ja/tai pinnoilta mikrobiologisessa olosuhdevalvonnassa käytetyillä menetelmillä ottamalla näytteitä elatusainemaljoille ennen ja jälkeen käsittelyn. Testauksien ja näytteenottojen aikana pyrittiin välttämään itse aiheutettua kontaminaatoriskiä sekä muiden työntekijöiden häiritsemistä.

6.1 Nocospray 2

Nocotech on vetyperoksidiin perustuva kuivasumutusmenetelmä, joka koostuu Nocospray laitteesta ja siinä käytettävästä bakteereihin, viruksiin, sieniin, homeisiin ja itiöihin tehoavasta desinfektioaineesta. Työssä käytettävä Nocolyse Food on käyttövalmis liuos, joka sisältää 7,9 % stabiloitua vetyperoksidia. (KiiltoClean 2022a) Desinfioinnissa käytettävä annostus vaihtelee tarpeen mukaan 1–6 ml/m³. Markkinoijan mukaan säännöllinen ennaltaehkäisevä desinfiointi voidaan suorittaa annostuksella 1 ml/m³, tarvittaessa loppusiivouksen yhteydessä tehtävä 3 ml/m³ ja ongelmatilanteissa 6 ml/m³. Annosteltava tilavuus valitaan kertomalla käsiteltävä tilavuus halutulla annoksella. Huomioitavaa on, että ilmoitettu toiminta-alue 50-1000 m³ koskee käsittelyä vain annostuksella 1 ml/m³. Kyseiselle Nocospray laitteelle käsiteltävän tilan maksimitilavuus annoksella 6 ml/m³ on vain noin 166 m³. Käsiteltävästä tilavuudesta ja annostuksesta riippuen sumutuksen kesto on 36 sekunnista 60 minuuttiin, jonka jälkeinen kontaktiaika alle 500 m³ tilavuuksille 30 minuuttia ja 500-1000 m³ tilavuuksille tai annostelun ollessa > 1 ml/m³ 60 minuuttia. Varoajan jälkeen tila ei vaadi pyyhintää tai tuuletusta. Elintarviketeollisuuteen tarkoitettu liuos on tehokas eikä jätä jäämiä, sillä vetyperoksidi hajoaa vedeksi ja hapeksi. Menetelmä soveltuu sekä ilman että pintojen desinfiointiin. Nocospray desinfiointiaine on laajasti testattu, bakterisidinen teho standardin EN 1276 mukaisesti, fungisidinen EN 1650 sekä näiden yhdistelmä EN 13697 standardin mukaisesti, virusidinen EN 14476 ja sporisidinen vaikutus 13704 mukaan. (KiiltoClean n.d.)

Nykyinen tuotantotiloissa käytettävä desinfiointiaine sisältää vetyperoksidin lisäksi etikkahappoa ja peretikkahappoa aiheuttaen korroosiota metallipinnoissa sekä vaatii ilmastointikatkoksen, tilojen eristämisen (ovien teippaus ulkopuolelta) ja vähintään tunnin mittaisen tuuletuksen kontaktiajan jälkeen. Noco ei vaadi ilmastoinnin katkaisua, mutta puhdastiloissa tehokkaan ilmastoinnin hidastamista desinfiointiaineen halutun pitoisuuden ja vaikutusajan saavuttamiseksi. Tilassa ylipaineen vallitessa sumu pyrkii matalamman paineen alueelle, jolloin vaikutus ei välttämättä ole tasainen tai riittävä. (Kiilto Ammattihygieniä 2017)

Nocotech menetelmää verrattiin myös nykyiseen kuivasumulaitteistoon ja siinä korvaavana vetyperoksidi ja peretikkahappo pohjaisena desinfiointiaineena käytettyyn KiiltoClean Oy:n F 268 Airol S:ään.

6.1.1 Noco testaus

Ensimmäisen testauksen tarkoituksena oli verrata Nocolyse Food desinfiointiainetta Nocospray 2 suurtehosumuttimella ja Kiillon F 268 Airol S kylmädesinfiointiainetta Minncare Dry Fog laitteistolla. Näillä kahdella eri laitteella ja vetyperoksidipohjaisella desinfiointiaineella sumutettiin sama tila peräkkäisinä päivinä ja arvioitiin niiden tehoa tilaan sijoitettujen bioindikaattorien avulla. Käsiteltävä tila oli EU-GMP luokituksen mukainen C-luokan puhdastila, johon sijoitettiin yhteensä 14 *Geobacillus stearothermophilus* itiöitä sisältäviä bioindikaattoriliuskoja kymmeneen eri näytepisteeseen. Noco käsittelyn yhteydessä näytepisteisiin asetettiin myös käyttöohjeen mukaan valmisteltuja kemiallisia indikaattoreita, Nocotest-liuskoja (KiiltoClean Oy 2022b). Tilan sisäiset ovet avattiin ja ilmastointi sammutettiin käsittelyn ajaksi, jotta sumu pääsee leviämään desinfiointitiloihin sekä näytepisteisiin ja haluttu vaikutusaika saavutetaan. Nocosprayn annosteluna käytettiin 2 ml/m³ ja kontaktiaikana 60 minuuttia. F 268 Airol S:n kanssa noudatettiin valmistajan mukaista 2 tunnin kontaktiaikaa, jonka jälkeen tila vaatii huolellisen tuuletuksen. Bioindikaattorit kerättiin yksitellen Minigrip-pusseihin ja toimitettiin

analysoitavaksi mikrobiologian laboratorioon. Neljälle indikaattorille tehtiin itiötason määrittäminen ja kymmenelle muulle steriilystesti laborantin toimesta.

Noco testaus mikrobiologian laboratoriossa suoritettiin toimistotilassa, laboratoriotilassa, D-luokan henkilösulussa sekä WC tilassa. Testauksessa otettiin näytteitä ennen ja jälkeen desinfiointia, jonka vuoksi käsiteltäviksi tiloiksi valittiin laboratorion tilat testaukseen puhtaiden C-luokan puhdistilojen sijaan. Ennen desinfiointia otetuissa näytteissä tuli olla kasvua, jotta ero oli mahdollista havaita, mutta pesäkkeiden oli oltava myös laskettavissa. Liitteestä 1 löytyvät kaikki yksittäiset tilakohtaiset ennen ja jälkeen tulokset jokaisesta näytepisteestä.

Käytettyjä näytetyyppejä olivat pintanäytteet kontaktimalja- ja sivelymenetelmällä sekä aktiiviset ilmanäytteet. Inkubointi suoritettiin kaksivaiheisesti, aluksi lämpötilassa 20–25 °C 5–7 vuorokautta, jonka jälkeen maljat siirrettiin 30–35 °C lämpötilaan 3–5 vuorokaudeksi. Tulosten analysointi pesäkelaskennalla. Käytettyjä menetelmiä on kuvattu tarkemmin kappaleessa 4.

Yhdessä D-luokan sumutuksessa otettiin testaukseen mukaan neljä bioindikaattoria. Käsittely tehtiin annostuksella 6 ml/m³ ja sijoitettiin indikaattorit eri puolille tilaa. Kolmelle indikaattoreista suoritettiin steriilystesti ja yhdestä tehtiin itiötasonmäärittäminen. Itiötasonmäärittämisessä tehtiin yhteensä kuusi maljaa, kolmella eri laimennoksella, joista kaikista kaksi rinnakkaista. Inkubointi 55–60 °C 48 tuntia. Vain yhdestä laimennoksesta saatiin laskettavia tuloksia, muissa pesäkkeiden määrä oli liian suuri. Steriilystestauksessa inkubointi suoritettiin myös 55–60 °C. Kaikissa putkissa oli kasvua jo ensimmäisen vuorokauden jälkeen.

6.2 MoonBeam™3

MoonBeam on siivouksen jälkeen käytettävä UVC-säteilyyn perustuva pintojen desinfiointimenetelmä. Laitteessa on kolme käsin pysty- ja vaakasuoraan säädettävissä olevaa desinfiointivartta. Lamput kykenevät desinfioimaan maksimissaan etäisyydeltä 3,3 m ja leveydeltä 2,1 m olevan alueen. Laitteen suojakansi toimii ohjausyksikkönä, josta ohjelma voidaan käynnistää ja tarvittaessa pysäyttää. Sekä laite itse että kansi tunnistaa liikettä ja pysäyttää desinfiointin automaattisesti, mikäli käsiteltävän tilan ovi avataan, laitetta tai suojakantta liikutetaan. Laite tarjoaa neljä eri desinfiointiaikaa 90, 180, 300 ja 600 sekuntia. Nopea ja helppokäyttöinen desinfiointimenetelmä voisi olla hyödyksi arkipäiväisessä työskentelyssä pintojen ja materiaalien mikrobiologisen laadun ylläpitämisessä.

6.2.1 MoonBeam testaus

MoonBeam testaus suoritettiin mikrobiologisen laboratorion toimistotilassa ja kahdessa eri WC tilassa käsittelemällä soveltuvia kohteita eri desinfiointiajoilla. Kohteiksi valittiin vertailtavat kohteet, jotka koostuivat neljästä työpöydästä, työtuolista, laatikostosta, näppäimistöstä, lattiasta, hiirestä, tietokoneen näytöstä, WC-istuimen kannesta, WC-paperitelineestä sekä WC tilan lattiasta. Kaikki näytepisteet ja käsittelyajat löytyvät liitteestä 2. UVC desinfioi ainoastaan pintoja, joten testauksessa kerättiin pelkästään pintanäytteitä. Suurin osa näytteistä otettiin kontaktimaljoille painamalla elatusaineen pintaa suoraan näytepisteeseen. Hankalammat ja epätasaisemmat näytepinnat eli näppäimistöt, hiiret ja tietokoneen näyttö siveltiin ensin 0,9 % NaCl-liuokseen kostutetulla steriilillä vanupuikolla ja näytepuikolla elatusaineen pintaan. Maljoja inkuboitiiin kaksivaiheisesti, eli ensin lämpötilassa 20–25 °C 5–7 vuorokautta, jonka jälkeen 3–5 vuorokautta 30–35 °C lämpötilassa.

7 Tulokset

Noco testauksen tulokset esitetty taulukossa 4 ennen ja jälkeen näytteiden pesäkemäärien erotuksena. Maljoja eri näytepisteistä, eri annostuksilla oli yhteensä 50. Osassa oli ristiriitaisia tuloksia eli pesäkemäärä oli käsittelyn jälkeisessä näytteessä suurempi kuin ennen desinfiointia otetussa näytteessä. Nämä negatiiviset pesäkemäärien vähenemät esitetty taulukossa 4 punaisella. Näytteenoton aikana tai tilassa ennen näytteenottoa oli tapahtunut kontaminaatio. Syynä on todennäköisesti ollut vähäinen kokemus näytteenotosta. Alipaineiseen laboratoriotilaan on myös voinut oven avauksen yhteydessä likaisen ilman mukana siirtyä kontaminanteja desinfioituun tilaan. Samaisessa tilassa erään testauksen yhteydessä oli käynyt henkilö ennen käsittelyn jälkeisen näytteenottoa, jolloin ulkoa tullut ilma tai henkilö on saattanut toimia kontaminaation lähteenä. Yksittäiset näytepistekohtaiset tulokset taulukoituna liitteessä 1.

Taulukko 4. Noco käsittelyn vaikutus pesäkemäärään, ennen_{cfu} – jälkeen_{cfu}

| Annos | Aika | Keskiarvo | Keskihajonta | Min | Max | CV% | Vähennmä % ka | Maljoja (kpl) | Kasvavia % |
|------------------------|-----------|-----------|--------------|-----------|------------|-------|------------------|------------------|---------------|
| 1 ml/m ³ | 30 min | 11 CFU | 21 CFU | -8 CFU | 85 CFU | 182,5 | 20 % | 24 | 50 % |
| 2 ml/m ³ | 30 min | 4 CFU | 6 CFU | 0 CFU | 15 CFU | 159,1 | 92 % | 4 | 25 % |
| 3 ml/m ³ | 30 min | 14 CFU | 19 CFU | -3 CFU | 49 CFU | 132,0 | 67 % | 9 | 78 % |
| 3 ml/m ³ | 60 min | 43 CFU | 87 CFU | 0 CFU | 217 CFU | 200,0 | 100 % | 5 | 0 % |
| 6 ml/m ³ | 60 min | 3 CFU | 4 CFU | -2 CFU | 10 CFU | 135,2 | 66 % | 8 | 38 % |

Desinfiointiprosessien tehoa arvioidessa määritetään menetelmällä saavutettu logaritminen alenema. Nocolyse on laajalti testattu, muun muassa bakterisidinen ja fungisidinen vaikutus todennettu standardin EN 13697 mukaisesti, joka vaatii vähintään 4 log alenemaa bakteereihin ja 3 log alenemaa hiivoille ja homeille. Desinfiointiaineen itiövaikutteisuus on testattu *Bacillus subtilis*, *Clastridium sporogenes* ja/tai *Bacillus cereus* organismeilla standardin EN 13704 mukaisesti, jonka vaatimuksena on vähintään 3 logaritmin alenema. (KiiltoClean Oy n.d.)

Taulukko 5. Noco käsittelyllä saavutettu log alenema laskettuna kaikkien annos ja käsittelyajan mukaisten näytteiden summien avulla

| Annos | Aika | Ennen summa | Jälkeen summa | Log alenema | Log alenema % |
|---------------------|-------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| 1 ml/m ³ | 30 min | 361 cfu | 90 cfu | 0,6033 | 75,069 % |
| 2 ml/m ³ | 30 min | 19 cfu | 3 cfu | 0,8016 | 84,211 % |
| 3 ml/m ³ | 30 min | 209 cfu | 82 cfu | 0,4063 | 60,766 % |
| 3 ml/m ³ | 60 min | 217 cfu | 0 cfu | > xx | 100,00 % |
| 6 ml/m ³ | 60 min | 50 cfu | 25 cfu | 0,301 | 50,00 % |

Laskemisessa käytetty kaavoja 4 ja 5. Tässä annoskohtaiset pesäkemäärät laskettu yhteen eli alkuperäisenä CFU:na on ennen näytteiden pesäkkeiden summa ja lopullisena jälkeen näytteiden summa.

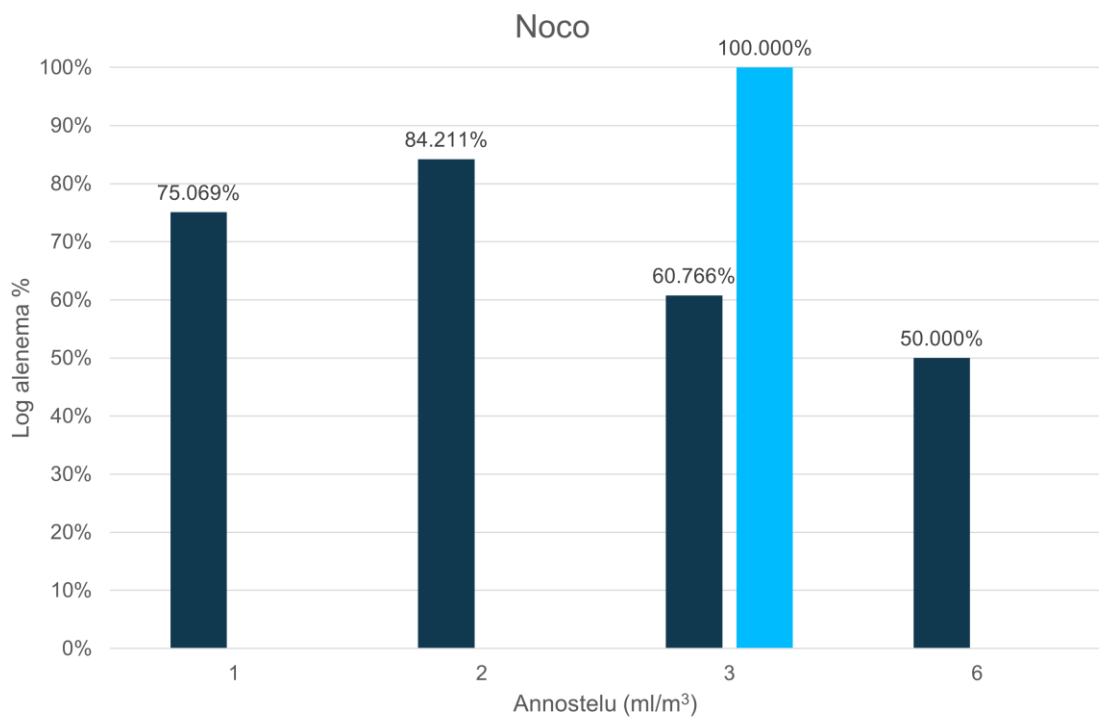
$$\log \text{alenema} = \log_{10} \left(\frac{\text{alkuperäinen CFU}}{\text{lopullinen CFU}} \right)$$

Kaava 4. Log alenema (Trzepiński, P. 2023)

$$\% \log \text{alenema} = 100 \cdot \frac{\text{alkuperäinen CFU} - \text{lopullinen CFU}}{\text{lopullinen CFU}}$$

Kaava 5. Prosentuaalinen log alenema (Trzepiński, P. 2023)

Vaatimukset saavutettavalle log alenemalle vaihtelevat sovelluksesta riippuen. Esimerkiksi lääketeollisuudessa vähimmäisvaatimus ilmaitse tehtävälle kemialliselle desinfiointille on 5 log alenema bakteereille ja 4 log sienille (SFS-EN 17272 2020, 46). Pintadesinfiointimenetelmille ilman mekaanista vaikutusta vaatimus on bakteereille 4 log ja sienille 3 log (SFS-EN 13697 2015, 6). Tällä testauksella Noco käsittelyllä ei saavutettu 1 log alenemaa muulla kuin 3 ml/m³ annoksella ja 60 minuutin kontaktiajalla, jota kuviossa 2 esittää vaaleansininen pylväs.



Kuvio 2. Noco desinfiointin prosentuaalinen log alenema

7.1 Bioindikaattoritestaus

Bioindikaattoritestauksen tulokset löytyvät taulukosta 6. Tehoa *Geobacillus stearothermophilus* itiöihin ei tällä tutkimuksella saatu osoitettua. Pienemmän laitteen rajoitteiden vuoksi annostuksena oli ainoastaan 2 ml/m³, joten tämä annos ei ainakaan kyseisiin itiöihin vaikuttanut. Kyseinen testaus oli osa erillistä työpyyntöä, jossa Noco verrattiin Airol S desinfiointiainetta käytettynä Minncare Dry Fog-laitteistossa. Tarkempia tuloksia ei sen vuoksi ole esitetty, mutta Minncare Airol S menetelmällä saavutettiin parempi tulos bioindikaattoritestauksessa.

Taulukko 6. Noco bioindikaattoritestauksen tulokset

| Analyysi | Bioindikaattoriliuska | Tulos |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| Steriiliystesti (+/-) | 1 | + |
| Steriiliystesti (+/-) | 2 | + |
| Steriiliystesti (+/-) | 3 | + |
| Positiivinen kontrolli | 4 | + |
| Itiötasonmääritys (CFU/liuska) | 5 | 1,6 · 10 ⁶ |

Annostuksella 6 ml/m³ tehoa ei myöskään havaittu. Steriiliytestauksessa jokaisessa putkessa oli kasvua jo 24 tunnin jälkeen, niin positiivikontrollissa kuin näyteputkissa. Puhdastilan tehokkaan ilmanvaihdon vuoksi vaadittua kontaktiaikaa ei välttämättä saavutettu, joka on voinut myös vaikuttaa tulokseen.

$$\frac{1578 + 1536}{2,0 \cdot 10^{-2}} = 155700 \approx 1,56 \cdot 10^6 \left(\frac{CFU}{liuska} \right)$$

Kaava 6. Itiötasonmäärityksen tuloksen laskenta

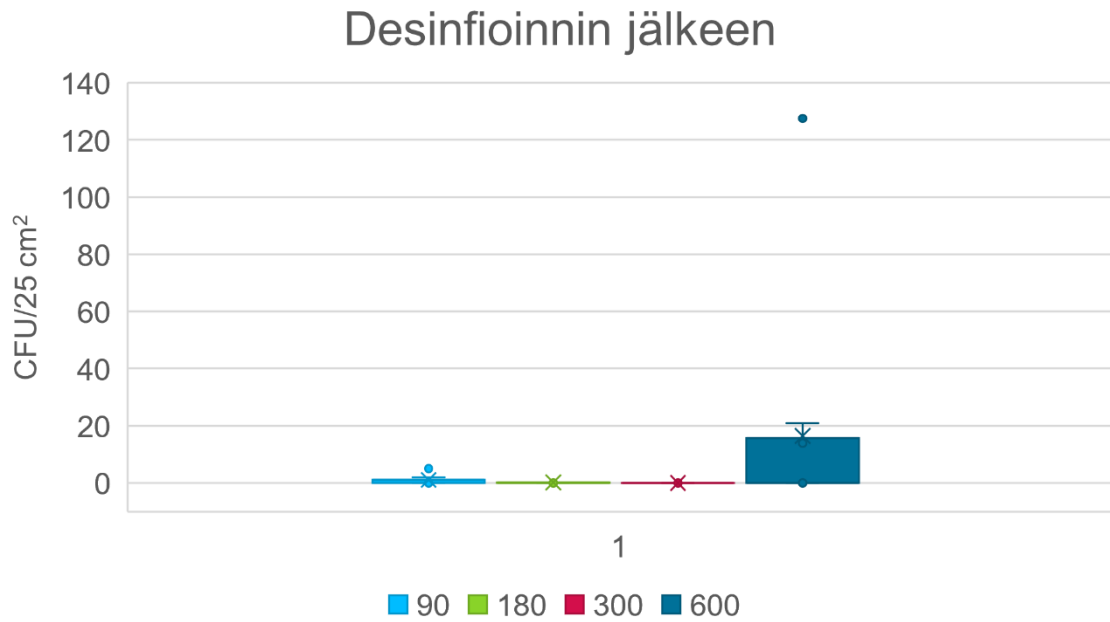
Itiötasonmäärityksessä ainoastaan suurimman laimennoksen maljat olivat laskettavissa. Ensimmäisestä maljasta laskettiin $\frac{1}{2}$ maljasta 789 CFU, josta kertomalla kahdella saatiin koko maljan arvioksi 1 578 CFU. Toisesta maljasta laskettiin $\frac{1}{4}$, josta saatiin 384 CFU ja kertomalla neljällä 1536 CFU. Alla olevalla kaavalla saatiin itiötasoksi noin $1,6 \cdot 10^6$ CFU/liuska eli taso ei juurikaan laskenut. Alkuperäinen itiötaso oli $2,0 \cdot 10^6$ CFU/liuska.

MoonBeam näytepisteiden ja eri käsittelyaikojen toistojen määrät suunniteltiin niin, että saataisiin luotettavampia tuloksia, joista voi suuremmalla varmuudella tehdä johtopäätöksiä menetelmän tehosta.

Taulukko 7. MoonBeam käsittelyn vaikutus pesäkemäärään, ennen_{cfu} – jälkeen_{cfu}

| Aika | Keskiarvo | Keskihajonta | Min | Max | CV% | Vähennä % ka | Maljoja (kpl) | Kasvavia % |
|-------|-----------|--------------|-------|---------|-------|--------------|---------------|------------|
| 90 s | 15 CFU | 17 CFU | 0 CFU | 41 CFU | 109,4 | 88 % | 10 | 60 % |
| 180 s | 10 CFU | 12 CFU | 0 CFU | 36 CFU | 118,1 | 93 % | 6 | 17 % |
| 300 s | 5 CFU | 3 CFU | 0 CFU | 9 CFU | 60,6 | 100 % | 6 | 0 % |
| 600 s | 27 CFU | 36 CFU | 1 CFU | 117 CFU | 131,1 | 87 % | 10 | 40 % |

Noco osuuteen verrattuna tulokset olivat parempia, ristiriitaisia tuloksia ei ollut lainkaan ja ennen näytteenä 0-maljoja oli huomattavasti vähemmän, jolloin laskettavia tuloksia oli enemmän. Parhaimmat tulokset saavutettiin 5 minuutin ohjelmalla, jolla kuudesta näytepisteestä viidessä saavutettiin 100 % alenema ja yksi näytteistä oli jo lähtötilanteessa 0 CFU/25 cm². Hyvät tulokset saavutettiin myös 3 minuutin ohjelmalla. Boscon ym. 2022 tekemässä tutkimuksessa eri valmistajan UVC-desinfiointiyksiköllä ei huomattu eroa 3 minuutin ja 5 minuutin ohjelmien välillä. Lyhyemmällä käsittelyllä voidaan siis todennäköisesti saavuttaa yhtä hyvä desinfiointitulos ja säästää aikaa.



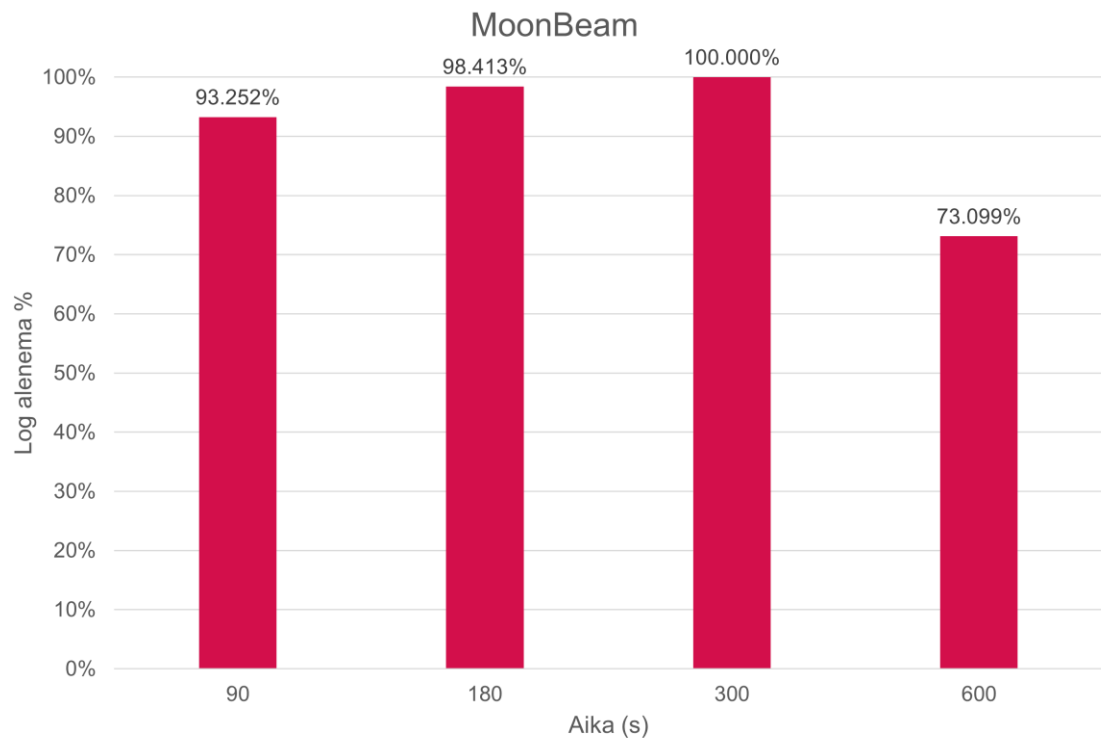
Kuvio 3. MoonBeam tulosten jakauma

Jakauma käsittelyn jälkeisten tulosten välillä on vähäistä. Yleisesti ottaen testauksessa saadut pesäkemäärät ovat pieniä, joka ei ole optimaalista. Eniten vaihtelua oli 10 minuutin ohjelmalla saaduissa tuloksissa, jossa huomattavasti poikkeava arvo näkyy laatikko-janakuviossa erillisenä pisteenä. Poikkeava tulos saatiin materiaaliltaan nahkaa muistuttavasta työtuolista, jonka pinta oli hieman kupera.

Taulukko 8. MoonBeam käsittelyllä saavutettu log alenema

| Aika | Ennen | Jälkeen | Log alenema | Log alenema % |
|-------|---------|---------|-------------|---------------|
| 90 s | 163 cfu | 11 cfu | 1,1708 | 93,252 % |
| 180 s | 63 cfu | 1 cfu | 1,7993 | 98,413 % |
| 300 s | 31 cfu | 0 cfu | > xx | 100,00 % |
| 600 s | 612 cfu | 165 cfu | 0,5702 | 73,099 % |

MoonBeamilla saavutettiin Nocolyseen verrattuna parempi log alenema kaikilla käsittelyajoilla paitsi 10 minuutin ohjelmalla. Valmistajan tarjoaman testidatan perusteella laitteella on saavutettu vaikeastikin tuhottavilla *C. difficile* itiöillä 3 logaritmin eli 99,9 % alenema 3 minuutin käsittelyllä 4 jalan (~1,2 metrin) etäisyydeltä (Diversey Inc. 2019).



Kuvio 4. MoonBeam desinfioinnin prosentuaalinen log alenema

Saatujen tulosten perusteella ja aiemman tutkimustiedon (Bosco ym. 2022) mukaan todennäköisesti jo 3 minuutin käsittelyllä saavutetaan riittävä desinfiointiteho yksittäisillä pinnoilla.

8 Loppupäätelmät

Kokeellisessa osuudessa Nocon testauksesta saatiin vaihtelevia tuloksia. Suunniteltu testaus ei antanut riittävästi laskettavia tuloksia eikä tulosten luotettavuutta voida taata. Suuntaa antavat tulokset näyttävät kuitenkin, että menetelmällä on potentiaalia. Varsinaisten tuotantotilojen desinfiointiin vaadittaisiin suurtehosumuttimesta huomattavasti suuremmille tilavuuksille tarkoitettu versio, NocoMax-laite.

Nocospray on aerosolista vetyperoksidia eli sumua tuottava laite, joka eroaa vetyperoksidihöyry- eli HPV-teknologiasta. Aerosoli on kaasun ja nestehiukkasten seos ja höyry kuumentamalla tuotettu kaasu, joka on lähellä nesteytymistä. Vetyperoksidisumutin on yksinkertainen ja edullisempi laite, mutta sillä ei saavuteta yhtä hyvää desinfiointitulosta kuin HPV-laitteistolla. Fun ym. (2012) tekemien tutkimusten mukaan sumutuksella vetyperoksidi ei jakaudu tilassa tasalaatuisesti, jolloin desinfiointiteho on huonompi. Sumutuslaitteisto kuten Nocospray sopii paremmin yksittäisten huoneiden käsittelyyn ja vaikutus 6-log itiötason biologisiin indikaattoreihin ei ole riittävä suuremallakaan annoksella. Useammalla Nocospray laitteella tai NocoMax laitteella saataisiin käytettäväksi useampi suutin ja mahdollisesti parempi tulos. Tarvittaisiin lisätutkimusta kontrolloidummassa ympäristössä, standardoidulla menetelmällä ja sammuttamalla ilmanvaihto käsiteltävästä tilasta. Tilaa ei oltu siivottu ennen käsittelyä, jonka vuoksi pinnoilla oleva lika ja mahdollinen biofilmi on saattanut estää desinfiointiainetta pääsemästä kontaktiin mikrobien kanssa.

HPV tekniikalla voitaisiin saavuttaa parempi mikrobisidinen teho, mutta huomattavasti korkeamman pitoisuuden omaavat vetyperoksidiliuokset herättävät omat huolensa kuten yhteensopivuus materiaalien kanssa, säilytykseen ja työturvallisuuteen liittyvät asiat. Vetyperoksidi voimakkaasti hapettavana aineena voi, erityisesti päästessään kontaktiin orgaanisten aineiden kanssa, aiheuttaa räjähdys- ja tulipalovaaran. Suurina pitoisuuksina altistuminen hengitysteiden, ruuansulatuskanavan, ihon ja silmien kautta on haitallista. Liuokset tulee säilyttää alkuperäispakkauksissa, hyvin ilmastoidussa

tilassa, erillään palavista aineista ja lämmönlähteistä, 4–25 °C lämpötilassa. Tuotetta käyttäessä huolehdittava asianmukaisista henkilösuojaimista, riittävästä ilmanvaihdosta, tiedotuksesta ja ohjeen mukaisesta käsittelystä. Tarpeen mukaan käsiteltävä tila eristetään teippaamalla ovet ja ikkunat. Ulkopuolisen tilan vetyperoksidipitoisuutta suositellaan seurattavan esimerkiksi kannettavalla kaasumittarilla altistumisen ehkäisemiseksi. Samoin varmistaa käsiteltävän tilan vetyperoksidipitoisuus ennen uudelleenkäyttöä. Turvallisuuden takaamiseksi pitoisuuden tulisi olla alle 1 ppm. (Fu ym. 2012)

Nykyiseen Minncare Dry Fog laitteistoon verrattuna, niin pienemmällä kuin isomalla Nocolla, säästettäisiin aikaa desinfiointiprosessissa. Noco käsittelyn vaikutusaika on maksimissaan yhden tunnin, kun taas toisella laitteistolla valmistajan suosittama kontaktiaika on kaksi tuntia. Noco käsittelyn jälkeen tilaa ei myöskään ole tarpeen tuulettaa, kunhan suositeltu kontaktiaika täyttyy. Noco menetelmän tehoa ei kuitenkaan tällä testauksella saatu osoitettua ja Minncare Dry Fog sekä Airol S kylmädesinfiointiaine vaikuttaa olevan tehokkaampi itiövaikutukseltaan. Tämän testauksen perusteella johtopäätöksiä tehosta ei voida tehdä, vaan tarvitaan lisätestausta kontrolloidummassa ympäristössä, jokaisella annostuksella useammalla määrällä toistoja, jotta saadaan vertailtavia ja luotettavampia tuloksia.

Molemmat menetelmät, Noco ja MoonBeam ovat niin sanottuja 'no-touch' laitteistoja. 'No-touch' desinfiointisysteemit ovat automatisoituja siinä mielessä, että ne eivät vaadi manuaalista työtä esimerkiksi siivoajalta ja vapauttavat operaattorin käsittelyn ajaksi muihin tehtäviin. Sen sijaan, että pinnat perinteisesti esimerkiksi pyyhittäisiin desinfiointiaineella henkilön toimesta, laite hoitaa tämän. Vapautuneen työajan lisäksi henkilöstön altistumista mahdollisesti haitallisille desinfiointiaineille voidaan välttää, tarvetta koulutukselle ei ole ja desinfiointin tulos on tasalaatuisempi (Otter ym. 2013).

MoonBeam testauksesta saatiin Nocoon verrattuna huomattavasti parempia tuloksia. Noco tulosten analysoinnissa nousseilta epäkohdilta pystyttiin välttymään paremmin ja suunnittelemaan MoonBeam osuuden toteutus paremmin. Näytteenotto sujui myös helpommin myöhemmässä vaiheessa,

jolloin mahdollisilta näytteenottovirheiltä pystyttiin välttymään todennäköisemmin.

UVC-desinfiointiyksikkö soveltuu kohde yrityksen käyttöön kemiallisen desinfektion rinnalla käytettäväksi nopeana ja helppokäyttöisenä menetelmänä pintojen mikrobiologisen laadun ylläpitämiseksi. Optimaalinen käsittelyaika, todennäköisesti 3 minuuttia, tulee vielä määrittää esimerkiksi laitekvalifioinnin yhteydessä. Desinfiointikäytäntö ja soveltuvat käyttökohteet tulee määrittää sekä tarkka ohjeistus laatia yrityksen sisäiseen käyttöön. Soveltuvat käyttökohteet voivat olla tuotanto- tai laboratoriotilojen primääripinnat erityisesti olosuhdevalvonnassa nousseiden ongelmatilanteiden kohdalla. Henkilöstön turvallisuudesta on myös huolehdittava. EU:n tieteellisen komitean 2017 antamassa kannanotossa on esitetty vaatimukset käytettävälle UVC-laitteelle ja työnantajalle sen käyttöönottoon liittyen. Vaatimuksiin kuuluvat muun muassa, että käsiteltävään tilaan mentäessä tai laitetta liikuttaessa laite sammuu automaattisesti ja että laitteen kanssa työskentelevät ovat saaneet asianmukaisen koulutuksen ja ohjeistuksen sekä tilanteen vaatiessa tarvittavat henkilösuojaimet. Raja-arvot sallittavalle määrälle UVC-säteilyä esitetään tarkemmin ISO-standardissa EN ISO 15858:2016.

Lähteet

- Bosco, R.; Cevenini, G.; Gambelli, S.; Nante, N. & Messina, G. 2022. Improvement and standardization of disinfection in hospital theatre with ultraviolet-C technology. *Journal of Hospital Infection*. Vol 128, 19–25.
- Breakwell, D.; MacDonald, B.; Woolverton, C.; Smith, K. & Robison, R. 2007. Colony Morphology Protocol. American Society for Microbiology.
- Diversey Inc. 2019. Laboratory Micro-Efficacy Test Data for MoonBeam™3.
- Duodecim n.d. Lääketieteen termit ja sanakirjat (Terveysportti).
- 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. Viitattu 3.1.2023.
https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/20220825_gmp-an1_en_0.pdf
- European Parliament & European Council 2012. Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Viitattu 7.2.2023.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/ALL/?uri=CELEX:32012R0528>
- Fimea n.d. Usein kysytyt kysymykset GMP-tarkastuksista. Viitattu 9.1.2023.
https://www.fimea.fi/valvonta/laaketehtaat_ja_tukkukaupat/toimiluvat/usein-kysytyt-kysymykset-gmp-tarkastuksista
- Friman, T. & Kivisalmi, V. 2015. Laboratorion välinehuolto. 1. painos. Saarijärvi: Saarijärven Offset.
- Fu, T.; Gent, P. & Kumar, V. 2012. Efficacy, efficiency and safety aspects of hydrogen peroxide vapour and aerosolized hydrogen peroxide room disinfection systems. *Journal of Hospital Infection*. Vol. 80, Issue 3, 199–205.
- Heikkinen, T.; Järvinen, A.; Meri, S.; Vapalahti, O. & Vuopio, J. 2020. Mikrobiologia [online]. Helsinki : Kustannus Oy Duodecim, 2022. Viitattu 17.2.2023. Saatavilla Internetissä (vaatii käyttäjätunnuksen):
www.oppiportti.fi/op/tunnus.

Kiilto Ammattihygienia 2017. Nocospray ja Nocomax – laitteet kuivahöyrydesinfektioon. Viitattu 3.1.2023.

<https://www.youtube.com/watch?v=Dhy-v9HO2ng>

KiiltoClean Oy n.d. Esitysmateriaali. OxyPharm kuivadesinfektio.

KiiltoClean Oy 2022a. Nocolyse Food, Tuote-esite. Viitattu 3.1.2023.

<https://pim.kiiltoclean.com/kiilto-pim-api/api/pdf/download/37360d3b-c299-4f0b-9910-38048999239d>

KiiltoClean Oy 2022b. Nocotest, Tuote-esite. Viitattu 3.1.2023.

<https://pim.kiiltoclean.com/kiilto-pim-api/api/pdf/download/fc2b4c22-273a-468c-9903-6cd29064de88>

Ma, B.; Burke-Bevis, S; Tiefel, L.; Rosen, J.; Feeney, B. & Linden, K. 2023. Reflection of UVC wavelengths from common materials during surface UV disinfection: Assessment of human UV exposure and ozone generation. Science of the Total Environment. Vol. 869.

Otter, J. A.; Yezli, S.; Perl, T. M.; Barbut, F. & French, G. L. 2013. The role of 'no-touch' automated room disinfection systems in infection prevention and control. Journal of Hospital Infection. Vol. 83, No 1, 1–13.

OXY'PHARM 2017. Nocospray 2, Käyttöohje. Viitattu 3.1.2023.

https://pim.kiiltoclean.com/media/download/9%252F4%252F6%252Fa%252F946abc38fd458879b931f9e8127e2ebf02797802_K_ytt_ohje_Nocospray_2_FI.pdf

OXY'PHARM 2018. Nocolyse Food, Käyttöturvallisuustiedote. Viitattu 3.1.2023.

<https://pim.kiiltoclean.com/ktt/https://kiiltoclean.sdsarea.com/gr/?cqr=YqZzqKeF&type=sds&lang=fi-FI>

Pastila, R. 2009. Ionisoimaton säteily – Ultravioletti- ja lasersäteily. Hämeenlinna: Säteilyturvakeskus. Viitattu 5.3.2023.

<https://www.stuk.fi/documents/12547/494524/ultravioletti-ja-lasersateily-kirjaluku-6.pdf/3cd34067-ca10-4ce2-b1d7-0304c11caf62>

Sandle, T. 2011. A Review of Cleanroom Microflora: Types, Trends, and Patterns. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. Vol. 65, Issue 1, 392–403.

Sandle, T. & Saghee, M. R. 2017. Cleanroom Management in Pharmaceuticals and Healthcare. 2nd Edition. Passfield: Euromed Communications.

SFS-EN ISO 14644-1:2015. Osa 1: Hiukkaspitoisuuden perusteella tehtävä puhtausluokitus. Helsinki: International Organization for Standardization.

SFS-EN ISO 15858:2016. UV-C Devices. Safety information. Permissible human exposure. Helsinki: International Organization for Standardization.

SFS-EN ISO 11737-1:2018. Terveystuotteiden sterilointi. Mikrobiologiset menetelmät. Osa 1: Mikro-organismipopulaation määrittely tuotteissa. Helsinki: International Organization for Standardization.

SFS-EN 13704:2018. Kemiaaliset desinfektioaineet ja antiseptiset aineet. Elintarviketeollisuudessa, teollisuudessa, kotitalouksissa ja julkisissa tiloissa käytetty kvantitatiivinen pintatesti bakterisidisen ja fungisidisen tehon arvioimiseksi. Testimenetelmä (ilman mekaanista vaikutusta) ja vaatimukset (vaihe 2.2). Helsinki: International Organization for Standardization.

SFS-EN 13704:2018. Kemiaaliset desinfektioaineet. Elintarviketeollisuudessa, teollisuudessa, kotitalouksissa ja julkisissa tiloissa käytetty kvantitatiivinen suspensiotesti sporisidisen tehon arvioimiseksi. Testimenetelmä ja vaatimukset (vaihe 2/1). Helsinki: International Organization for Standardization.

SFS-EN 17141:2020. Puhdistilat ja puhtaat alueet. Biokontaminaation hallinta. Helsinki: Suomen Standardoimisliitto SFS ry.

Solunetti n.d. Mikrobit. Viitattu 17.2.2023.

<https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/mikrobit/>

Suomen Standardoimisliitto SFS 2020. SFS-EN 17272. 2020. Chemical disinfectants and antiseptics. Methods of airborne room disinfection by automated process. Determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal, fungicidal, yeasticidal, virucidal and phagocidal activities.

Talaro, K. P. & Chess, B. 2015. Foundations in Microbiology. 9. painos. New York: McGraw-Hill Education.

Trzepiński, P. 2023. Log Reduction Calculator (omnicalculator.com). Viitattu 24.2.2023.

Työterveyslaitos 2022. Onnettomuuden vaaraa aiheuttavat aineet – Vetyperoksidi. Viitattu 20.2.2023. <https://www.ttl.fi/ova/vetyperoksidi>

Whyte, W. 2010. Cleanroom technology. 2. painos. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

Wikipedia Commons 2016. Colony morphology of bacteria. Viitattu 1.2.2023 https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Colony_morphology.svg

Wikipedia Commons 2007. Simplified universal phylogenetic tree, made using information from the Interactive Tree of Life. Viitattu 15.2.2023. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simplified_tree.png

Taulukko 1 Nocolyse desinfiointin tulokset mikrobiologian laboratorion sisäisessä toimistotilassa.

| Näytepiste | ma 5.12.2022 (3 ml/m ³ 30 min) | | ke 7.12.2022 (1 ml/m ³ 30 min) | |
|--|---|--------------------------|---|---------|
| | Ennen | Jälkeen | Ennen | Jälkeen |
| Tuoli (CFU/25 cm ²) | 70 | 21 | 3 | 0 |
| Pöytä (CFU/25 cm ²) | 11 | 0 | 2 | 4 |
| Kaapin hylly (CFU/25 cm ²) | 18 | 13 | 0 | 0 |
| Lattia (CFU/25 cm ²) | 80 | 39 | 52 | 11 |
| Näppäimistö (CFU/25 cm ²) | Ei otettu ^(a) | Ei otettu ^(a) | 18 | 0 |
| Ilma (CFU/m ³) | 0 | Ei otettu ^(a) | 2 | 1 |

^(a) Maanantaina 5.12 ei otettu sivelynäytteitä eikä desinfiointin jälkeistä aktiivista ilmanäytettä.

Taulukko 2 Nocolyse desinfiointin tulokset D-puhtausluokan henkilösulussa.

| Näytepiste | ke 7.12.2022 (1 ml/m ³ 30 min) | | to 8.12.2022 (1 ml/ m ³ 30 min) | | pe 9.12.2022 (1 ml/m ³ 30 min) | | ti 13.12.2022 (6 ml/m ³ 60 min) | |
|---|--|---------|---|---------|--|---------|---|-----------|
| | Ennen | Jälkeen | Ennen | Jälkeen | Ennen | Jälkeen | Ennen | Jälkeen |
| Ovi C-tilaan (CFU/25 cm ²) | 6 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Ovi D-tilaan (CFU/25 cm ²) | 1 | 9 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| Seinä (CFU/25 cm ²) | 6 | 1 | 5 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Lattia (CFU/25 cm ²) | 52 | 0 | 41 | 13 | 46 | 31 | 27 | 17 |
| Ilma (CFU/m ³) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Ei otettu | Ei otettu |

Taulukko 3 Nocolyse desinfiointin tulokset laboratoriotilassa

| Näytepiste | to 8.12.2022 (3 ml/m ³ 30 min) | | pe 9.12.2022 (3 ml/m ³ 60 min) | | pe 6.1.2022 (6 ml/m ³ 60 min) | |
|---|--|------------------|--|---------|---|------------------|
| | Ennen | Jälkeen | Ennen | Jälkeen | Ennen | Jälkeen |
| Pöytä (CFU/25 cm²) | 0 | 3 ^(b) | 0 | 0 | 9 | 0 |
| Seinä (CFU/25 cm²) | 0 | 1 ^(b) | 0 | 0 | 3 | 0 |
| Ovi (CFU/25 cm²) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 ^(c) |
| Lattia (CFU/25 cm²) | 30 | 4 | 217 | 0 | 5 | 7 ^(c) |
| Ilma (CFU/m³) | 0 | 1 ^(b) | 0 | 0 | Ei otettu | Ei otettu |

^(b) Tilassa käynyt henkilö ennen desinfiointin jälkeistä näytteenottoa. Todennäköinen syy ristiriitaisiin tuloksiin.

^(c) Tilassa alipaine, joten tilaan mentäessä ulkopuolelta tullut ilma saattanut aiheuttaa kontaminaation.

Taulukko 4 Nocolyse desinfiointin tulokset sulkutilassa.

| Näytepiste | to 8.12.2022 (2 ml/m ³ 30 min) | |
|---------------------------------------|---|---------|
| | Ennen | Jälkeen |
| Seinä (CFU/25 cm²) | 0 | 0 |
| Ovi (CFU/25 cm²) | 1 | 0 |
| Lattia (CFU/25 cm²) | 18 | 3 |
| Ilma (CFU/m³) | 0 | 0 |

Taulukko 5 Nocolyse desinfioidin tulokset WC tilassa.

| Näytepiste | to 8.12.2022 (1 ml/m ³ 30 min) | |
|----------------------------------|---|---------|
| | Ennen | Jälkeen |
| Lattia (CFU/25 cm ²) | 10 | 2 |
| Seinä (CFU/25 cm ²) | 100 | 15 |
| Hana (CFU/25 cm ²) | 8 | 1 |

Taulukko 6 Nocolyse desinfioidin tulokset D-luokan henkilösulkussa (bioindikaattoritestausta *Geobacillus stearothermophilus*).

| Analyysi | Inkubointiaika | Liuska | ti 13.12.2022 (6 ml/m ³ 60 min) |
|-------------------------------|----------------|--------|---|
| Steriiliystesti (+/-) | 1 vrk | 1. | + |
| | | 2. | + |
| | | 3. | + |
| Positiivi kontrolli (+/-) | | 4. | + |
| Itiötason määrittäminen (CFU) | 2 vrk | 5. | 1,6 · 10 ⁶ CFU/liuska ^(d) |

^(d) Käsittelemättömien indikaattorien itiötaso 10⁶ CFU/liuska eli ei muutosta.

Taulukko 9 MoonBeam desinfiointi 90 sekunnin ohjelmalla.

| Pinta | Päivämäärä | Ennen (CFU/25 cm²) | Jälkeen (CFU/25 cm²) |
|------------------------|-------------------|--------------------------------------|--|
| Pöytä | 6.1.2023 | 16 | 0 |
| Tuoli | 6.1.2023 | 4 | 0 |
| Laatikosto | 6.1.2023 | 38 | 1 |
| Näppäimistö | 9.1.2023 | 0 | 0 |
| Näyttö | 9.1.2023 | 1 | 0 |
| Lattia | 6.1.2023 | 46 | 5 |
| Lattia (pelkkä) | 6.1.2023 | 42 | 1 |
| WC-istuin | 6.1.2023 | 4 | 1 |
| WC-paperiteline | 6.1.2023 | 2 | 1 |
| WC lattia | 6.1.2023 | 10 | 2 |

Taulukko 10 MoonBeam desinfiointi 180 sekunnin ohjelmalla.

| Pinta | Päivämäärä | Ennen (CFU/25 cm²) | Jälkeen (CFU/25 cm²) |
|------------------------|-------------------|--------------------------------------|--|
| Pöytä | 6.1.2023 | 0 | 0 |
| Tuoli | 6.1.2023 | 13 | 0 |
| Laatikosto | 6.1.2023 | 7 | 0 |
| Näppäimistö | 6.1.2023 | 4 | 0 |
| Lattia | 6.1.2023 | 36 | 0 |
| Lattia (pelkkä) | 6.1.2023 | 3 | 1 |

Taulukko 11 MoonBeam desinfiointi 300 sekunnin ohjelmalla.

| Pinta | Päivämäärä | Ennen (CFU/25 cm²) | Jälkeen (CFU/25 cm²) |
|------------------------|-------------------|--------------------------------------|--|
| Pöytä | 6.1.2023 | 8 | 0 |
| Tuoli | 6.1.2023 | 9 | 0 |
| Laatikosto | 6.1.2023 | 7 | 0 |
| Näppäimistö | 6.1.2023 | 0 | 0 |
| Lattia | 6.1.2023 | 4 | 0 |
| Lattia (pelkkä) | 6.1.2023 | 3 | 0 |

Taulukko 12 MoonBeam desinfiointi 600 sekunnin ohjelmalla.

| Pinta | Päivämäärä | Ennen (CFU/25 cm²) | Jälkeen (CFU/25 cm²) |
|------------------------|-------------------|---|--|
| Pöytä | 6.1.2023 | 9 | 0 |
| Tuoli | 6.1.2023 | 173 | 128 |
| Laatikosto | 6.1.2023 | Ei laskettavissa, leviävä pesäke ^(a) | 0 |
| Näppäimistö | 9.1.2023 | 4 | 0 |
| Hiiri | 9.1.2023 | 2 | 0 |
| Lattia | 6.1.2023 | 9 | 2 |
| Lattia (pelkkä) | 6.1.2023 | 1 | 0 |
| WC-istuin | 6.1.2023 | 13 | 0 |
| WC-paperiteline | 6.1.2023 | 131 | 14 |
| WC lattia | 6.1.2023 | 70 | 21 |

^(a) Koko maljan peittävä musta home.